تاثیر مایع رویی لنفوسیت T در القای بلوغ سلول‌های دندریتیک (DC1) و تولید سلول‌های موثر برای ایمونوتراپی تومور

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۱۶

معصومه اسدی[1*]، فرح فرخی[1]
میثم گنجی‌بخش[1]، نوروز دلیرژ[2]
وحید نجاتی[1]، کیکاوس غلامی[1]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم
۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی
دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کدپستی: ۵۷۱۵۹۱۵۱۹۹
تلفن: ۰۹۳۵۷۸۶۰۱۰۱
email: masome.asadi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: از آنجا که سلول‌های دندریتیک (DC) قادر به القای پاسخ ایمنی بر علیه تومور می‌باشند، امروزه علاقه فزاینده‌ای در به‌کارگیری این سلول‌ها در ایمونوتراپی تومور وجود دارد. در مطالعه حاضر سلول‌های دندریتیک به‌منظور استفاده در امر تحقیقات و ایمونوتراپی تومور بررسی شدند. ***روش بررسی:*** بخشی‌از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که به پلاستیک می‌چسبند در حضور GM-CSF و IL-4 به‌مدت پنج روز و سپس به مدت دو روز نیز با TNF-α, PLY-IC و مایع رویی لنفوسیت T تحریک شده با PHA، PHA-activated T cells Conditioned Medium کشت داده شد و بررسی مورفولوژیک تعیین فنوتیپ، قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک ارزیابی شد. توانایی سلول‌های تولیدشده در واکنش مختلط لکوسیتی آلوژن و میزان سایتوکین‌های تولید شده مورد سنجش قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** سلول‌های دندرتیک تولید شده با این روش دارای افزایش بیان مولکول‌های سطحی نظیر CD80، CD83، CD86، HLA-DR بودند. این سلول‌ها دارای توانایی فاگوسیتوز کم و قدرت تحریک بالای لنفوسیت‌های T بودند. با سنجش نسبت سایتوکین‌ها مشخص شد سلول‌های دندریتیک تولید شده از نوع DC1 می‌باشند. ***نتیجه‌گیری:*** این داده‌ها نشان‌دهنده القای بلوغ کارامدتر سلول‌های دندریتیکی توسط مایع رویی سلول‌های لنفوسیت T می‌باشد که با PHA تحریک شده بودند. استفاده از این مایع رویی به‌عنوان فاکتور بلوغ می‌تواند منجر به تولید سلول‌های دندریتیکی کارامدتر با توانایی ایمونوتراپی تومور باشد و امکان تکامل هر چه بیشتر استراتژی‌های جدید در ایمونوتراپی بیماری‌ها با استفاده از سلول‌های دندریتیک تولید شده در آزمایشگاه را فراهم کند.

کلمات کلیدی: سلول‌های دندریتیک، لنفوسیت T، ایمونوتراپی تومور.

مقدمه

در طی سال‌های اخیر محققین توانستند از مونوسیت‌های خون محیطی سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells (DC را تولید کنند و گزارش کردند که با کشت مونوسیت‌ها تحت تاثیر IL-4 و GM-CSF سلول‌های دندریتیک حاصل می‌شوند[1] و این یافته‌ها پایه‌های استفاده از سلول‌های دندریتیک در ایمونوتراپی را پی‌ریزی کردند.[2] این سلول‌ها اولین سلول‌های ایمنی هستند که با عوامل بیگانه مواجه می‌شوند و نقش مهمی در رابطه با بیماری‌های عفونی، خود ایمنی، پیوند، آلرژی و سرطان دارند. همچنین در بیماری خود ایمن صرف‌نظر از نوع و محل ایجاد آن، سلول‌های دندریتیک اولین سلول‌هایی هستند که به محل مراجعه و در آن تجمع می‌یابند و به‌دنبال آن سایر سلول‌های ایمنی نیز خود را به محل می‌رسانند.

هم‌چنین به سبب افزایش یافته‌ها، در مورد فیزیولوژی سلول‌های دندریتیک و اهمیت آن‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی با استفاده از ارایه آنتی‌ژن، امید به‌کار بردن این سلول‌ها در درمان سرطان بسیار بالا می‌باشد.[3] دو نوع سلول دندریتیک در خون محیطی وجود دارند که از ویژگی‌های فنوتیپی، عملکردی و تکوینی متفاوتی برخوردار می‌باشند.[4] ویژگی‌هایی که برای سلول‌های دندریتیک بیان گردیده این سلول‌ها را به‌عنوان قوی‌ترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن که نقش مرکزی را در ایجاد پاسخ ایمنی به‌ویژه در تحریک سلول‌های T دست نخورده دارند، مطرح می‌سازد. این سلول‌ها در ایجاد پاسخ‌های ایمنی، خود ایمنی، دفع پیوند، عفونت و آنتی‌بادی وابسته به سلول T، دخالت دارند. سلول‌های دندریتیک به‌دلیل ظرفیت بالای خود در عرضه پپتیدهای ایمنوژن به همراه مولکول‌های MHC I, II

Archive of SID
www.SID.ir

می‌توانند باعث فعال شدن سلول‌های T و بیان گیرنده‌های هم‌تحریکی (Co-stimulator) و چسبنده و تولید سایتوکین‌ها گردند.[۵] امروزه به‌منظور استفاده از سلول‌های دندریتیک برای ایمونوتراپی سرطان آن‌ها را از دو منبع سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان یا خون محیطی و یا مونوسیت‌های خون محیطی اخذ می‌کنند. البته تولید سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای $CD34^+$ مستلزم بیوپسی و تهیه مغز استخوان و یا تزریق GM-CSF به‌منظور افزایش تعداد آن‌ها در خون محیطی می‌باشد و هر دوی این روش‌ها به تیمار اضافی نیاز داشته و خطراتی را برای بیمار به‌همراه دارند.[۶] باید به این نکته توجه داشت که استفاده از سلول‌های دندریتیک به‌علت توان منحصر به فرد آن در آغاز پاسخ‌های اختصاصی به آنتی‌ژن در سلول T به‌صورت In vivo و In vitro به‌منظور تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی میزبان جهت معالجه بیماری‌های ویروسی و ایمونوتراپی سرطان، مورد توجه شدید قرار گرفته است[۷] و امکان تولید DCهای منتج شده از سلول‌های پیش‌ساز، به‌صورت آزمایشگاهی و به‌میزان مورد نیاز، هم در مدل‌های آزمایشگاهی و هم در معالجات انسانی، به طراحی و آزمایش روش‌های جدید مبتنی بر تولید DC کمک کرده است.[۸] نتایج اخیر نشان می‌دهد مایع رویی لنفوسیت‌های T تحریک‌شده دارای CD40L، TNF-α و IFN-g می‌باشد و لنفوسیت‌ها علاوه بر این‌که CD40 L بروز می‌دهد، قادر به تولید CD40 L محلولی در محیط آزمایشگاهی نیز می‌باشد. مایع رویی لنفوسیت‌های T با داشتن CD40 L می‌تواند مولکول‌های کمک تحریکی مثل CD86 و CD80 را القا کند. همچنین مایع رویی لنفوسیت‌های T تحریک شده حاوی IFN-g می‌باشد که این سایتوکین قادر به تقویت بلوغ میلوییدDC (CD11c1) myeloid می‌باشد.[۹] در این تحقیق، که به‌منظور تقویت بنیان‌های ایمونوتراپی سرطان صورت گرفت، تولید سلول‌های دندریتیک از منوسیت‌های خون افراد سالم، مد نظر قرار گرفت، تا ضمن دست‌یابی به روش مناسب برای تولید انبوه سلول‌های دندریتیک در خارج از بدن و تعیین ویژگی‌های مورفولوژیکی، فنوتیپی و عملکردی آن‌ها، از این سلول‌ها برای بررسی پاسخ ایمنی بیماران سرطان در خارج از بدن و نیز مطالعات بالینی بهره گرفت.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی- تحلیلی است و به منظور تولید سلول‌های دندریتیک مناسب ایمونوتراپی تومور از تیرماه سال ۱۳۸۸ تا شهریور ۱۳۸۹ در Clean room پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه صورت گرفت. محیط کشت، سایتوکین‌ها: در تمامی مراحل از محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Gibco، انگلستان) که به آن ۲mM، L- گلوتامین (شرکت Sigma، آمریکا)، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین (شرکت Sigma، آمریکا)، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (شرکت Sigma، آمریکا) ۲- مرکاپتو اتانول ($2/5\times10^{-5}$ M) (شرکت Sigma، آمریکا) و ۱۰٪ FBS (شرکت Gibco، انگلستان) اضافه شده بود، استفاده گردید. در این مطالعه از سایتوکین‌های ۱۰۰۰u/ml از GM-CSF (Peprotech، آمریکا) و ۵۰۰u/ml از IL-4 (Peprotech، آمریکا) ۱۰ng/ml از TNF-α (Peprotech، آمریکا) و ۲۰ng/ml از PLY-IC (Peprotech، آمریکا) استفاده شد.

کشت سلول‌های دندریتیک: کشت این سلول‌ها در دو گروه کنترل و تیمار انجام شد. مقدار ۵۰ml خون هپارینه (۲۰۰U/ml) از سه فرد داوطلب اخذ گردید. خون هپارینه با ۵۰ml محیط کشت RPNI-1640 رقیق گردید. خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت. مجموعه خون رقیق شده و فایکول با سرعت ۸۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده جمع شده بودند به آرامی جمع‌آوری گردید و PBMC به‌دست آمده به‌منظور حذف فایکول همراه آن با محیط کشت RPMI 1640 مخلوط و با سرعت ۴۵۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI 1640 مخلوط و این بار به‌منظور حذف پلاکت همراه PBMC با سرعت ۲۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به‌دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین گردید. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در مرحله قبل تهیه شده بود برای تولید سلول‌های دندریتیک مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های PBMC به تعداد $1/5-3\times10^6$ سلول در هر میلی‌لیتر و به‌مقدار ۵ml در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰U/ml) استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml)، 2ME ($2/5\times10^{-5}$ M) FBS (۱۰٪) به‌مدت دو ساعت در ۳۷ °C، ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار

Archive of SID
www.SID.ir

شستشوی آرام جدا شدند، به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها را منوسیت‌ها تشکیل می‌دادند، محیط کشت جدید به اضافه (GM-CSF ۱۰۰۰U/ml) و IL-4 (۵۰۰U/ml) اضافه و کشت داده شد. در روز سوم مجدداً مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به فلاسک‌های حاوی سلول اضافه گردید. عصارهٔ سلول‌های توموری خون k562 که قبلاً به‌عنوان آنتی‌ژن تهیه شده بود روز چهار اضافه گردید. در روز پنجم TNF-α (۱۰ng/ml) و ۲۰ng/ml از PLY-IC ۵۰٪ مایع رویی (TCM) جهت کمک به فرآیند بلوغ سلول‌های دندریتیک اضافه گردید که گروه تیمار نام گرفت، اما در کنترل از این مایع رویی FCM استفاده نشد. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵mM) برداشت و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ و قدرت بیگانه‌خواری و تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و تولید سایتوکین‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

مطالعه میکروسکوپی: مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده از اولین مرحله کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تا مرحله نهایی برداشت سلول‌های دندریتیک بالغ به‌وسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که جزئیات تغییرات مورفولوژیک در طی دورهٔ کشت و ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک به‌دست آمده در بخش نتایج ارایه گردیده است.

بررسی فنوتیپ سطحی سلول به‌وسیله فلوسایتومتری: در روز هفتم کشت به‌دلیل بالغ شدن سلول‌ها، اکثریت سلول‌های دندریتیک به حالت شناور در آمدند و معدود سلول‌های چسبنده نیز با اضافه کردن بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵mM) و انکوبه کردن در ۳۷ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه برداشت گردیدند. سلول‌های به‌دست آمده بعد از یک بار شستشو با بافر FACS در همین بافر که حاوی ۲٪ سرم موش بود به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ °C انکوبه شد. در پایان زمان انکوباسیون سلول‌ها مجدداً با بافر FACS شستشو شده بعد از رساندن حجم آن‌ها به ۱۰۰µl مقدار ۱۰µl آنتی‌بادی مربوطه یا کنترل ایزوتایپ اضافه به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ °C انکوبه گردیدند.

بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌ها یک‌بار با بافر FACS شسته شده بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتری FACSCalibor (Becton-Dickinson آمریکا) آزمایش شده نتایج حاصل با نرم‌افزار CellQuest مورد آنالیز قرار گرفت.

واکنش مختلط لکوسیستی آلوژن و اتولوگ: به منظور سنجش قدرت سلول‌های دندریتیک تولید شده (سلول‌های محرک) از نظر تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T (سلول‌های پاسخ‌دهنده) واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن و اتولوگ به شرح زیر انجام گرفت. لنفوسیت‌های T آلوژن از PBMC افراد داوطلب و با خلوص بیش از ۸۰٪ تهیه گردید. تعداد 10^5 لنفوسیت T با نسبت‌های مختلف (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰) با سلول‌های دندریتیک مخلوط و به‌مدت پنج روز در پلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد در محیط کشت RPMI-1640 به اضافه ۱۰٪ سرم AB انسانی در حجم ۲۰۰µl در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 کشت داده شد. خانه‌های حاوی سلول‌های دندریتیک تنها، لنفوسیت‌های T تنها و لنفوسیت‌های T تحریک شده با PHA (۲/۵٪) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در روز پنجم به هر خانه مقدار ۱µCi متیل تیمیدین نشان‌دار شده با رادیواکتیو (H3 thymidine) (Amersham، انگلستان) اضافه و به‌مدت ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گردید. سلول‌ها توسط دستگاه Cell Harvester (شرکت ICN– انگلستان) بر روی فیلتر نیتروسلولوزی منتقل گردید. بخش‌هایی از فیلتر که حاوی سلول‌های برداشت شده‌بود جدا و در ویال مخصوص قرار گرفته مقدار ۲ml محلول سنتیلاسیون به هر ویال اضافه گردید. میزان تابش پرتو بتا از هر نمونه به‌مدت یک دقیقه توسط دستگاه شمارش‌گر بتا (شرکت Wallac– فنلاند) شمارش و ثبت گردید. تمامی آزمایشات به‌صورت سه تایی انجام و نتایج به‌دست آمده به‌صورت Count Per Minute (CPM) محاسبه و گزارش گردید.

اندازه‌گیری قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک: ۲۰ µL از بید لاتکس فلورسانت (کنژوگه با FITC) (Sigma) با غلظت $2/5\times10^8$ در هر میلی‌لیتر در ۵µl سرم AB^+ به‌مدت ۷/۵ دقیقه اپسونیزه (Opsonized) شد. سپس بید اپسونیزه شده با ۲۰µl از سلول‌های دندریتیک بالغ (روز هفت، قبل از اضافه کردن عامل بلوغ) با غلظت $1/25\times10^7$ در هر میلی‌لیتر مخلوط شده و با اضافه کردن ۶۰µl بافر مخصوص بیگانه‌خواری (PBS، ۵mM گلوکز، ۰/۹mM $CaCl_2$، ۰/۵mM $MgSO_4$ و ۰/۵٪ FBS) به حجم کلی ۱۰۰µl رسید (در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد). میکروپلیت حاوی گروه‌های تیمار به همراه گروه‌های شاهد حاوی تمام مواد به‌جز بید لاتکس به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C، ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت انکوبه شد. بعد از اتمام ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها برداشت شده و به‌منظور خاموش شدن فلورسانت سطح سلول با بافر خاموش‌کننده

Archive of SID
www.SID.ir

Quenching buffer (۰/۹٪NaCl)، بافر سیترات ۱۳µM و تریپان بلو ۰/۲۵mg/ml) شسته شدند (۳۰۰g، ۱۰ دقیقه).

اندازه‌گیری سایتوکین: آزمایش مربوط به IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 به‌صورت جداگانه به‌وسیله کیت اندازه‌گیری سایتوکین‌های IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 (Peprotech) انجام گرفت ولی به‌دلیل تشابه روش کار در یک‌جا توضیح داده می‌شود، میزان تولید IFN-γ و IL-4 در مایع رویی تست MLR و میزان تولید IL-10 و IL-12 در مایع رویی روز هفتم کشت سلول‌های دندریتیک مورد سنجش قرار گرفت. از Capture Ab مربوط به تست IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 تهیه شده با غلظت ۱µg/ml به‌مقدار ۱۰۰µl به هر خانه پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. برای هر نمونه آزمایش دو خانه در نظر گرفته شد و شش جفت خانه نیز برای نمونه استاندارد در نظر گرفته شد. سطح پلیت پوشانده شده و به‌مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. هر خانه پلیت چهار بار با ۳۰۰µl، Wash buffer شسته شده و آب اضافی پلیت گرفته شد. به هر خانه پلیت ۳۰۰µl، Block buffer اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. همانند مرحله سه شستشو انجام شد. به خانه‌های مربوطه مایع رویی جمع‌آوری شده به‌صورت دوتایی اضافه شد. همچنین آنتی‌بادی استاندارد نیز به‌طور سریالی از رقت ۲۰ng/ml تا صفر تهیه شد و به شش خانه به‌طور دوتایی اضافه گردید. سطح پلیت پوشانده شده و به‌مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. همانند مرحله سه شستشو انجام شد. Detection Ab با غلظت گفته شده در پروتکل تهیه شد و به هر خانه ۱۰۰µl اضافه شد. سطح پلیت پوشانده شده و به‌مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. همانند مرحله سه شستشو انجام شد. Avidin-HRP Conjugate با غلظت ۱:۲۰۰۰ تهیه شد و به هر خانه ۱۰۰µl اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. همانند مرحله سه شستشو انجام شد. به هر خانه ۱۰۰µl از ABTS liquid substrate اضافه شد. با مشاهده تغییر رنگ پلیت با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا (Awerness) و با طول موج ۴۰۵nm قرائت شد. متوسط OD به‌دست آمده محاسبه با استفاده از برنامه Curve expert (version 0/7) مقدار IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 موجود در نمونه تعیین و به‌صورت ng/ml گزارش شد.

تولید مایع رویی لنفوسیت T تحریک شده با PHA: ابتدا سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) طبق روش ذکر شده از نمونه خون افراد داوطلب استخراج گردید. سلول‌های PBMC همراه با ۵ml در فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰U/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰g/ml) به‌مدت دو ساعت در شرایط دمای ۳۷ °C، (۵٪) CO_2 و رطوبت (۹۰٪) انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام جدا شده و به تعداد ۲×۱۰^{۶}/ml لنفوسیت T به فلاسک دیگر منتقل گردیدند. محیط کشت تازه بدون سرم، همراه با IL-2 (۲۰U/ml)، PHA (۲۰µg/ml) به فلاسک اضافه و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، مایع رویی جمع‌آوری و سانتریفوژ (۲۰۰۰rpm) گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری و با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲µM استریل گردید و برای استفاده بعدی در دمای ۷۰ °C– قرار داده شد.

تهیه عصاره سلول‌های توموری از سوسپانسیون سلول‌های توموری K562: سوسپانسیون سلول‌های توموری K562 به تعداد $۱۰-۱۱^{۶}$ سلول تهیه و دو بار با محیط کشت RPMI-1640 شسته شد. بعد از آخرین شستشو حجم سوسپانسیون سلولی به ۱/۵ml رسانده شد. سوسپانسیون سلولی چهار دور با قرار دادن در نیتروژن مایع و آب ۳۷ °C هر کدام به‌مدت پنج دقیقه Freeze/thaw گردید. محصولات به‌دست آمده به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شده و مجدداً به‌مدت یک‌ساعت با سرعت ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ گردید و با استفاده از فیلتر µm ۰/۲۲ استریل گردید. تمامی آزمایش‌ها با سه مرتبه تکرار به ثبت رسیدند و نتایج با برنامه SPSS ویراست ۱۷ بررسی شد. مقایسه بین گروه‌ها توسط Paired t- test و One- way ANOVA انجام شد و مقدار P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین نتایج تست الایزا توسط نرم‌افزار CUREXPERT 0.7 مورد آنالیز قرار گرفت. مقدار P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژیکی: کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در دمای ۳۷ °C به‌مدت دو ساعت باعث شد تا اکثریت سلول‌ها که درصد بیشتر آن مونوسیت بودند به ته فلاسک بچسبند و بعد از سه روز کشت سلول‌های چسبنده در حضور IL-4, GM-CSF چسبندگی خود را از دست داده و شناور شدند. این سلول‌ها بزرگ‌تر از مونوسیت‌ها شده بودند و زواید سیتوپلاسمی پیدا کرده بودند. این روند ادامه یافت تا این‌که در روز پنجم با افزودن فاکتورهای بلوغ

Archive of SID
www.SID.ir

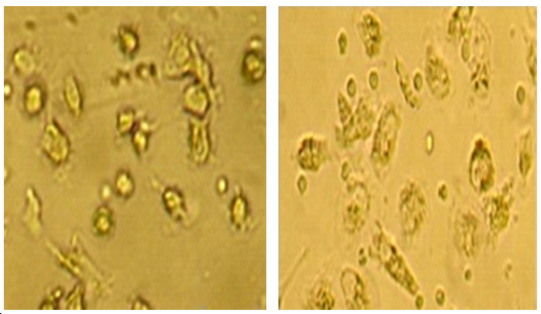
TNF-α، PLY-IC و TCM افزایش قابل ملاحظه اندازه سلول و تعداد زواید سیتوپلاسمی و روند شناور شدن آن‌ها دیده می‌شد. انجام این آزمایشات به‌صورت مکرر نشان داد که حدود ۱۰-۳٪ از PBMC به سلول‌هایی با ویژگی‌های سلول دندریتیک تبدیل می‌شوند (شکل ۱).

ویژگی‌های فنوتیپی سلول‌های دندریتیک: درصد بیان مولکول‌های CD14، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به‌صورت میانگین درصد بیان مولکول‌ها، در نمودار ۲ ارایه شده است. همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود میزان بیان CD14 از مقدار ۱۸/۲۶٪ در گروه کنترل به مقدار ۱۲/۱۰٪ در گروه تیمار کاهش یافته که دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند و میزان بیان مولکول CD80 از ۱۶/۵۱٪ در گروه کنترل به مقدار ۴۷/۱۵٪ در گروه تیمار افزایش یافته که این افزایش دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد. همچنین میزان بیان مولکول CD83 از ۲۱/۳۸٪ در گروه کنترل به‌مقدار ۳۴/۱۸٪ در گروه تیمار افزایش یافته که این افزایش نیز دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد و میزان بیان مولکول CD86 از ۱۳/۸۷٪ در گروه کنترل به‌مقدار ۲۶/۹۱٪ در تیمار افزایش یافته است و نیز میزان بیان مولکول HLA-DR از ۴۴/۱۱٪ در گروه کنترل به‌مقدار ۷۰/۰۱٪ در تیمار افزایش یافته است که این مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشند.

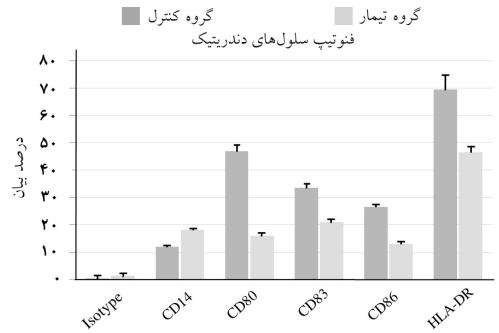
قدرت بیگانه‌خواری سلول‌ها: سنجش این تست با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج فلوسایتومتری به‌دست آمده نشان داد درصد بیگانه‌خواری نسبت به‌گروه کنترل کاهش یافته است اما در این تحقیق تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول-های دندریتیک به وسیله دستگاه فلوسایتومتری که به صورت میانگین شدت فلورسانس (MFI) نشان داده می‌شود نیز مورد سنجش قرار گرفت و مشخص گردید تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول‌های دندریتیک تیمار نسبت به گروه کنترل به‌میزان اندکی افزایش نشان می‌دهد که این مسئله نشان دهنده این است که هر چند تعداد سلول‌های فاگوسیتوز کننده در گروه تیمار کمتر بوده ولی قدرت فاگوسیتوز آن‌ها به ازای هر سلول بیشتر شده بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵) (نمودار ۲).

سنجش تحریک لنفوسیت T: به‌منظور سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک تولید شده در تیمار و گروه کنترل، توانایی آن‌ها در القاء واکنش لوکوسیتی آلوژنیک مطالعه شد و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های دندریتیک تولید شده در تیمار دارای توانایی بیشتر در القاء تکثیر سلول‌های آلوژن نسبت به سلول‌های دندریتیک گروه کنترل می‌باشند (نتایج به‌صورت میانگین CPM در نمودار ۳ نمایش داده شده است)، که تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

بررسی توانایی تولید سایتوکین‌ها توسط سلول‌ها: میزان ترشح سایتوکین INF-γ و IL-4 از لنفوسیت‌های T، که توسط سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و تیمار تحریک شده بودند به‌وسیله کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت و نتایج نشان داد میزان ترشح INF-γ و IL-4 توسط لنفوسیت‌های T، در تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (نمودار ۴). همان‌گونه که در نمودار ۵ مشخص گردیده میزان ترشح IL-12 در تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و همچنین میزان ترشح IL-10 در تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است همین‌طور نسبت IL-12 به IL-10 در تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است.

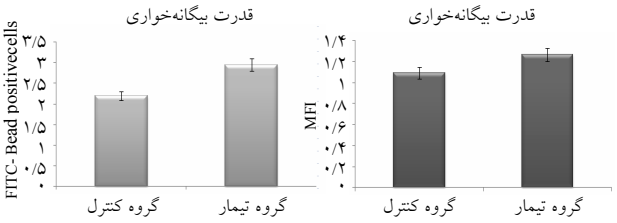


شکل-۱: مقایسه میکروسکوپی سلول‌های موجود در فلاسک‌های ایجاد شده گروه کنترل (چپ) و تیمار (راست)

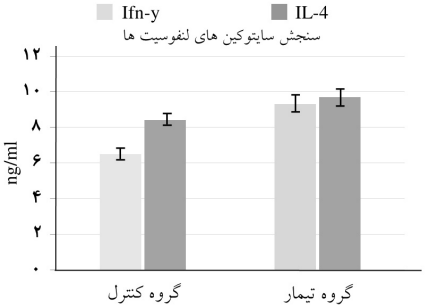


نمودار-۱: میانگین درصد بیان مولکول‌های CD14، CD83، CD80، CD86، HLA-DR در سطح سلول‌های دندریتیک کنترل‌و تیمار * اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد

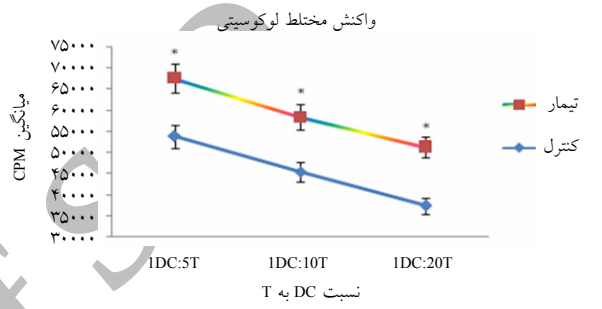
Archive of SID
www.SID.ir



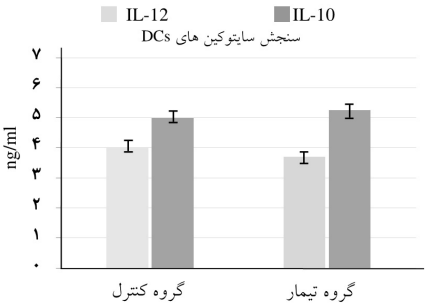
نمودار-۲: مقایسه بیگانه‌خواری در سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و تیمار (با فلوسایتومتری)



نمودار-۴: نتایج سنجش سایتوکین‌های لنفوسیت T با کیت الایزا



نمودار-۳: نتایج واکنش مختلط لوکوسیتی (MLR) با استفاده از متیل تایمیدین نشان‌دار



نمودار-۵: نتایج سنجش سایتوکین‌های دندریتیک با کیت الایزا

بحث

از اواخر قرن نوزدهم به بعد ایمونوتراپی تومور در کنار روش‌های متداول درمانی مورد توجه محققین و صاحب‌نظران قرار گرفته است، و از آن زمان تاکنون هم‌زمان با پیشرفت علوم بیوتکنولوژی، ایمونولوژی، بیوشیمی و بیولوژی مولکولی از روش‌های مختلفی از جمله انواع واکسن‌های توموری، تغییر دهنده‌های پاسخ‌های بیولوژیکی، سایتوکین‌ها، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و غیره برای ایمونوتراپی فعال و غیر فعال بهره گرفته‌اند. به‌دنبال شناسایی و تعیین ویژگی‌های ریخت‌شناختی و عملکردی سلول‌های دندریتیک به‌عنوان سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن توجه خاصی به استفاده از این سلول‌ها در ایمونوتراپی تومور معطوف شده است.[11] در این مطالعه از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی افراد داوطلب که بعد از دو ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C به فلاسک کشت چسبیده بودند، برای تولید سلول‌های دندریتیک استفاده شد. در طی دو ساعت حدودا ۰/۸٪ از سلول‌های چسبنده را مونوسیت‌های CD14 و بقیه را مخصوصاً لنفوسیت‌ها تشکیل می‌دهند.[12] برخی محققین ابتدا مونوسیت‌های خون محیطی جدا کرده و سپس برای تولید DC استفاده کرده‌اند. ولی از آنجا که حضور لنفوسیت‌ها و عوامل ترشح شده از آن‌ها به رشد و تمایز سلول‌های DC کمک می‌کند،[13] روش مذکور مورد استفاده قرار نگرفت. سلول‌های دندریتیک بالغ نقش مهمی را در ایمنی ضد توموری ارایه می‌دهند. تولید سلول‌های دندریتیک بالغ پایدار می‌تواند برای سلول درمانی مفید باشد. سلول‌های دندریتیک تولید شده در محیط آزمایشگاهی قدرت تحریک لنفوسیت T بکر را دارند. مایع رویی لنفوسیت T حاوی سطوح بالایی از اشکال فعال بیولوژیکی مثل CD40L, TNF-α, IFN-g می‌باشد. مایع رویی لنفوسیت T تحریک شده به‌علت دارا بودن TNF-α، IFN-g قادر به افزایش بروز مولکول‌های سطحی چسبنده و کمک محرک می‌باشد. علاوه بر این CD40 L توانایی القای تولید سایتوکین‌هایی نظیر IL-12, IFN-γ, TNF-α و مولکول‌های سطحی ضروری پاسخ ایمنی نظیر CD80، CD83 و CD86 را دارد.[6] بنابراین مایع رویی لنفوسیت‌های T تحریک‌شده با PHA دارای سایتوکین‌های محرک برای تمایز و بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌باشد. یک سلول دندریتیک ایده‌آل برای ایمونوتراپی باید بتواند بعد از بلوغ و به‌عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

یکی از مشخصه‌های اصلی بلوغ، سلول‌های T اختصاصی را در تحریک کند که ابزارهای آن برای این امر، مولکول‌های کمک محرک مثل CD40، CD80/86، مولکول‌های چسبندگی و سایتوکین‌هایی مثل IL-12 می‌باشد. از طرفی سلول‌های دندریتیک بالغ می‌بایست دارای مقادیر کاهش یافته‌ای از CD14 بر سطح خود باشند، که این کاهش در حین بلوغ و به واسطه کاهش نسخه‌برداری از ژن CD14 بر اثر IL-4 اضافه شده، رخ می‌دهد.[۱۴] از دیگر شاخص‌های سلول‌های دندریتیک، می‌توان به بیان مولکول CD83 در سطح این سلول‌ها اشاره کرد، این مولکول سطحی جزو ابرخانواده ایمونوگلوبولین‌ها بوده و هنوز نقش اصلی آن در هاله‌ای از ابهام است. البته به‌نظر می‌رسد این مولکول سطحی در تنظیم ایمنی سلولی بی‌تاثیر نباشد.[۱۵] از دیگر مشخصه‌های مورد بحث در مورد سلول‌های دندریتیک بالغ، افزایش بیان MHC II در سطح این سلول‌ها می‌باشد که در مطالعه حاضر، بیان این مولکول در قالب سنجش میزان بروز HLA-DR در سطح سلول‌های تولید شده بررسی شد.[۸] در این تحقیق مشخص گردید که سلول‌های دندریتیک که با کمک مایع رویی سلول‌های لنفوسیت T بلوغ یافتند نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار از لحاظ آماری در بروز مولکول‌های سطحی CD80، CD83، CD86 و HLA-DR نشان می‌دهند. مشخصه بعدی بلوغ، قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک می‌باشد که انتظار می‌رود سلول‌های دندریتیک با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه‌خواری و تمامی ویژگی‌های لازم برای اخذ آنتی‌ژن از جمله گیرنده‌های سطحی لازم برای این کار را از دست داده و در عوض قدرت عرضه آنتی‌ژن و نهایتاً تحریک سلول‌های T را تقویت کنند.[۱۶] در این تحقیق تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول‌های دندریتیک به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری که به‌صورت میانگین شدت فلورسانس Mean Fluorescence Intensity (MFI) نشان داده می‌شود مورد سنجش قرار گرفت و مشخص گردید تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول‌های دندریتیک تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌دهند که این مسئله نشان‌دهنده این است که هر چند تعداد سلول‌های فاگوسیتوز کننده در تیمارها کمتر بوده ولی قدرت فاگوسیتوز آن‌ها به ازای هر سلول بیشتر بوده است. یکی دیگر از شاخص‌های مورد بحث در مورد بلوغ سلول‌های دندریتیک قدرت تحریکی سلول‌های دندریتیک در تکثیر لنفوسیت‌های T می‌باشد که در این تحقیق پس از مقایسه نتایج MLR (واکنش مختلط لوکوسیتی) آلوژنیک مشخص گردید، سلول‌های تولید شده در تیمار نسبت به کنترل، لنفوسیت‌های مجاور را بیشتر تحریک کرده بودند و سبب تکثیر بیشتری شده بودند این مسئله نشان می‌دهد سلول‌های دندریتیک تیمار دارای توانایی بیشتر در تحریک لنفوسیت‌های T بکر می‌باشند که این مسئله به‌علت بلوغ بهتر این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌باشد. DC فعال شده IL-12 تولید و باعث ترشح IFN-γ به‌وسیلهٔ سلول‌های T می‌شود. در بررسی پاسخ ایمنی بر علیه آنتی‌ژن‌های توموری یکی از معیارهای ارزیابی سنجش سایتوکین تولید شده توسط سلول‌های حساس شده است نگاهی به این مطالعات نشان می‌دهد که در اغلب موارد IL-4 و IFN-γ به‌عنوان نمایندگان تیپ‌های سایتوکینی دندریتیک تیپ ۲ و دندریتیک تیپ ۱ مورد سنجش واقع شده‌اند.[۱۴] یکی از عواملی که در تعیین تیپ پاسخ‌های ایمنی مورد بررسی قرار می‌گیرد، نوع سایتوکینی است که توسط سلول‌های دندریتیک بالغ و یا لنفوسیت‌های T تحریک شده توسط آن‌ها تولید می‌شود. اگر سلول‌های 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 سلول‌های دندریتیک به‌سمت DC2 خواهند رفت. DC1 در القای پاسخ ایمنی سلولی و مبارزه با پاتوژن‌های داخل سلولی موثر است.[۱۷] با این هدف در این تحقیق از مایع رویی لنفوسیت T تحریک شده برای القای پولاریزاسیون سلول‌های دندریتیک استفاده شده، همان‌گونه که در بخش نتایج بیان شد حضور این مایع رویی با این‌که باعث افزایش تولید هر دو سایتوکین IL-10 و IL-12 شده بود ولی تولید IL-10 کمتر بود بنابراین نسبت IL-12 به IL-10 افزایش یافته بود. لنفوسیت‌های T در پاسخ به تحریکات آنتی‌ژنی در داخل و خارج از بدن به تولید انواع سایتوکین‌ها می‌پردازند بر اساس، نوع، مقدار و مسیر عرضهٔ آنتی‌ژن و نیز محیط ظریف اطراف سلول‌های T به‌همراه تحریکات سایر سلول‌ها دو نوع سلول T یعنی Th1 و Th2 را القاء می‌شود که هر کدام از آن‌ها انواع خاصی از سایتوکین را ترشح می‌کنند IFN-γ به‌عنوان سایتوکین شاخص Th1 و IL-4 به‌عنوان سایتوکین شاخص Th2 شناخته می‌شوند. در ایمونولوژی تومور القاء پاسخ Th1 و در نتیجه تقویت ایمنی سلولی با واسطهٔ سایتوکین‌هایی چون IFN-γ، IL-2 و غیره با تقویت پاسخ ضد توموری، تحلیل تومور همراه است.[۱۸و۱۹] بر این مبنا در این مطالعه سنجش IL-4 و IFN-γ

Archive of SID

www.SID.ir

به‌عنوان نمایندگان تیپ‌های سایتوکینی Th1 و Th2 مورد سنجش قرار گرفت و مشاهده گردید که میزان ترشح سایتوکین IL-4 و INF-γ در تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و نسبت INF-γ به IL-4 نیز افزایش یافته بود که نشان‌دهنده تیپ‌های سایتوکینی Th1 می‌باشد. این تحقیق نشان می‌دهد که مایع رویی سلول‌های لنفوسیت T، تاثیر مثبت بر عملکرد و فنوتیپ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت خون دارد و باعث القای بلوغ در این سلول‌ها می‌شود. سلول‌های دندریتیک تولید شده از نوع DC1 بوده که در ایمونوتراپی تومور موثر می‌باشند.

References

1. Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, et al. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(7):3038-42.
2. Brossart P, Bevan MJ. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 1997;90(4):1594-9.
3. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996;26(3):659-68.
4. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996;183(1):317-22.
5. Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145^{+}, MHC CLASS II^{+}, B7-1^{dim}, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* 2003;60(12):1539-45.
6. Kato K, Takaue Y, Wakasugi H. T-cell-conditioned medium efficiently induces the maturation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2001;70(6):941-9.
7. Dudda JC, Simon JC, Martin S. Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol* 2004;172(2):857-63.
8. Stick SM, Holt PG. The airway epithelium as immune modulator: the LARC ascending. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(6):641-4.
9. Kato K, Takaue Y, Wakasugi H. T-cell-conditioned medium efficiently induces the maturation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2001;70(6):941-9.
10. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2(1):52-8.
11. Goxe B, Latour N, Chokri M, Abastado JP, Salcedo M. Simplified method to generate large quantities of dendritic cells suitable for clinical applications. *Immunol Invest* 2000;29(3):319-36.
12. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
13. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164(3):1269-76.
14. Bitton RJ. Cancer vaccines: a critical review on clinical impact. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6(1):17-26.
15. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
16. Grégoire M, Ligeza-Poisson C, Juge-Morineau N, Spisek R. Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* 2003;21(7-8):791-4.
17. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159(10):4772-80.
18. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from CD4+ T cells. *J Immunol* 1995:154:5071.
19. 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. *Cell Immunol* 2009;257(1-2):23-31.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 1, April 2011: 1-9

The effects of T-cell conditioned media on the induction of dendritic cell (DC1) maturation for effective tumor immunotherapy

Masoumeh Asadi MSc.[1*]
Farah Farokhi PhD.[1]
Meysam Ganji Bakhsh MSc.[1]
Nowruz Delirezh PhD.[2]
Vahid Nejati PhD.[1]
Keykavos Gholami MSc.[1]

1- Department of Biology and Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: January 08, 2011 Accepted: February 05, 2011

Abstract

Background: Nowadays, dendritic cells (DC) are used for tumor immunotherapy as they can induce immune responses against tumor cells. In this research, we comprehensively studied the maturation stimulus addition, PHA-activated T-cell (PHA-TCM) conditioned medium, autologous monocyte-conditioned medium (MCM) and TNF-α for their ability to promote uniformly mature dendritic cells that elicit T-cell responses.

Methods: Plastic adherent monocytes were cultured with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) for five days and two days with monocyte-conditioned medium (MCM), tumor necrotizing factor-α (TNF-α) without TCM (PHA-activated T-cell conditioned medium). Phenotypic and functional analyses were carried out using anti-CD14, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD83 monoclonal antibodies. Phagocytic activity, mixed lymphocyte reaction (MLR) and cytokine production were also evaluated.

Results: The generated dendritic cells had high expression of surface molecules i.e. CD80, CD83, CD86 and HLA-DR. Moreover, the cells had low phagocytic and high T-lymphocyte stimulating activities. Measurement of the produced cytokines showed the generation of type-1 dendritic cells (DC1) in the study.

Conclusion: The findings indicated that more efficient maturation of dendritic cells could be achieved by the use of PHA-activated T-lymphocyte conditioned medium in the culture medium. The aforesaid supernatant can be used as a maturation factor for the production of efficient dendritic cells with the ability to be used for tumor immunotherapy. This conditioned medium can provide new strategies and evolve into more advance tools for the generation of dendritic cells in vitro for tumor immunotherapy.

Keywords: Conditioned media, dendritic cells, T-lymphocyte, tumor immunotherapy.

* Corresponding author: Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran, Postal Code: 5715915199
Tel: +98-935-7860101
email: masome.asadi@gmail.com

www.SID.ir