تاثیر واکسن سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما گوندی بر سلول‌های T از نوع $CD8^+$ اختصاصی تومور

افشین آماری[۱]، سید علیرضا رضوی[۱]
آرزو جمالی[۲]، عباسعلی امینی سردرود[۳]
معصومه معتمدی[۴]، سعیده شجاعی[۵]
بیتا انصاری‌پور[۶]، آرش پورغلامی نژاد[۶]
جمشید حاجتی[۶*]

۱- گروه پاتوبیولوژی، بخش ایمونولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- گروه ایمونولوژی، دانشگاه‌علوم‌پزشکی مشهد
۴- دانشگاه علوم پزشکی لرستان
۵- گروه انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: صندوق پستی: ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی تلفن: ۶۶۴۱۹۵۳۶
email: hajatij@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۷/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های دندریتیک مهمترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن‌های توموری به سلول‌های $TCD8^+$ و $TCD4^+$ می‌باشند که باعث برانگیختن این سلول‌ها و ایجاد پاسخ اختصاصی ضد تومور می‌شوند. یکی از راه‌های ایجاد پاسخ مناسب ضد توموری افزایش کارایی سلول‌های دندریتیک در عرضه آنتی‌ژن و تحریک لنفوسیت‌های T می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی تاثیر سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما گوندی بر نفوذ سلول‌های $TCD8^+$ در بافت تومور و پاسخ سیتوتوکسیک آنها است. ***روش بررسی:*** سلول‌های مغز استخوان موش به‌مدت پنج روز در حضور GM-CSF و IL-4 کشت داده شدند. روز پنجم سلول‌های دندریتیک نابالغ حاصله با اجزاء پروتیینی یا عصاره کامل توکسوپلاسما گوندی و یا LPS به‌مدت دو روز کشت داده شد. برای القای تومور سلول WEHI-164 به‌صورت زیر جلدی به موش تزریق شد. برای ایمونوتراپی $۱۰^۶$ سلول دندریتیک بالغ شده با ترکیبات مختلف به موش‌ها تزریق شد. از روش فلوسایتومتری برای اندازه‌گیری میزان نفوذ سلول‌های $CD8^+$ استفاده شد و قدرت کشندگی لنفوسیت‌ها با روش LDH اندازه‌گیری گردید. ***یافته‌ها:*** استفاده از اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما برای بلوغ سلول‌های دندریتیک در مقایسه با سایر عوامل به‌طور معنی‌داری باعث افزایش نفوذ سلول‌های $CD8^+$ به بافت تومور و تقویت پاسخ‌های سیتوتوکسیک گردید. میزان بقای موش‌ها در این گروه از گروه‌های دیگر بیشتر بود ($p<۰/۰۰۰۱$). ***نتیجه‌گیری:*** ترکیبات میکروبی مانند اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما که پاسخ Th1 را سبب می‌شوند، می‌توانند باعث افزایش کارایی سلول دندریتیک در نفوذ سلول‌های $T\ CD8^+$ و افزایش پاسخ‌های سیتوتوکسیک شوند.

کلمات کلیدی: سلول $TCD8^+$، سلول دندریتیک، توکسوپلاسما گوندی.

مقدمه

مکانیسم اصلی ایمنی علیه تومورها از بین بردن سلول‌های توموری توسط لنفوسیت‌های $TCD8^+$ سیتوتوکسیک Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) می‌باشد. توانایی CTLها در از بین بردن سلول‌های توموری در شرایط In vivo در آزمایشات حیوانی و انسانی تایید شده است.[۱] مکانیسم عمل این سلول‌ها شامل شناسایی آنتی‌ژن‌ها، فعال شدن و از بین بردن سلول هدف است. آنتی‌ژن توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن شناسایی، برداشت و پردازش شده و به‌همراه کمپلکس سازگاری نسجی اصلی Major Histocompatibility Complex (MHC) کلاس یک به سلول‌های CTL عرضه می‌گردد. از طرف دیگر همین سلول‌های عرضه‌کننده از طریق عرضه آنتی‌ژن‌های توموری همراه با MHC کلاس دو موجب فعال شدن سلول‌های $TCD4^+$ کمکی Helper T lymphocyte (Th) و تمایز آنها به سلول‌های $TCD4^+$ کمکی نوع ۱ (TH1) می‌شوند که این سلول‌ها با ترشح انترفرون گاما Interferon-Gamma (IFN- γ) و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا Tumor Necrosis Factor (TNF-α) باعث بروز MHC کلاس یک بر سطح سلول‌های توموری و حساس شدن آنها به لیز توسط CTLها می‌شوند. مکانیسم اصلی لیز توسط این سلول‌ها انتشار پروتیین‌های سیتوتوکسیک مانند پرفورین perforin و گرآنزیم granzyme می‌باشد.[۵-۲] در ناحیه تومور فاکتورهای زیادی مانند فاکتور تغییر دهنده رشد بتا Tumor Growth factor β (TGF-β) وجود دارد که عملکرد این سلول‌ها را مختل می‌کنند. TGF-β در ناحیه تومور بیان ژن‌های سایتولیتیک در CTL مانند پرفورین، گرآنزیم A، گرآنزیم B، لیگاند Fas و IFN -γ را سرکوب می‌کند.[۶]

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cell (DC نقش مهمی در راه‌اندازی پاسخ ضد توموری از طریق برداشت و عرضه آنتی‌ژن توموری و فعال کردن سلول‌های $TCD4^+$ و $TCD8^+$ بکر و خاطره‌ای دارند.[۷] شرایط محیطی نامناسب در موضع تومور، علاوه بر ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های دندریتیک، ورود این سلول‌ها را هم به محل تومور مختل می‌سازد.[۸] موفقیت درایمونوتراپی نیازمند برطرف کردن نقص سلول‌های دندریتیک و ایجاد پاسخ Th1 و $TCD8^+$ است.[۷] با افزودن ترکیبات مختلف به محیط کشت DC از جمله اینترلوکین-۶ (IL-6) Interleukin-6، اینترلوکین-۱ (IL-1) Interleukin-1، TNF- α و فرآورده‌های میکروبی مختلف مانند لیپو پلی ساکارید (LPS) Lipopolysaccharide، DNA غیر متیله باکتری (CpG) CpG motif bacterial unmethylated و (PolyI:C) Polyinosinic:polycytidylic acid[۹-۱۱] و آنتی‌ژن‌های میکروب‌هایی از قبیل لیستریا و توکسوپلاسما می‌توان پاسخ DC را در برانگیختن سلول‌های TH1 و $TCD8^+$ تقویت کرد.[۱۲-۱۴] با توجه به تجربیات قبلی که استفاده از عصاره کامل توکسوپلاسما گوندی موجب تقویت عملکرد سلول‌های دندریتیک در ایمونوتراپی مدل تجربی تومور گردیده بود، در مطالعه حاضر با استفاده از جداسازی ترکیبات پروتیینی توکسوپلاسما، تاثیر این اجزاء بر عملکرد سلول‌های دندریتیک و واکسن حاصله در ایمونوتراپی مدل تجربی تومور و همچنین ارتشاح لنفوسیت‌های $T\ CD8^+$ به‌عنوان یکی از معیارهای اصلی موفقیت ایمونوتراپی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

در یک مطالعه مداخله‌ای (interventional) که به‌مدت یک‌سال طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ در گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت و گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفت از موش‌های Balb/c ماده شش تا هشت هفته استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌های WEHI-164 (فیبروسارکومای موش Balb/c) از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت این سلول‌ها از محیط RPMI 1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین، دو میلی‌مول ال- گلوتامین و ۱۰٪ سرم غیر فعال شده گوساله (Gibco, USA)، ۰/۱ درصد ۲- مرکاپتواتانول (Sigma, USA)، سدیم پیروات (Sigma) و اسیدآمینه غیر ضروری (Sigma) و در حضور ۲۰ng/ml، GM-CSF (Peprotech, USA) و ۱۰ng/ml، IL- 4 (Peprotech) در پیلت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد. روز سوم سلول‌های غیر چسبان جدا شده و پس از افزودن سایتوکاین، در پلیت‌های شش خانه‌ای کشت داده شد. در روز پنجم ۱۰۰ میکروگرم لیزات تومور به ازای 10^6 سلول به سلول‌ها اضافه و بعد از شش تا هشت ساعت، ۷۰ میکروگرم پروتیین توکسوپلاسما گوندی، ۷۰ میکروگرم عصاره کامل توکسوپلاسما گوندی و یک میکروگرم LPS به‌ازای 10^6 سلول به‌مدت دو روز به‌منظور بلوغ سلول‌های دندریتیک به سلول‌ها اضافه گردید.

گروه‌های واکسیناسیون: در این مطالعه از ۳۵ موش در پنج گروه

تهیه لیزات توموری: برای تهیه لیزات تومور تعداد 4×10^7 سلول WEHI-164 را شش تا هفت بار فریز و ذوب نموده و پس از سانتریفیوژ و تعیین میزان پروتیین مایع رویی به‌عنوان منبع آنتی‌ژن‌های توموری مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما گوندی: سویه توکسوپلاسما (RH) از گروه انگل‌شناسی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی توکسوپلاسما به داخل صفاق موش تزریق شد. سه یا چهار روز بعد از تزریق موش‌ها کشته شده و بعد از تزریق بافر فسفات به حفره صفاقی، محتویات صفاقی جمع‌آوری گردید. برای تهیه آنتی‌ژن، محتویات صفاق چند بار از سر سوزن ۲۷ عبور داده شد تا ماکروفاژها پاره گردیده و تاکی زوییت‌ها آزاد شوند. برای لیز کردن تاکی‌زوییت‌ها از سونیکاتور (چهار بار به‌مدت پنج دقیقه با قدرت پنج و سیکل ۵۰٪) استفاده شد. برای جداسازی اجزاء پروتئینی از کیت مخصوص (QIAGEN,37900,USA) استفاده شد.

تولید و بلوغ سلول‌های دندریتیک: برای تولید سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان استفاده شد.[۱۵] به‌طور خلاصه بعد از کشتن موش Balb/c استخوان ران و ساق جدا و با استفاده از محیط ناقص (RPMI بدون سرم) محتویات داخل استخوان‌ها خارج شد. گلبول‌های قرمز با آمونیوم کلراید (۰/۱۵M NH4Cl، ۱/۰mM KHCO3، ۰/۱mM EDTA) به‌مدت دو دقیقه در دمای اتاق لیز گردید. سلول‌ها با غلظت 10^6 در میلی‌لیتر در محیط RPMI 1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین، دو میلی‌مول ال- گلوتامین و ۱۰٪ سرم غیر فعال شده گوساله (Gibco, USA)، ۰/۱ درصد ۲- مرکاپتواتانول (Sigma, USA)، سدیم پیروات (Sigma) و اسیدآمینه غیر ضروری (Sigma) و در حضور ۲۰ng/ml، GM-CSF (Peprotech, USA) و ۱۰ng/ml، IL- 4 (Peprotech) در پیلت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد. روز سوم سلول‌های غیر چسبان جدا شده و پس از افزودن سایتوکاین، در پلیت‌های شش خانه‌ای کشت داده شد. در روز پنجم ۱۰۰ میکروگرم لیزات تومور به ازای 10^6 سلول به سلول‌ها اضافه و بعد از شش تا هشت ساعت، ۷۰ میکروگرم پروتیین توکسوپلاسما گوندی، ۷۰ میکروگرم عصاره کامل توکسوپلاسما گوندی و یک میکروگرم LPS به‌ازای 10^6 سلول به‌مدت دو روز به‌منظور بلوغ سلول‌های دندریتیک به سلول‌ها اضافه گردید.

گروه‌های واکسیناسیون: در این مطالعه از ۳۵ موش در پنج گروه

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده شد که هر گروه شامل هفت سر موش Balb/c بود. گروه اول موش‌های دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک مواجه شده با اجزاء پروتیینی توکسو پلاسما گوندی، گروه دوم موش‌های دریافت‌کننده سلول‌های‌دندریتیک مواجه‌شده با عصاره‌کامل توکسو پلاسما گوندی، گروه سوم موش‌های دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک مواجه شده با LPS، گروه چهارم موش‌های دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک نابالغ و گروه پنجم موش‌های دریافت‌کننده بافر فسفات بودند.

ایجاد تومور و ایمونوتراپی با استفاده از سلول‌های دندریتیک: برای ایجاد تومور تعداد $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول WEHI-164 در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به‌صورت زیر جلدی به پهلوی راست موش تزریق شد. در روز نهم پس از تزریق سلول‌های توموری، وقتی که تومورها قابل لمس شدند، تعداد $۱۰^{۶}$ سلول دندریتیک مواجه شده با اجزاء پروتیینی توکسو پلاسما گوندی، عصاره کامل توکسوپلاسما گوندی، LPS و لیزات تومور به ناحیه اطراف تومور تزریق شد. برای گروه کنترل بافر فسفات به ناحیه اطراف تومور تزریق گردید.

جداسازی لنفوسیت‌ها از تومور: بافت تومور به‌دست آمده را با PBS شستشو داده شد و در محیط کشت با اسکالپل به‌خوبی خرد گردید. قطعات بافتی به‌دست آمده از مرحله تجزیه مکانیکی در محیط حاوی آنزیم کلاژناز نوع چهار در دمای ۳۷^{oC} و 5CO2٪ در انکوباتور انکوبه شد. سپس سوسپانسیون سلولی حاصل از توری استریل با قطر منفذ ۴۰ میکرومتر عبور داده شد. سلول‌های جمع‌آوری شده و با استفاده از فایکول، سلول‌های تک هسته‌ای جدا شدند.

بررسی میزان نفوذ سلول‌های $CD8^{+}$ در بافت تومور: برای بررسی میزان نفوذ سلول‌های $CD8^{+}$ در ناحیه تومور از آنتی‌بادی CD8 FITC (BD Pharmingen, USA) استفاده شد. سلول‌های جدا شده از بافت تومور به‌مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و سرما در مجاورت آنتی‌بادی منوکلونال ضد مولکول CD8 قرار گرفتند. سپس قرائت نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام پذیرفت (Partech, Germany) و با نرم‌افزار WinMDI-2.7 مورد تحلیل و تجزیه قرار گرفت.

بررسی تاثیر اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما گوندی بر قدرت کشندگی لنفوسیت‌ها: برای ارزیابی قدرت کشندگی لنفوسیت‌ها، سلول‌های طحالی جدا شده از موش‌های درمان شده با سلول‌های دندریتیک بالغ شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما گوندی، بدون درمان (بافر فسفات تزریق شده)، عصاره کامل توکسوپلاسما، سلول‌های دندریتیک نابالغ، LPS با رده سلولی توموری کشت توام داده شد. به‌منظور بررسی اختصاصی بودن قدرت کشندگی سلول‌های توموری، آزمایش با رده سلولی نامرتبط (CT-26) نیز انجام شد. درصد لیز سلول‌های توموری با استفاده از روش LDH (Roche, 12920800, Germany) ارزیابی شد. به‌طور خلاصه پس از مجاورت سلول‌های طحالی و سلول‌های هدف به‌مدت شش ساعت میزان آزاد شدن LDH به‌عنوان معیاری برای تخریب سلول‌های هدف ارزیابی شد.

بررسی اثر ایمونوتراپی بر رشد تومور و بقای حیوانات مبتلا به تومور: اندازه‌گیری رشد تومور به‌صورت یک روز در میان با استفاده از کولیس دیجیتال انجام پذیرفته و حاصلضرب قطر کوچک در قطر بزرگ به‌عنوان مساحت تومور تعیین گردید. برای ارزیابی مدت بقا موش‌ها در گروه‌های مختلف، رسیدن قطر تومور به ۴۰۰ میلی‌متر مربع به‌عنوان زمان پایان آزمایش در نظر گرفته شد و در این زمان حیوان معدوم گردید. رشد تومور در گروه‌های مختلف به‌مدت دو هفته پس از اینکه در گروه کنترل همه حیوانات مورد مطالعه به نقطه پایان آزمایش رسیده بودند، ثبت گردید.

مشخصات ابزار جمع آوری اطلاعات و نحوه جمع‌آوری آن:

فلوسایتومتر: به‌منظور بررسی میزان نفوذ سلول‌های $TCD8^{+}$ در ناحیه تومور

الایزا ریدر: به‌منظور بررسی آزاد شدن LDH

کولیس دیجیتال: جهت ثبت قطر تومور

روش محاسبه حجم نمونه و تعداد آن: براساس مقالات مطالعه شده در هر گروه هفت عدد موش استفاده شده است.

ملاحظات اخلاقی: اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق پروتکل معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران رعایت شده است.

روش آماری: One-Way ANOVA برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها و Kaplan-meier برای بررسی بقای موش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۲ انجام و سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ انتخاب شد.

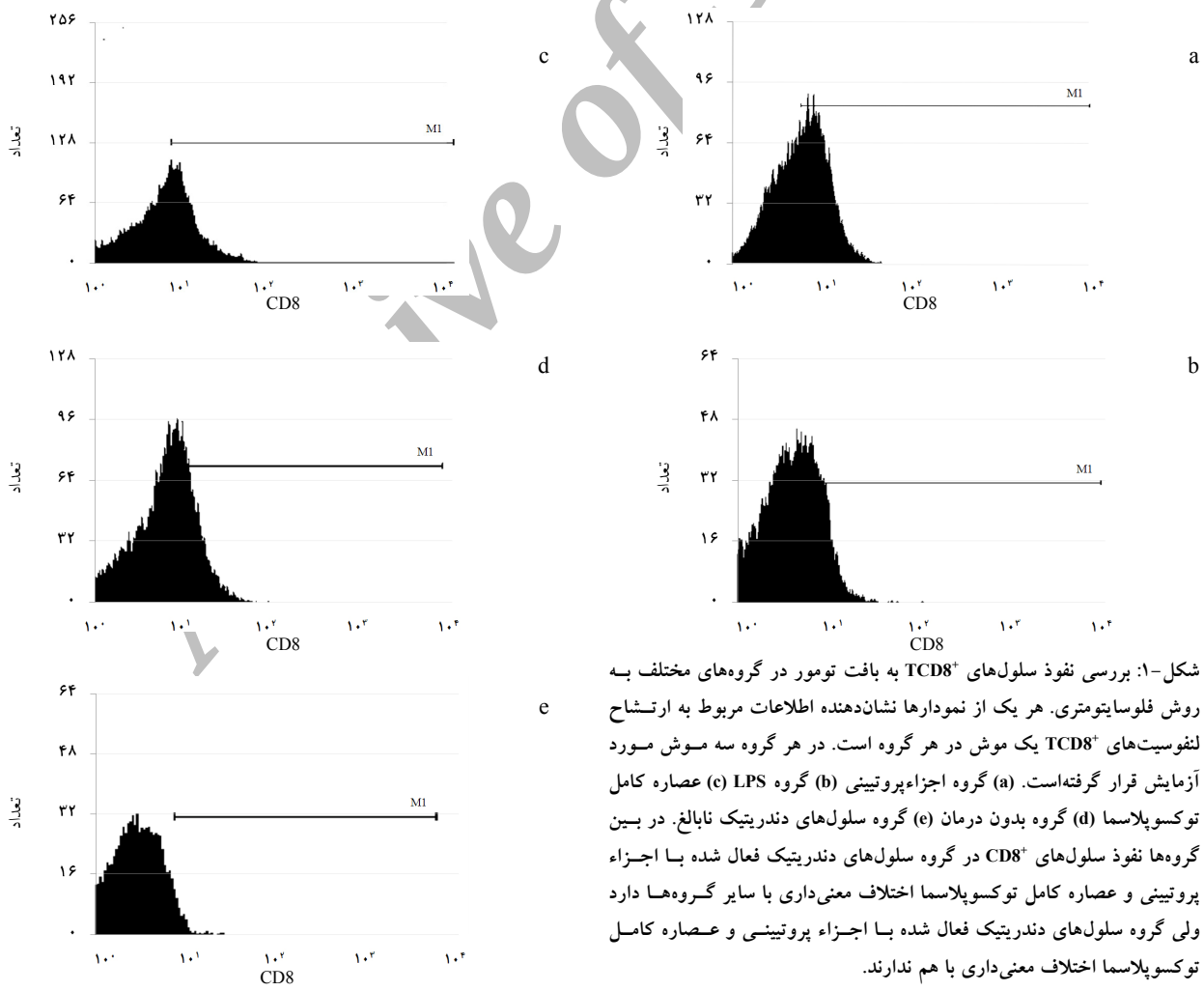
یافته‌ها

میزان نفوذ سلولی +CD8 در ناحیه تومور: ۲۱ روز بعد از ایجاد تومور از هر گروه دو تا سه موش به‌طور تصادفی انتخاب شد. بعد از کشتن موش‌ها و جدا سازی بافت تومور و هضم آنزیمی و جداسازی سلول‌ها از بافت تومور، سلول‌های به‌دست آمده با آنتی‌بادی ضد CD8

Archive of SID
www.SID.ir

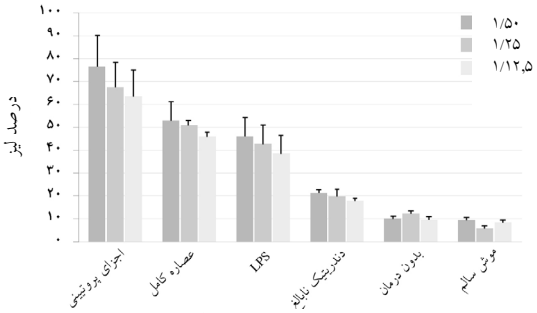
رنگ‌آمیزی شد. بالاترین میزان نفوذ سلول‌های CD8 مربوط به گروه ایمونوتراپی با سلول‌های دندریتیک بالغ شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما با میانگین ۲/۵۱±۴۹/۳۳ درصد و کمترین میزان نفوذ مربوط به گروه سلول‌های دندریتیک نابالغ با میانگین ۰/۹۰±۷۵/۴ درصد می‌باشد. در گروه ایمونوتراپی با سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما به‌طور معنی‌داری نفوذ سلول‌های CD8 به ناحیه تومور نسبت به گروه سلول‌های دندریتیک مجاور شده با LPS، سلول‌های دندریتیک نابالغ و گروه بدون درمان افزایش یافته است ($p<0/0001$) ولی با گروه سلول‌های دندریتیک فعال شده با عصاره کامل توکسوپلاسما تفاوت معنی‌داری ندارد ($p<0/857$). در بین گروه‌های دیگر همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است به‌ترتیب، گروه‌های عصاره کامل توکسوپلاسما، LPS و سلول‌های دندریتیک نابالغ از لحاظ ارتشاح لنفوسیت‌های TCD8 عملکرد بهتری داشته‌اند.

تاثیر واکسن سلول دندریتیک بر قدرت کشندگی لنفوسیت‌ها: بر اساس نتایج به‌دست آمده، همان‌گونه که در شکل ۲ مشخص گردیده است، در گروه ایمونوتراپی با سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما درصد سایتوتوکسیسیتی لنفوسیت‌ها با $p<0/0001$ در بالاترین حد قرار دارد (۷۶/۳۳٪) و کمترین میزان سایتوتوکسیسیتی مربوط به گروه بدون تومور (۹٪) و بدون درمان (۱۰٪) می‌باشد. در بین سایر گروه‌ها، گروه عصاره کامل توکسو-پلاسما، LPS و سلول‌های نابالغ به‌ترتیب از لحاظ میزان سایتوتو-کسیسیتی بیشترین تاثیر را اعمال نموده‌اند. میزان سایتوتوکسیسیتی در برابر سلول‌های توموری غیر مرتبط (رده CT-26) در تمام گروه‌ها کمتر از ۱۳٪ (مشابه گروه سالم) بوده است که نشان دهنده اختصاصی بودن قدرت کشندگی لنفوسیت‌ها برای سلول‌های توموری ایجاد شده می‌باشد که در شکل نشان داده نشده است.

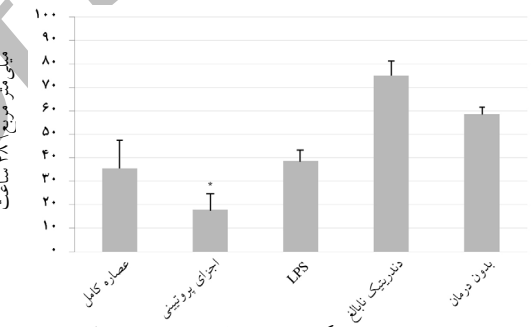


شکل-۱: بررسی نفوذ سلول‌های $TCD8^+$ به بافت تومور در گروه‌های مختلف به روش فلوسایتومتری. هر یک از نمودارها نشان‌دهنده اطلاعات مربوط به ارتشاح لنفوسیت‌های $TCD8^+$ یک موش در هر گروه است. در هر گروه سه موش مورد آزمایش قرار گرفته‌است. (a) گروه اجزاءپروتیینی (b) گروه LPS (c) عصاره کامل توکسوپلاسما (d) گروه بدون درمان (e) گروه سلول‌های دندریتیک نابالغ. در بین گروه‌ها نفوذ سلول‌های $CD8^+$ در گروه سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی و عصاره کامل توکسوپلاسما اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها دارد ولی گروه سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی و عصاره کامل توکسوپلاسما اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Archive of SID
www.SID.ir

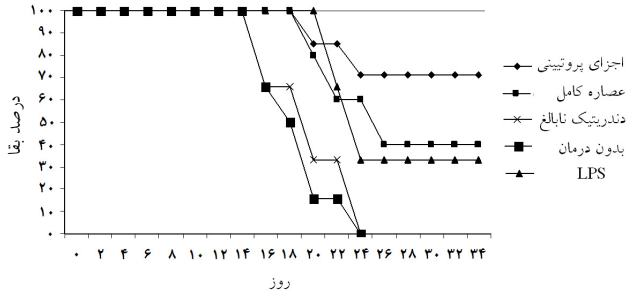


شکل-۲: درصد سایتوتوکسیسیتی سلول‌های طحالی موش‌های ایمونوتراپی شده با سلول‌های دندریتیک فعال شده با ترکیبات مختلف و گروه‌های کنترل در برابر سلول‌های توموری (WEHI-164) در نسبت‌های مختلف (۱/۱۲,۵، ۱/۲۵، ۱/۵۰)، سلول سایتوتوکسیک به‌هدف (Effector : Target) با استفاده از روش LDH ارزیابی شد. در بین گروه‌ها، سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی بیشترین درصد سایتوتوکسیسیتی را با گروه‌های دیگر دارد (p<۰/۰۰۰۱) و کمترین مقدار مربوط به موش‌های سالم، بدون درمان و موش‌های دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک نابالغ می‌باشد.



شکل-۳: سرعت رشد تومور در گروه‌های مختلف. قطر تومور یک روز در میان کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شده و میانگین تفاوت رشد در دو نوبت در هر گروه به صورت میلی‌متر مربع در هر ۴۸ ساعت نشان داده شده است. بیشترین سرعت رشد تومور مربوط به گروه سلول‌های دندریتیک نابالغ و بدون درمان (p<۰/۰۰۱) و کمترین سرعت رشد تومور مربوط به سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما می‌باشد.

اثر واکسن سلول دندریتیک بر میزان رشد تومور و بقای حیوانات مورد آزمایش: نتایج مربوط به سرعت رشد تومور در شکل ۳ و میزان بقای حیوانات مورد آزمایش در شکل ۴ به نمایش در آمده است. برای محاسبه سرعت رشد تومور میانگین تفاوت رشد در دو نوبت متوالی در گروه‌های مختلف مد نظر قرار گرفته و به‌صورت سرعت رشد در هر ۴۸ ساعت بر حسب میلی‌متر مربع نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل فوق دیده می‌شود بیشترین سرعت رشد تومور (۷۵/۱ میلی‌متر مربع) در سلول‌های دندریتیک نابالغ دیده می‌شود که



شکل-۴: میزان بقای موش‌های مبتلا به تومور در گروه‌های مختلف. در هر گروه تعداد هفت موش مورد بررسی قرار گرفته و هنگامی‌که سطح تومور در هر حیوان به ۴۰۰ میلی‌متر مربع رسید، به‌عنوان زمان پایان آزمایش (End point) در نظر گرفته شده است. میزان بقا به‌صورت درصد حیوانات زنده در هر مقطع زمانی نشان داده شده است. ثبت نتایج تا ۳۴ روز پس از ایجاد تومور صورت پذیرفته است که بیشترین میزان بقاء مربوط به سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما ۷۱٪ (پنج سر) و کمترین میزان بقاء مربوط به گروه دندریتیک نابالغ و بدون درمان می‌باشد که در روز ۲۴ تمام موش‌های این گروه‌ها به نقطه پایان آزمایش رسیدند.

بر همین اساس در روز ۲۴ تمامی حیوانات مورد آزمایش در گروه سلول‌های دندریتیک نابالغ و گروه بدون درمان به نقطه پایان آزمایش رسیده‌اند. در گروه ایمنوتراپی با سلول‌های دندریتیک فعال شده با اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما کمترین سرعت رشد (۱۸/۱ میلی‌متر مربع) دیده می‌شود و در روز ۲۴ پس از ایجاد تومور که نقطه پایان آزمایش در گروه کنترل (بدون درمان) بوده است، ۷۱٪ (پنج سر) از حیوانات مورد مطالعه زنده بوده‌اند (شکل ۴) که همگی به‌طور کامل تومورهای ایجاد شده را پاکسازی نموده بودند. در گروه LPS سرعت رشد تومور ۳۸/۸ بوده و در روز ۲۴ تنها ۳۳٪ (دو سر) از حیوانات مورد آزمایش زنده بوده (شکل ۴) و در آنها تومور به‌طور کامل حذف شده بود. در گروه بدون درمان سرعت رشد تومور و میزان بقای حیوانات مورد مطالعه مشابه گروه سلول‌های دندریتیک نابالغ بوده است. سرعت رشد تومور در گروه بدون درمان ۵۸ میلی‌متر مربع در هر ۴۸ ساعت بوده است.

بحث

بر اساس مطالعه‌ای که با استفاده از عصاره کامل توکسوپلاسما گوندی بر سلول‌های دندریتیک و ایمونوتراپی مدل تجربی تومور انجام شد، سلول‌های T سایتوتوکسیک در موش‌های درمان شده با

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های دندریتیک فعال شده با عصاره کامل توکسو پلاسما قدرت کشندگی اختصاصی ضد توموری بالاتری نسبت به گروه درمانی با سلول‌های دندریتیک نابالغ نشان دادند.[۱۳] سلول‌های دندریتیک بالغ شده با عصاره توکسوپلاسما گوندی قادر به محافظت از ابتلا به توکسوپلاسموز با ایجاد پاسخ قوی Th1 می‌باشد.[۱۶] جدا کردن اجزاء پروتیینی به‌منظور بررسی دقیق‌تر اجزاء موثر عصاره کامل، در این مطالعه انجام شده است. در مطالعاتی که روی اثر برخی از اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما انجام شده نشان داده‌اند که HSP70 باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک و افزایش مولکول‌های محرک کمکی CD80، CD86، CD40، HLA-DR و کاهش خاصیت فاگوسیتوز و افزایش عرضه آنتی‌ژن در سلول‌های دندریتیک می‌شود.[۱۷] HSP70 از طریق اتصال به TLR- 4 باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک و افزایش تولید IL-12 می‌شود.[۱۸] از اجزاء دیگر، سایکلوفیلین که مولکولی شبیه چاپرون است، توسط تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما و سلول‌های آلوده به توکسوپلاسما آزاد می‌شود.[۱۹] این مولکول با اتصال به CCR5، رسپتور کموکاین مورد نیاز برای مهاجرت سلول‌های دندریتیک به ناحیه سلول‌های T طحال، باعث تحریک این رسپتور و افزایش مهاجرت و تولید IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک می‌شود.[۲۰] مطالعات زیادی اهمیت سلول‌های $TCD8^+$ در ایمنی تومور را اثبات کرده‌اند. سلول‌های CTL به‌طور مستقیم از طریق شناسایی آنتی‌ژن‌های محدود به MHC کلاس یک و به‌طور غیرمستقیم از طریق لنفوسیت‌های T کمکی و با واسطه IFN- γ فعال شده و سلول هدف را از طریق پرفورین و گرآنزیم حذف می‌کنند.[۳-۵] سلول‌های دندریتیک نابالغ پس از برخورد با توکسوپلاسما گوندی از طریق TLR-2، TLR-4، TLR-9، TLR-11 با افزایش میزان بروز مولکول‌های CD86، MHCII، CD80 بالغ شده و مقدار فراوانی IL-12 تولید می‌کنند. سلول‌های دندریتیک بالغ شده و با مهاجرت به اعضای لنفاوی ثانویه با واسطه IL-12 موجب تمایز سلول‌های T بکر به Th1 و تولید IFN-γ می‌شود. IFN-γ موجب القای CD8 و افزایش فعالیت ماکروفاژها می‌گردد.[۲۱-۲۴] فعال شدن کامل سلول‌های $TCD8^+$ بکر و تمایز آنها به CTLهای عملکردی نیازمند مشارکت سلول‌های $TCD4^+$ کمکی می‌باشد. به بیان دیگر سلول‌های $TCD4^+$ می‌توانند سیگنال ثانویه را برای سلول‌های $TCD8^+$ فراهم کنند.[۲۵] مطالعات در مدل‌های مختلف درمانی با سلول‌های دندریتیک نشان می‌دهد که در مواردی که پس‌رفت کامل و یا تاخیر در رشد تومور مشاهده شده، پاسخ قوی سلول‌های T سیتوتوکسیک وجود داشته است.[۲۶] در مطالعه حاضر برای بلوغ سلول‌های دندریتیک از اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما گوندی برای بلوغ سلول‌های دندریتیک استفاده شد. در بین گروه‌ها، سلول‌های دندریتیک بالغ شده با اجزاء پروتیینی توکسو پلاسما نسبت به گروه LPS، عصاره کامل توکسوپلاسما، سلول‌های نابالغ و بدون درمان بالاترین نفوذ سلول‌های $CD8^+$ به ناحیه تومور را باعث شدند. همچنین سلول‌های دندریتیک بالغ شده با اجزاء پروتیینی توکسو پلاسما بیشترین قدرت کشندگی را در بین گروه‌های مختلف دارا بوده‌اند. بیشترین طول عمر حیوانات در گروه‌های مختلف مربوط به گروه اجزاء پروتیینی می‌باشد که تا روز آخر مطالعه ۷۱٪ موش‌ها در این گروه زنده مانده بودند که این به‌علت پاسخ سیتوتوکسیک قوی و نفوذ بیشتر سلول‌های $TCD8^+$ به ناحیه تومور، در این گروه بوده است. با وجود اینکه عصاره کامل توکسو پلاسما حاوی اجزاء پروتیینی نیز می‌باشد، ولی نسبت به اجزاء پروتیینی از لحاظ عملکرد سایتوتوکسیک سلول‌های $TCD8^+$ و طول عمر حیوانات کمتر موثر بوده است. احتمالا در عصاره کامل ترکیباتی وجود دارند که می‌توانند باعث مهار پاسخ ضد توموری شوند. از جمله مشخص شده است که DNA میکروبی می‌تواند در مواردی سبب بروز پاسخ تنظیمی شود. لذا بررسی تاثیر این اجزا بر عملکرد سلول‌های دندریتیک در ایمونوتراپی تومور، اطلاعات ارزشمندی در اختیار قرار خواهد داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، احتمالاً وجود اجزاء پروتیینی که برخی از آنها مورد اشاره قرار گرفته‌اند و همچنین پروتیین‌های دیگری که هنوز شناسایی نشده‌اند باعث تحریک و افزایش عملکرد سلول‌های دندریتیک در تقویت پاسخ سیتوتوکسیک و ضد توموری شده است. اجزاء پروتیینی توکسوپلاسما گوندی با تاثیر بر سلول‌های دندریتیک و ایجاد پاسخ ضد توموری قوی نفوذ سلول‌های TCD8 را به ناحیه تومور افزایش می‌دهند و باعث افزایش قابلیت سیستم دفاعی در برابر تومور می‌شوند. شناسایی اجزای موثر موجود در این ترکیبات و جداسازی و تخلیص آنها زمینه را برای بررسی دقیق‌تر در مورد کارایی این ترکیبات به‌عنوان تقویت‌کننده پاسخ‌های ضد توموری فراهم می‌سازد. *سپاسگزاری:* این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۷۰۱۹ به تاریخ ۸۷/۶/۱۲ است.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Coulie PG, Connerotte T. Human tumor-specific T lymphocytes: does function matter more than number? *Curr Opin Immunol* 2005;17(3):320-5.
2. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 2004;305(5681):200-5.
3. Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 2001;167(12):6991-7000.
4. Saio M, Radoja S, Marino M, Frey AB. Tumor-infiltrating macrophages induce apoptosis in activated CD8(+) T cells by a mechanism requiring cell contact and mediated by both the cell-associated form of TNF and nitric oxide. *J Immunol* 2001;167(10):5583-93.
5. Peng L, Krauss JC, Plautz GE, Mukai S, Shu S, Cohen PA. T cell-mediated tumor rejection displays diverse dependence upon perforin and IFN-gamma mechanisms that cannot be predicted from in vitro T cell characteristics. *J Immunol* 2000;165(12):7116-24.
6. Thomas DA, Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005;8(5):369-80.
7. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Ohta M, Yamaguchi H, Mori M. Effective strategy of dendritic cell-based immunotherapy for advanced tumor-bearing hosts: the critical role of Th1-dominant immunity. *Mol Cancer Ther* 2002;1(10):785-94.
8. Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggujaro D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect* 1999;1(13):1079-84.
9. Arab S, Motamedi M, Khansari N, Moazzeni SM, Gheflati Z, Hadjati J. Dendritic cell maturation with CpG for tumor immunotherapy. *Iran J Immunol* 2006;3(3):99-105.
10. Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, et al. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 2000;165(11):6278-86.
11. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999;189(5):821-9.
12. Khamisabadi M, Arab S, Motamedi M, Khansari N, Moazzeni SM, Gheflati Z, et al. Listeria monocytogenes activated dendritic cell based vaccine for prevention of experimental tumor in mice. *Iran J Immunol* 2008;5(1):36-44.
13. Motamedi M, Arab S, Moazzeni SM, Khamis Abadi M, Hadjati J. Improvement of dendritic cell based therapeutic cancer vaccine with components of Toxoplasma Gondii. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(10):1393-8.
14. Makala LH, Reyes JC, Nishikawa Y, Tsushima Y, Xuan X, Huang X, et al. A comparison of the phenotype of dendritic cells derived from discrete Peyer's patch macrophages of non-infected and Toxoplasma gondii infected mice. *J Vet Med Sci* 2003;65(5):591-7.
15. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176(6):1693-702.
16. Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingeard P, Dimier-Poisson I. Toxoplasma gondii antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against T. gondii infection. *Infect Immun* 2004;72(7):4127-37.
17. Kang HK, Lee HY, Lee YN, Jo EJ, Kim JI, Aosai F, et al. Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70 stimulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322(3):899-904.
18. Aosai F, Rodriguez Pena MS, Mun HS, Fang H, Mitsunaga T, Norose K, et al. Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones* 2006;11(1):13-22.
19. Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, et al. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2000;1(1):83-7.
20. Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, et al. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 2003;4(5):485-90.
21. Minns LA, Menard LC, Foureau DM, Darche S, Ronet C, Mielcarz DW, et al. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of Toxoplasma gondii. *J Immunol* 2006;176(12):7589-97.
22. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005;308(5728):1626-9.
23. Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, et al. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against Toxoplasma gondii infection. *Int Immunol* 2003;15(9):1081-7.
24. Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, et al. Toxoplasma gondii and mucosal immunity. *Int J Parasitol* 2004;34(3):401-9.
25. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007.
26. Wang JX, Liu GH, Fan YZ, Liu QL, Zhou J, Zhang DY, et al. Effects of cytotoxic T lymphocytes on hepatoma cell line SMMC-7721 induced by different subsets of dendritic cells in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006;5(3):422-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 9, Dec 2009: 615-622

Effects of dendritic cell vaccine activated with protein components of *toxoplasma gondii* on tumor specific CD8+ T-cells

Amari A.[1]
Razavi AL.[1]
Jamali A.[2]
AminiSardrod AA.[3]
Motamedi M.[4]
Shojaee S.[5]
Ansaripour B.[6]
Pourgholaminejad A.[6]
Hadjati J.[6*]

1- Department of Immunology, School of public health, Tehran University of Medical Sciences
2- Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences
3- Department of Immunology, Mashhad University of Medical Sciences
4- Lorestan University of Medical Sciences
5- Department of Parasitology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences
6- Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences

* Corresponding author: Dept. of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel: +98-21-66419536
email: hajatij@sina.tums.ac.ir

Received: July 22, 2009 Accepted: October 03, 2009

Abstract

Background: Dendritic Cell (DC) is an important antigen-presenting cell that present tumor antigen to $CD8^+$ and $CD4^+$ T- Lymphocytes and induce specific anti-tumor immunity. In order to induce effective anti-tumor response, an option is increasing the efficiency of antigen presentation of dendritic cells and T cell activation capacity. The aim of the present study was to investigate the effect of dendritic cell maturation with protein components of toxoplasma gondii on cytotoxic T lymphocyte activity and their infiltration in to the tumor.

Methods: For DC generation, bone marrow cells were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4 for five days. After that, LPS, protein components and whole extract of toxoplasma gondii were added to the culture media and incubated for another two days for DC maturation. To generate tumor, mices were injected subcutaneously with WEHI-164 cell line. For immunotherapy 10^6 DCs matured with different compounds were injected around the tumor site. Infiltration of $CD8^+$ T cells were determined by flow cytometry and cytotoxic activity was measured by LDH detection kit.

Results: Immunotherapy with DCs treated with protein components of toxoplasma gondii led to a significant increase in the activity of cytotoxic T cells and infiltration of $CD8^+$ T cells in to the tumor. Immunotherapy using protein components of toxoplasma gondii significantly improved the survival of the mice compared with other groups ($p<0.0001$).

Conclusion: Protein components of toxoplasma are able to increase DC capability in induction of CTL-mediated anti-tumor response and increase infiltration of these cells in to the tumor.

Keywords: $CD8^+$ T- Lymphocytes, dendritic cell, toxoplasma gondii.

www.SID.ir