Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 15(61): 73-83

Inducing dendritic cells maturation by human umbilical vein endothelial cells and PHA-activated T lymphocytes conditioned media

Ganji Bakhsh M(M.Sc)[1*], Asadi M(M.Sc)[1], Nejati V(PhD)[1], Delirezh N(PhD)[2], Farokhi F(PhD)[1]

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
2- Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 29 Feb 2011, Accepted: 13 Jun 2011

Abstract

Background: Since researchers were able to produce dendritic cells (DCs) from peripheral blood monocytes, many scientists have been in search of discovering the best way of producing dendritic cells and optimizing the DCs maturation processes in vitro to treat some diseases. The aim of this study was to investigate the maturation of DCs for tumor immunotherapy.

Materials and Methods: In this experimental study, DCs were produced in two stages. In the first stage, monocyte cells were converted to immature DCs by GM-CSF and IL-4. In the second stage, immature DCs were made mature in the presence of human umbilical vein endothelial cells and PHA - activated T lymphocytes conditioned media and maturation factors.

Results: The produced DCs with appropriate phenotype, phagocytosis ability, and proliferation of T lymphocytes stimulation traits could secrete high levels of cytokines.

Conclusion: Endothelial cells and T lymphocytes conditioned media can produce Th1 and DC1 in vitro. Therefore, DCs produced through this method are suitable for immunotherapy treatment applications and cancer treatment through treatment cells.

Keywords: Dendritic cell, Endothelial cell, Maturation, T lymphocyte

*Corresponding author:
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
Email: Meysam_Ganjy@Yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 2 (شماره پیاپی 61)، خرداد و تیر 1391، 83-73

القای بلوغ سلول‌های دندریتیک به وسیله مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین

میثم گنجی بخش[1*]، معصومه اسدی[1]، وحید نجاتی[2]، نوروز دلیرژ[3]، فرح فرخی[2]

1- کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
2- استادیار، دکترای بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
3- استادیار، دکترای ایمنی شناسی،گروه ایمنی شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: 89/12/11 تاریخ پذیرش: 90/3/25

چکیده

زمینه و هدف: از زمانی که محققین توانستند سلول‌های دندریتیک را از مونوسیت‌های خون محیطی متمایز کنند، دانشمندان بسیاری در پی یافتن بهترین راه تولید سلول‌های دندریتیک و بهینه سازی فرایند بلوغ این سلول‌ها، در شرایط آزمایشگاهی هستند تا از این سلول‌ها در درمان بیماری‌ها استفاده کنند. هدف از این مطالعه بلوغ سلول‌های دندریتیک مناسب ایمنی درمانی تومور می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تولید سلول‌های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول‌های مونوسیت تحت تاثیر سیتوکاین‌های GM-CSF و اینترلوکین-4 به سلول‌های دندریک نابالغ تبدیل شدند و در مرحله دوم این سلول‌ها در حضور مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین و عوامل بلوغ به سلول‌های دندریتیک بالغ تبدیل شدند.

یافته‌ها: سلول‌های دندریتیک تولید شده دارای ویژگی‌های مناسب از لحاظ فنوتیپ، توانایی فاگوسیتوز، میزان تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T بودند و قادر به ترشح مقادیر بالایی از سایتوکین‌ها بودند.

نتیجه‌گیری: مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و لنفوسیت‌های T باعث تولید سلول‌های دندریتیک نوع 1 و لفنوسیت‌های T یا دیگر نوع 1 در شرایط آزمایشگاهی می‌گردند. بنابراین سلول‌های دندریتیک تولید شده با این روش سلول‌هایی مناسب برای کاربردهای ایمنی درمانی و درمان سرطان از طریق سلول درمانی می‌باشند.

واژگان کلیدی: سلول دندریتیک، سلول اندوتلیال، بلوغ، لنفوسیت T

[*]**نویسنده مسئول:** ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: meysam_ganjy@yahoo.com

مقدمه

در سال 1994 محققین توانستند سلول‌های دندریتیک (Deneritic Cells-DC) را از مونوسیت‌های خون محیطی متمایز کنند و گزارش کردند که با کشت مونوسیت‌ها تحت تاثیر اینترلوکین-4 (Interleukin 4-IL-4) و فاکتور تحریکی گرانوسیت – ماکروفاژ(GM-CSF) سلول‌های دندریتیک حاصل می‌شوند(1). همین یافته پایه‌های استفاده از سلول‌های دندریتیک در ایمونوتراپی را پی‌ریزی کرد(2).

بعد از این کشف مهم، دانشمندان بسیاری در پی یافتن بهترین راه تولید سلول‌های دندریتیک و بهینه سازی فرایند بلوغ این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بودند زیرا در بیماران سرطانی سلول‌های دندریتیک تحت تاثیر عوامل سرکوب‌گر مختلفی که از سلول‌های توموری ناشی می‌شوند، عملکرد طبیعی خود را از دست داده و به خوبی نمی‌توانند نقش فعال سازی سلول‌ها را به عهده بگیرند. این عوامل سرکوب‌گر شامل عامل رشد اندوتلیال عروقی-(Vascular endothelial growth factor (VEGF)، عامل تغییر دهنده رشد- بتا (Transforming growthfactor beta- TGF- β)، IL-10 ، IL-6 و تعدادی از پروستانوئیدها می‌باشند. نبود مولکول‌های کمک تحریکی و سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های دندریتیک باعث ایجاد آنرژی(Anergy) در سلول‌های T دست نخورده، خاطره‌ای و عملگر شده و در واقع آنها را به سلول‌های T تنظیم گر (T regulatory-Trag) تبدیل می‌کند که برای فرار سلول‌های توموری از سیستم ایمنی مناسب می‌باشند. به علاوه عواملی مثل سرآمیدها، اینترلوکین-10، گانگلیوزیدها و نیتریک اکساید با قطعه قطعه کردن DNA سلول‌های دندریتیک باعث آپوپتوزیس این سلول‌ها می‌شوند. باید این نکته را خاطر نشان کرد که برخلاف سلول‌های دندریتیک نابالغ، انواع بالغ این سلول‌ها کمتر تحت تاثیر عوامل سرکوب‌گر تولید شده از سلول‌های توموری قرار می‌گیرند. به همین خاطر است که محققین به منظور بازیابی سیستم ایمنی افراد مبتلا به سرطان، از سلول‌های دندریتیک کاملاً بالغ استفاده می‌نمایند(3).

سلول‌های اندوتلیال عروق انسان به طور طبیعی کمپلکس‌های سازگاری نسجی اصلی (MHC I , II) را در سطح خود نمایش می‌دهند و با سلول‌های لنفوسیت T تماس برقرار می‌کنند و با ارائه دادن آنتی ژن به سلول‌های T خاطره نقش مهمی در بقای ایمنی ایفا می‌کنند. در عوض سلول‌های T فعال شده از طریق سیگنال‌های وابسته به تماس و محلول، نقش مهمی در تنظیم عملکرد سلول‌های اندوتلیال دارند. هنگام مهاجرت سلول‌های دندریتیک از بافت‌های محیطی به بافت لنفاوی با محیط‌های کوچک استرومایی (که از ماتریکس خارج سلولی، عوامل محلول و انواع مختلفی از سلول‌ها نظیر سلول‌های فیبروبلاست، ماکروفاژ، مونوسیت واندوتلیال و غیره تشکیل شده)، تماس می‌یابد. شواهد زیادی وجود دارد که این محیط‌های کوچک استرومایی نقش مهمی را در تنظیم عملکرد سلول‌های دندریتیک ایفا می‌کنند. سلول‌های دندریتیک در مسیر حرکت از بافت به گرهای لنفاوی و هم‌چنین در خون با سلول‌های اندوتلیال تماس مستقیم دارند(4). لنفوسیت‌های T وقتی با سلول‌های دندریتیک تماس می‌یابند با ارائه سیگنال‌هایی باعث القای تمایز نهایی در سلول‌های دندریتیک می‌گردند که یکی از ملکول‌های سطحی مهم در این پیوند لیگاند ($CD_{40}L$) است. مایع روئی سلول‌های T حاوی عوامل اینترفرون گاما(Interferonγ-IFN-γ)، عامل نکروز دهنده تومور-آلفا (Tumor necrosis Factor-alpha-TNF-α) و $CD_{40}L$ می‌باشد که باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از منوسیت می‌شود(5). موفقیت‌های اولیه در ایمونوتراپی آزمایشی بر پایه سلول‌های دندریتیک، در اواسط دهه 1990 انجام گرفت(۶،۷). این سلول‌ها با موفقیت برای درمان میلوما، لنفوما و کارسینومای سلول‌های کلیه مورد استفاده قرار گرفتند(8). البته موفقیت درمانگاهی این درمان‌ها بیشتر از 10 تا 15 درصد نبود و پژوهشگران را بر این داشت که به دنبال تولید انواع با کیفیت تری از سلول‌های دندریتیک باشند.

مشخصه‌های یک سلول دندریتیک مناسب برای تولید واکسن سرطان را می‌توان به صورت زیر خلاصه نمود.

1- بروز سطوح بالایی از مولکول‌های کمک تحریکی، شامل CD 80/86, CD40

2- قابلیت مهاجرت صحیح در پاسخ به CCL21 و CCL19 و بیان گیرنده‌های کموکاینی CXCR4, CCR7.

3- ترشح مقادیر بالایی از اینترلوکین-12 به منظور تولید لنفوسیت‌های T یاریگر نوع 1 (Theloe γ -1-Th-1) اختصاصی تومور.

متاسفانه همه این مشخصه‌ها در سلول‌های دندریتیک تولید شده با روش‌های مختلف، به دست نیامده و محققین با تغییر شرایط کشت، نحوه جداسازی سلول‌های مونوسیت و عوامل بلوغ، سعی بر آن دارند که مناسب‌ترین سلول دندریتیک را تولید نمایند(9). به منظور دست یافتن به این مهم در این تحقیق تاثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین (Phytohaemagg Tutinin-PHA) در القای بلوغ سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص گردد که سلول‌های اندوتلیال و لنفوسیت‌های T چه تاثیری بر فنوتیپ، عملکرد و القای بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت دارند. هدف از این مطالعه تمایز سلول‌های دندریتیک مناسب ایمنوتراپی تومور می‌باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی به منظور تولید سلول‌های دندریتیک مناسب ایمنوتراپی تومور از تیر ماه سال 1388 تا شهریور 1389 در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه صورت گرفت. این آزمایشات در سه تکرار انجام گرفت. به منظور تولید مایع رویی سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان (HUVEG) از بانک سلولی ایران تهیه گردید و در فلاسک کشت سلولی T75 در محیط کشت DMEM (Gibco- انگلستان) حاوی پنی سیلین (100 واحد بر میلی‌لیتر)، استروپتومایسین (100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) وسرم جنینی گاوی(FBS) (10درصد) به مدت 2 ساعت در شرایط دمای 37 درجه سانتی‌گراد، CO_2 (5 درصد) و رطوبت (90 درصد) کشت داده شدند. بعد از آن که 80 درصد از کف فلاسک‌ها به وسیله سلول‌ها پوشیده گردید، مایع رویی دور ریخته شد و مقدار 8 میلی‌لیتر محیط کشت تازه RPMI-1640 بدون سرم، به فلاسک‌ها اضافه گردید و بعد از 48 ساعت انکوباسیون، مایع رویی جمع‌آوری و سانتریفیوژ (2000rpm) گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری شد و با فیلتر سرسرنگی (22 میکرومتر) استریل گردید و برای استفاده بعدی در دمای 70- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به منظور تولید مایع رویی لنفوسیت‌های T (TCCM) تعداد $2\text{-}3\times10^{6}$ لنفوسیت T، در4 میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی سیلین (100 واحد بر میلی‌لیتر)، استروپتومایسین (100 میکروگرم بر میلی‌لیتر)، سرم AB^{+} انسان (10 درصد) و IL-2 (20 واحد بر میلی‌لیتر) و فیتوهماگلوتینین (20 میکروگرم بر میلی‌لیتر) (sigma- آمریکا) به مدت 48 ساعت در شرایط دمای 37 درجه سانتی‌گراد، CO_2 (5 درصد) و رطوبت (90 درصد) انکوبه شدند. بعد از 48 ساعت انکوباسیون، مایع رویی جمع‌آوری و سانتریفیوژ (2000 rpm) گردید و مایع رویی جمع‌آوری شد و با فیلتر سرسرنگی (22 میکرومتر) استریل گردید و برای استفاده بعدی در دمای 70- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای تولید سلول‌های دندریتیک ابتدا از افراد داوطلب خون‌گیری به عمل آمد و مقدار 100 میلی‌لیتر خون هپارینه (200 واحد بر میلی‌لیتر) با 100 میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (Gibco- انگلستان) رقیق گردید. سپس خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت و مجموعه خون رقیق شده و فایکول با سرعت 800 g به مدت 15 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 به دست آمده به منظور

حذف فایکول همراه آن با محیط کشت RPMI 1640 مخلوط و با سرعت 450 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت‌ها، PBMC با سرعت 200 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید و تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین گردید. سلول‌های PBMC به تعداد 4×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر و به مقدار 5 میلی‌لیتر در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی پنی سیلین (100 واحد بر میلی‌لیتر)، استروپتومایسین (100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و FBS (10 درصد) به مدت 2 ساعت در شرایط دمای 37 درجه سانتی‌گراد، CO2 (5 درصد) و رطوبت (90 درصد) انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام، جدا شده و از فلاسک خارج گردیدند. تولید سلول‌های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول‌های چسبنده تحت تاثیر سیتوکاین‌های GM-CSF و IL-4 به سلول‌های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند و در مرحله دوم این سلول‌ها در حضور مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین و عوامل بلوغ به سلول‌های دندریتیک بالغ تبدیل شدند. به سلول‌های چسبنده که اکثریت آنها را منوسیت‌ها تشکیل می‌دادند محیط کشت جدید به همراه GM-CSF (1000 واحد بر میلی‌لیتر) و IL-4 (500 واحد بر میلی‌لیتر) (سیگما-آمریکا) اضافه و به مدت 5 روز کشت داده شد (مرحله اول). در روز سوم مجدداً مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به فلاسک‌های حاوی سلول اضافه گردید. در روز پنجم به سلول‌های دندریتیک نابالغ، مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان (25 درصد) و مایع رویی لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین (25 درصد)، به علاوه TNF-α (10نانو گرم بر میلی‌لیتر)، مایع رویی مونوسیت (MCM) (25 درصد) و POLY-IC (20 نانو گرم بر میلی‌لیتر) (سیگما-آمریکا) به عنوان عوامل بلوغ و عصاره سلول‌های سرطانی (k562) به عنوان آنتی ژن اضافه گردید. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک برداشت شدند و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ و قدرت تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و میزان ترشح سایتوکین‌های IL-10 و IL-12و میزان تحریک ترشح سایتوکین‌های IL-4 و INF-γ به وسیله کیت الیزا (Peprotech– آمریکا) مورد سنجش قرار گرفتند.

توانایی فاگوسیتوز سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بید لاتکس فلورسانت (کنژوگه با FITC) (سیگما- آمریکا) و دستگاه فلوسایتومتری در دو حالت نابالغ (روز پنجم) و حالت بالغ (روز هفتم) مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین به منظور سنجش قدرت سلول‌های دندریتیک تولید شده از نظر تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T، واکنش مختلط لکوسیتی (Mixed Lymphocyte reaction-MLR) آلوژن انجام پذیرفت که برای این منظور تعداد 10^5 لنفوسیت با نسبت‌های مختلف (1:5، 1:10 و1:20) با سلول‌های دندریتیک مخلوط و به مدت 5 روز در میکروپلیت 96 خانه‌ای ته گرد در محیط کشت RPMI-1640، به اضافه 10 درصد سرم AB^+ انسانی در حجم 200 میکرو لیتر در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، CO_2 (5 درصد) و 90 درصد رطوبت کشت داده شدند. سپس در روز پنجم به هر خانه مقدار 1/5 میکروکوری (µCurie) متیل تیمیدین نشان‌دار شده با [^{3}H] (Amersham ـ انگلستان) اضافه، و به مدت 18 ساعت دیگر انکوبه گردید و سپس میزان تکثیر لنفوسیت‌های T با استفاده از دستگاه Cell harvester (ICN-انگلستان) و دستگاه شمارش‌گر بتا (شرکت Wallac-فنلاند) مورد سنجش قرار گرفت.

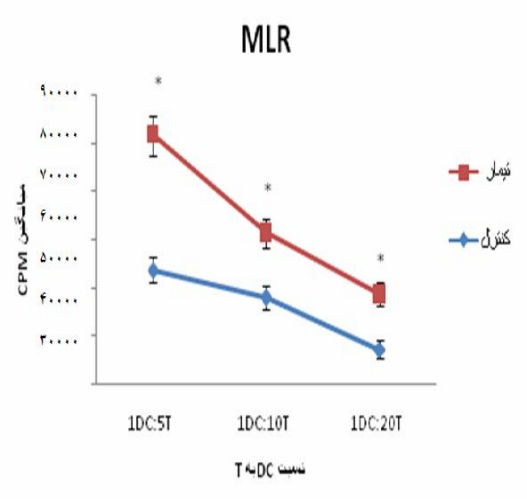
میزان ترشح IL-12 و IL-10 از سلول‌های دندریتیک حاصل شده به وسیله کیت الیزا (Peprotech– آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین به منظور بررسی پاسخ پلاریزاسیون لنفوسیت‌های تحریک شده به وسیله سلول‌های دندریتیک، میزان ترشح IL-4 و INF-γ از طریق مایع رویی واکنش مختلط لکوسیتی به وسیله کیت الیزا (Peprotech– آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت. هم‌چنین

برای تعیین فنوتیپ سلول‌های دندریتیک، در روز هفتم سلول‌های دندرتیک برداشت گردیدند و فنوتیپ آنها از لحاظ بیان ملکول‌های CD83، CD14، CD80، HLA-DR و CD86 به وسیله استفاده از آنتی بادی‌های ضد نشان‌گرهای سطحی (DAKO– دانمارک) با دستگاه فلوسیتومتری FACSCalibor (شرکت Becton-Dickinson آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت و نتایج حاصل با نرم افزار CellQuest مورد آنالیز قرار گرفت.

در این تحقیق، در گروه کنترل، تولید سلول‌های دندریتیک بدون استفاده از مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین انجام گرفت و در گروه تیمار تولید سلول‌های دندریتیک تحت تاثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین انجام پذیرفت و تمامی آزمایش‌ها با سه مرتبه تکرار به ثبت رسیدند. نتایج با برنامه SPSS نسخه 17 بررسی شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین بیان و برای مقایسه نتایج فنوتیپ از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد و نیز به منظور آنالیز تفاوت بین حالت‌های بالغ و نابالغ سلول‌ها در فاگوسیتوز، آزمون تی انجام شد. به منظور مقایسه تفاوت‌های بین گروهی، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد و در تمامی یافته‌ها مقدار $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. هم‌چنین نتایج تست الیزا توسط نرم افزار CUREXPERT 0.7 مورد آنالیز قرار گرفت.

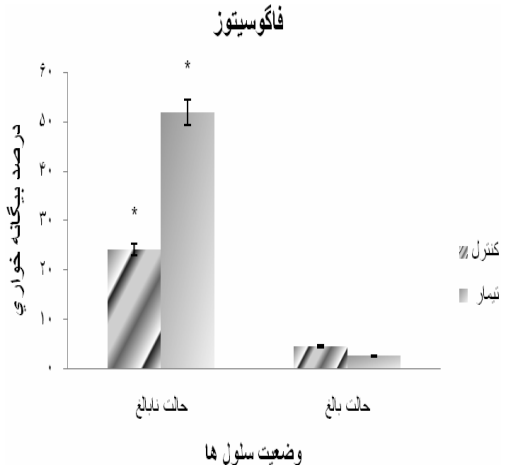
یافته ها

به منظور سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار و کنترل، توانایی آنها در القاء واکنش مختلط لوکوسیتی آلوژنیک (MLR) مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار دارای توانایی بیشتر در القاء تکثیر لنفوسیت‌های T آلوژن نسبت به سلول‌های دندریتیک گروه کنترل می‌باشند نمودار 1، و بین این دو گروه اختلاف معنی دار از نظر آماری در نسبت‌های 1:5، 1:10 و 1:20 وجود داشت که به ترتیب $p=0/03$، $p=0/041$ و $p=0/043$ بود.



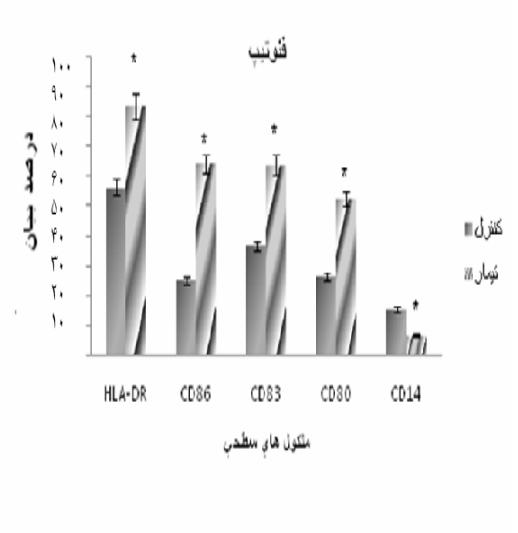
نمودار 1. مقایسه میانگین نتایج حاصل از واکنش MLR با استفاده از متیل تایمیدین نشان دار در گروه کنترل و تیمار (* وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل $p<0/05$)

توانایی بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ در گروه تیمار و کنترل با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت که نتایج فلوسیتومتری به دست آمده نشان داد که میانگین درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه خواری انجام داده بودند در گروه کنترل در حالت نابالغ (روز پنجم) 24/13 درصد بوده و در حالت بالغ این مقدار به 4/56 درصد کاهش یافته بود و این مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار با همدیگر می‌باشند. هم‌چنین در گروه تیمار میانگین درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه خواری انجام داده بودند در حالت نابالغ 51/93 درصد محاسبه گردید و این مقدار در حالت بالغ به 2/61 درصد کاهش یافته بود و این مقادیر نیز با $p=0/039$ دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشند. هم‌چنین بین گروه کنترل و تیمار در حالت نابالغ نیز با $p=0/046$ تفاوت معنی دار مشاهده گردید(نمودار2).



نمودار 2. میانگین درصد بیگانه خواری در سلول های دندریتیک گروه کنترل و تیمار در حالت نابالغ و بالغ (* وجود اختلاف معنی دار بین حالت بالغ و نابالغ p <0/05)

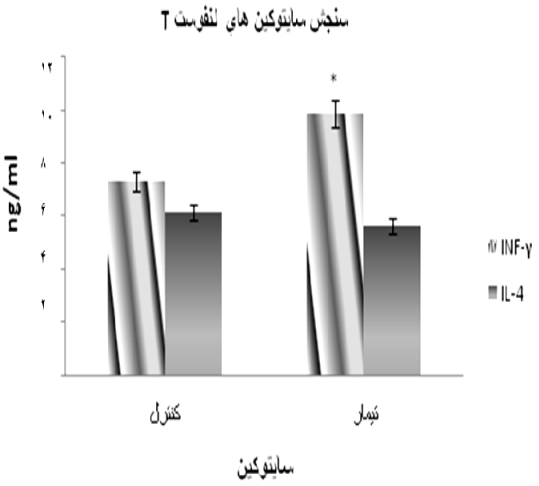
فنوتیپ سلول‌های دندریتیک نیز با بررسی نشان‌گرهای CD14، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR در سطح سلول‌های دندریتیک به وسیله دستگاه فلوسایتومتری، مورد بررسی قرار گرفت و میانگین درصد بیان این مولکول‌ها، در نمودار 3 نشان داده شده است. همان طور که در نمودار 3 مشاهده می‌شود میزان بیان CD14 از مقدار 15/24 درصد در گروه کنترل به مقدار 6/58 درصد در گروه تیمار کاهش یافته و با مقدارp=0/046 دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به هم می‌باشند و میزان بیان ملکول CD80 از 26/35 درصد در گروه کنترل به مقدار 52/57 درصد در گروه تیمار افزایش یافته که این افزایش با مقدار p=0/045 دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد. هم‌چنین میزان بیان ملکول CD83 از 36/58 درصد در گروه کنترل به مقدار 63/98 درصد در گروه تیمار افزایش یافته که این افزایش نیز با مقدارp=0/045 دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد و میزان بیان ملکول CD86از 24/98 درصد در گروه کنترل به مقدار 64/27 درصد در گروه تیمار افزایش یافته است. هم‌چنین میزان بیان ملکول HLA-DR از 56/25 درصد در گروه کنترل به مقدار 83/67 درصد در گروه تیمار افزایش یافته است که این مقادیر به ترتیب با مقدارp=0/042 و p=0/046 دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشند.



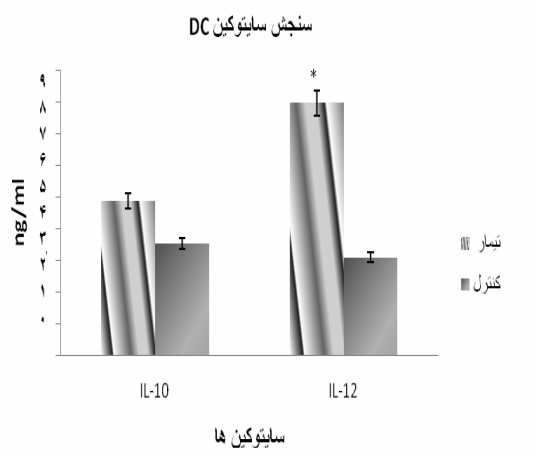
نمودار 3. فنوتیپ سلول های دندریتیک در گروه کنترل و تیمار (* وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل p <0/05)

میزان ترشح سایتوکین INF-γ و IL-4 از لنفوسیت‌های T، که توسط سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و تیمار تحریک شده بودند از طریق مایع رویی جمع‌آوری شده در آزمون MLR، به وسیله کیت الیزا مورد سنجش قرار گرفت و میانگین نتایج آنها بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر در نمودار 4 نشان داده شده است و مشاهده گردید که بین گروه‌ها از لحاظ ترشح سایتوکین INF-γ اختلاف معنی‌دار وجود دارد(p= 0/048).

هم‌چنین به منظور اندازه‌گیری سایتوکین‌های ترشح شده از سلول‌های دندریتیک در حالت بالغ (روز هفتم)، میزان ترشح IL-12 و IL-10 به وسیله کیت الیزا مورد سنجش قرار گرفت و میانگین نتایج آنها بر حسب نانوگرم/ میلی‌لیتر در نمودار 5 ترسیم شده است و مشاهده گردید که بین گروه کنترل و گروه تیمار، از لحاظ میزان ترشح IL-12 اختلاف معنی‌دار وجود دارد(p =0/049).



نمودار 4. میانگین میزان ترشح سایتوکین های IL-4 و IFN-γ از لنفوسیت های T که توسط سلول های دندریتیک تحریک شده بودند (* وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل p <0/05)



نمودار 5. میانگین میزان ترشح سایتوکین های IL-10 و IL-12 از سلول های دندریتیک در حالت بالغ (* وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل p <0/05)

بحث

قابلیت بالای سلول‌های دندریتیک در عرضه آنتی ژن و عملکرد حرفه‌ای این سلول‌ها در انجام این وظیفه، محققان را بر آن داشت که این سلول‌ها را در درمان برخی بیماری‌ها نظیر سرطان و بیماری‌های عفونی و هم‌چنین بیماری‌های خود ایمنی و جلوگیری از رد پیوند، به کار گیرند(2).

یکی از مشخصه‌های مورد بحث در مورد سلول دندریتیک بالغ، قدرت تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T به وسیله سلول‌های دندریتیک می‌باشد که در این تحقیق، این شاخص به وسیله واکنش مختلط لکوسیتی، مورد ارزیابی قرار گرفت(10) و همان گونه که در بخش نتایج مشاهده گردید سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار لنفوسیت‌های T را بیشتر تحریک کرده بودند و سبب تکثیر بیشتری شده بودند که به واسطه بلوغ و بیان بالای مولکول‌های کمک تحریکی CD86, CD80 توسط سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار می‌باشد.

موضوع مورد بحث بعدی قدرت بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک می‌باشد که انتظار می‌رود سلول‌های دندریتیک با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه‌خواری و تمامی ویژگی‌های لازم برای اخذ آنتی ژن را از دست داده و در عوض قدرت عرضه آنتی ژن و در نهایت تحریک سلول‌های T را تقویت کنند(11). قدرت بالای اخذ آنتی ژن در یک سلول دندریتیک نابالغ که قرار است به عنوان یک اَجوانت سلولی به کار رود، یک ویژگی حیاتی محسوب می‌شود، چرا که در صورت اختلال در این امر کلیدی، آنتی ژن‌هایی که با سلول‌های دندریتیک مجاور می‌شوند(روز پنجم کشت) به خوبی توسط این سلول‌ها برداشت نشده و به دنبال آن عرضه و تحریک اختصاصی هم رخ نخواهد داد. همان طور که در نتایج مشاهده می‌شود سلول‌های دندریتیک گروه تیمار از این لحاظ نیز نسبت به گروه کنترل برتری دارند و میزان فاگوسیتوزشان در حالت نابالغ بالا بوده ولی زمانی که بالغ می‌شوند میزان فاگوسیتوزشان به شدت کاهش می‌یابد و در عوض میزان بیان ملکول‌های سطحی آنها افزایش می‌یابد. ژانگ و همکاران نیز بیان داشتند که سلول‌های اندوتلیال باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک بینابینی می‌شوند و به واسطه آن باعث بهبود فنوتیپ و توانایی فاگوسیتوز سلول‌های دندریتیک می‌شوند(12).

باید به این نکته توجه داشت که سلول دندریتیک ایده‌آل برای ایمنوتراپی باید بتواند بعد از بلوغ و به عنوان

یکی از مشخصه‌های اصلی بلوغ، سلول‌های T اختصاصی را در نهایت توان تحریک کند که ابزارهای آن برای این امر، مولکول‌های کمک تحریکی مثل CD40، CD80/86، مولکول‌های چسبندگی و سایتوکاین‌هایی مثل IL-12 می‌باشد(13). از طرفی سلول‌های دندریتیک بالغ می‌بایست دارای مقادیر کاهش یافته‌ای از CD14 بر سطح خود باشند، همان گونه که در نتایج ملاحظه گردید میزان بیان ملکول CD14 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود که این کاهش در واقع در حین بلوغ و به واسطه کاهش نسخه‌برداری از ژن CD14 بر اثر IL-4 اضافه شده، رخ می‌دهد(14). از دیگر شاخص‌های مورد بحث در مورد سلول‌های دندریتیک، می‌توان به بیان ملکول CD83 در سطح این سلول‌ها اشاره کرد. این نشان‌گر جزو ابرخانواده ایمنوگلوبولین‌ها بوده و هنوز نقش اصلی آن در هاله‌ای از ابهام است. البته به نظر می‌رسد این مولکول سطحی در تنظیم ایمنی سلولی بی‌تاثیر نباشد و بروز این نشان‌گر در سطح سلول‌های دندریتیک نشان دهنده بلوغ این سلول‌ها می‌باشد(15، 16). همان‌گونه که در بخش نتایج مشاهده شد میزان بروز نشان‌گر CD83 در سطح سلول‌های دندریتیک گروه تیمار نسبت به کنترل دارای افزایش معنی داری می‌باشد که علت آن تاثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و لنفوسیت‌های T، در القای بلوغ سلول‌های دندریتیک گروه تیمار می‌باشد. موضوع مورد بحث دیگر در مورد سلول‌های دندریتیک بالغ، افزایش بیان MHC II در سطح این سلول‌ها می‌باشد که در این تحقیق، بیان این مولکول در قالب سنجش میزان بروز HLA-DR در سطح سلول‌های تولید شده مورد بررسی قرار گرفت و همان طور که ملاحظه گردید میزان بیان این ملکول در سطح سلول‌های دندریتیک گروه تیمار نسبت به گروه کنترل، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است که مسئله ناشی از بلوغ کامل‌تر سلول‌های DC گروه تیمار می‌باشد(6).

بیتون و همکاران بیان می‌کنند که از مشخصه‌های اصلی بلوغ سلول‌های دندریتیک، بیان بالای مولکول‌های کمک تحریکی مثل CD40، CD80/86، در سطح این سلول‌ها می‌باشد(13). همان گونه که در نتایج ملاحظه گردید بیان ملکول‌های CD80 و CD86 در سطح سلول‌های دندریتیک گروه تیمار به میزان چشم‌گیری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود و این عامل باعث شد که این سلول‌ها بتوانند لنفوسیت‌های T را به میزان بیشتری نسبت به گروه کنترل تحریک کنند تا تکثیر یابند و این مسئله نشان دهنده بلوغ بهترسلول‌های دندریتیک گروه تیمار نسبت به گروه کنترل می‌باشد. بنابراین سلول‌های دندریتیک تولید شده تحت تاثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین از لحاظ فنوتیپ دارای ویژگی‌های بهتری نسبت به گروه کنترل می‌باشند و این مسئله به علت بلوغ بهتر این سلول‌ها به واسطه سایتوکین‌های موجود در مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و لنفوسیت‌های T می‌باشد. کازونوری و همکاران این طور بیان می‌کنند که مایع رویی لنفوسیت‌های T باعث القای بلوغ و بهبود فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک می‌شوند(5).

باید توجه داشت که لنفوسیت‌های T در پاسخ به تحریکات آنتی ژنی در داخل و خارج از بدن به تولید انواع سیتوکین‌ها می‌پردازند و بر اساس نوع، مقدار و مسیر عرضهٔ آنتی ژن و تحریکات سایر سلول‌ها، دو نوع لنفوسیت T یعنی Th1 و Th2 به وجود می‌آیند که هر کدام از آنها، انواع خاصی از سیتوکین‌ها را ترشح می‌کنند. دکتر دلیرژ وهمکاران در این رابطه این طور می‌نویسند که IFN-γ به عنوان سیتوکین شاخص Th1 و IL-4 به عنوان سیتوکین شاخص Th2 شناخته می‌شود. فعال شدن هر یک از این سلول‌ها به تقویت بیشتر بازوی سلولی و یا هومورال سیستم ایمنی می‌انجامد که در ایمونولوژی تومور القاء پاسخ Th1 و به تبع آن تقویت ایمنی سلولی با واسطهٔ سیتوکین‌هایی چون IFN-γ، IL-12 و غیره با تقویت پاسخ ضد توموری، تحلیل تومور و بهبود بیماری همراه است(17، 18). بر این مبنا در این مطالعه سنجش IL-4 وIFN-γ به عنوان نمایندگان تیپ‌های سیتوکینی Th1 و Th2 مورد سنجش قرار گرفت و چون نسبت IFN-γ به IL-4 درگروه تیمار بیشتر بود بنابراین

سلول‌های دندریتیک گروه تیمار باعث پلاریزاسیون لنفوسیت‌های T به سمت Th1 می‌شوند.

سلول‌های دندریتیک از طریق ترشح سیتوکین‌های IL-12 و انترفرون‌های کلاس I و II نقش مهمی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. 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 به سمت DC2 خواهند رفت. DC1 در القای پاسخ ایمنی سلولی و مبارزه با پاتوژن‌های داخل سلولی موثر است و DC2 در تولید آنتی بادی و مبارزه با پاتوژن‌های خارج سلولی ایفای نقش می‌کند(19). همان‌گونه که در بخش نتایج مشاهده گردید نسبت IL-12 به IL-10 درگروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود بنابراین سلول‌های دندریتیک تولید شده در تیمار 1 از نوع DC1 می‌باشند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده این طور استنباط می‌شود که افزودن مخلوط مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان و لنفوسیت‌های T فعال شده با فیتوهماگلوتینین به محیط کشت، باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت می‌گردند و باعث بهبود فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک می‌شوند و موجب هدایت آنها به سمت DC1 و تیپ سیتوکینی Th1 در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. بنابراین استفاده از سلول‌های دندریتیک تولید شده، سلول‌هایی مناسب برای کاربردهای ایمنوتراپی و درمان سرطان نتیجه بخش خواهد بود زیرا برای دفع تومور نیاز به فعال سازی Th1 و لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه کسانی که در انجام این پایان نامه همکاری داشتند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند هم‌چنین از دکتر فرهنگ پژوه، دکتر ملک خطابی، دکتر اکبری، دکتر احسان شجاعی فر و مهندس عزیزی و آقای مهدی دوست صمیمانه سپاسگذاریم که ما را در انجام این طرح یاری رساندند و شایان ذکر است که این طرح در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه صورت گرفته و نتایج به دست آمده، حاصل تلاش شبانه روزی اساتید بزرگوار و همکاران محترم می‌باشد.

منابع

1. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 1994;179(4):1109-18.

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

3. Kanto T, Kalinski P, Hunter OC, Lotze MT, Amoscato AA. Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis. J Immunol. 2001;167(7):3773-84.

4. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. Annu Rev Immunol. 2004;22:683-709.

5. 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.

6. 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.

7. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat Med. 1998;4(3):328-32.

8. Nestle FO, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. Curr Opin Immunol. 2005;17(2):163-9.

9. Kalinski P, Urban J, Narang R, Berk E, Wieckowski E, Muthuswamy R. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we

have and what we need. Future Oncol. 2009;5(3):379-90.
10. Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Klüter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. J Immunol Methods. 2003;275(1-2):57-68.
11. Henry F, Boisteau O, Bretaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Grégoire M. Antigen-presenting Cells That Phagocytose Apoptotic Tumor-derived Cells Are Potent Tumor Vaccines. Cancer Research. 1999;59(14):3329-32.
12. Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. Nat Immunol. 2004;5(11):1124-33.
13. Bitton RJ. Cancer vaccines: a critical review on clinical impact. Curr Opin Mol Ther. 2004;6(1):17-26.
14. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. Eur J Immunol. 1990;20(11):2375-81.
15. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell. 2001;106(3):255-8.
16. Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. J Immunol. 2002;168(6):2599-602.
17. 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 naive CD4+ T cells. J Immunol. 1995;154(10):5071-9.
18. 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.
19. 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.