Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

کومش- جلد ۲۳، شماره ۱ (پیاپی ۸۱)، زمستان ۱۳۹۹

بررسی اثر اینترلوکین-۲۷ بر فعالیت سلول‌های طبیعی کشنده مغز استخوان در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن در شرایط آزمایشگاهی

عبدالوحید صادق‌نژاد [۱] (M.Sc)، مارال همتی [۱] (M.Sc)، مهرنوش پاشایی [۲و۱] (Ph.D)، زهرا رسولی‌نژاد [۱] (M.Sc)، فرحناز قهرمانفرد [۱] (M.D)، پرویز کوخایی [۳و۱*] (Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه انکولوژی-پاتولوژی، بیوکلینیکوم، دانشگاه بیمارستان سولنا و انستیتو کارولینسکا، استکهلم، سوئد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۵۱۷۷۶۸۸۹ ۸ ۴۶+ parviz.kokhaei@ki.se

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲

چکیده

هدف: نقص در عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی از مهم‌ترین علل رشد و گسترش سلول‌های توموری بوده و استفاده از سایتوکاین‌های محرک سیستم ایمنی، از جمله درمان‌های جدید در بدخیمی‌های‌خونی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر اینترلوکین ۲۷ (IL-27) بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) مغز استخوان افراد مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا ۱۰ml آسپیره مغز استخوان از ۵ بیمار مبتلابه CLL جمع‌آوری و سلول‌های تک‌هسته‌ای آن با استفاده از روش گرادیان فایکول جداسازی‌شده و سلول‌های NK با روش MACS تخلیص شدند. سلول‌های تک هسته‌ای (BMCs) در محیط کشت RPMI در حضور و عدم‌حضور IL-27 نوترکیب انسانی (۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند. میزان بیان CD69 بر روی سلول‌های NK تخلیص‌شده و BMCs با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های NK تخلیص‌شده به‌عنوان سلول کشنده با رده‌سلولی K562 به عنوان سلول هدف در سه نسبت سلول کشنده (Effector) به سلول هدف (Target) (E:T) معادل با ۲/۵:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱ مجاور و میزان مرگ سلول‌های هدف با استفاده از Annexin V/7-AAD بررسی‌شد.

یافته‌ها: مطابق نتایج به‌دست‌آمده IL-27 موجب افزایش بیان CD69 در سطح سلول‌های NK تخلیص شده، گردیده است (P=۰/۰۵)؛ در حالی‌که میزان بیان CD69 سلول‌های NK تخلیص نشده (BMCs) در مجاورت با IL-27 افزایش معناداری نشان نداد (P=۰/۰۶). هم‌چنین نتایج تست‌کشندگی نشان داد در نسبت ۱۰:۱ میزان کشندگی سلول NK افزایش معناداری داشته است (P=۰/۳)، اما در نسبت‌های ۲/۵:۱ و ۵:۱ این تفاوت معنادار نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: IL-27 می‌تواند موجب تقویت عملکرد سلول‌های NK مغز استخوان در CLL شده و کشندگی آن‌ها را علیه سلول‌های بدخیم افزایش دهد. حاصل دست‌آوردهای این مطالعه می‌تواند در مطالعات کارآزمایی بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین-۲۷، لوسمی لنفوسیتی مزمن، سلول کشنده طبیعی

مقدمه

سالانه ۴/۹ نفر به ازای هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر در کشورهای غربی به بیماری لوسمی لنفوئیدی مزمن (CLL)، شایع‌ترین نوع لوسمی، مبتلا می‌شوند [۱]. در کشورهای آسیایی نیز شیوع این نوع لوسمی کم‌تر، اما رو به افزایش است [۳،۲]. با افزایش سن، به‌ویژه در سنین بالای ۷۰ سال، خطر ابتلا بیش‌تر شده و در مردان ۲ برابر زنان می‌باشد. اگر چه عوامل محیطی و ژنتیکی، سن، جنسیت، نژاد و سابقه خانوادگی ابتلا به بدخیمی‌های خونی از جمله فاکتورهای خطر محسوب می‌شوند، اما هم‌چنان علت اصلی این بیماری ناشناخته باقی‌مانده است [۵،۴]. در CLL، لنفوسیت‌های B از نظر مورفولوژی طبیعی، اما از نظر ایمونولوژی کم‌تر بلوغ یافته‌اند. از منظر آزمایشگاهی تعداد سلول‌های توموری، به بیش از ۵۰۰۰ در میلی‌متر مکعب افزایش یافته و در خون، مغز استخوان و غدد لنفاوی تجمع می‌یابند [۷،۶].

از جمله عوامل درمانی متعددی که در CLL مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به رژیم‌های شیمی‌درمانی، عوامل آلکیله کننده مانند کلرامبوسیل و یا آنالوگ‌های پورینی مثل فلودارابین

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

اشاره نمود که دارای عوارض جانبی بوده و بهبودی کامل به‌ویژه در CLL پیش‌رونده، به ندرت حاصل می‌شود. از این رو، استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، سایتوکاین‌ها، ریزمولکول‌ها و سلول درمانی در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی به عنوان جایگزین درمانی امیدوارکننده در CLL مطرح شده‌اند [۸].

مغز استخوان که زیستگاه سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSCs) می‌باشد، محلی است که فرایند تومورزایی نیز در آن رخ می‌دهد [۹]. تعامل ریزمحیط مغز استخوان جهت بقای سلول‌های بدخیم CLL ضرورت دارد؛ زیرا از طرفی سلول‌های بدخیم در حفرات مخفی مغز استخوان پنهان شده و از اثر درمان‌ها می‌گریزند، از طرف دیگر با دریافت سیگنال‌های بقا از طریق پذیرنده‌های کمکی هم‌چون CD40، پذیرنده‌های شبه تول (TLRs) و پذیرنده‌ی لنفوسیت B (BCR) از سلول‌های موجود در ریزمحیط اطراف از قبیل سلول‌های استرومایی مزانشیمی و شبه پرستار (NLCs)، کلون‌های سلولی مقاوم به درمان/عود مجدد را شکل می‌دهند. هم‌چنین این ریز محیط با تولید فاکتورهای تنظیمی، پاسخ‌های ایمنی را سرکوب می‌نماید. نتایج مطالعه‌ی Pradier نشان می‌دهد سلول‌های استرومایی مزانشیمی (MSCs) دارای نقش تنظیمی روی سلول‌های T و NKآلوژنیک و اتولوگ هستند؛ در حقیقت سلول‌های MSCs تکثیر سلول‌های NK، تولید اینترفرون–گاما (IFN-γ) و فعالیت سایتوتوکسیک این سلول‌ها را کاهش می‌دهند [۱۰].

سلول‌های NK که حدود ۵–۱۵٪ از جمعیت سلول‌های تک هسته‌ای (PBMC) را در خون‌محیطی به خود اختصاص می‌دهند بازوی اجرایی اصلی سیستم ایمنی ذاتی علیه تومورها هستند و متعاقب فعال شدن از طریق مسیری وابسته به شناسایی مولکول MHC-I، کموکاین و سایتوکاین‌هایی که میانجی‌گر/افزاینده پاسخ‌های التهابی، رشد و فعال‌سازی گرانولیست‌ها و مونوسیت‌ها هستند، را تولید نموده و در تقویت پاسخ‌های سلول T نیز مؤثر می‌باشند [۱۱]. در بیماری CLL با توجه به درجه تمایز بیماری، شبکه سایتوکاینی و لیگاندها تغییر کرده و پاسخ سیستمیک نهایتاً به نفع تومور تنظیم می‌شود. به طور مثال لیگاندهای مربوط به گیرنده‌های تحریکیNKG2D و NKp30 در سطح لنفوسیت‌های B توموری دچار کاهش بیان شده و به صورت محلول در سرم تبدیل به راهی برای گریز از پاسخ سلول‌های دفاعی می‌شوند [۱۲]. هم‌چنین در CLL تولید سایتوکاین‌های محرک هم‌چون IFN-γ و IL-12 کاهش و در مقابل سایتوکاین‌های تنظیمی مثل IL-10 و فاکتور رشد تغییردهنده–بتا (TGF-β) افزایش می‌یابد که موجب کاهش دگرانولاسیون سلول NK، حساسیت بیش‌تر به آپوپتوز و در نتیجه بقای کم‌تر این سلول می‌شود [۱۴،۱۳]. علاوه بر این، سطح میانجی‌گرهای کشنده‌ی محلول سلول NK شامل پرفورین و گرانزیم نیز در بیماری CLL کاهش می‌یابد [۱۵]. نتایج بررسی‌های ریزآرایه (microarray) ژن‌های دخیل در فرآیند کشندگی سلول NK توسط Parry و همکارانش نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان این ژن‌ها در CLL می‌باشد [۱۶].

به نظر می‌رسد تقویت سلول‌های ایمنی هم‌چون لنفوسیت‌های T و کشنده طبیعی (NK) با استفاده از سایتوکاین‌هایی از قبیل اینترلوکین ۲ (IL-2)، IL-12، IL-15 و IL-18، می‌تواند در بهبود بیماران مبتلا به CLL مفید واقع شود [۱۸،۱۷]. IL-27 یکی از اعضای خانواده IL-12 که عمدتاً توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APCs) تولید می‌شود بر فعالیت سلول NK موثر است [۲۰،۱۹]. IL-27 در ترکیب با IL-12 منجر به تولید بیش‌تر IFN-γ، افزایش فعالیت لنفوسیت‌های T کشنده (CTLs) و تکامل سلول‌های NK شده [۴۹]، هم‌چنین موجب القای بیان فاکتورهای نسخه‌برداری T-bet، Eomesodermin و مولکول‌های اجرایی پرفورین و گرانزیم و القای پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی علیه تومور (ADCC) می‌شود [۲۱]. با توجه به اهمیت سلول‌های NK مغز استخوان در دفاع علیه سلول‌های بدخیم در CLL و اثرات ضدتوموری به اثبات رسیده IL-27 در انواع بدخیمی‌های خونی، لذا در مطالعه‌ی حاضر اثرات این سایتوکاین بر فعالیت سلول‌های NK مغز استخوان در بیماران مبتلا به CLL مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

میزان ۱۰ml نمونه آسپیراسیون مغز استخوان از ۵ بیمار مبتلا به CLL شامل ۳ زن و ۲ مرد با محدوده سنی ۶/۸±۶۱/۱۱ سال (میانگین± انحراف معیار)، که بیماری آن‌ها توسط پزشک متخصص بر اساس معیارهای کار گروه بین‌المللی لوسمی لنفوسیتی مزمن (IWCLL) تشخیص داده شده و درمانی دریافت نکرده‌اند، پس از اخذ رضایت آگاهانه در بخش انکولوژی بیمارستان کوثر سمنان جمع‌آوری و به لوله‌ی حاوی ضد انعقاد هپارینه منتقل شد. ویژگی‌های بالینی بیماران در جدول ۱ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

جدول ۱. اطلاعات بالینی بیماران مبتلا به CLL شرکت کننده در مطالعه

کد بیمار	جنسیت	سن	تعداد گلبول سفید/میکرولیتر خون محیطی
۱	زن	۸۰	۱۲۰×۱۰^{۳}
۲	مرد	۵۵	۱۸×۱۰^{۳}
۳	زن	۵۰	۵۴×۱۰^{۳}
۴	زن	۵۷	۳۱×۱۰^{۳}
۵	مرد	۶۶	۴۶×۱۰^{۳}

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای و تهیه جمعیت سلولی غنی از سلول NK

سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان با استفاده از فایکول (Amersham, Uppsala, Sweden) جداسازی شدند؛ به این ترتیب که در ابتدا جهت حذف تجمعات سلولی مغز استخوان از فیلتر (سایز منافذ ۱۰۰ میکرومتر) استفاده شد و در مرحله بعد نمونه رقیق شده با بافر فسفات‌سالین (pH=۷/۲-۷/۴) به نسبت ۵ به ۱ (به ترتیب بافر فسفات‌سالین: نمونه آسپیره مغز استخوان) به آرامی روی فایکول ریخته و به مدت ۳۵ دقیقه با نیروی ۴۴۵×g در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. نیمی از سلول‌های تک هسته‌ای پس از جداسازی و شمارش به عنوان سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان (BMCs) با محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, Invitrogen Corp, USA) کشت داده شدند و مابقی سلول‌ها جهت تهیه جمعیت غنی از سلول NK در محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۵٪ FBS در ستون Nylon wool ریخته شده و به مدت ۱ ساعت ستون به حالت عمودی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بدین ترتیب سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و لنفوسیت‌های B به الیاف موجود در ستون متصل شده و با تخلیه ستون جمعیت غنی از سلول‌های T و NK جدا شدند [۲۲].

تخلیص سلول‌های NK با روش MACS

به منظور تخلیص سلول‌های NK از گزینش مثبت روش MACS با استفاده از میکروبیدهای متصل به آنتی‌بادی علیه مارکر CD56 (mAb; Miltenyi Biotec, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به این ترتیب که سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه به میزان مشخصی از میکروبید CD56- بروی یخ انکوبه شدند و پس از آن روی ستون ریخته شدند. با قرار گرفتن ستون در میدان مغناطیسی، سلول‌های بیان‌کننده CD56 به ستون متصل و مابقی سلول‌ها خارج شدند و در نهایت با شست‌وشوی ستون سلول‌های مورد نظر به دست آمدند. میزان خلوص سلول‌های $CD56^{+}$ با روش فلوسایتومتری بیش از ۹۰٪ گزارش شد.

کشت سلول‌های NK/BMC به منظور سنجش مارکر CD69

به منظور بررسی اثر IL-27 بر فعالیت سلول‌های NK از طریق سنجش میزان CD69، تعداد ۱۰^{۵} سلول BMCs (تخلیص‌نشده) و NK تخلیص شده با محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین در حضور و عدم حضور IL-27 (غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) (R&D systems, USA) در پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ دی‌اکسید کربن و ۹۵٪ رطوبت) کشت داده شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، تعداد ۱۰^{۵} سلول جمع‌آوری و شست‌وشو داده شدند و با غلظت مناسب (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) از آنتی‌بادی‌های موشی علیه مارکرهای انسانی (Mouse Anti-human) CD56-PE، CD3-APC و CD69-FITC به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتر (Partec, Münster, Germany) مورد خوانش قرار گرفتند؛ به این صورت که درصد بیان CD69 در سطح سلول‌های $CD3^{-}$/$CD56^{+}$ با استفاده از نرم‌افزار فلوجو ورژن ۱۰،۵،۳ (FLOWJO LLC, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش میزان کشندگی سلول NK

به منظور بررسی اثر IL-27 بر میزان کشندگی سلول‌های NK، سلول‌های NK تخلیص شده که در حضور و عدم حضور IL-27 (غلظت ۱۰۰نانوگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند، به عنوان سلول‌های کشنده و رده‌ی سلولی K562 به عنوان سلول هدف در سه نسبت سلول اجرایی/سلول هدف (E:T) معادل با ۲/۵:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱ [۲۴،۲۳] در پلیت‌های ۹۶ خانه به حجم نهایی هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر کشت داده شدند و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. هم‌چنین یک چاهک که تنها حاوی سلول‌های K562 و محیط کشت بوده است جهت بررسی میزان مرگ خودبه‌خودی و یک چاهک حاوی سلول K562 که در ۱۵ دقیقه انتهای زمان انکوباسیون به آن اتانول ۷۰٪ افزوده شد، به عنوان کنترل مثبت و نشان‌دهنده حداکثر مرگ سلولی در نظر گرفته شد. به منظور بررسی میزان مرگ سلول‌های هدف پس از پایان زمان کشت، سلول‌ها با رنگ‌های Annexin v-FITC و 7-AAD (Biolegend, USA) رنگ‌آمیزی شدند و درصد کشندگی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد کشندگی} = \frac{\text{مرگ خودبخودی} - \text{مرگ گروه تست}}{\text{مرگ خودبخودی} - \text{حداکثر مرگ}} \times 100$$

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 و GraphPad Prism (version 8.0.1) انجام شد. برای بررسی نحوه توزیع متغیرهای عددی پیوسته از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها جهت مقایسه دو گروه تیمار و کنترل از آزمون پارامتریک paired two-tailed t-test و در مورد تست‌های کشندگی از آزمون ANOVA استفاده شد. هم‌چنین در صورت عدم نرمال بودن توزیع داده‌ها آزمون آماری Wilcoxon matched-pairs signed rank test مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و $P<۰/۰۵$ به صورت معنادار در نظر گرفته شد.

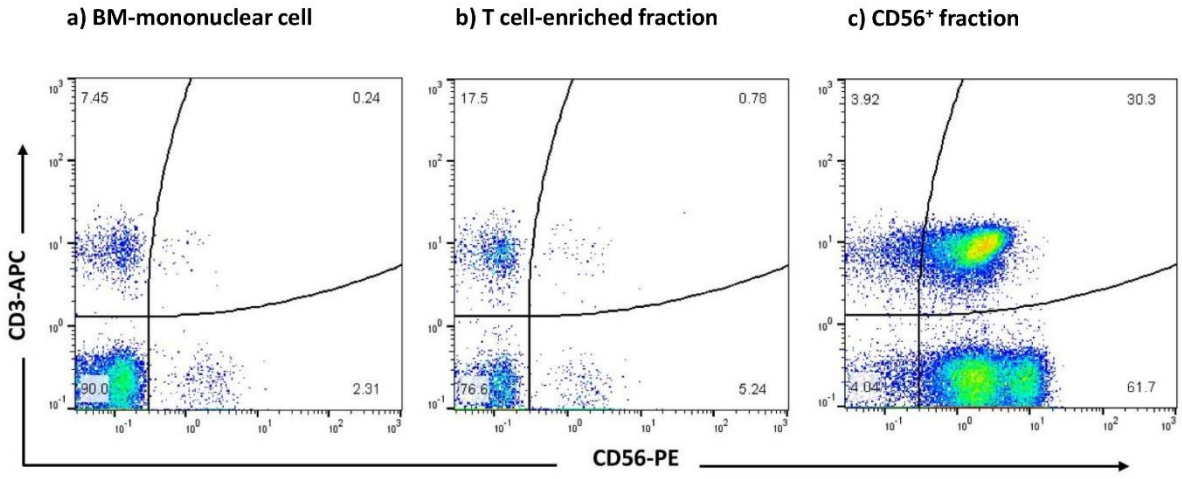
نتایج

اثر IL-27 بر میزان بیان CD69 در سطح سلول‌های NK

به منظور بررسی اثر ریزمحیط توموری بر فعالیت سلول‌های NK مغز استخوان، اثر سایتوکاین به طور مجزا بر روی سلول‌های $CD3^-/CD56^+$ موجود در جمعیت BMCs (تخلیص‌نشده) و سلول‌های NK تخلیص شده که مطابق شکل ۱ دارای خلوص بیش از ۹۰٪ می‌باشند، مورد سنجش قرار گرفت. مطابق نتایج به دست آمده، میزان بیان CD69 در سطح سلول‌های NK تخلیص‌نشده که در مجاورت با IL-27 قرار گرفتند در مقایسه با گروه کنترل (عدم حضور IL-27)، افزایش یافته، اما این تفاوت معنادار نبود ($P=۰/۰۶$). این در حالی است که میزان بیان CD69 در سلول‌های NK تخلیص شده پس از کشت با IL-27 افزایش معناداری را نشان داد ($P=۰/۰۵$) (شکل ۲).

توانایی کشندگی سلول‌های NK تحت اثر IL-27

به منظور بررسی اثر IL-27 بر فعالیت کشندگی سلول‌های NK، سلول‌های NK تخلیص شده در دو گروه مجاور شده با سایتوکاین و کنترل، در سه نسبت ذکر شده با سلول‌های K562 هم کشتی داده شدند. نتایج نشان می‌دهد در نسبت ۲/۵:۱ و ۵:۱ میزان کشندگی سلول‌های NK که با IL-27 کشت داده شده نسبت به گروه کنترل افزایش داشته، اما این افزایش معنادار نمی‌باشد ($P=۰/۰۷$ و $P=۰/۰۶$ به ترتیب برای نسبت‌های ۲/۵:۱ و ۵:۱). این در حالی است که با افزایش تعداد سلول‌های NK به سلول‌های توموری K562، در نسبت ۱۰:۱، افزایش معناداری در میزان کشندگی سلول‌های مجاور شده با IL-27 در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P=۰/۰۳$) (شکل ۳).

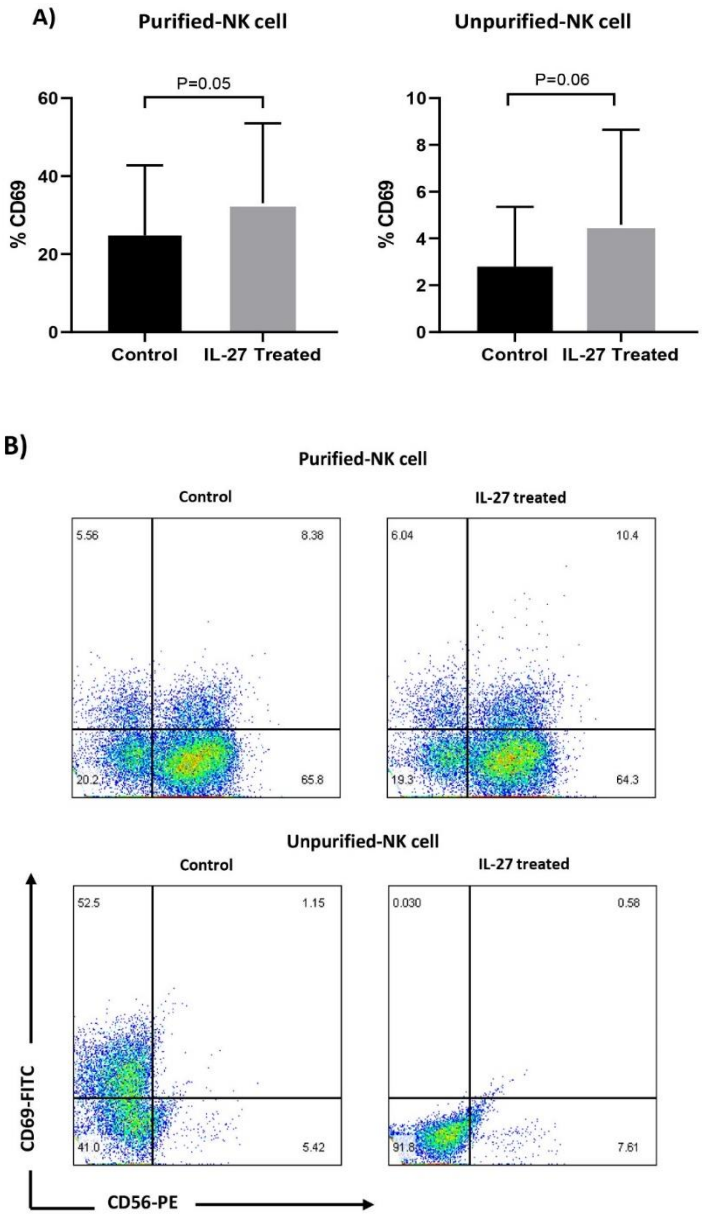


شکل ۱. سنجش میزان خلوص سلول‌های NK به روش MACS. به منظور بررسی خلوص سلول‌های NK از آنتی‌بادی‌های CD56-PE، CD3-APC استفاده شد. درصد سلول‌های NK در a) سلول های تک هسته ای مغز استخوان؛ b) جمعیت سلولی تک هسته‌ای غنی از سلول T و NK حاصل از Naylon wool؛ c) جمعیت $CD56^+$ حاصل از گزینش مثبت روش MACS، مشاهده می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

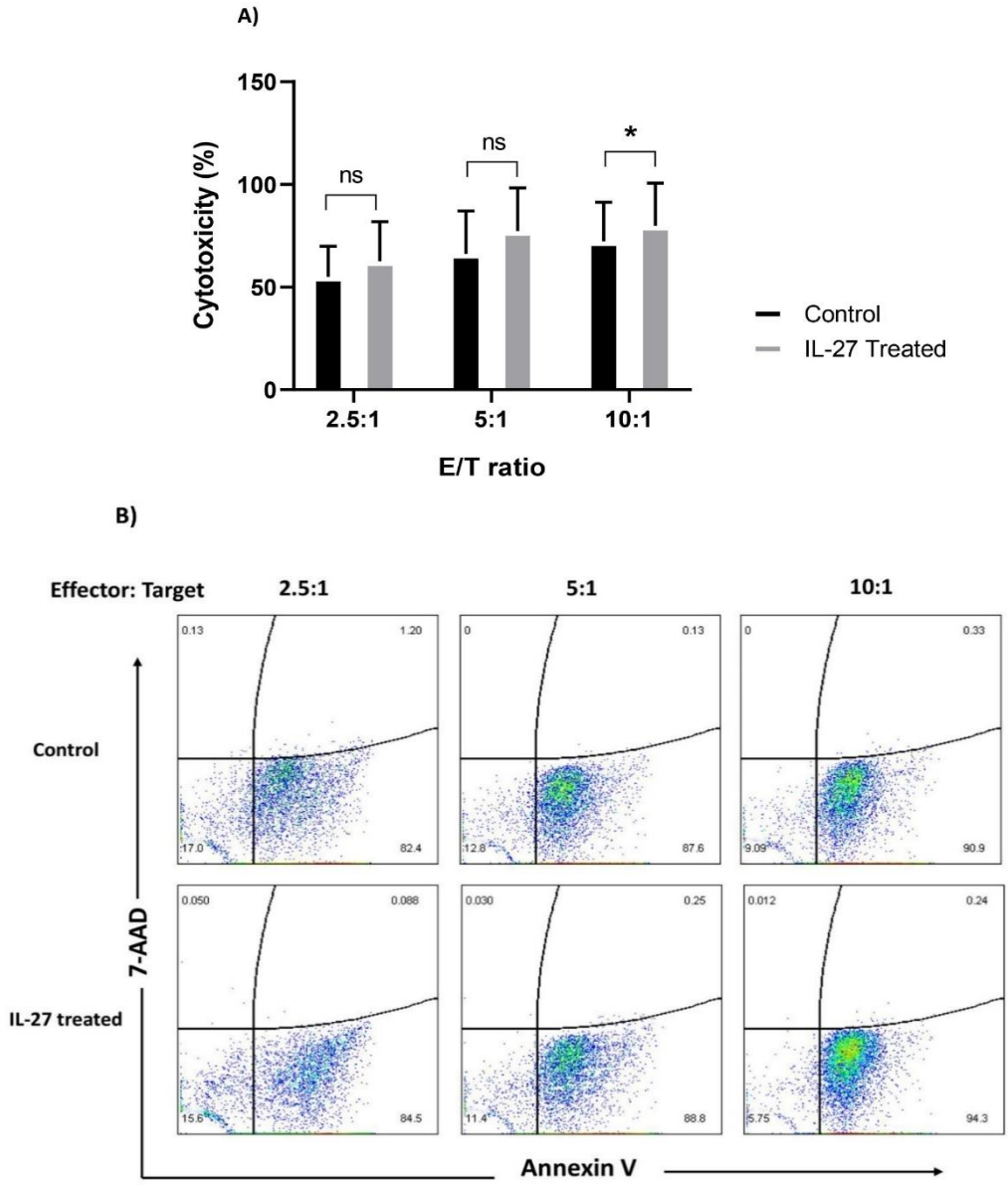


شکل ۲. بررسی اثر IL-27 بر میزان بیان CD69 در سطح سلول های NK. به منظور بررسی اثر IL-27 بر میزان بیان CD69 در سطح سلول‌های NK مغز استخوان (در حالت تخلیص شده و نشده)، این سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در حضور و عدم حضور IL-27 (۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) کشت داده شدند و پس از آن با آنتی بادی‌های CD56-PE، CD69-FITC و CD3-APC رنگ آمیزی شدند. A) میزان بیان CD69 در سطح سلول‌های NK تخلیص شده متعاقب تیمار با IL-27 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری را نشان می‌دهد (P=۰/۰۵). هم‌چنین سایتوکاین موجب افزایش اندک بیان CD69 در سلول‌های NK تخلیص نشده، شده است، اما این تفاوت معنادار نمی‌باشد (P=۰/۰۶). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. B) نتایج فلوسایتومتری میزان بیان CD69 در سطح سلول‌های NK تخلیص شده و نشده متعلق به یکی از بیماران دخیل در مطالعه آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021



شکل ۳. اثر IL-27 بر میزان کشندگی سلول‌های NK مغزاستخوان. جهت بررسی اثر IL-27 برفعالیت کشندگی سلول‌های NK، این سلول‌ها در ۳ نسبت متفاوت E:T معادل با 2.5:1، 5:1 و 10:1 با سلول‌های K562 در حضور و عدم حضور IL-27 کشت داده شدند و جهت بررسی میزان مرگ سلول‌های هدف (K562) از رنگ آمیزی Annexin v/7-AAD استفاده شد. A) میزان کشندگی سلول‌های NK تیمار شده با IL-27 در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داده است، اما این افزایش تنها در با افزایش نسبت سلول NK در کشت، معادل با نسبت 10:1 معنادار بوده است (P=0.07، P=0.06 و P=0.03 به ترتیب برای نسبت های 2.5:1، 5:1 و 10:1). B) نتایج فلوسایتومتری میزان کشندگی سلول‌های NK متعلق به یکی از بیماران دخیل در مطالعه آورده شده است. جهت سنجش میزان مرگ سلول‌های هدف از Annexin v/7-AAD استفاده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، IL-27 قادر به القاء افزایش فعالیت سلول‌های NK تخلیص شده مغز استخوان در افراد مبتلا به CLL از طریق افزایش CD69 در این سلول‌ها شده است (*P*=۰/۰۵). این در حالی است که سلول‌های NK مغز استخوان موجود در BMCs (تخلیص نشده) این افراد در مجاورت با IL-27 در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری در میزان CD69 نداشته‌اند (*P*=۰/۰۶). علاوه بر این بررسی نتایج اثر IL-27 بر فعالیت کشندگی سلول‌های NK در نسبت‌های E:T معادل با ۲/۵:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱ بیانگر آن است که با افزایش نسبت E:T فعالیت کشندگی این سلول‌ها افزایش می‌یابد (*P*=۰/۰۳).

لوسمی لنفوسیتی مزمن نوعی بدخیمی خونی ناشی از تکثیر و تجمع بیش از حد لنفوسیت‌های B بالغ کوچک $CD5^+$، $CD19^+$ و $CD23^+$ می‌باشد که در ایران شیوع بین ۱۵-۱۱٪ از انواع مختلف لوسمی دارد [۲۵]. در CLL همچون سایر بدخیمی‌های خونی علاوه بر مکانسیم‌های سلول‌های توموری برای گریز از پاسخ‌های سیستم ایمنی، در عملکرد اجزای سیستم ایمنی نیز نقص و آشفتگی وجود دارد [۲۶]. بنابراین محققان با

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

استفاده از سایتوکاین‌های مختلف مثل IL-2، IL-12 و IL-18 سعی در فعال کردن سلول‌هایی هم‌چون CTL و NK دارند. ازجمله مهم‌ترین نقص‌های سیستم ایمنی در CLL، نقص عملکرد سلول‌های NK می‌باشد و تلاش در جهت تقویت پاسخ‌های سلول NK از موضوعات مورد بررسی طیف وسیعی از مطالعات است [۱۵]. سایتوکاین IL-27 به عنوان عضوی از خانواده IL-12 اثرات ضدتوموری متعددی را از طریق مکانیسم‌های گوناگون هم‌چون اثرگذاری بر سلول‌های NK، CTL و فعالیت ADCC، مهار آنژیوژنز و آنزیم سیکلواکسیژناز ۲، هم‌چنین مهار مستقیم رشد تومور نشان داده است [۲۷]. از جمله مهم‌ترین مکانیسم اثرگذار IL-27 در القاء پاسخ‌های ضدتوموری، فعال نمودن سلول NK است [۲۸].

باتوجه به اهمیت ریزمحیط مغز استخوان در شکل‌گیری کلون‌های سلولی مقاوم به درمان در CLL، تلاش در جهت تقویت فعالیت سلول‌های NK موجود در این ریزمحیط می‌تواند در افزایش پاسخ‌دهی سیستم ایمنی مغز استخوان حائز اهمیت باشد. طبق نتایج این مطالعه، تخلیص سلول‌های NK مغز استخوان به منظور تقویت عملکرد آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی میزان پاسخ‌دهی این سلول‌ها را به اثرات تحریکی IL-27 افزایش می‌دهد. وجود ریزمحیط مهاری مغز استخوان در CLL که مستقیماً عملکرد سلول‌های NK را کاهش می‌دهد، از جمله دلایل احتمالی حصول این نتایج است که میزان اثر IL-27 را بر فعالیت سلول‌های NK موجود در BMCs (حالت تخلیص نشده) مهار نموده است. علاوه بر این، با افزایش تعداد سلول‌های NK نسبت به سلول‌های هدف K562، میزان کشندگی در گروه تیمار شده با IL-27 در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داده است. به منظور تائید نتایج به‌دست آمده می‌توان به مطالعه‌ی Dondero اشاره نمود؛ در این مطالعه اثر IL-27 به مدت ۴۸ ساعت بر فعالیت سلول‌های NK مغز استخوان در بیماری مالتیپل میلوما مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج این مطالعه، IL-27 توانست به‌صورت معناداری میزان بیان CD69، NKG2D و هم‌چنین کشندگی علیه رده‌ی سرطانی EA (رده سلولی اندوتلیال انسانی) را افزایش دهد [۲۹]. علاوه بر این، زیر رده‌ای از سلول‌های NK به نام $CD56^{low}/CD16^{low}$ وجود داشته که در شرایط فیزیولوژیک در مغز استخوان نسبت به خون محیطی فراوانی بیش‌تری دارند. این سلول‌ها فعالیت دگرانولاسیون بالاتری داشته، IFN-γ بیش‌تری تولید نموده و توانایی کشندگی بیش‌تری دارند [۳۰]. بنابراین تصور می‌شود محیط مغز استخوان به علت حضور تعداد کم‌تری سلول بدخیم و فاکتورهای مهاری، جایگاه بهتری جهت تقویت سلول‌های ایمنی می‌باشد. با توجه به آن‌چه ذکر شد، تصور می‌شود تلاش در جهت تقویت عملکرد سلول‌های NK مغز استخوان در CLL نسبت به سلول‌های موجود در خون محیطی این بیماران، می‌تواند کارایی بالاتری در جهت حذف سلول‌های توموری داشته باشد. بر اساس نتایج مطالعه‌ای که توسط این گروه به منظور مقایسه‌ی اثر IL-27 بر فعالیت سلول‌های NK مغز استخوان و خون محیطی در افراد مبتلا به CLL صورت گرفت، میزان پاسخ‌دهی سلول‌های NK مغز استخوان از طریق افزایش میزان بیان CD69، میزان دگرانولاسیون و هم‌چنین میزان فعالیت کشندگی، در مقایسه با سلول‌های NK خون محیطی افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد، که به توانایی بالقوه این سلول‌های موجود در مغز استخوان اشاره دارد [۳۱]. علی‌رغم نتایج قابل توجه این مطالعه، کوچک بودن جامعه آماری و دشواری در تهیه نمونه آسپیره‌ی مغز استخوان از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت تیمار سلول‌های NK مغز استخوان افراد مبتلا به CLL با سایتوکاین IL-27 با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی قادر است فعالیت این سلول‌ها را به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد. هم‌چنین فعالیت کشندگی سلول‌های NK مغز استخوان در مجاورت با IL-27 نیز افزایش می‌یابد. بر اساس این یافته‌ها، تقویت تیمار سلول‌های NK مغز استخوان با IL-27 در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند فعالیت این سلول‌ها را در بیماری CLL افزایش دهد. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود اثرات ضدتوموری IL-27 به‌عنوان یک سایتوکاین محرک در جهت بهبود عملکرد و القاء فعالیت کشندگی سلول‌های NK در بدخیمی‌های خونی در ترکیب با IL-2 یا IL-15، مورد بررسی‌های جامع‌تری واقع شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران جهت تامین بودجه تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد. این تحقیق بنیادی- کاربردی توسط کمیته‌ی اخلاق در پژوهش موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران به شناسه‌ی IR.NIMAD.REC.1396.207 مورد تصویب واقع گردید.

منابع

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin 2019; 69: 7-34.

[2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018; 68: 394-424.

[3] Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

[17] Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 2017; 17: 559.

[18] Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. Nat Immunol 2016; 17: 1025.

[19] Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. PLoS One 2009; 4: e7965.

[20] Huber M, Steinwald V, Guralnik A, Brüstle A, Kleemann P, Rosenplänter C, et al. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. Int Immunol 2007; 20: 223-234.

[21] Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T, et al. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cancer Res 2009; 69: 2523-2530.

[22] Whiteside TL. Isolation of human NK cells and generation of LAK activity. Curr Protoc Immunol 1996; 17: 1-7, 11.

[23] Lee HR, Son CH, Koh EK, Bae JH, Kang CD, Yang K, Park YS. Expansion of cytotoxic natural killer cells using irradiated autologous peripheral blood mononuclear cells and anti-CD16 antibody. Sci Rep 2017; 7: 1-13.

[24] Shi C, Tjwa E, Biesta P, Boonstra A, Xie Q, Janssen H, Woltman A. Hepatitis B virus suppresses the functional interaction between natural killer cells and plasmacytoid dendritic cells. J Viral Hepat 2012; 19: e26-e33.

[25] Ghojogh M, Kor Y, Rafiemanesh H. Leukemia in Iran: epidemiology and morphology trends. Asian Pac J Cancer Prev 2015; 16: 7759-7763.

[26] Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. Blood 2015; 126: 573-581.

[27] Canale S, Cocco C, Frasson C, Seganfreddo E, Di Carlo E, Ognio E, et al. Interleukin-27 inhibits pediatric B-acute lymphoblastic leukemia cell spreading in a preclinical model. Leukemia 2011; 25: 1815.

[28] Keyser J, Schultz J, Ladell K, Elzaouk L, Heinzerling L, Pavlovic J, Moelling K. IP-10-encoding plasmid DNA therapy exhibits anti-tumor and anti-metastatic efficiency. Exp Dermatol 2004; 13: 380-390.

[29] Dondero A, Casu B, Bellora F, Vacca A, De Luisi A, Frassanito MA, et al. NK cells and multiple myeloma-associated endothelial cells: molecular interactions and influence of IL-27. Oncotarget 2017; 8: 35088.

[30] Stabile H, Nisti P, Morrone S, Pagliara D, Bertaina A, Locatelli F, et al. Multifunctional human CD56low CD16low natural killer cells are the prominent subset in bone marrow of both healthy pediatric donors and leukemic patients. Haematologica 2015; 100: 489-498.

[31] Hemati M, Nejad ZR, Shokri MR, Ghahremanfard F, Mohammadkhani MM, Kokhaei P. IL-27 impact on NK cells activity: Implication for a robust anti-tumor response in chronic lymphocytic leukemia. Int Immunopharmacol 2020; 82: 106350.

countries: a population-based study. Lancet Haematol 2018; 5: e14-e24.

[4] Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. The Lancet 2018; 391: 1524-1537.

[5] Sindhar S, Kallogjeri D, Wildes TS, Avidan MS, Piccirillo JF. Association of preoperative functional performance with outcomes after surgical treatment of head and neck cancer: a clinical severity staging system. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg 2019; 145: 1128-1136.

[6] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. Blood J Am Soc Hematol 2008; 111: 5446-5456.

[7] Moshfeghi K, Mosayebi G. Therapeutic effects of fludarabine-cyclophosphamide combined therapy in Iranian patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Koomesh 2015; 16. (Persian).

[8] Palma M, Kokhaei P, Lundin J, Choudhury A, Mellstedt H, Österborg A. The biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Ann Oncol 2006; 17: x144-x154.

[9] Kumar R, Godavarthy PS, Krause DS. The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance. J Cell Sci 2018; 131: jcs201707.

[10] Pradier A, Passweg J, Villard J, Kindler V. Human bone marrow stromal cells and skin fibroblasts inhibit natural killer cell proliferation and cytotoxic activity. Cell Transplant 2011; 20: 681-691.

[11] Moretta L, Montaldo E, Vacca P, Del Zotto G, Moretta F, Merli P, et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. Int Arch Allergy Immunol 2014; 164: 253-264.

[12] Nückel H, Switala M, Sellmann L, Horn P, Dürig J, Dührsen U, et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2010; 24: 1152.

[13] Antosz H, Wojciechowska K, Sajewicz J, Choroszyńska D, Marzec-Kotarska B, Osiak M, et al. IL-6, IL-10, c-Jun and STAT3 expression in B-CLL. Blood Cells Mol Dis 2015; 54: 258-265.

[14] Yan XJ, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2011; 118: 5201-5210.

[15] Katrinakis G, Kyriakou D, Papadaki H, Kalokyri I, Markidou F, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor (s) but not of tumour necrosis factor-α. Acta Haematol 1996; 96: 16-23.

[16] Parry HM, Stevens T, Oldreive C, Zadran B, McSkeane T, Rudzki Z, et al. NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. Oncotarget 2016; 7: 68513.

www.SID.ir

Archive of SID

Volume 23, Issue 1 (Winter 2021), 131-138

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.131]

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 8:55 +0330 on Saturday January 16th 2021

Effect of IL-27 on activity of bone marrow NK cells of patient with B-chronic lymphocytic leukemia *in vitro*

Abdolvahid Sadeghnejad (M.Sc)[1], Maral Hemati (M.Sc)[1], Mehrnoosh Pashaei (Ph.D)[1,2], Zahra Rasouli Nejad (M.Sc)[1], Farahnaz Ghahremanfard (M.D)[1], Parviz Kokhaei (Ph.D)[*1,3]

1- Cancer Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2- Dept. of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Dept. of Oncology-Pathology, BioClinicum, Karolinska University Hospital Solna and Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

* Corresponding author. +46 8-51776889 parviz.kokhaei@ki.se

Received: 18Jan 2020; Accepted: 23Aug 2020

Introduction: Functional defect in immune cells is the prominent feature in hematological malignancies that lead to the expansion of tumor cells. Using immunostimulatory cytokines is one of the new therapeutic approaches. This study aimed to investigate the effect of IL-27 on the activity of bone marrow-NK cells of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients in vitro.

Materials and Methods: 10 ml of bone marrow aspirate samples were collected from 5 patients with CLL and isolated monocular cells using Ficoll-Hypaque density gradient. NK cells were then purified by MACS technique. The mononuclear cells were cultured in RPMI with or without recombinant human IL-27 (100ng/ml) for 48 hours. Expression of CD69 was assessed on purified and unpurified NK cells (BMCs) using flow cytometry. Also, purified NK cells were adjacent to the target cells as the K562 cell line in E:T ratios of 2.5:1, 5:1 and 10:1, then the target cell survival was assessed by flow cytometry using Annexin V/7-AAD.

Results: The levels of CD69 expression on purified NK cells increased in IL-27 treated group in compared to the control (P=0.05). However, the expression level of CD69 in unpurified NK cells did not significantly increase with IL-27 treatment (P=0.06). Moreover, in the ratio of E/T:10, the NK cell cytotoxicity rate increased significantly (P=0.03), but this difference was not significant in the E:T ratios of 2.5 and 5.

Conclusion: IL-27 cytokine increased NK cell function and cytotoxic activity against malignant cells in CLL. The results of this study can be used in clinical trials in the future.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia, Interleukin-27, NK Cells.

www.SID.ir