Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

مقاله پژوهشی

بررسی اثر DNA آسیب دیده با داروی آلکیله کننده ملفالان بر میزان و کیفیت شاخص‌های بلوغ و جهت گیری فنوتیپ های ایمنی سلول‌های دندرتیک

دکتر احمد مرشدی[1]، دکتر نوروز دلیرژ[2]، دکتر پرواپروین[3]، آرام مکاری زاده[4]*

تاریخ دریافت: 1391/02/08 تاریخ پذیرش: 1391/04/07

چکیده

پیش زمینه و هدف: سلول‌های دندریتیک تواناترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن درالقا یا جهت دهی پاسخ‌های ایمنی وابسته به سلول‌های T هستند. در افراد مبتلا به سرطان، سرکوب و یا انحراف پاسخ‌های ایمنی از جهت مطلوب، مانع عملکرد مناسب این سلول‌ها در قبال سلول‌های سرطانی می‌گردد. امروزه تولید، ازدیاد و بلوغ این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی درحضور فاکتورهای بلوغی که در نهایت بتواند موجب شکل گیری پاسخ‌های TH1[5] در فرد دریافت کننده گردد، محور بسیاری از تحقیقات مرتبط با ایمونوتراپی سرطان‌ها قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر DNA آزادسازی شده از سلول تحت تأثیر داروی ضد سرطان ملفالان، بر بلوغ و فنوتیپ سلول‌های دندرتیک و نیزجهت دهی پاسخ‌های ایمنی مرتبط با بهبود یا تشدید بیماری در لنفوسیت های T کمکی می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه تأثیر DNA آسیب دیده رده سلولی MCF-7، که تحت تیمار با عامل آلکیله کننده ملفالان تهیه شده است در همراهی با عوامل بلوغ استاندارد (TNF-α و MCM[6]) بر شاخص‌های بلوغ سلول‌های دندرتیک از قبیل مورفولوژی، فنوتیپ، توان بیگانه خواری، قدرت القاء MLR[7] و ترشح سایتوکاینی در قیاس با گروه شاهد تیمار شده با عوامل بلوغ استاندارد، بررسی شده است.

یافته‌ها: داده‌ها نشان دادند که تیمار سلول‌های دندرتیک باDNA آسیب دیده موجب افزایش بیان CD83(شاخص بلوغ سلول‌های دندرتیک)، کاهش قدرت بیگانه خواری سلول‌ها و نیز جهت دهی پاسخ‌ها به سمت تشکیل فنوتیپ DC1 و تیپ سیتوکاینی TH1می‌شود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که DNA آسیب دیده در القاء بلوغ سلول‌های دندرتیک و جهت دهی پاسخ ایمنی مناسب بر ضد رده سلولی سرطان سینه (MCF-7) کارآمد می‌باشد.

کلید واژه‌ها: سلول دندرتیک، DNA آسیب دیده، ملفالان، ایمونوتراپی، T H1، MCF-7، TNF-α، MCM، MLR، CD83

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره سوم، ص ۳۱۴-۳۰۴، مرداد و شهریور ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۹۱۲۶۴۰۸۹۳۳

Email: aramm79@yahoo.com

مقدمه

سلول‌های دندریتیک به عنوان تواناترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن در القا یا جهت دهی پاسخ‌های ایمنی وابسته به سلول‌های T و نیز به دلیل مجموعه وسیعی از کاربردهای بالقوه در زمینه تقویت پاسخ‌های ایمنی و یا جهت دهی این پاسخ‌ها، نظر بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. شناخت روش‌های جداسازی، تولید و القاء بلوغ این سلول‌ها در شرایط In vitro نه تنها کاربردهای زیادی در زمینه ایمونو تراپی سرطان‌ها و اختلالات سیستم ایمنی نظیر بیماری‌های خود ایمن دارد بلکه امکان درک بیشتر مکانیسم‌های حاکم بر سیستم ایمنی در In vivo را نیز فراهم می‌سازد(۲،۱). از این رو شناخت عوامل ناشناخته القا کننده بلوغ، نظیر عواملی که در نتیجه تأثیر داروهای شیمی درمانی بر سلول‌های سرطانی، ایجاد و آزادسازی می‌شوند. نه تنها در گسترش درک ما از بیولوژی و عملکرد این سلول‌ها در مواجهه با این عوامل در شرایط In vivo مفید می‌باشد بلکه در روش‌های ایمونوتراپی به عنوان ابزاری در القاء بلوغ سلول‌های

[1] دانشیار ایمونولوژی، گروه میکروب شناسی،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[2] استادیار ایمونولوژی، گروه میکروب شناسی،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[3] دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی

[4] دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی ،گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

دندریتیک نابالغ بیماران سرطانی که در آن سرکوب شدیدسیستم ایمنی، روند شکل گیری یا جهت گیری صحیح بسیاری از پاسخ‌های ایمنی را تحت الشعاع قرار می‌دهد، بسیار حائز اهمیت است (۳، ۴) از سوی دیگر نوع سایتوکاینی که توسط سلول‌های دندریتیک بالغ و یا لنفوسیت‌های T تحریک شده توسط آن‌ها تولید می‌شود در جهت دهی تیپ پاسخ‌های ایمنی بسیار حائز اهمیت است (۵). در این راستا اگر سلول‌های دندریتیک در طی بلوغ به سمت فنوتیپ DC1حرکت کنند میزان تولید IL-12 نسبت به IL-10 بیشتر خواهد بود و برعکس اگر میزان تولید IL-10 نسبت بهIL-12 بیشتر باشد سلول‌های دندریتیک به سمت فنوتیپ DC2 خواهند رفت (۶). DC1 در القای پاسخ ایمنی سلولی از قبیل ایمنی ضد توموری موثر است و DC2 در تولید آنتی بادی و مبارزه با پاتوژن های خارج سلولی ایفای نقش می‌کند (۷). با تکیه بر این هدف که بلوغ و پولاریزاسیون سلول‌های دندرتیک به سمت فنوتیپ DC1 در القاء زیر مجموعه TH1[1] و پیشبرد پاسخ ایمنی ضد توموری موثر است در تحقیق حاضر به بررسی تا ثیر DNA آسیب دیده آزاد سازی شده از سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) که تحت تیمار با داروی ضد سرطان ملافان تهیه شده است به عنوان یکی از ترکیبات آزادسازی شده از سلول‌های سرطانی متعاقب شیمی درمانی، برپیشبردشاخص های بلوغ، جهت دهی فنوتیپ سلول‌های دندرتیک وتوانایی آن‌ها درپولاریزاسیون پاسخ سلول‌های T کمکی به سمت زیررده های موثر در بهبود یا تشدید بیماری پرداخته شده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه پس از تهیه سلول‌های دندریتیک نابالغ از سلول‌های مونوسیت خون محیطی پنج فرد داوطلب، جهت القاء بلوغ در گروه شاهد از MCM و TNF-α و در گروه تیمار از MCM[2] و TNF-α به همراه DNA آسیب دیده استفاده گردید.

مونوسیت‌های خون محیطی بر اساس قابلیت چسبیدن به فلاسک کشت و بر مبنای روش Delirezh و همکاران جداسازی شدند (۸). به طور خلاصه پس از اخذ خون هپارینه از داوطلبین و بردن آن بر روی گرادیانت فایکول هایپک (سیگما-آمریکا)، اقدام به جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای مستقر در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده گردید. با انتقال سلول‌های تک هسته‌ای به فلاسک کشت T75، سلول‌های مونوسیت بر مبنای قابلیت چسبیدن به کف فلاسک خالص سازی گردید. به منظور تولید DC از سلول‌های چسبنده، به محیط کشت RPMI 1640 (Gibco-انگلستان) , 1000U/ml GM-CSF (Sandoz Basel ـ سوئیس) و IL-4 500U/ml(Peprotech-آمریکا) افزوده شد. در روز سوم مجدداً مقادیر مشابهی ازGM-CSF و IL-4 به فلاسک های حاوی سلول اضافه گشت. در روز چهارم عصاره سلول‌های MCF-7 که قبلاً به عنوان آنتی ژن تهیه شده بود، به نسبت ۱: ۱ به سلول‌های دندریتیک اضافه شدند. جهت تهیه عصاره سلول‌های MCF-7 به طور خلاصه پس از کشت این رده سلولی، سوسپانسیون سلولی آن متعاقب چهار بار قرار گرفتن در نیتروژن مایع و آب ۳۷ °C هر کدام به مدت ۵ دقیقه (چرخه فریز / ذوب) تهیه می‌گردد. سپس محصولات بدست آمده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع آوری و مجددا به مدت یک ساعت با سرعت ۱۳۰۰۰g سانتریفیوژ و با فیلتر۰/۲۲μm استریل گردید. از این مایع رویی به عنوان آنتی ژن استفاده شد.

در روز پنجم به عنوان عامل بلوغ (Peprotech ـ آمریکا) (ml/ ۱۰ng) TNF- α MCM,حدود ۲۵درصد محیط کشت به گروه شاهد و به گروه تیماربه همراه این عوامل DNA آسیب دیده با غلظت ۱۰۰μg/ml اضافه شد. MCM مایع رویی کشت ۲۴ ساعته مونوسیت‌های فعال شده توسط ایمونوگلوبولین انسانی بوده که سرشاراز سایتوکاین های مترشحه از مونوسیت‌ها می‌باشدDNA آسیب دیده به شیوه Rad و همکاران تهیه گردید. به طور خلاصه متعاقب کشت رده سلول‌های سرطانی MCF-7، این سلول‌ها به مدت ۱۸ ساعت تحت تأثیر داروی ملفالان (شرکت GlaxoSmithKline- آلمان) به میزان 100μg/ml قرار گرفتند. جهت تایید اثر دارو، میزان آپوپتوزیس و نکروز در سلول‌های تیمار شده به روش Annexin-V PI مورد سنجش قرار گرفته و نهایتا DNA آسیب دیده این سلول‌ها به روش استاندارد کلروفرم-فنل استخراج گردید. DNA استخراج گردیده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه گیری کمی و کیفی گردید (۹).

سلول‌های دندریتیک تولید شده در روز هفتم با استفاده از بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵mM) برداشت شده و با استفاده از تریپان بلو شمارش و میزان زنده بودنشان نیز تعیین و ثبت شد. ازپنج معیار زیر به عنوان شاخص بلوغ DC ها استفاده شدند:

۱- مورفولوژی: از لحاظ میکروسکوپی سلول‌های نسبتاً بزرگ، گرد و دارای زوائد سلولی بسیار زیاد به عنوان سلول دندریتیک در نظر گرفته شدند.

۲- ارزیابی فنوتیپ با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری:

از آنتی بادی‌های آنتی CD83، آنتی HLA-DR و آنتی CD14 (DAKO-امریکا) به منظور تعیین فنوتیپ سلول‌های

[1] T Helper 1
[2] Monocyte conditioned medium

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

دندریتیک استفاده گردید. نتایج حاصل از فلوسایتومتری با نرم افزار CellQuest مورد آنالیز قرار گرفت.

۳- قدرت بیگانه خواری: برای این منظور از بید لاتکس فلورسانت گنژوگه با FITC (سیگما- آمریکا) استفاده شد. نمونه‌های سلولی متعاقب ۴۸ ساعت انکوباسیون با بید لاتکس به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه جهت بررسی با میکروسکوپ فلورسانت و گروه دیگر برای سنجش میانگین شدت فلورسانت (MFI) با دستگاه فلوسیتومتری، تخصیص یافت (۱۰).

۴- واکنش مختلط لنفوسیتی(MLR): لنفوسیت های آلوژن از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد داوطلب (سلول‌های نچسبیده به کف فلاسک بعد از ۲ ساعت انکوباسیون) تهیه گردید. 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 حاوی ۱۰درصد سرم AB^+ انسانی در حجم ۲۰۰µl در دمای ۳۷ °C، ۵% CO2 و ۹۰درصد رطوبت کشت داده شدند. در روز پنجم به هر خانه مقدار ۱/۵µ Ci متیل تیمیدین نشاندار شده با[^{3}H] اضافه و به مدت ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گردیدند. سلول‌ها توسط دستگاه Cell Harvester بر روی کاغذ نیتروسلولزی منتقل شدند. میزان تابش پرتو بتا از هر نمونه به مدت یک دقیقه توسط دستگاه شمارشگر بتا، شمارش و ثبت شد.

۵- اندازه گیری سایتوکاین: میزان تولید IFN-γ (شاخص TH1) و(IL-4 شاخصTH2) در مایع رویی تست MLR و میزان تولید IL-10و IL-12 در مایع رویی روز هفتم کشت سلول‌های دندریتیک با استفاده از کیتهای الایزا(Peprotech – آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت.

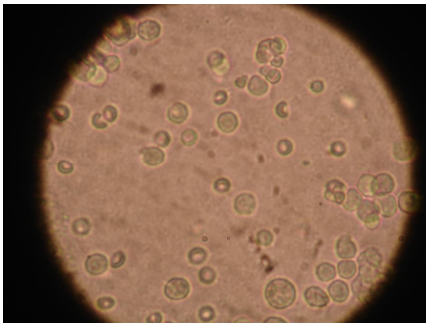
نتایج این مطالعه با برنامه Graph Pad Prism Software(version 5.03. Graph Pad (software Inc. San Diego, California تفسیر و بررسی شد. مقایسه بین گروه‌ها توسط Paired t Test انجام شد.

مقدار $P<0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

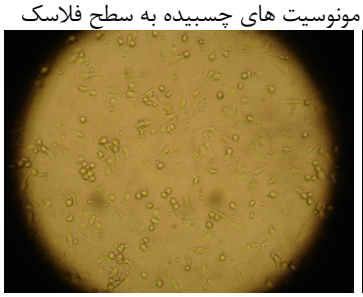
یافته‌ها

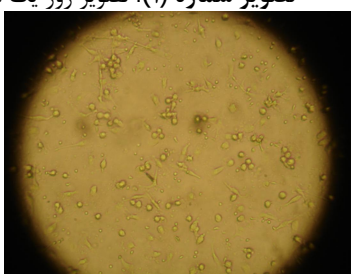
- بررسی سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس

بررسی فلاسک های کشت به طور روزانه با میکروسکپ معکوس نشان داد که طی هفت روز کشت، جمعیت همگونی از سلول‌های دندریتیک شناور با زوائد دندریتیک زیاد، مشخص و هستهٔ بزرگ واقع در خارج از مرکز سلول ایجاد شدند (تصاویر ۱، ۲ و ۳). به لحاظ مورفولوژی تفاوتی بین سلول‌های دندریتیک بالغ شده در گروه تیمار و شاهد مشاهده نشد.



تصویر شماره (۱): تصویر روز یک مونوسیت های چسبیده به سطح فلاسک





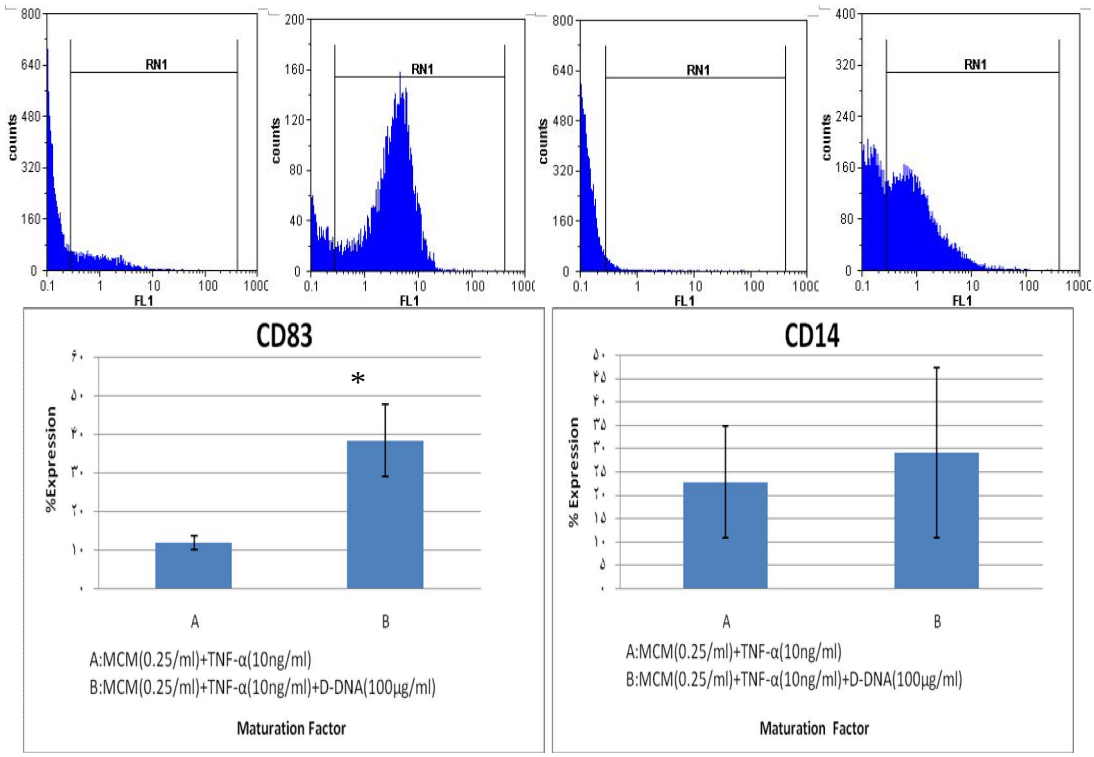
تصویر شماره (۲): تصویر روز هفت یکی از گروه‌های شاهد

تصویر شماره (۳): تصویر روز هفت یکی ازگروه های تیمار

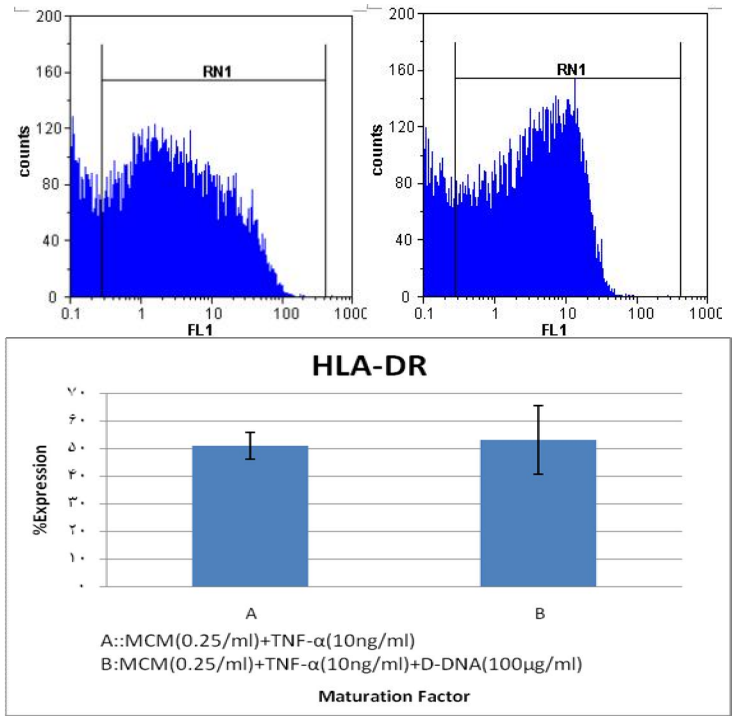
- بررسی فنوتیپ سطحی سلول‌های دندریتیک

با بررسی سه نشانگر در سطح سلول‌های دندریتیک مشخص شد، درصد بیان مولکول‌های CD14، CD83 و HLA-DR به طور میانگین به ترتیب در گروه‌های شاهد ۱۱/۹۵±۲۲/۹۱٪، ۱۲/۰۱±۱/۸۴٪ و ۱۲/۴۹±۵۰/۹۳٪ و در گروه‌های تیمار ۱۴/۸۴ ± ۲۹/۲۴٪، ۱۰/۱۲±۳۸/۵۸٪ و ۴/۸۵ ±۵۳/۰۱٪ بود. که با در نظر گرفتن P<۰/۰۵ تنها دربیان CD83 اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (نمودار ۱ و ۲).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017



نمودار شماره (۱): سنجش CD14 و CD83 سلول‌های دندریتیک حاصل از دو گروه که فاکتور بلوغ متفاوت دریافت نموده‌اند. * نشانگر اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است. یکی از هیستوگرام های به دست آمده به عنوان نمونه در بالای نمودار ستونی مربوطه قرار داده شده است.



نمودار شماره (۲): سنجش HLA-DR درسلول های دندریتیک حاصل از دو گروه که فاکتور بلوغ متفاوت دریافت نموده‌اند. یکی از هیستوگرام های به دست آمده به عنوان نمونه در بالای نمودار ستونی مربوطه قرار داده شده است.

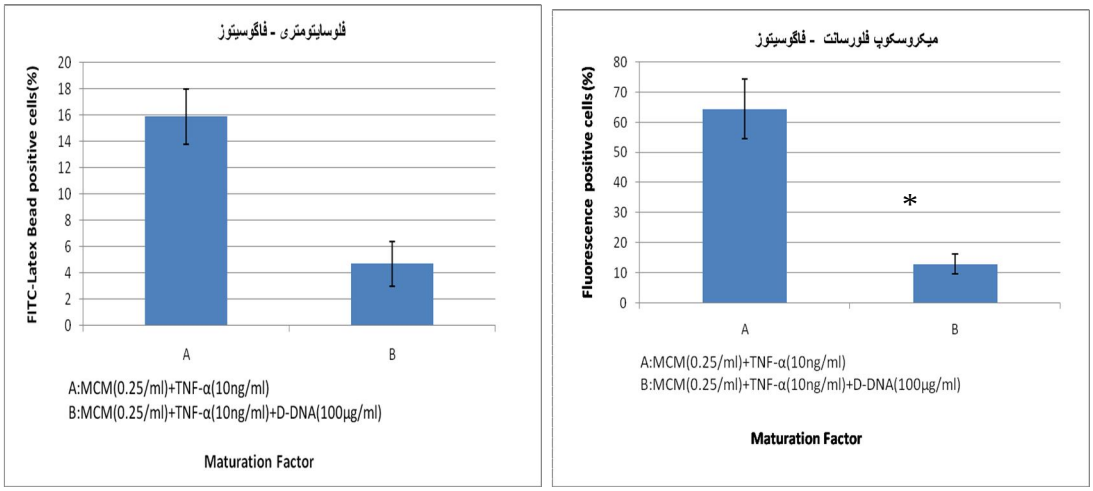
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

-بررسی قدرت بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک بالغ

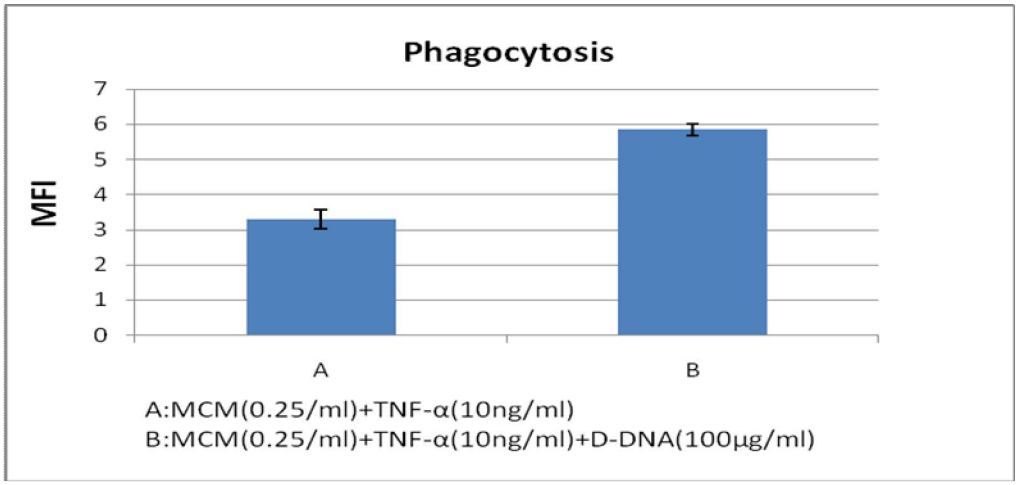
بررسی قدرت بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک بالغ در گروه‌های شاهد وتیماربا روش فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلول‌های دندریتیک که بیگانه خواری انجام داده‌اند در گروه‌های شاهد وتیماربطورمیانگین به ترتیب ۶/۱۸ ±۹/ ۱۵٪ و ۱/۷۳± ۴/۷۱٪ بود (نمودار ۳).

در بررسی انجام شده با میکروسکوپ فلورسنت معلوم شد به طور میانگین به ترتیب ۹/۸۵± ۶۴/۴۹ ٪ و ۳/۴۳ ± ۱۲/۹۶٪ از سلول‌های دندریتیک حاصل از گروه‌های شاهد وتیمار، ذرات لاتکس فلورسانت را بیگانه خواری کردند با در نظر گرفتن P<۰/۰۵، اختلاف معنی‌دار بود (نمودار ۳).

بررسی میانگین شدت فلورسانت (MFI) نیزکه نشان دهنده تعداد ذرات لاتکس بلع شده به ازای هر سلول می‌باشد در مورد گروه‌های شاهد وتیمار به طور میانگین به ترتیب ۰/۲۷ ±۳/۳۰٪ و ۲/۹۷ ± ۵/۸۵٪ بود که اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌داد (نمودار ۴).



نمودار شماره (۳): مقایسه درصد سلول‌های دندریتیک بیگانه خواری کرده حاصل از دو گروه که فاکتور بلوغ متفاوت دریافت نموده‌اند، با استفاده از بررسی میکروسکوپی و دستگاه فلوسیتومتری. * نشانگر اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.



نمودار شماره (۴): مقایسه MFI سلول‌های دندریتیک حاصل از دو گروه که فاکتور بلوغ متفاوت دریافت نموده‌اند.

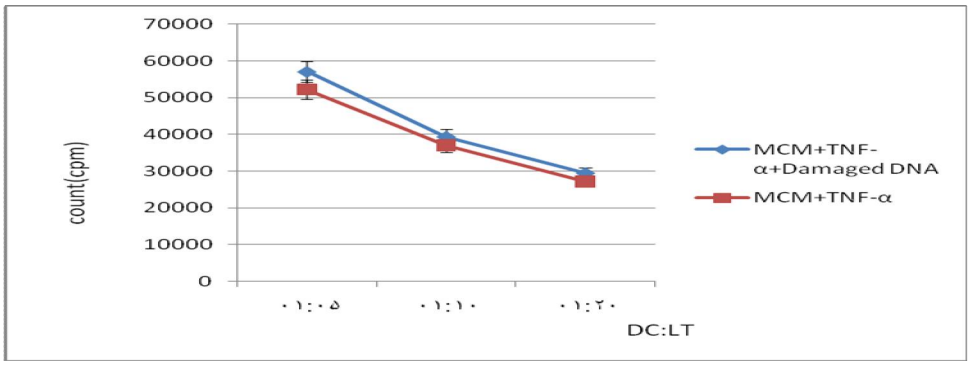
- واکنش مختلط لنفوسیتی آلوژن (MLR)

به منظور سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک حاصل از گروه‌های شاهد وتیمار، توانایی آن‌ها در القاء واکنش لنفوسیتی آلوژنیک مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که هر چند توانایی سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه‌های تیمار در القاء تکثیر سلول‌های T آلوژن بیشتر از سلول‌های تولید شده در گروه‌های شاهد بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دارنبود (جدول ۱ و نمودار ۵).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

جدول شماره (۱): نتایج حاصل از میزان تابش پرتو بتا نمونه‌های سلولی در مدت یک دقیقه توسط دستگاه شمارشگر بتا در واکنش مختلط لوکوسیتی (MLR)

T/DC ratio	MCM+TNF-α cpm	MCM+TNF-α+Damaged DNA cpm
۵ :۱	۵۲۱۹۱	۵۷۰۶۱
۱۰ :۱	۳۶۹۶۳	۳۹۳۶۳
۲۰ :۱	۲۷۱۲۰	۲۹۴۷۲



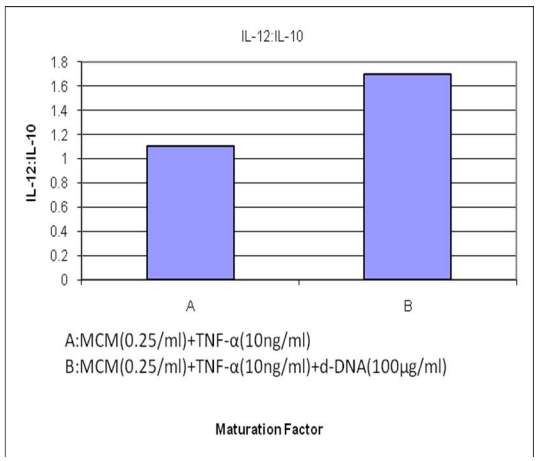
نمودار شماره (۵): نتایج حاصل از واکنش MLR با استفاده از متیل تایمیدین نشان‌دار

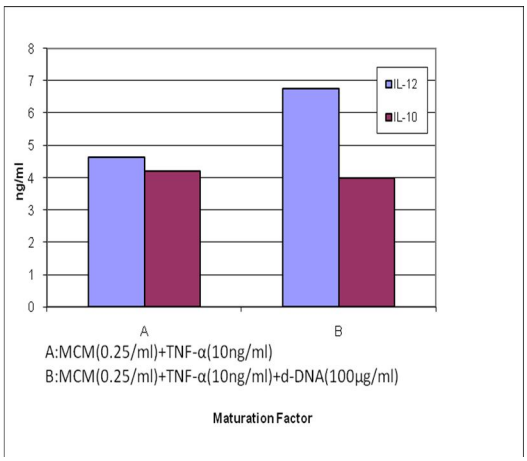
- *سنجش سیتوکاین های IFN- γ، IL-4، IL-10و IL-12*

به منظور بررسی نوع سایتوکاینهای تولید شده توسط سلول‌های دندریتیک و لنفوسیتهای T، از مایع روئی کشت سلول‌های دندریتیک در روز هفتم و مایع روئی واکنش MLR، به ترتیب برای سنجش سایتوکاینهای IL-12 (شاخص فنوتیپDC1) و IL-10 (شاخص فنوتیپ DC2) و نیز IFN-γ و IL-4 به عنوان نمایندگان تیپ‌های سایتوکینی TH 1 وTH 2 استفاده گردید.

اندازه گیری میزان تولید این سایتوکاینها نشان داد در اثر افزودن DNAآسیب دیده به عوامل بلوغ استاندارد، میزان تولید سایتوکاین IL-12 افزایش و تحت این شرایط نسبت IL-10: IL-12 کاهش یافت (نمودار ۶).

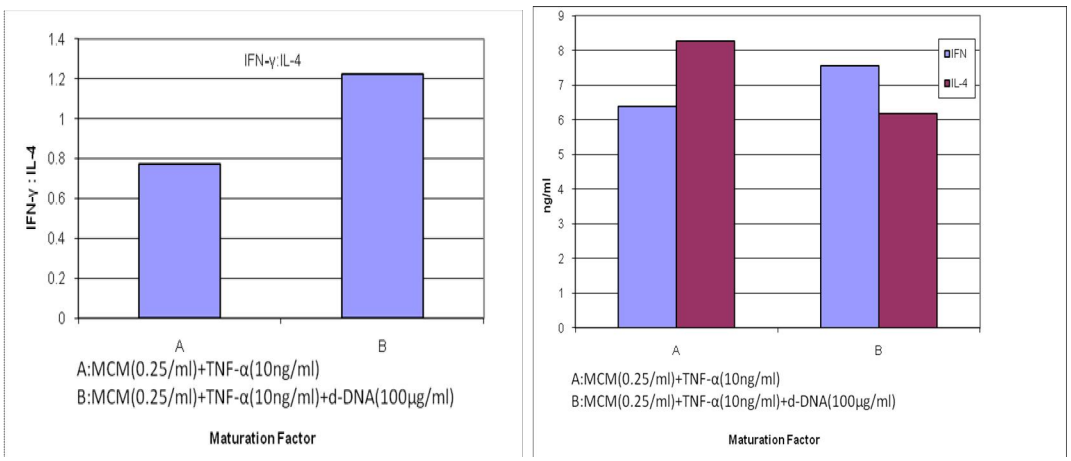
بررسی میزان تولید سایتوکاینهای IFN-γ و IL-4 نیز نشان داد که در حضور DNAآسیب دیده، افزایش تولید IFN-γ منجربه افزایشی درنسبتIL-4 : IFN-γ گردید. (نمودار ۷)





نمودار شماره (۶): سنجشIL-10 وIL-12 تولید شده در مایع رویی کشت سلول‌های دندرتیک گروه‌های شاهد و تیمار (سمت راست) و مقایسه نسبت IL-12 به IL-10 تولید شده (سمت چپ)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017



نمودار شماره (۷): سنجش γ -IFNو IL-4 تولید شده در مایع رویی کشت واکنش مختلط سلولی گروه‌های شاهد و تیمار (سمت راست) ومقایسه نسبت γ -IFN به IL-4 تولید شده (سمت چپ)

بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از شمارش سلول‌های تولید شده و بررسی میکروسکوپی فلاسک ها نشان دادکه درصد محصول در استفاده از هر دو نوع فاکتور بلوغ، به دامنه‌ی بدست آمده توسط دیگر محققان (حدود ۵-۶%) نزدیک بوده (۱۱،۸) و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد.

از شاخص‌های اصلی بلوغ سلول‌های دندریتیک، می‌توان به افزایش بیان CD83 به عنوان نشانگر اصلی و اختصاصی سلول‌های دندریتیک بالغ اشاره کرد (۱۲). از آنجایی که عملکرد این نشانگر در عرضه آنتی ژنی، فعال‌سازی لنفوسیت ها و تنظیم پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌باشد (۱۳). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن DNA آسیب دیده به پرتوکول القای بلوغ سلول‌های دندرتیک، موجب افزایش بیان این شاخص می‌گردد. نتایج بدست آمده در مورد تحریک و جهت دهی پاسخ لنفوسیت های T کمکی توسط سلول‌های دندرتیک خود موید این نکته می‌باشد. حاصل کار با نتایج کار سایر محققین همخوانی دارد (۹).

در طی فرایند بلوغ سلول‌های دندرتیک، IL-4 اضافه شده موجب کاهش بروز مولکول‌های CD14 می‌گردد (۱۴). نتایج حاصل از سنجش این شاخص در سطح سلول‌های دندرتیک، حاکی از کاهش بروز آن در قیاس با مونوسیت‌های اولیه (۸۵%) به ۲۲درصد در گروه شاهد فاقد DNA آسیب دیده و ۲۹درصد در گروه دریافت کننده DNA آسیب دیده می‌باشد. با اینکه به طور کلی بروز این نشانگر در سطح سلول‌های دندریتیک حاصل از هر دو گروه نسبت به مقدار قابل انتظار آن در مونوسیت های اولیه (۸۵%) بسیار کاهش یافته است (به ترتیب ۲۲% و ۲۹%) و این کاهش در سلول‌هایی که DNA آسیب دیده دریافت کرده‌اند اندکی کم‌تر از گروه شاهد بوده ولی معنی‌دار نیست. طبق یافته‌های Alyamkina و همکاران DNA دو رشته‌ای قطعه قطعه شده باعث کاهش بیان CD14 در سطح سلول‌های دندریتیک بالغ می‌شود (۱۵).

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. همانطور که در نتایج مشاهده شد میزان بروز HLA-DR در سطح سلول‌های دندریتیکی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF-αو DNAآسیب دیده دریافت کرده بودند نسبت به سلول‌هایی که فقطMCM و TNF-α دریافت کرده بودند، بیشتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود این افزایش جزئی می‌تواند بیانگر تأثیر DNA آسیب دیده در افزایش بیان این مولکول می‌باشد. مضاف بر اینکه خود شاخص HLA- DR در سطح مونوسیت ها نیزقابل تشخیص بوده و افزایش آن در جریان بلوغ سلول‌های دندرتیک، چندان هم چشمگیر نمی‌باشد.

ویژگی 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 بلع پردازش آنتی ژن از جمله گیرنده‌های سطحی لازم برای این کار را از دست داده و در عوض قدرت عرضه آنتی ژن و نهایتاً تحریک سلول‌های T را تقویت کنند (۱۰). نتایج نشان داد درصد سلول‌های دندریتیک بالغی که بیگانه خواری کرده‌اند در گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF-αو DNA آسیب دیده دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که فقط

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

MCM و TNF-α دریافت کرده بودند، در ارزیابی فلوسایتومتری از ۱۵/۹ درصد به ۴/۷ درصد و در ارزیابی با میکروسکوپ فلورسانت از ۶۴/۴۹ به ۱۲/۹۶ کاهش یافته بود. این کاهش را اینگونه می‌توان توجیه نمود که DNA آسیب دیده با القای بلوغ بیشتر در سلول‌های دندریتیک سبب کاهش قدرت بیگانه خواری (بلع و پردازش آنتی ژن) می‌شود. ولی در عوض قدرت عرضه کنندگی آنتی ژن آن با افزایش بیان CD83 و HLA-DR افزایش می‌یابد. علت تفاوت نسبتاً چشمگیر موجود در نتایج درصد سلول‌های فاگوسیتوزکننده با فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلورسانت مربوط به این نکته می‌باشد که در ارزیابی با میکروسکوپ فلورسانت بر خلاف فلوسایتومتری، فاگوسیتوز در هر سه حالت اتصال، در برگیری و بلع آنتی ژن تشخیص و لحاظ می‌شود.

بررسی نتایج MLR آلوژنیک سلول‌های دندریتیک حاصل نشان داد این سلول‌ها در هر دو گروه تیمار و شاهد، لنفوسیت های مجاور شده را تحریک کرده و سبب تکثیرآنها شدند ولی اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت که شاید به دلیل عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بیان HLA-DR و احتمالا مولکول‌های کمک تحریکی در بین دو گروه باشد.

Ishii و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که ds-DNA ژنومی آزاد شده از سلول‌های توموری در حال مرگ، محرکی برای بلوغ فنوتیپی و عملکردی سلول‌های دندریتیک بوده و می‌تواند این سلول‌ها رابرای ظهور بیشتر MHC کلاس I و II و همچنین مولکول‌های کمک تحریکی CD80/86 تحریک نماید (۱۶). Alyamkina و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کاری مشابه، تاثیر ds-DNA آسیب دیده ژنوم انسان را بر بلوغ سلول‌های دندریتیک، کاهش نسبت سلول‌های $CD14^+$ و افزایش نسبت سلول‌های $CD83^+$ نشان دادند (۱۷).

Rad وهمکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که کشت توام سلول‌های دندریتیک نابالغ با سلول‌های توموری تحت تأثیر عوامل آلکیله کننده melphalan و chlorambucil، منجر به بالا رفتن قدرت DCs در تحریک سلول‌های T اتولوگ، بالا نگهداشتن میزان MHC کلاس II (HLA-DR)، ظهور بیشتر مولکول‌های کمک تحریکی CD86 و افزایش ترشح IL-12 می‌گردد (۹).

نتایج بدست آمده از دو پژوهش فوق با نتایج مطالعه حاضر، در مورد بروز بیشتر MHC کلاس II (HLA-DR) و CD83 هم خوانی دارد لیکن علی‌رغم افزایشی که در نسبت سلول‌های $CD14^+$ در گروه تیمار دریافت دارنده DNA آسیب دیده به گروه شاهد مشاهده گردید، افزایش یاد شده معنی‌دار نمی‌باشد ($P<0/05$).

با توجه به اینکه جهت گیری سلول‌های دندرتیک به سمت فنوتیپ DC1 در القاء زیر مجموعه TH1 و پیشبرد پاسخ ایمنی سلولی نظیر ایمنی ضد توموری موثر است درمطالعه حاضر نیز همراهی DNA آسیب دیده با عوامل بلوغ استاندارد منجر به افزایش تولید سایتوکاین IL-12، افزایش درنسبت IL-12 به IL-10 وپیشبرد شکل گیری فنوتیپ DC1 گشته بود.

اصولاً لنفوسیت‌های T در پاسخ به تحریکات آنتی ژنی در داخل و خارج از بدن به تولید انواع سایتوکاینها می‌پردازند این سایتوکاین‌ها به صورت اتوکراین و پاراکراین بر روی خود سلول‌های تولید کننده و سلول‌های دیگر تأثیر گذاشته به همراه سایر واکنش‌های بین سلولی به القاء پاسخ ایمنی و تنظیم آن می‌پردازند. براین اساس، نوع، مقدار، مسیر عرضهٔ آنتی ژن و محیط ظریف اطراف سلول‌های T به همراه تحریکات سایر سلول‌ها منجر به القاء دو نوع سلول T یعنی TH1 و TH2 می‌شود که هر کدام از آن‌ها انواع خاصی از سایتوکاین را ترشح می‌کنند در این میان، IFN-γ به عنوان سایتوکاین شاخص TH1 و IL-4 به عنوان سایتوکاین شاخص TH2 شناخته می‌شود. در نهایت فعال شدن هر یک از این رده‌های سلولی به تقویت بیشتر یکی از دو بازوی سلولی یا هومورال سیستم ایمنی می‌انجامد. در ایمونولوژی تومور، القاء پاسخ TH1 و به تبع آن تقویت ایمنی سلولی با واسطهٔ سایتوکاین‌هایی چون IFN-γ، IL-2 و غیره با تقویت پاسخ ضد توموری، تحلیل تومور و پیش آگهی بهتر بیماری همراه است بنابراین آگاهی از نوع سایتوکاینهای تولید شده در پاسخ به تحریک سیستم ایمنی با آنتی ژن خاص به اتخاذ تصمیم در مورد روند پاسخ ایمنی و پیش آگهی بیماری کمک به سزائی می‌کند. بر این مبنا در این مطالعه میزان تولید IL-4 و IFN-γ در مایع رویی واکنش MLR به عنوان نمایندگان تیپ‌های سایتوکاینی TH1 وTH2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که سلول‌های T آلوژن مقادیر بیشتری از IFN-γرادر پاسخ به حضور سلول‌های دندرتیک تیمارشده با DNA آسیب دیده در قیاس با گروه کنترل تولید می‌کردند که می‌تواند نشان دهنده شیفت پاسخ سلول‌هایT کمکی به سمت زیر رده TH1 باشد.

Nikitina و همکاران در سال ۲۰۰۱ درمطالعه ای بر روی موش‌های مبتلا به MethA Sarcoma و تومورC3 نشان دادند که ترکیب توام درمان با القاء آپوپتوزیس در سلول‌های توموری و تجویز سلول‌های دندرتیک می‌تواند یک راهبرد ایده ال در درمان تومورهای پیشرفته باشد (۱۸).

به طور کلی نقش DNA مهره داران در ارسال پیام خطر بسیار بحث بر انگیز است. Hall و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که DNA دست نخورده از طریق تعامل با سلول‌های

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

دندرتیک می‌تواند نقش ادجوانت را در پاسخ‌های ایمنی روده‌ای داشته باشد (۱۹). Ishii و همکارانش در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که ds-DNA تغییر نیافته آزادسازی شده از سلول‌های بافت نکروتیک در مدل موشی، ویژگی تحریک ایمنی دارد اما قطعه قطعه شدن یا جدا شدن دو رشته DNA از یکدیگر منجر به از بین رفتن این ویژگی می‌شود (۱۶). از سوی دیگر مطالعات اخیر نشان می‌دهد که dsDNA، فارغ از منشاء، فرم و سکانس نوکلئوتیدی خود می‌تواند منجر به فعال شدن پاسخ ایمنی هومورال و سلولار شود و این تأثیر مستقل از مسیر تعدیل ایمنی TLR9 انجام می‌پذیرد. علاوه بر این امروزه مشخص شده است که فرم نوکلئوزومی dsDNA(20و21)،DNA خالص سازی شده پستانداران، باکتری و ویروس‌ها (۲۲،۲۳) و dsDNA فاقد موتیف CpG (۲۳) همگی می‌توانند باعث بلوغ و تقویت فعالیت‌های سلول‌های دندرتیک و ماکروفاژها شوند (۲۴). آغازگرهای فعال‌سازی می‌توانند فارغ از سکانس‌های نوکلئوتیدی مربوطه، هر دو نوع DNA ژنومی آزادسازی شده از سلول‌های آپوپتوتیک یا آسیب دیده و dsDNA ژنومی اگزوژن یا سنتتیک باشند. هرچند ساز و کار و مسیرهای این فعال‌سازی چندان شناخته شده نمی‌باشد اما به نظر می‌رسد این کار اصلا به علت حضور غیر عادی فرم بتای dsDNA راستگرد در داخل سلول باشد که به نظر می‌رسد فرم ایمنوژنیسیته DNA بوده و جهت تشکیل آن، فعالیت TBK-1 کیناز ضروری می‌باشد. (۲۵،۲۶).

از آنجایی که تغییر مختصر DNA در نتیجه عوامل سایتوتوکسیک ضد سرطان از دیر باز شناخته شده است احتمال تأثیر این DNA تغییر یافته بر روی سلول‌های دندرتیک یا دیگر سلول‌های ایمنی محتمل به نظر می‌رسد. به نظر می‌رسد که همانند مکانیسم پاسخ سلول به CpG ODN یا ds-RNA ویروسی از طریق رسپتورهای ذاتی نظیر TLRها، عوامل آلکیله کننده DNA نظیر داروی ملفالان بتوانند با ایجاد اتصالات متقاطع در ساختار DNA و در معرض قرار دادن سایت‌های محرک ایمنی مخفی در سکانس‌های آن، منجر به تقویت ایمونوژیسیته و تحریک سلول‌های دندرتیک از طریق رسپتورهای پاسخ دهنده متناظر شوند. به نظر می‌رسد پاسخ این تأثیر تا حد زیادی وابسته به سکانس اسید نوکلئیکی DNA در سلول منشأ باشد. هر چند احتمال تأثیر DNA آسیب دیده از طریق مسیرهای مستقل از TLR نظیر مسیر وابسته به TBK-1کیناز نیز کاملاً محتمل به نظر می‌رسد. در مطالعه اخیر ممکن است داروی آلکیله کننده باعث افزایش بیان یا عملکرد آنزیم TBK-1 کیناز گردیده باشد و یا اینکه تأثیر به وقوع پیوسته، حاصل پاسخ سلول‌های دندرتیک به حضور طبیعی فرم بتای DNA راست گرد در سلول منشأ باشد.

در کل می‌توان گفت که افزودن DNA آسیب دیده باعث تقویت بلوغ سلول‌های دندریتیک و هدایت آن‌ها به سمت فنوتیپ DC1 و تیپ سایتوکینی TH1 می‌شود. این اتفاق در حالی می‌افتد که آنتی ژن مورد استفاده عصاره سلول‌های توموری می‌باشد بنابراین به نظر می‌رسد حداقل در مورد این نوع تومور (سرطان پستان) استفاده از DNA آسیب دیده نتیجه بخش خواهد بود زیرا برای دفع تومور نیاز به فعال سازی TH1 و لنفوسیت های T سیتوتوکسیک می‌باشد.

به نظر می‌رسد که راهکار استفاده از DNA آسیب دیده به عنوان فاکتور بلوغ سلول‌های دندرتیک در بحث ایمونوتراپی سرطان، یکسری محدودیت‌هایی را نیز به دنبال داشته باشد. همچنان که برخی گزارشات بالینی حاکی از امکان بروز عوارض جانبی نظیر وقوع بیماری‌های خود ایمن به دنبال درمان‌های نئوپلاستیک می‌باشد در بحث حاضر نیز احتمال وقوع چنین عوارضی دور از تصور نبوده و نیازمند مطالعات و کارآزمایی های بالینی بیشتر می‌باشد. علاوه بر این مورد، محدودیت استفاده بالینی از داروهای ضد سرطان سیتوتوکسیک به لحاظ افزایش احتمال بروز موتاسیون و مقاومت دارویی در دراز مدت کماکان پابرجاست.

پیشنهاد می‌شود جهت تکمیل شدن پژوهش حاضر، برخی دیگر از نشانگرهای سطحی دندریتیک سل‌ها که در امر فعالیت و قدرت دندریتیک سل‌ها در فعال کردن پاسخ TH1 وTH2 دخالت دارند، مورد اندازه گیری قرار گیرند. همچنین بررسی تأثیر سکانس‌های خاصی از قطعات DNA مرتبط با تومورهای خاص که به روش PCR در آزمایشگاه تکثیر یافته باشند، در فعال کردن دندریتیک سل‌ها در خارج از بدن پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه می‌باشد که بدین وسیله از زحمات همه همکاران محترم آن پژوهشکده و شورای محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References:

1. Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B, Pohla H, Bigalke I. Generation of clinical grade Dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. Transl Med 2007; 5: 18.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017

2. Wong EC, Lee SM, Hines K, Lee J. Development 2. of a closed system process for clinical-scale generation of DC evaluation of two monocyte enrichment methods and two culture containers. Cytotherapy 2002; 4: 65-76.
3. Finn OJ. Cancer immunology. New Eng J Med 2008; 358(25):2704-15.
4. Malmberg KJ. Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape? Cancer Immunol Immunother 2004; 53:879-92.
5. Kapsenberg ML. Dendritic cell control of pathogen -driven T-cell polarization. Nat Rev Immonol 2003; 3:984-93.
6. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and non polarized T cells. Nat Immunol 2000; 1:311-16.
7. Tizard IR, Philadelphia S. Veterinary imuunology: an introduction. 8th Ed. St Louis, MO: Saunders/Elsevier; 2008. P.420-1.
8. 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 Cell Imm 2009;257:23-31.
9. Rad AN, Pollara G, Afzal- sohaib SM, Chiang C, Chain BM, Katz DR. The differential influence of allogeneic tumor cell death via DNA damage on Dendritic cell maturation and antigen presentation. Cancer Res 2003; 63:5143-50.
10. De-Smedt T, Pajak B, Muraille E. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by LPS in vivo. J Exp Med 1996; 184: 1413-24.
11. Abdel-Wahab Z, DeMatos P, Hester D, Dong XD, Seigler HF. Human dendritic cells pulsed with either melanoma tumor cell lysate or the gp100 peptide (280-288) induce pairs of T-cell culture with similar phenotype and lytic activity. Cell Immunol 1998; 186: 63-7.
12. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 2588-92.
13. Scholler N, Hayden- Ledbetter M, Dahlin A, Hellstrom I. Hellstrom KE, Ledbetter JA. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. J Immunol 2002; 168:2599-602.
14. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. Interleukin 4 downregulates the expression of CD14 in normal human monocytes. Eur J Immunol 1990; 20: 2375-81.
15. Alyamkina EA, Dolgova EV, Likhacheva AS, Rogachev VA, Sebeleva TE, Nikolin VP, et al. Exogenous allogenic fragmented double-strand DNA is internalized into human dendritic cells and enhance their allostimulatory activity. Cell Immunol 2010; 262:120-6
16. Ishi K, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoth Y, Matoba H, et al. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. J Immunol 2001; 167:2602-7.
17. Alyamkina EA, Leplina OY, Sakhno LV, Chernykh ER, Ostanin AA , Efremov YR, et al .Effect of double-strand DNA on maturation of Dendretic cells in vitro. Cell Immunol 2010; 266:46-51.
18. Nikitina EY, Gabrilovich DI. Combination of γ-Irradiation and dendritic cell administration induce a potent antitumor response in tumor bearing mice:Approach to treatment of advanced stage cancer. Int J Cancer 2001; 94:825-33.
19. Hall J, Bouladoux M, Sun CM, Wohlfert E, Blank R, Zhu Q, et al. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuant of intestinal immune response. Immunity 2008;17(29):637-49.
20. Decher P, Singh-Jashua H, Hagger S, Kotter I, Rammensee HG. Nucleosome, the main autoantigen in systemic Lupus erythmatosis,

induces direct DC activation via a MyD88-independent pathway:consequences on inflammation. Immunol 2005; 174:3326-34.

21. Ronnefarth VM , Erbacher AI , Lamkemeyer T, Madlung J, Nordheim A, Rammensee HG, et al. TLR2/TLR4 -independent neutrophil activation and recruitment upon endocutosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. Immunol 2006; 177:7740-9.
22. Martin DA, Elkon KB. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid DC to produce type I interferones predominantly through a toll like receptor 9-independent pathway. Arthritis Rheum 2006; 54:951-62.
23. Shirota H, Ishii KJ, Takakuwa H, Klinman DM. Contribution of IFN-β to the immune activation induced by double-strand DNA. Immunol 2006; 118:302-10.
24. Jiang W, Reich CF, Pisetsky DS. Mechanisms of activation of the RAW264.7 macrophage cell line by transfected mammalian DNA. Cell Immunol 2004; 229:31-40.
25. Ishii KJ, Akira S. Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. Curr Opin Immunol 2008; 20:524-9.
26. Takeshita F, Ishii KJ. Intracellular DNA sensors in Immunity. Curr Opin Immunol 2008;20:383-8.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:51 +0430 on Thursday September 21st 2017