Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018

مقاله پژوهشی

تأثیر مایع رویی سلول‌های فیبروبلاست و اندوتلیال بر فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک و پاسخ پلاریزاسیون لنفوسیت‌های T

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

تاریخ دریافت: 90/09/12 تاریخ پذیرش: 90/10/15

چکیده

سابقه و هدف: قابلیت بالای سلول‌های دندریتیک در عرضه‌ی 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، بکار گیرند. هدف از این مطالعه بلوغ سلول‌های دندریتیک برای ایمنوتراپی تومور می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تولید سلول‌های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول‌های مونوسیت تحت تأثیر سیتوکاین های GM-CSF و IL-4 به سلول‌های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند و در مرحله دوم سلول‌های دندریتیک نابالغ در حضور مایع رویی سلول‌های فیبروبلاست پوست (HSFPI3)، سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان (HUVECE)، CM و POLY-IC به عنوان عوامل بلوغ و عصاره سلول‌های سرطانی (k562) به عنوان آنتی ژن 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 سایتوکین IL-12 بودند.

بحث و نتیجه گیری: سلول‌های دندریتیک که تحت تأثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست تولید گردیدند دارای فنوتیپ و عملکرد مطلوب بودند و باعث پلاریزاسیون لنفوسیت‌های T به سمت Th_1 شدند.

واژه‌های کلیدی: سلول دندریتیک، سلول اندوتلیال، لنفوسیت T، فیبروبلاست

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و دوم، شماره ششم، ص ۵۵۹-۵۵۱، بهمن و اسفند ۱۳۹۰

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی: ۵۷۱۵۹۱۵۱۹۹ تلفن همراه: ۰۹۳۵۹۶۸۹۹۸۵

E-mail: meysam_ganjy@yahoo.com

مقدمه

سلول‌های دندریتیک (DC)، سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی ژن می‌باشند که دارای توانایی منحصر به فردی، در تحریک اولیه پاسخ‌های ایمنی می‌باشند. سلول‌های دندریتیک مسئول اخذ و انتقال اطلاعات از جهان خارج به سیستم ایمنی هستند. سلول‌های دندریتیک، سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (APC) منحصر به فردی هستند و به همین دلیل به عنوان سلول‌های ارائه دهندگانتی ژن حرفه‌ای (APC) نیز تلقی می‌شوند و این سلول‌ها دارای قابلیت تحریک پاسخ‌های ایمنی اولیه در لنفوسیت‌های T دست نخورده می‌باشند (۱).

قابلیت بالای سلول‌های دندریتیک در عرضه‌ی 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، بکار گیرند (۲). سلول‌های دندریتیک نه تنها سبب القای تکثیر در

[۱] دانشجویان کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)
[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
[۳] دانشجویان کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
[۴] استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
[۵] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018

لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی ژن می‌شوند بلکه تمایز سلول‌های T، به سلول‌های تنظیم کننده و یا عمل کننده را منجر می‌گردند. IL-12 ترشح شده توسط سلول‌های دندریتیک منجر به پلاریزاسیون سلول‌های Th_1 می‌باشد در حالی که سایر فاکتورها از جمله IL-4و یا عدم ترشح IL-12 منجر به پلاریزاسیون سلول‌های Th_2می‌گردد. این سلول‌ها نیز به نوبه خود سیتوکین‌های مختلفی را ترشح می‌کنند. توانایی سلول‌های دندریتیک در تحت تأثیر قرار دادن نوع سیتوکین مترشحه از لنفوسیت‌های Tاز علل عمده‌ای می‌باشد که نتیجه نهایی پاسخ ایمنی نسبت به پاتوژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳).

لنفوسیت‌های T در پاسخ به تحریکات آنتی ژنی در داخل و خارج از بدن به تولید انواع سیتوکین‌ها می‌پردازند که این سیتوکین‌ها به صورت اتوکراین و پاراکراین بر روی خود سلول‌های تولید کننده و سلول‌های دیگر تأثیر می‌گذارند و به همراه سایر واکنش‌های بین سلولی به القاء پاسخ ایمنی و تنظیم آن می‌پردازند. بر اساس نوع، مقدار، مسیر عرضه آنتی ژن و نیز محیط ظریف اطراف لنفوسیت‌های T و تحریکات سایر سلول‌ها دو نوع لنفوسیت T یعنی Th1 و Th2 القاء می‌شوند که هر کدام از آن‌ها انواع خاصی از سیتوکین‌ها را ترشح می‌کنند اینترفرون گاما، (IFN-γ) به عنوان سیتوکین شاخص Th1 و IL-4 به عنوان سیتوکین شاخص Th2 شناخته می‌شود. فعال شدن هر یک از این لنفوسیت‌ها 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 به واسطه سیتوکین‌هایی چون IL- IFN-γ 12 و غیره به تقویت پاسخ ضد تومور، تحلیل تومور و بهبود بیماری می‌انجامد؛ بنابراین آگاهی از نوع سیتوکین‌های تولید شده در پاسخ به تحریک سیستم ایمنی با آنتی ژنی خاص، به روند پاسخ ایمنی و بهبود بیماری کمک به سزایی می‌کند (۴).

باید به این نکته توجه داشت که فیبروبلاست ها سلول‌هایی هستند که در انواع مختلف بافت‌ها یافت می‌شوند و با ترشح عوامل مختلف در رشد و تمایز سلول‌ها دخالت دارند آن‌ها همچنین با ترشح فاکتورهائی نظیر IL6 , M-CSF , GM-CSF , IFN-β بر روی تکامل سلول‌های دندریتیک به سمت DC1 یا DC2 موثر می‌باشند (۵). مایع روئی سلول‌های اندوتلیال حاوی فاکتورهای VEGF, BFGF, IGF, EGF می‌باشد که می‌تواند باعث تمایز سلول‌های تشکیل دهنده کلونی هماتوپویتیک شوند و بر روند بلوغ و تکامل سلول‌های دندریتیک موثر باشند (۶).

بنابراین در این تحقیق تأثیر مایع رویی سلول‌های فیبروبلاست پوست (HSFPI3) و سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان (HUVECE) در پلاریزاسیون لنفوسیت‌های T به وسیله سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص گردد سایتوکین‌های موجود در مایع رویی سلول‌های فیبروبلاست پوست و سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان چه تأثیری بر بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک می‌گذارند که باعث می‌شوند در شرایط آزمایشگاهی لنفوسیت‌های T به سمت TH1 یا TH2 سوق پیدا کنند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه پژوهشی و تحلیلی به منظور تولید سلول‌های دندریتیک مناسب ایمنوتراپی تومور از خرداد سال ۱۳۸۸ تا آبان ۱۳۸۹ در Clean Room پژوهشکده‌ی زیست فناوری دانشگاه ارومیه صورت گرفت. این آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت. به منظور سنجش سلول‌های دندریتیک از تست‌های متفاوتی استفاده گشت. فنوتیپ این سلول‌ها به وسیله دستگاه فلوسایتومتری سنجش گردید. با بلوغ این سلول‌ها قدرت فاگوسیتوز کاهش می‌یابد که با استفاده از لاتکس بید قدرت فاگوسیته آن‌ها بررسی شد همچنین توانایی این سلول‌ها در تحریک لنفوسیت‌ها از طریق واکنش مختلط لوکوسیتی سنجش شد. مقدار سایتوکین‌های تولید شده به کمک کیت الایزا اندازه گیری گشت. ابتدا به منظور بدست آوردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) مقدار ۵۰ میلی لیتر خون هپارینه (۲۰۰ U/ml) از افراد داوطلب اخذ گردید و خون هپارینه با ۵۰ میلی لیتر محیط کشت (Gibco- انگلستان) RPMI-1640 رقیق گردید و خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت سپس مجموعه خون رقیق شده و فایکول با سرعت ۸۰۰g به مدت 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 بدست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن با محیط کشت RPMI 1640 مخلوط و با سرعت ۴۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI 1640 مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت همراه PBMC با سرعت ۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بدست آمده با استفاده از رنگ تریپان به لو تعیین گردید.

تولید سلول‌های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول‌های چسبنده تحت تأثیر سیتو کاین‌های 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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018

(PHA)، و عوامل بلوغ به سلول‌های دندریتیک بالغ تبدیل شدند. در مرحله اول به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها را منوسیت‌ها تشکیل می‌دادند محیط کشت جدید به اضافه (۱۰۰۰ واحد/میلی لیتر) GM-CSF و IL-4 (۵۰۰ واحد/میلی لیتر) (سیگما- آمریکا) اضافه و به مدت پنج 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 گروه تیمار، مایع رویی سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان (۲۵ درصد) و مایع رویی فیبروبلاست (۲۵ درصد)، بعلاوه TNF-α(۱۰ نانو گرم/ میلی لیتر)، (۲۵ درصد) (MCM) مایع رویی مونوسیت و (۲۰ نانو گرم/ میلی لیتر) POLY-IC (sigma- آمریکا) به عنوان عوامل بلوغ و عصاره سلول‌های سرطانی (k562) به عنوان آنتی ژن اضافه گردید. اما به گروه کنترل فقط عوامل بلوغ TNF-α (۱۰ نانو گرم/ میلی لیتر)، (۲۵ درصد) MCM و (۲۰ نانو گرم/ میلی لیتر) POLY-IC اضافه گشت. 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-12 و میزان تحریک ترشح سایتوکین‌های IL-4 و INF- γ به وسیله کیت الیزا (Peprotech– آمریکا) مورد سنجش قرار گرفتند.

به منظور تولید مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست، سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان (HUVEG) و فیبروبلاست پوست انسان (HSFPI3) از بانک سلولی ایران تهیه شد و در فلاسک کشت سلولی T75 در محیط کشت DMEM حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰U/ml)، استروپتومایسین (۱۰۰ g/ml) و سرم جنین گاوی (FBS) (۱۰درصد) در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO2 (۵ درصد)و رطوبت (۹۰ درصد) کشت داده شدند.

بعد از آنکه ۸۰درصد از کف فلاسک‌ها به وسیله سلول‌ها پوشیده گردید، مایع رویی دور ریخته شد و مقدار ۸ میلی لیتر محیط کشت تازه RPMI-1640بدون سرم، به فلاسک‌ها اضافه گردید و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، مایع رویی جمع‌آوری و سانتریفیوژ (۲۰۰۰ rpm) گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری شد و با فیلتر سر سرنگی (۲۲ µm) استریل گردید و برای استفاده بعدی در دمای ˚C 70- قرار داده شد.

برای تعیین فنوتیپ سلول‌های دندریتیک، در روز هفتم سلول‌های دندرتیک بدست آمده بعد از یک بار شستشو با بافر FACS در همین بافر که حاوی ۲درصد سرم موش بود به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند.

سپس سلول‌ها مجدداً با بافر FACS شستشو شده بعد از رساندن حجم آن‌ها به ۱۰۰ میلی لیتر مقدار ۱۰ میلی لیتر آنتی بادی مربوطه (CD83 FITC, CD14 FITC ,CD80 FITC, HLA-DR PE, CD86 FITC) (DAKO– دانمارک) و کنترل ایزوتیپ به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس سلول‌ها دوباره با بافر FACS شسته شده و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتری FACSCalibor (شرکت Becton- Dickinson آمریکا) مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج حاصل با نرم افزار CellQuest مورد آنالیز قرار گرفت.

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 (MLR) آلوژن، انجام پذیرفت که برای این منظور تعداد 10^5 لنفوسیت با نسبت‌های مختلف (۱:۵،۱:۱۰ و ۱:۲۰) با سلول‌های دندریتیک مخلوط و به مدت ۵ روز درمیکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد در محیط کشت RPMI-1640، به اضافه ۱۰درصد سرم AB^+ انسانی در حجم ۲۰۰µl در دمای $^{\circ}C$ ۳۷، (۵ درصد) CO_2 و ۹۰درصد رطوبت کشت داده شدند. سپس در روز پنجم به هر خانه مقدار ۱/۵µ Ci[1] متیل تیمیدین نشاندار شده با [^{3}H] (Amersham ـ انگلستان) اضافه و به مدت ۱۸ 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-10از 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-4وINF-γ از طریق مایع رویی واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) به وسیله کیت الیزا (Peprotech– آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت. در این تحقیق، در گروه کنترل، تولید سلول‌های دندریتیک بدون استفاده از مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست انجام گرفت و در گروه تیمار تولید سلول‌های دندریتیک تحت تأثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست انجام پذیرفت و تمامی آزمایش‌ها با سه مرتبه تکرار به ثبت رسیدند و نتایج با برنامه SPSS17 تفسیر و بررسی شد و

[1].Curie

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018

مقایسه بین گروه‌ها در تست فاگوسیتوز توسط paired t test و بقیه تست‌ها توسط one way Anova انجام شد و مقدار P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین نتایج تست الیزا توسط نرم‌افزار CUREXPERT 0.7 مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

به منظور سنجش میزان بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک تولید شده در حالت نابالغ (روز پنجم) و بالغ (روز هفتم) تست فاگوسیتوز با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. 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) ۲۴/۱۳ درصد بوده است و در حالت بالغ این مقدار به ۴/۵۶ درصد کاهش یافته بود و این مقادیر از لحاظ آماری (P <۰/۰۵) دارای اختلاف معنی‌دار با همدیگر بودند. همچنین در گروه تیمار میانگین درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه خواری انجام داده بودند در حالت نابالغ ۴۱/۴۳ درصد بوده است و این مقدار در حالت بالغ به ۲/۴۶ درصد کاهش یافته بود و این مقادیر نیز دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بودند و حتی بین گروه کنترل و گروه تیمار نیز تفاوت معنی‌دار از لحاظ آماری مشاهده گردید (نمودار شماره ۱).

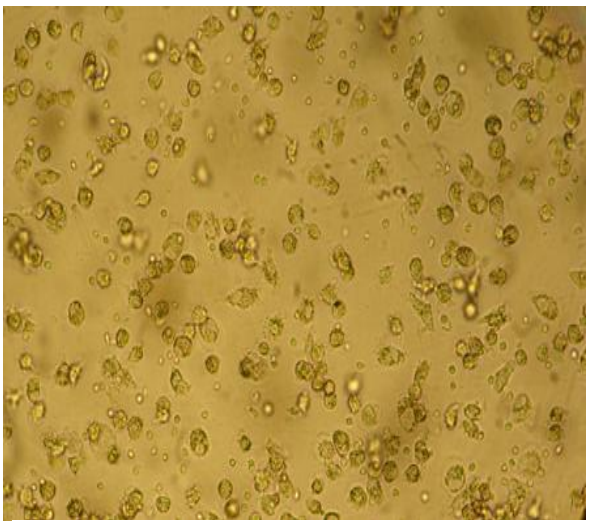
فنوتیپ سلول‌های دندریتیک نیز با بررسی پنج نشانگر در سطح سلول‌های دندریتیک به وسیله دستگاه فلوسایتومتری، مورد بررسی قرار گرفت و درصد بیان مولکول‌های CD14، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR به صورت میانگین درصدها، در نمودار شماره ۲ آورده شده است.

همان‌طور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود میزان بیان CD14 از مقدار ۱۵/۲۴±۳/۱۱ درصد در گروه کنترل به مقدار ۸/۳۲±۳/۱۳ درصد در گروه تیمار کاهش یافته و دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به هم می‌باشند و میزانییان مولکول CD80 از ۲۶/۳۵±۵/۱ درصد در گروه کنترل به مقدار ۱۰/۱۱± ۶۳/۳۱ درصد در گروه تیمار افزایش یافته که این افزایش دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

همچنین میزانییان مولکول CD83 از ۳۶/۵۸±۱/۸۱ درصد در گروه کنترل به مقدار ۶/۱۳± ۶۸/۱۳ درصد در گروه تیمار افزایش یافته که این افزایش نیز دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد و میزان بیان مولکول CD86 از ۲۴/۹۸±۰/۹۱ درصد در گروه کنترل به مقدار ۲/۱۱± ۵۲/۸۳ درصد در گروه تیمار افزایش یافته است و نیز میزان بیان مولکول HLA-DR از ۱۰/۱۸± ۵۶/۲۵ درصد در گروه کنترل به مقدار ۱۳/۱۱± ۷۸/۸۲ درصد در گروه تیمار افزایش یافته است که این مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می‌باشند.

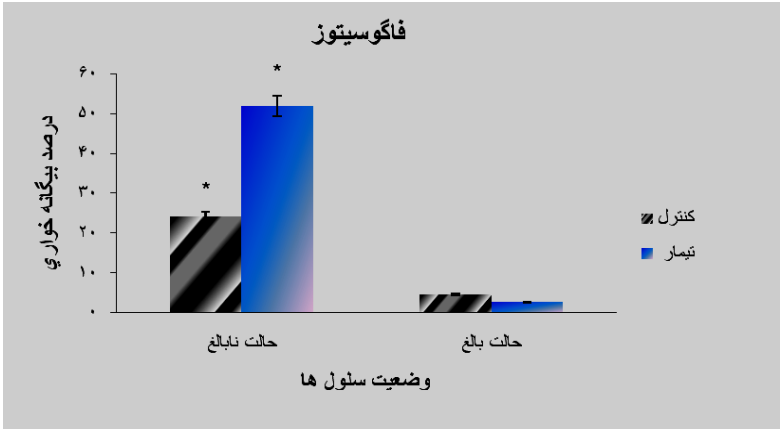
واکنش لوکوسیتی (MLR) آلوژنیک برای سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک تولید شده از لحاظ توانایی آن‌ها در القاء تکثیر لنفوسیت‌های T در گروه تیمار و گروه کنترل، مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار دارای توانایی بیشتر در القاء تکثیر لنفوسیت‌های T نسبت به سلول‌های دندریتیک گروه کنترل می‌باشند (نتایج به صورت میانگین cpm[1] در نمودار شماره ۳ نمایش داده شده است)، و دارای اختلاف معنی‌دار از نظر آماری با یکدیگر می‌باشند.

به منظور اندازه گیری 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. میانگین نتایج IL-10 در گروه کنترل ۵/۰۱± ۳/۳۹ و تیمار ۳/۱۱±۴/۹۸ و مقادیر IL-12 در گروه کنترل ۵/۱۵± ۲/۳۱ و تیمار ۹/۱۱±۷/۳۸ بر حسب ng/ml در نمودار شماره ۴ ترسیم شده است و مشاهده گردید که میزان ترشح IL-12 و IL-10 بین گروه کنترل و گروه تیمار دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. همچنین میزان ترشح سایتوکین INF-γ و IL-4 از لنفوسیت‌های T تحریک شده به وسیله سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و گروه تیمار، از طریق مایع رویی جمع‌آوری شده در تست MLR، به وسیله کیت الیزا مورد سنجش قرار گرفت و مقادیر IL-4 در گروه کنترل ۷/۹۱± ۴/۰۹ و تیمار ۳/۸۱±۵/۲۸ همچنین مقادیر INF-γ در گروه کنترل ۱۲/۱۰±۷/۸۹ و تیمار ۶/۱۹±۹/۹۸ بر حسب ng/ml در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است.

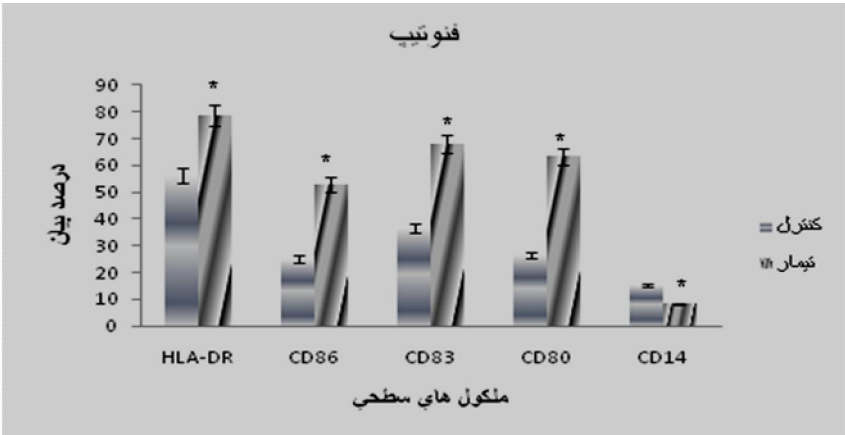


شکل شماره (۱): سلول‌های دندریتیک گروه تیمار با بزرگنمایی ۴۰×۱۰

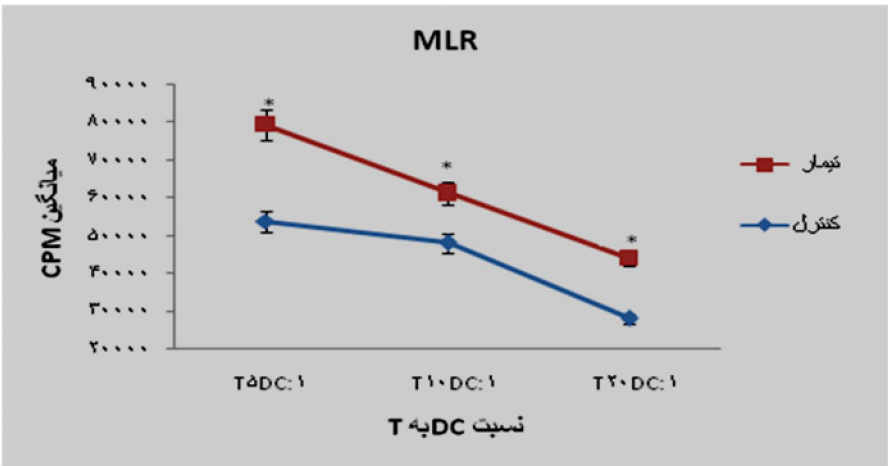
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018



نمودار شماره (۱): میانگین درصد بیگانه خواری در سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و تیمار در حالت نابالغ و بالغ (* وجود اختلاف معنی‌دار بین حالت بالغ و نابالغ P <۰/۰۵)

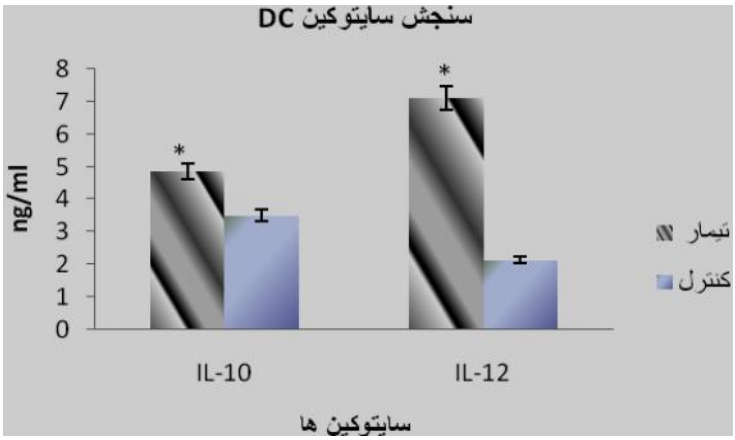


نمودار شماره (۲): فنوتیپ سلول‌های دندریتیک در گروه کنترل و تیمار (* وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل P <۰/۰۵)

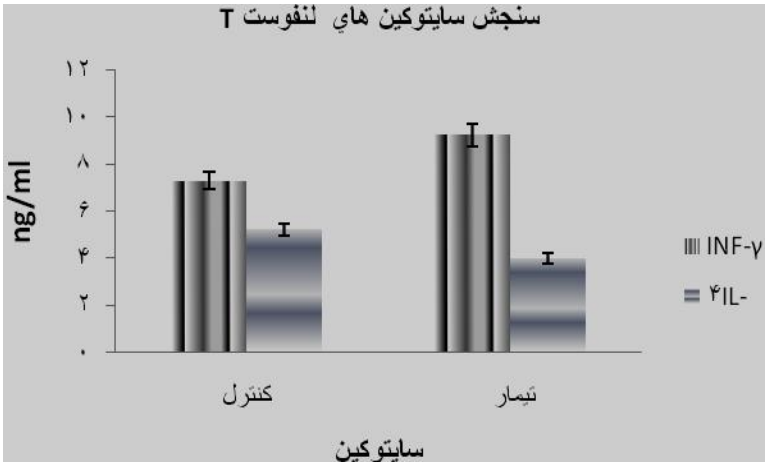


نمودار شماره (۳): مقایسه میانگین نتایج حاصل از واکنش MLR با استفاده از متیل تایمیدین نشاندار در گروه کنترل و تیمار

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018



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



نمودار شماره (۵): میانگین میزان ترشح سایتوکین‌های IL-4 و IFN-γ از لنفوسیت‌های T که توسط سلول‌های دندریتیک تحریک شده بودند.

بحث و نتیجه گیری

به سبب افزایش یافته‌ها در مورد فیزیولوژی سلول‌های دندریتیک و اهمیت آن‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی با استفاده از ارائه‌ی آنتی ژن، امید بکار بردن این سلول‌ها در درمان سرطان بسیار زیاد است؛ بنابراین دانشمندان در پی این هستند که سلول‌های دندریتیکی تولید کنند که بهترین عملکرد بیولوژیکی را داشته باشند اما بدون شک تولید سلول‌های دندریتیک کاملاً بالغ، یک دست و دارای تمامی مشخصه‌های مورد نیاز برای استفاده در ایمنوتراپی، در شرایط آزمایشگاه، کاری بسیار مشکل و نسبی است (۹-۷). امروزه به منظور استفاده از سلول‌های دندریتیک برای ایمونوتراپی سرطان، امکان تولید آن‌ها از دو منبع یعنی سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان یا خون محیطی و یا مونوسیت های خون محیطی فراهم است. ولی از آنجایی که تولید سلول‌های دندریتیک از پیش سازهای $CD34^+$ مستلزم انجام بیوپسی و تهیه‌ی مغز

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018

استخوان و یا تزریق G-CSF به منظور افزایش تعداد آن‌ها در خون محیطی و سپس لکوفرز می‌باشد و هر دوی این روش‌ها با تیمار اضافی و خطراتی برای بیمار همراه است، امروزه تولید سلول‌های دندریتیک از مونوسیت های خون محیطی کاربرد تحقیقاتی و بالینی گسترده‌ای یافته است (۱۰).

اکثر تحقیقات در عرصه‌ی سلول‌های دندریتیک بر حول محور استفاده‌های درمانگاهی این سلول‌های ارزشمند، در جریان هستند و هر پژوهشگری به دنبال تولید سلول دندریتیک مناسب، منطبق بر نوع استفاده از آن، می‌باشد. ویژگی‌های مورد نظر و قابل بررسی این سلول‌ها از قبیل میزان بیان نشانگرهای سطحی، بروز کمپلکس‌های سازگاری نسجی اصلی MHC، قدرت بیگانه خواری، قابلیت پاسخ گویی به کموکاین های مسئول مهاجرت و نهایتاً توانایی این سلول‌ها در تحریک سلول‌های T و نحوه‌ی پلاریزاسیون آن‌ها، تنها بخشی از ده‌ها آزمایش پیچیده و دشواری است که بر پایه‌ی تعیین میزان بلوغ این سلول‌ها استوار می‌باشند (۱۱).

همان‌طور که در نتایج ملاحظه گردید سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار از لحاظ فنوتیپ دارای شاخص‌های بهتری نسبت به گروه کنترل بودند که یکی از این شاخص‌های مورد بحث میزان بیان مولکول CD14 در سطح سلول‌های دندریتیک می‌باشد. سلول‌های دندریتیک بالغ می‌بایست دارای مقادیر کاهش یافته‌ای از CD14 بر سطح خود باشند، که این کاهش در واقع در حین بلوغ و به واسطه‌ی کاهش نسخه برداری از ژن CD14 بر اثر IL-4 اضافه شده، رخ می‌دهد (۱۲)؛ بنابراین سلول‌های DC تولید شده در گروه تیمار از این لحاظ نسبت به گروه کنترل برتری دارند و کاهش بیان مولکول CD14 در سطح آن‌ها نشان دهنده بلوغ این سلول‌ها می‌باشد. مولدن و همکارانش به این نتیجه رسیدند که سلول‌های اندوتلیال که در معرض TNF-α قرار داشتند باعث القای بلوغ و بهبود فنوتیپ سلول‌های دندریتیک گردیدند که نتایج آن‌ها با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱۳). سلول‌های فیبروبلاست با ترشح فاکتورهائی نظیر IL6 ,IFN-β ,GM-CSF ,M-CSF، باعث تکامل سلول‌های دندریتیک می‌شوند و میزان بیگانه خواری آن‌ها را در حالت بلوغ کاهش می‌دهند (۱۴).

از دیگر شاخص‌های سلول‌های دندریتیک، می‌توان به بیان مولکول CD83 در سطح این سلول‌ها اشاره کرد، این نشانگر جزو ابرخانواده‌ی ایمنوگلوبولین ها بوده و هنوز نقش اصلی آن در هاله‌ای از ابهام است. البته به نظر می‌رسد این مولکول سطحی در تنظیم ایمنی سلولی بی تأثیر نباشد (۱۶-۱۵). باید به این نکته توجه داشت که یک سلول دندریتیک ایده آل 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 سایتوکاین هایی مثل IL-12 می‌باشد (۱۲). همان‌گونه که در نتایج ملاحظه گردید سلول‌های دندریتیک گروه تیمار به میزان چشمگیری بیان مولکول‌های CD80 و CD86 در سطحشان نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود و این عامل باعث شده بود که این سلول‌ها بتوانند لنفوسیت‌های T را به میزان بیشتری نسبت به گروه کنترل تحریک کنند تا تکثیر یابند و این مسئله در نمودار شماره ۳ کاملاً مشهود است و نشان دهنده بلوغ بهتر سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار می‌باشد. از دیگر مشخصه‌های مورد بحث در مورد سلول‌های دندریتیک بالغ، افزایش بیان MHC II در سطح این سلول‌ها می‌باشد که در مطالعه‌ی حاضر، بیان این مولکول در قالب سنجش میزان بروز HLA-DR در سطح سلول‌های تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های دندریتیک که تحت تأثیر مایع رویی سلول‌های فیبروبلاست (HSFPI3) و اندوتلیال (HUVECE) تولید شده بودند از این لحاظ نسبت به گروه کنترل برتری داشتند و میزان بروز HLA-DR در سطح آن‌ها از گروه کنترل با اختلاف معنی‌داری بیشتر بود که این موضوع نیز بیانگر بلوغ بهتر این سلول نسبت به گروه کنترل می‌باشد. اندرج و همکارانش نیز به این نتیجه رسیدند که سلول‌های فیبروبلاست پوست باعث القای بلوغ در سلول‌های دندریتیک می‌شوند (۱۷). همچنین تانگ و همکارانش گزارش دادند که سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شوند (۱۸). موضوع مورد بحث بعدی قدرت بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک است. انتظار می‌رود سلول‌های دندریتیک با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه خواری و تمامی ویژگی‌های لازم برای اخذ آنتی ژن از جمله گیرنده‌های سطحی لازم برای این کار را از دست داده و در عوض قدرت عرضه‌ی آنتی ژن و نهایتاً تحریک سلول‌های T را تقویت کنند (۱۹). قدرت اخذ آنتی ژن بالا در یک سلول دندریتیک نابالغ که قرار است به عنوان یک اَجوانت سلولی بکار 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. همان‌طور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌شود سلول‌های دندریتیک گروه تیمار از این لحاظ نیز بدون نقص بودند و میزان فاگوسیتوزشان در حالت نابالغ بالا بود ولی زمانی که بالغ شدند میزان فاگوسیتوزشان به شدت کاهش یافت و در عوض میزان بیان مولکول‌های سطحی آن‌ها افزایش

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018

یافت. ژانگ و همکارانش نیز بیان کردند که سلول‌های اندوتلیال باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک بینابینی می‌شوند و باعث می‌شوند این سلول‌ها در زمان بلوغ میزان فاگوسیتوزشان به شدت کاهش یابد (۲۰). از دیگر 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 (MLR)، مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱) و همان‌گونه 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 واسطه‌ی بلوغ و بیان بالای مولکول‌های کمک تحریکی CD86 , CD80توسط سلول‌های دندریتیک در گروه تیمار می‌باشد.

سلول‌های دندریتیک می‌توانند عملکرد لنفوسیت‌های T تنظیم کننده را کنترل نمایند. این سلول‌ها 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؛ بنابراین سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار از نوع DC1 می‌باشند. DC1 در القای پاسخ ایمنی سلولی و مبارزه با پاتوژن های داخل سلولی موثر است و DC2 در تولید آنتی بادی و مبارزه با پاتوژن‌های خارج سلولی ایفای نقش می‌کند (۲۲).

در این مطالعه سنجش IL-4 و IFN-γ به عنوان نمایندگان تیپ‌های سیتوکینی Th1 و Th2 مورد سنجش قرار گرفت و چون نسبت IFN-γ به IL-4 در گروه تیمار بیشتر بود؛ بنابراین سلول‌های دندریتیک که تحت تأثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال وریدناف انسان (HUVEG) و فیبروبلاست پوست انسان (HSFPI3) تولید گردیدند باعث پلاریزاسیون لنفوسیت‌های T به سمت Th1 شدند.

تشکر و سپاسگزاری

در اینجا جا دارد از کلیه کسانی که ما را در انجام این طرح یاری رساندند، تقدیر و تشکر به عمل آوریم همچنین از آقایان مهدی دوست، فرهنگ پژوه، دکتر ملک خطابی، دکتر اکبری، دکتر احسان شجاعی فر و مهندس عزیزی 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 بدست آمده، حاصل تلاش شبانه روزی اساتید بزرگوار و همکاران محترم می‌باشد، امید است با تحقیق بیشتر بر روی این سلول‌های دندرتیک زمینه پیشرفت درمان بیماری‌های خاص و سرطان در کشورمان با سرعت بیشتری دنبال گردد و باعث پیشرفت علمی کشورمان در زمینه سلول درمانی گردد.

References:

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000; 18: 767-811.
2. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol 2005; 5:296-306.
3. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 2002; 20: 621-7.
4. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol Today 1999; 20: 561-7.
5. Smith R. S, Smith T, Blieden M, Phipps R. Fibroblasts assentinel cells: synthesis of chemokines and regulation of inflammation. Am J Pathol 1997;151: 317-22.
6. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. J Cell Biochem 61 1996; 514-23.
7. 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.
8. Fernandez NC, Lozier A, Flament C. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: crosstalk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. Nat Med 1999; 5: 405-41.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 21:44 +0330 on Friday February 23rd 2018

9. Garcia F, Lejeune M, ClimentN, Gil C, Alcami J, Morente V et al. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heatinactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. J Infec Dis 2005; 191: 1680-5.
10. Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei, P. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. J Cellimm 2009; 257: 23-31.
11. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. Nat Rev Immunol 2004; 4: 941-52.
12. Bitton R.J. Cancer vaccines: a critical review on clinical impact. Curr Opin Mol Ther2004; 17-26
13. Moldenhauer A, Nociari M, Lam G, Salama A, Rafii S, Moore MA. Tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelium: an inducer of dendritic cell development from hematopoieticprogenitors and myeloid leukemic cells. Stem Cells 2004; 22: 144-57.
14. Smith RS, Smith T, Blieden M, Phipps R. Fibroblasts assentinel cells: synthesis of chemokines and regulation of inflammation. Am J Pathol1997; 151: 317-22.
15. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001; 106:255-8.
16. Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. J Immunol 2001; 168: 2599-602.
17. Saalbach A, Klein C, Sleeman J, Sack U, Kauer F, Gebhardt C et al. Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells. J Immunol 2007; 178; 4966-74.
18. Tang H, Guo Z, Zhang M, Wang J, Chen G, Cao X. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10. Blood. 2006 15;108(4):1189-97.
19. Henry F, Boisteau O, Betaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Gregoire M. Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. Cancer Res 1999; 59: 3329-32.
20. 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: 1124-33.
21. Nguyen X.D, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Kluter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. J Immunol Methods 2003; 275: 57-64.
22. Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J Immunol 1997; 159: 4772-85.