

## *Comparison of the Effect of TNF- $\alpha$ , MCM and Poly I:C in Maturation of Dendritic Cells*

Nowruz Delirezh,  
Behnaz Asadi

Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

(Received June 22, 2011 ; Accepted January 23, 2012)

### *Abstract*

**Background and purpose:** Different laboratories have considered different maturation factors for producing human dendritic cells (DC) from peripheral blood monocytes. In this study, we comprehensively investigated the effect of adding poly (I:C) to standard maturation stimulus, i.e. MCM and TNF- $\alpha$  on the induction of T cell response.

**Materials and methods:** Peripheral blood monocytes adhered to culture flask after two-hour incubation in the temperature 37 C<sup>o</sup> were cultured for four days with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4). Allogenic tumor antigen was added in the fourth day and in the fifth day, maturation factors including MCM and TNF- $\alpha$  were added to one group and MCM, TNF- $\alpha$ , and poly (I:C) to the other group. Morphology of the generated DCs was assessed using invert microscope and phenotypic analysis was carried out using anti CD14, HLA-DR and CD83 monoclonal antibodies. Furthermore, their functions were evaluated using induction of mixed lymphocyte reaction (MLR), phagocytic activity, and cytokine release by DC stimulated T lymphocytes.

**Results:** It was found that dendritic cells with the same morphology were generated in the presence of MCM and TNF- $\alpha$  with or without poly (I:C). Flow cytometric analysis using anti-CD14, HLA-DR and CD83 revealed that addition of poly (I:C) to conventional maturation factors results in a decrease in the expression of CD14 and an increase in the expression of HLA-DR and CD83. Moreover, the amount of MLR slightly increased and the percentage of phagocytic cells decreased, while an increase was observed in their mean fluorescent intensity (MFI). Furthermore, the results revealed that adding poly (I:C) leads to the reduction of IL-12: IL-10 and IFN- $\gamma$ : IL-4 ratios in DC and DC-primed T cell supernatants, respectively.

**Conclusion:** Our results support this idea that adding poly (I:C) to MCM and TNF- $\alpha$  causes more maturation in dendritic cells and leads the stimulated lymphocytes to TH2 type cytokine release.

**Key words:** Dendritic cell, Monocyte Conditioned Medium (MCM), TNF- $\alpha$ , poly (I:C)

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(Supple 1): 50-64 (Persian).

# مقایسه تأثیر $Tumor\ Necrosis\ Factor-\alpha$ و $Monocyte\ Conditioned\ Medium$ در بلوغ سلول‌های دندریتیک $polyinosinic-polycytidylic\ acid$

نوروز دلیرز

بهناز اسدی

## چکیده

**سابقه و هدف:** برای تولید سلول‌های دندریتیک از مونوسیت‌های خون محیطی انسان، آزمایشگاه‌های مختلف عوامل بلوغ متفاوتی را به کار می‌برند. ما در این مطالعه تأثیر افزودن Poly(I-C) به عوامل بلوغ متداول یعنی MCM و  $TNF-\alpha$  را در القاء پاسخ لنفوسیت‌های T مورد بررسی قرار دادیم.

**مواد و روش‌ها:** مونوسیت‌های خون محیطی که پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}C$  به فلاسک کشت چسبیده بودند به مدت چهار روز در حضور GM-CSF و IL-4 کشت داده شده، در روز چهارم آنتی ژن توموری آلوزن و در روز پنجم عامل بلوغ شامل MCM و  $TNF-\alpha$  به یک گروه و MCM،  $TNF-\alpha$  و Poly(I-C) به گروه دیگر اضافه شد. مورفولوژی سلول‌های دندریتیک تولید شده با میکروسکوپ اینورت و فوتیپ آن‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد CD14، CD83 و HLA-DR مورد ارزیابی قرار گرفت. عملکرد آن‌ها نیز از طریق سنجش قدرت فاگوسیتوز، القاء MLR و تولید سیتوکین توسط سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های T تحریک شده با آن‌ها صورت گرفت.

**یافته‌ها:** بررسی نشان می‌دهد که در حضور MCM و  $TNF-\alpha$  با و یا بدون Poly(I-C) سلول‌های دندریتیک با مورفولوژی یکسان تولید می‌شود. افزودن Poly(I-C) به عوامل بلوغ باعث کاهش بیان CD14 و افزایش بیان CD83 و HLA-DR می‌گردد. میزان MLR به مقدار اندکی افزایش یافته، درصد سلول‌های فاگوسیت‌کننده کاهش و در عوض MFI آن‌ها افزایش می‌یابد. از طرف دیگر افزودن Poly(I-C) باعث کاهش نسبت IL-10 به IL-12 در مایع رویی سلول‌های دندریتیک و کاهش نسبت  $IFN-\gamma$  به IL-4 در مایع رویی سلول‌های T تحریک شده با همان سلول‌های دندریتیک می‌گردد.

**استنتاج:** نتایج این مطالعه نشان داد افزودن Poly(I-C) به MCM و  $TNF-\alpha$  باعث بلوغ بیشتر سلول‌های دندریتیک و هدایت لنفوسیت‌های تحریک شده با این سلول‌ها به طرف  $TH2$  می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های دندریتیک، MCM،  $TNF-\alpha$ ، poly (I-C)

## مقدمه

سلول‌های دندریتیک (DC) لکوسیت‌هایی هستند خون محیطی و رگ‌های لنفی آوران پراکنده‌اند (۱).  
که در سراسر بافت‌های لنفاوی و غیر لنفاوی، چنین نوع سلول دندریتیک متفاوت در بافت‌های

1. Dendritic cell

E-mail: n.delirez@urmia.ac.ir

مؤلف مسئول: نوروز دلیرز - ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی

گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۰/۵/۱۰ تاریخ تصویب: ۹۰/۱۱/۳

گوناگون یافت شده‌اند که شامل سلول‌های لانگرهانس<sup>۱</sup> در اپیدرم، سلول‌های دندریتیک بینایی<sup>۲</sup> در بافت‌های مختلف، سلول‌های دندریتیک تیموس و جمعیت‌هایی از سلول‌های دندریتیک که در سایر اندام‌های لنفاوی یافت می‌شوند، می‌باشند (۲).

سلول‌های دندریتیک اولین بار توسط Steinman در سال ۱۹۷۳ شناسایی شد وی سلول‌هایی با استپاله‌های فراوان را در طحال شناسایی نمود که وجه تسمیه‌ی این سلول‌ها نیز به خاطر این استپاله‌ها می‌باشد (۳). این سلول‌ها تحت تأثیر سیتوکین‌ها از سلول‌های ریشه‌ای خون‌ساز CD34<sup>+</sup> منشأ گرفته (۴)، در طی یک فرایند چند مرحله‌ای تمایز پیدا می‌کنند. سلول‌های دندریتیک نابالغ از طریق جریان خون به بافت‌ها منتقل و در آن‌ها مستقر می‌شوند (۵). این سلول‌ها تکثیر پیدا نمی‌کنند و بعد از مدت زمان معینی دچار آپوپتوز<sup>۳</sup> شده، جای خود را به سلول‌های دیگر می‌دهند (۱).

سلول‌های دندریتیک، مجموعه‌ی پپتید غیر خودی و MHC<sup>۴</sup> را به سلول‌های T دست نخورده و خاطره‌ای عرضه و باعث ایجاد ایمنی اختصاصی به‌ویژه در اندام‌های لنفاوی ثانویه می‌شوند (۶). این سلول‌ها همچنین می‌توانند عملکرد سلول‌های T تنظیم‌کننده را نیز کنترل نموده از طریق ترشح IL-12 و اینترفرون‌های کلاس I و II (۷، ۸) نقش مهمی در ایمنی ذاتی به‌ویژه فعال شدن سلول‌های NK ایفاء کنند (۹، ۱۰). IL-12 ترشح شده توسط سلول‌های دندریتیک منجر به پلاریزاسیون سلول‌های T به طرف سلول‌های Th1 می‌شود در حالی که سایر عوامل از جمله IL-4 و یا عدم ترشح IL-12 منجر به پلاریزاسیون سلول‌های T به طرف سلول‌های Th2 می‌گردد (۱۱).

بلوغ سلول دندریتیک یک فرایند پیوسته بوده که با برخورد با آنتی ژن (LPS، لیگوانوکلئوتیدهای

CpG و آلرژن‌های تماسی) (۱۲) یا سیتوکین‌های انتهایی (INF- $\alpha$ ، PGE2، IL-1 $\beta$ ، TNF- $\alpha$ ) در بافت‌های محیطی شروع شده، تحت تأثیر متقابل DC و سلول‌های T کامل می‌شود. سلول‌های دندریتیک در طی بلوغ دچار تغییراتی می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها کاهش گیرنده‌های اندوسیتوز و فاگوسیتوز، افزایش مولکول‌های کمک‌حرکی مثل CD40، CD58، CD80 و CD86، تغییرات مورفولوژیکی از قبیل کاهش ساختارهای چسبندگی، سازمان‌دهی مجدد اسکلت سلولی، به‌دست آوردن تحرک سلولی بالا و تغییر در میزان بیان MHC II می‌باشد (۱۳).

هر چند سلول‌های دندریتیک در خون محیطی گردش می‌کنند و در تمام بافت‌ها یافت می‌شوند، ولی به دلیل پراکندگی و مقدار کم آن‌ها نمی‌توان با روش جداسازی، سلول کافی برای کاربردهای تحقیقاتی و بالینی به‌دست آورد. از این رو محققین تلاش گسترده‌ای را برای تولید سلول‌های دندریتیک از پیش‌سازهای آن‌ها و نیز سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به عمل آورده‌اند. حدود سه دهه قبل Knight و همکارانش (۱۴) مونسیت‌هایی را توصیف کردند که بعد از جداسازی، ظاهری نقاب‌دار و دندان‌دار کسب می‌کردند. اخیراً مشخص شده که مونسیت‌ها تحت تأثیر GM-CSF و IL-4 به سلول‌های دندریتیک CD1a<sup>+</sup> تمایز می‌یابند. نقش GM-CSF و IL-4 در ایجاد DC‌های نابالغ به‌طور تجربی نیز اثبات و نشان داده شده است که GM-CSF عامل رشد، تحریک، بقاء و تکثیر پیش‌سازهای میلوئیدی و تمایز آن‌ها به رده‌های سلولی ماکروفاژ و گرانولوسیت بوده و IL-4 بلوک‌کننده‌ی تکامل ماکروفاژها می‌باشد (۱۵). سلول‌های دندریتیک مشتق از مونسیت فنوتیپ نابالغ داشته، CD83 را بیان نمی‌کنند و CD80، CD86 و CD58 را به مقدار کم بیان می‌کنند. آن‌ها همچنین MHC II را در بخش‌های

1. Langerhans
2. Interstitial dendritic cell
3. Apoptosis
4. Major Histocompatibility Complex

لیپوبلی ساکارید و الیگونوکلو تیدهای CpG (۱۲)، MCM<sup>4</sup> (۱۹) اشاره کرد. پلی اینوزینیک- پلی سیتیدیلیک اسید<sup>5</sup> (Poly(I-C)) آنالوگ سنتزی RNA دو رشته‌ای ویروسی می‌باشد که می‌توان آن را به عنوان عامل القاء بلوغ در سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار داد، زیرا آگونیست گیرنده‌ی شبه عوارضی<sup>3</sup> (TLR3<sup>6</sup>) بوده، می‌تواند از طریق این گیرنده در سطح سلول‌های دندریتیک جذب و موجب فعال شدن آن‌ها گردد. از این رو در این مطالعه به منظور روشن شدن نقش Poly(I-C) در فرایند بلوغ سلول‌های دندریتیک، این سلول‌ها در شرایط *in vitro* تولید و اثرات سینرژستی Poly(I-C) همراه با MCM و TNF- $\alpha$  در بلوغ سلول‌های دندریتیک در قالب گروه تیمار با گروه کنترل که به عنوان عامل بلوغ فقط MCM و TNF- $\alpha$  دریافت کرده بودند، مورد مقایسه قرار گرفت. از آن جایی که مطالعات ما در خصوص سلول‌های دندریتیک به منظور یافتن بهترین عوامل القاء بلوغ و مؤثرترین روش برای تولید سلول‌های دندریتیک است که بتواند ضمن عرضه آنتی ژن‌های سلول‌های توموری پستان انسان به سلول‌های T اتولوگ آن‌ها را به سمت سلول‌های TH1 پولاریزه کند، از این رو در این مطالعه از عصاره سلول‌های توموری سرطان پستان انسان برای مجاور کردن سلول‌های دندریتیک نابالغ استفاده گردید.

## مواد و روش ها

### کشت و دما دهی سلول‌های MCF-7

- 1- برای کشت سلول‌های MCF-7 (رده سلولی سرطان پستان انسان) از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FCS استفاده شد.
- 2- به ۱۰ فلاسک و هر فلاسک تعداد ۲×۱۰<sup>۶</sup> سلول اضافه شده به منظور القاء پروتئین‌های شوک حرارتی در

داخل سیتوپلاسمی بیان کرده، نشانه‌های مونوسیتی CD11b، CD36 و CD68 را بیان می‌کنند. این سلول‌ها توانایی بالایی در برداشت آنتی‌ژن دارند ولی قدرت آن‌ها در حساس سازی سلول‌های T دست نخورده ضعیف است چنین سلول‌هایی در حضور LPS، TNF- $\alpha$ ، IL-1 یا CD40L بالغ می‌شوند (۱۶). به دنبال چنین تحریکاتی سلول‌های دندریتیک ویژگی‌های بلوغ شامل زوائد گسترده، حذف نشانه‌های مونوسیتی، از دست دادن قدرت برداشت آنتی‌ژن و بیان مولکول‌های هم تحریکی CD86، CD80 و CD58 و انتقال مولکول‌های MHC II به سطح سلول و بالاخره توانایی حساس سازی سلول‌های T دست نخورده را پیدا می‌کنند.

در سال ۱۹۹۴ Romani و همکارانش موفق شدند سلول‌های دندریتیک را از مونوسیت‌های خون محیطی تولید نمایند (۱۵). این دستاورد امکان طراحی راهبردهای درمانی با استفاده از سلول‌های دندریتیک در خارج از بدن را فراهم ساخت. در این روش برای به دست آوردن سلول‌های دندریتیک نابالغ، مونوسیت‌های خون محیطی به مدت پنج روز در حضور GM-CSF و IL-4 کشت داده می‌شوند و برای القاء بلوغ نیز کشت سلول‌ها دو روز دیگر در حضور عوامل القاء بلوغ ادامه می‌یابد سلول‌های دندریتیک بالغی که بدین ترتیب در شرایط آزمایشگاهی تولید می‌شوند، از نظر توانایی بالا در حساس سازی سلول‌های T، معادل سلول‌های لانگرهانس هستند که در داخل بدن بعد از برداشت آنتی ژن به گره‌های لنفاوی مهاجرت می‌کنند (۱۷، ۱۸).

امروزه دانشمندان از مواد و روش‌های بسیار متعددی جهت القاء بلوغ در سلول‌های دندریتیک استفاده می‌نمایند که از آن جمله می‌توان به IL-1 $\beta$ ، PGE<sup>1</sup>، IFN- $\alpha$ <sup>2</sup>، TNF- $\alpha$ <sup>3</sup>، ساختارهای میکروبی مانند

4. Monocyte conditioned medium  
5. Poly- inosinic: poly- cytidylic acid  
6. Toll Like Receptor

1. prostaglandin E<sub>2</sub>  
2. interferon- $\alpha$   
3. Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$

دمای  $41^{\circ}\text{C}$  به مدت یک ساعت دماهی و سپس در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۲ ساعت انکوبه گردیدند.

۳- بعد از اتمام زمان انکوباسیون، فلاسک‌ها تریپسینه شده، سلول‌ها جمع آوری گردید.

تهیه عصاره سلول‌های توموری از سوسپانسیون سلولی

۱- سوسپانسیون سلول‌های توموری به تعداد  $2 \times 10^6$  سلول چهار دور با قرار دادن در نیتروژن مایع و آب  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۵ دقیقه Freeze/Thaw گردید.

۲- محصول به دست آمده به مدت ۵ دقیقه با سرعت  $1500\text{g}$  و سپس به مدت یک ساعت با سرعت  $13000\text{g}$  سانتریفیوژ شد.

۳- مایع رویی جمع‌آوری و با فیلتر  $0.22\ \mu\text{m}$  استریل گردیده، برای استفاده بعدی در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  ذخیره گردید.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و تولید سلول‌های دندرتیک

۱- از پنج فرد داوطلب بعد از اطلاع یافتن از هدف تحقیق و رعایت شرایط استریل، توسط سرنگ‌های هپارینه ( $200\text{IU/ml}$ ) به مقدار  $30$  میلی‌لیتر خون‌گیری به عمل آمده سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) آن با استفاده از فایکول جداسازی گردید.

۲- تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی حاصل با استفاده از رنگ تریپان بلو مشخص شد.

۳- سلول‌های PBMC به تعداد  $2-3 \times 10^6$  سلول در هر میلی‌لیتر و به مقدار  $4\text{ ml}$  در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI تکمیل شده با پنی‌سیلین ( $100\text{IU/ml}$ )، استروپتومایسین ( $100\ \mu\text{g/ml}$ )، سرم  $\text{AB}^+$  انسان ( $10\%$  درصد) و pH تنظیم شده در حدود ۷، به مدت ۲ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ،  $5\%$  درصد  $\text{CO}_2$  و  $90\%$  درصد رطوبت انکوبه شدند. از هر نمونه‌ی خون، شش فلاسک (سه فلاسک به عنوان گروه شاهد و سه فلاسک به

عنوان گروه تیمار) تهیه شد.

۴- بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌هایی که به فلاسک نجسیده بودند با دو بار شستشوی آرام توسط محیط کشت RPMI جدا و دور ریخته شدند.

۵- به سلول‌های چسبیده که اکثریت آن‌ها را مونوسیت‌ها تشکیل می‌دادند،  $4\text{ml}$  محیط کشت جدید حاوی GM-CSF ( $875\text{IU/ml}$ ) و IL-4 ( $400\text{IU/ml}$ )

۶- اضافه شده به مدت ۵ روز کشت داده شدند. از فلاسک‌ها هر روز تا پایان روز هفتم، در زیر میکروسکوپ معکوس عکس برداری به عمل آمد.

۶- در روز سوم مجدداً مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به هر دو گروه حاوی سلول اضافه گردید.

۷- در روز چهارم عصاره‌ی سلول‌های توموری رده‌ی MCF-7 که قبلاً به عنوان آنتی ژن تهیه شده بود، به مقدار  $50\ \mu\text{g/ml}$  به سلول‌های دندرتیک اضافه گردید.

۸- در روز پنجم به عنوان عامل بلوغ به گروه شاهد  $10\ \text{ng/ml}$  TNF- و MCM (مایع رویی حاصل از کشت ۲۴ ساعته مونوسیت‌های چسبیده به پتری دیش پوشیده از گاماگلوبولین انسانی) به مقدار  $25\%$  درصد محیط کشت و به گروه تیمار  $10\ \text{ng/ml}$  TNF-، MCM به مقدار  $25\%$  درصد محیط کشت  $30\ \mu\text{g/ml}$  و  $30\ \mu\text{g/ml}$  poly(I:C) اضافه شد.

۹- در روز هفتم سلول‌های دندرتیک تولید شده با استفاده از بافر PBS حاوی EDTA ( $0.5\text{mM}$ ) برداشت و تعداد و میزان زنده بودن آن‌ها تعیین گردید.

بررسی شکل و اندازه سلول‌های دندرتیک در طی مراحل تمایز

۱- به منظور به دست آوردن میزان تولید کمی سلول‌های دندرتیک، تعداد سلول‌های حاصل، بر تعداد PBMC به کار برده شده در ابتدای کشت تقسیم و حاصل در  $100$  ضرب شد. عدد به دست آمده نشانگر درصد محصول سلول دندرتیک از PBMC اولیه بود.

اندازه گیری قدرت بیگانه خواری سلول های دندریتیک بالغ  
۱- ۲۰ μl از بید لاتکس فلورسانت (کنزوگه با  
FITC) با غلظت  $10^8 \times 2/5$  بید در هر میلی لیتر در ۵ μl  
سرم AB<sup>+</sup> به مدت ۷/۵ دقیقه اپسونیزه<sup>۱</sup> شد.

۲- در میکروپلیت ۹۶ خانه ای ته گرد، ۲۰ μl بید  
اپسونیزه شده با ۲۰ μl از سلول های دندریتیک (با غلظت  
 $10^7 \times 1/25$  در هر میلی لیتر) مخلوط شده، با اضافه  
کردن ۶۰ μl بافر مخصوص بیگانه خواری (PBS)،  
۵ mM گلوکز، ۰/۹ mM CaCl<sub>2</sub>، ۰/۵ mM MgSO<sub>4</sub> و  
۰/۵ درصد FBS) به حجم کلی ۱۰۰ μl رسانده شد.

۳- میکروپلیت حاوی گروه های تیمار و شاهد به  
مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۰  
درصد رطوبت انکوبه شد.

۴- بعد از اتمام ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول ها با  
پیپتاژ از کف چاهک ها برداشت شده به منظور خاموش  
شدن فلورسانت سطح سلول با بافر خاموش کننده<sup>۲</sup>  
(NaCl ۰/۹ درصد، بافر سترات ۱۳ μM و تریپان بلو  
۰/۲۵ mg/ml) شسته شدند (g × ۳۰۰، ۱۰ دقیقه)

۵- نمونه ها به دو قسمت تقسیم شدند. یکی برای  
بررسی با میکروسکوپ فلورسانت و دیگری برای  
سنجش میانگین شدت فلورسانت با دستگاه  
فلوسیتومتری، تخصیص یافت.

۸- درصد بیگانه خواری سلول ها با فرمول زیر  
محاسبه شد.

$$\%Ph = \frac{GreenDC}{TotalDC} \times 100$$

GreenDC: سلول های دندریتیک حاوی بید لاتکس.

TotalDC: تمامی سلول های دندریتیک.

واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلورژن

۱- لنفوسیت های آلورژن از PBMC افراد داوطلب  
به روش چسبیدن به فلاسک (سلول های نچسبیده بعد از  
۲ ساعت انکوباسیون) تهیه گردید.

۲- تعداد  $10^5$  لنفوسیت با نسبت های مختلف

۲- به منظور بررسی مشخصه های ظاهری سلول های  
دندریتیک، فلاسک های حاوی سلول به طور روزانه با  
میکروسکوپ معکوس بررسی و عکس برداری به عمل  
آمد. از لحاظ ظاهری سلول های نسبتاً بزرگ، گرد و  
دارای زوائد سلولی بسیار زیاد به عنوان سلول دندریتیک،  
سلول های کشیده و بی زائده، به عنوان ماکروفاژ  
(سلول هایی که در مسیر دیگری متمایز شده اند) و  
سلول های گردی که در طول مدت کشت دچار تغییر  
اندازه نشدند به عنوان لنفوسیت در نظر گرفته شدند (۲۰).

بررسی فنوتیپ سلول های دندریتیک

۱- در روز هفتم کشت به دلیل بالغ شدن سلول ها،  
اکثریت سلول های دندریتیک به حالت شناور در آمدند  
و معدود سلول های چسبیده نیز با اضافه کردن بافر PBS  
حاوی EDTA (۰/۵mM) و انکوبه کردن در دمای  
۳۷ °C به مدت ۱۵ دقیقه برداشت گردیده تعداد و میزان  
زنده بودن آن ها مشخص کردید.

۲- حدود دوست هزار سلول به ازای هر آنتی بادی  
(CD14، CD83، HLA-DR و control Isotype)  
(شرکت DAKO - دانمارک) بعد از یک بار شستشو  
(g × ۳۰۰، ۱۰ دقیقه) با بافر مخصوص فلوسیتومتری یا  
بافر FACS (PBS)، سدیم آزاید ۰/۱ درصد و FBS ۱  
درصد) در همین بافر که حاوی ۲ درصد سرم موش بود  
به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ °C انکوبه شد.

۳- در پایان زمان انکوباسیون سلول ها مجدداً با  
بافر FACS شستشو شده (g × ۳۰۰، ۱۰ دقیقه)، بعد از  
رساندن حجم آن ها به ۱۰۰ μl، مقدار ۱۰ μl آنتی بادی  
ضد نشان گر سطحی یا کنترل ایزوتیپ اضافه شد، سپس  
به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ °C و در تاریکی انکوبه گردید.

۴- بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول ها یک بار  
با بافر FACS شسته شده (g × ۳۰۰، ۱۰ دقیقه)، تا زمان  
سنجش بر روی یخ خرد شده قرار دادند. سپس با  
استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (شرکت Partec -  
آلمان) سنجش و نتایج حاصل با نرم افزار FlowMax  
مورد آنالیز قرار گرفت.

1. Opsonization  
2. Quenching Buffer

version 5.03. Graph Pad Software Inc. San Diego, California) تفسیر و بررسی شد. مقایسه بین گروه‌ها توسط paired t-test انجام شده، مقدار  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول‌های دندریتیک تولید شده سلول‌های چسبنده بعد از ۲-۳ روز کشت در حضور سیتوکین‌های GM-CSF و IL-4، چسبندگی خود را از دست داده به صورت منفرد و یا مجموعه‌های سلولی به هم چسبیده شناور در آمدند. اندازه این سلول‌ها بزرگ‌تر از مونوسیت‌های اولیه بوده و زوائد سیتوپلاسمی پیدا کرده بود با گذشت زمان روند کننده شدن سلول‌های چسبنده، بزرگ شدن اندازه آن‌ها و افزایش تعداد زوائد سیتوپلاسمی ادامه یافت به طوری که در روز پنجم که عامل القاء بلوغ اضافه شد ۶۰-۷۰ درصد سلول‌ها به صورت شناور در آمده بود. حضور عامل بلوغ به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش قابل ملاحظه اندازه سلول و تعداد زوائد سیتوپلاسمی آن شد و روند شناور شدن آن‌ها را شتاب بخشید. بعد از ۷ روز به هنگام برداشت سلول‌ها ۸۰-۹۰ درصد آن‌ها آزاد و به صورت مجموعه‌های به هم چسبیده شناور در آمده بود از این تعداد ۸۰-۶۰ درصد آن‌ها سلول‌های همگون بزرگ با زوائد دندریتیک زیاد و مشخص و هسته‌ی بزرگ واقع در خارج از مرکز سلول بودند که با ویژگی‌های توصیف شده برای سلول‌های دندریتیک کاملاً هم‌خوانی داشت. بررسی در روزهای پنجم و هفتم نشان داد که از نظر ویژگی‌هایی که در بالا به آن‌ها اشاره شد تفاوتی بین سلول‌های دندریتیک بالغ شده در حضور MCM و TNF- $\alpha$  و آن‌هایی که PolyI-C نیز دریافت کرده بودند وجود نداشت (تصویر شماره ۱).

(۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰) با سلول‌های دندریتیک مخلوط و به مدت ۵ روز در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد در محیط کشت RPMI-1640 کامل، به اضافه ۱۰ درصد سرم AB<sup>+</sup> انسانی در حجم ۲۰۰  $\mu$ l در دمای ۳۷ °C، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۰ درصد رطوبت کشت داده شد.

۳- خانه‌های حاوی سلول‌های دندریتیک تنها و لنفوسیت تنها، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

۴- در روز پنجم به هر خانه مقدار ۱  $\mu$ Ci <sup>۱</sup> ۱/۵ متیل تیمیدین نشاندار شده با [<sup>3</sup>H] اضافه و به مدت ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گردید.

۵- سلول‌ها توسط دستگاه Cell Harvester (شرکت Perkin-Elmer - آمریکا) برداشت و میزان تابش پرتو بتا از هر نمونه توسط دستگاه شمارش گر بتا (شرکت Wallac - فنلاند)، شمارش و ثبت شد.

۶- تمامی آزمایش‌ها به صورت سه‌تایی انجام شد و نتایج به دست آمده با واحد CPM<sup>2</sup> به صورت Mean CPM  $\pm$  SD گزارش شد.

اندازه‌گیری میزان تولید سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-4، IL-10 و IL-12 به روش الیزا

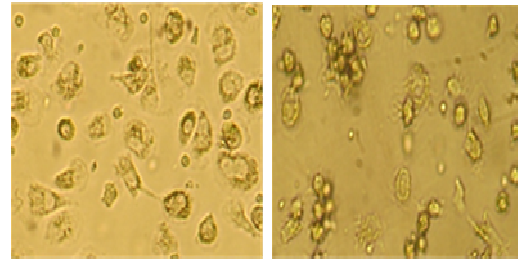
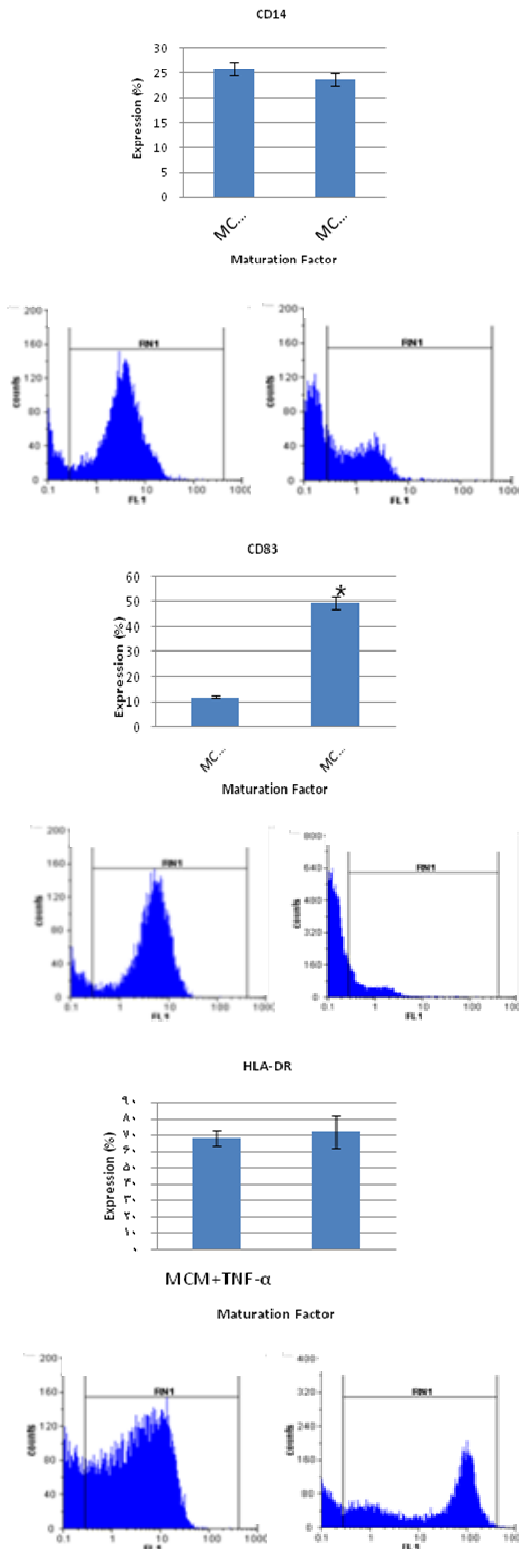
۱- آزمایش مربوط به سنجش میزان IFN- $\gamma$ ، IL-4، IL-10 و IL-12 با استفاده از کیت تجارتي الیزا (شرکت R&D - آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به صورت جداگانه انجام گرفت. میزان تولید IFN- $\gamma$  و IL-4 در مایع رویی تست MLR و میزان تولید IL-10 و IL-12 در مایع رویی روز هفتم کشت سلول‌های دندریتیک مورد سنجش قرار گرفت.

۲- آزمایش به صورت دوتایی انجام و نتایج به دست آمده به صورت ng/ml گزارش شد.

تحلیل آماری

نتایج این مطالعه با برنامه Graph Pad Prism Software

1. Curie  
2. Count per minute



MCM+TNF-α MCM+TNF-α+Poly (I:C)

تصویر شماره ۱: مقایسه‌ی میکروسکوپی سلول‌های دندریتیک حاصل از دو گروه که عوامل بلوغ متفاوتی دریافت کرده بودند.

### بررسی فنوتیپ سطحی سلول‌های دندریتیک

با بررسی سه نشانگر در سطح سلول‌های دندریتیک مشخص شد بیان مولکول‌های CD14، CD83 و HLA-DR به‌طور میانگین به ترتیب در گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF-α و poly(I:C) دریافت کرده بودند  $2/95 \pm 23/91$ ،  $4/39 \pm 49/72$  و  $4/85 \pm 71/99$  در گروهی که فقط MCM و TNF-α دریافت کرده بودند  $1/84 \pm 12/01$ ،  $3/25 \pm 25/71$  و  $6/72 \pm 68/01$  بود. که با در نظر گرفتن نتایج فوق مشخص گردید در گروهی که PolyI-C در یافت کرده بودند میزان بیان CD14 کاهش و میزان بیان CD83 و HLA-DR افزایش یافته بود که در این میان میزان بیان CD83 به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ( $p < 0/05$ ) (نمودار شماره ۱).

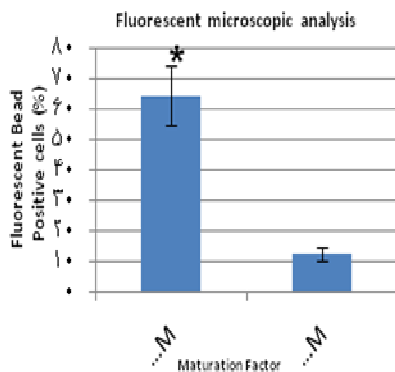
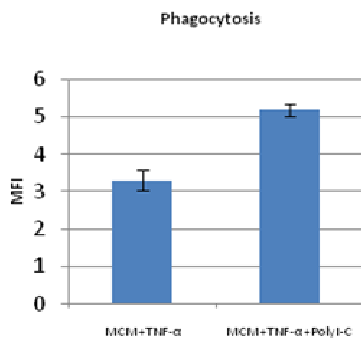
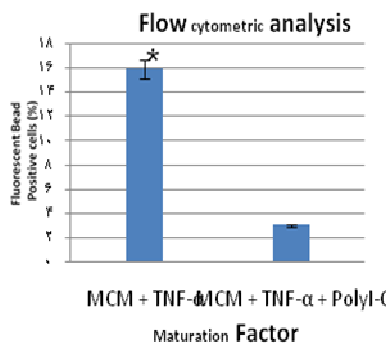
### بررسی قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک

قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک بالغ با استفاده از دو روش مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده از فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه‌خواری انجام داده‌اند در مورد گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF-α و poly(I:C) دریافت کرده بودند به‌طور میانگین  $1/35 \pm 2/98$  و در مورد گروهی که فقط MCM و TNF-α دریافت کرده بودند  $3/18 \pm 15/9$  می‌باشد، که این اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0/05$ ). بررسی میانگین

نمودار شماره ۱: سنجش CD14، CD83 و HLA-DR سلول‌های دندریتیک حاصل از دو گروه که عامل بلوغ متفاوت دریافت نموده‌اند. \*نشانگر اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) است. یکی از هیستوگرام‌های فلوسیتومتری به عنوان نمونه در کنار نمودار ستونی مربوطه قرار داده شده است.



میزان این افزایش معنی دار نبود. تحت این شرایط نسبت IL-12:IL-10 کاهش یافته بود (نمودار شماره ۴). بررسی میزان تولید سیتوکین های IFN- $\gamma$  و IL-4 نیز نشان داد که در حضور PolyI-C تولید IL-4 بیشتر از IFN- $\gamma$  افزایش یافته، نسبت IL-4:IFN- $\gamma$  نیز کاهش نشان می داد (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۴: مقایسه درصد سلول های دندریتیک بیگانه خواری کرده مربوط به دو گروه که عوامل بلوغ متفاوتی را دریافت کرده اند، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (درصد و MFI) و بررسی میکروسکوپی.

شدت فلورسانس (MFI) که نشان دهنده ی تعداد ذرات لاتک بلع شده به ازای هر سلول می باشد در مورد گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM و TNF- $\alpha$  دریافت کرده بودند به طور میانگین  $0.27 \pm 0.3$  و در مورد گروهی که poly(I:C) نیز دریافت کرده بودند  $0.17 \pm 0.19$  می باشد (نمودار شماره ۲).

همچنین با بررسی های انجام شده با میکروسکوپ فلورسانس معلوم شد به طور میانگین  $9/85 \pm 64/49$  درصد از سلول های دندریتیک حاصل از گروهی که به عنوان عامل بلوغ فقط MCM و TNF- $\alpha$  دریافت کرده بودند و  $2/02 \pm 12/36$  درصد از سلول های دندریتیک حاصل از گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF- $\alpha$  و poly(I:C) دریافت کرده بودند، ذرات لاتکس فلورسنت را بیگانه خواری کرده اند (نمودار شماره ۲).

#### واکنش مختلط لوکوسیتی (MLR) آلورژن

به منظور سنجش عملکرد سلول های دندریتیک حاصل از دو گروه، توانایی آن ها در القاء واکنش مختلط لوکوسیتی آلورژنیک مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که هر دو گروه به میزان تقریباً مساوی سبب تکثیر سلول های T شده اند و اختلاف معنی داری بین آن ها وجود ندارد (نمودار شماره ۳).

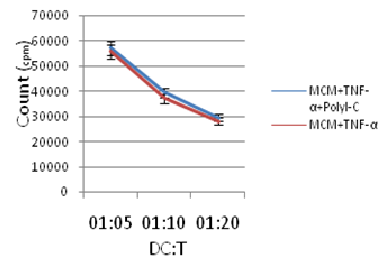
#### سنجش میزان سیتوکین های تولید شده توسط سلول های دندریتیک و لنفوسیت های T حساس شده

به منظور بررسی نوع سیتوکین های تولید شده توسط سلول های دندریتیک و لنفوسیت های T، مایع رویی سلول های دندریتیک در روز هفتم برای سنجش سیتوکین های IL-10 و IL-12 و مایع رویی واکنش MLR برای سنجش سیتوکین های IFN- $\gamma$  و IL-4 به عنوان نمایندگان تیپ های سیتوکینی ۱ و ۲ مورد استفاده قرار گرفت. اندازه گیری میزان تولید این سیتوکین ها نشان داد در اثر افزودن PolyI-C به عوامل بلوغ میزان تولید هر دو سیتوکین IL-10 و IL-12 افزایش یافته ولی

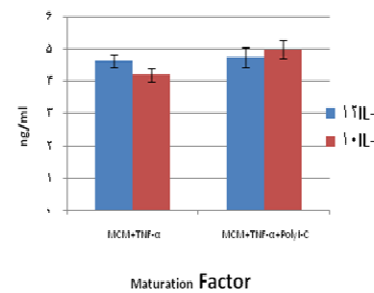
## بحث

در حال حاضر از سلول های دندریتیک برای القاء و بررسی پاسخ ایمنی در مدل های حیوانی، در شرایط *in vitro* و انسان استفاده می گردد. وجود تفاوت های فیزیولوژیک از یک طرف، ناهمگون بودن سلول های توموری انسان و فشار ناشی از درمان در القاء این ناهمگونی از طرف دیگر، باعث گردیده تا نتایج مطالعات به عمل آمده بر روی مدل های حیوانی به طور دقیق در مورد انسان قابل انطباق نباشد (۲۱). از طرف دیگر استفاده بالینی از واکسیناسیون با سلول های دندریتیک بدون انجام مطالعات پیش بالینی ضمن این که خطراتی را برای بیمار در بر دارد به دلیل پیچیدگی عوامل مؤثر در پاسخ ایمنی میزبان، تجزیه و تحلیل نتایج حاصل به آسانی میسر نخواهد بود. از این رو در این مطالعه بررسی پاسخ لنفوسیت های T به آنتی ژن های توموری سرطان پستان عرضه شده توسط سلول های دندریتیک که با استفاده از دو گروه متفاوت از عوامل القاء بلوغ در شرایط آزمایشگاهی تولید شده بودند مدنظر قرار گرفت تا این که بتوان پاسخ های ایجاد شده توسط لنفوسیت های T را مورد بررسی قرار داده، بهترین عامل القاء بلوغ را برای تولید سلول های دندریتیک کارا به منظور انجام ایمونوتراپی سرطان پستان تعیین و به کار گرفت.

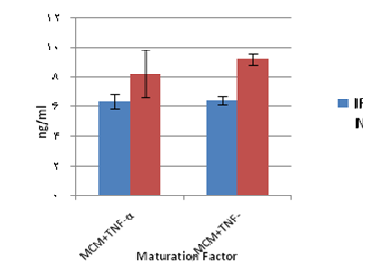
انتخاب محرک بلوغ برای تولید سلول های دندریتیک ایمونوپوتنت بر پایه ی بسیاری از معیارها می باشد که شامل بیان نشان گرهای فنوتیپی آنها، ترشح IL-12، ظرفیت القاء سلول های T سیتوتوکسیک و تنظیم کننده قوی و ثبات آنها به منظور ایجاد پاسخ ایمنی قوی در طی تجویز به داخل بدن می باشد (۲۲). یکی از دغدغه های محققین در امر تولید سلول های دندریتیک، تولید انبوه و نسبتاً ارزان این سلول های پر کاربرد است، از این رو، محققین می کوشند روشی را رایج کنند که ضمن توجه اقتصادی ابتدأ درصد خلوص مونسیت ها در آن بالا بوده، در مرحله ی بعد درصد تولید سلول های دندریتیک، نسبت به سلول های تک



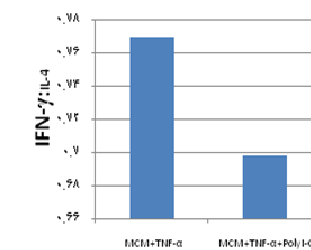
نمودار شماره ۳: نتایج حاصل از واکنش MLR با استفاده از متیل تایمیدین نشاندار



نمودار شماره ۴: میزان سیتوکین های تولید شده توسط سلول های دندریتیک



نمودار شماره ۵: میزان سیتوکین های تولید شده توسط لنفوسیت های T مجاور شده با سلول های دندریتیک.



هسته‌ای اولیه نیز در سطوح قابل قبولی باشد.

نتایج به‌دست آمده از شمارش سلول‌های تولید شده و بررسی‌های میکروسکوپی فلاسک‌ها نشان داد که درصد محصول در استفاده از هر دو نوع عامل بلوغ، به دامنه‌ی به‌دست آمده توسط دیگر محققان (حدود ۵-۶ درصد) نزدیک می‌باشد (۲۳،۱۹) و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد تحقیقات متعددی به بررسی مولکولی واکنش چسبیدن مونوسیت به سطوح شیشه و پلاستیک پرداخته، درصد خلوص مونوسیت‌های جدا شده به این روش را بیان می‌دارند. این پژوهش‌ها مشخص کرده‌اند با وجود بیان وسیع گیرنده‌های مسئول چسبندگی از جمله بتا-۲ اینتگرین‌ها (CD11b/CD18) و (CD11c/CD18) در سطح مونوسیت‌ها، این گیرنده‌ها بر روی گرانولوسیت‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی نیز نسبتاً بروز دارند و همچنین CD11b بر روی لنفوسیت‌ها و CD18 بر روی تمام لوکوسیت‌ها بیان می‌شوند (۲۴) و این بدان معنی است که سلول‌های دیگری هم در هنگام استفاده از روش چسبیدن به فلاسک به همراه مونوسیت‌ها در سطح فلاسک باقی می‌مانند. چون روش جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در هر دو گروه یکسان بود بنابراین هر دو گروه از نظر وجود سلول‌های دیگر نظیر لنفوسیت، پلاکت و ماکروفاژ یکسان بودند و هر دو عامل بلوغ توانسته بودند سلول‌های دندریتیکی با اندازه‌ی بزرگ و دارای زوائد سیتوپلاسمی تولید کنند (تصویر شماره ۱).

یافته‌های محققین حاکی از آن است که سلول‌های دندریتیکی بالغ می‌بایست دارای مقادیر کاهش یافته‌ای از CD14 بر سطح خود باشند، که این کاهش در واقع در حین بلوغ و به واسطه‌ی کاهش نسخه‌برداری از ژن CD14 بر اثر IL-4 اضافه شده، رخ می‌دهد (۲۵). با بررسی نتایج فلوسیتومتری سنجش این نشان‌گر در سطح سلول‌های دندریتیکی حاصل، معلوم شد با این که به‌طور کلی بروز این نشان‌گر در سطح سلول‌های دندریتیکی حاصل از هر دو گروه نسبت به مقدار قابل انتظار آن در

مونوسیت‌های اولیه (۸۵ درصد) بسیار کاهش یافته است (به ترتیب ۲۳ درصد و ۲۵ درصد) و این کاهش در سلول‌هایی که poly(I:C) دریافت کرده بودند بیشتر از گروه شاهد بود (نمودار شماره ۱).

از طرفی یکی از شاخص‌های اصلی بلوغ سلول‌های دندریتیکی، افزایش بیان CD83 به عنوان نشانگر اختصاصی سلول‌های دندریتیکی بالغ می‌باشد (۲۶)، این نشانگر جزو ابرخانواده‌ی ایمنوگلوبولین‌ها بوده و هنوز نقش اصلی آن در حاله‌ای از ابهام است. البته به نظر می‌رسد این مولکول سطحی در تنظیم ایمنی سلولی بی‌تأثیر نباشد (۲۷). در مقایسه‌ی انجام شده در این مطالعه، مشخص شد سلول‌هایی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF- $\alpha$  و poly(I:C) دریافت کرده بودند به‌طور چشم‌گیری این مولکول را بیشتر از سلول‌هایی که فقط MCM و TNF- $\alpha$  دریافت کرده بودند، در سطح خود بیان می‌کنند ( $p \leq 0.05$ ) و این امر به معنی تأثیر poly(I:C) بر بلوغ سلول‌های دندریتیکی حاصل است. poly(I:C) آنالوگ سنتزی RNA دو رشته‌ای و ویروسی بوده و آگونیست TLR-3 می‌باشد (۲۸) و بلوغ‌یابنداری را در سلول‌های دندریتیکی انسان القاء می‌کند (۲۹، ۳۰) و طبق یافته‌های Wischke و همکارانش میزان بیان CD80، CD86 و CD83 را در سطح سلول افزایش می‌دهد (نمودار شماره ۱) (۳۱).

از دیگر مشخصه‌های مورد بحث در مورد سلول‌های دندریتیکی 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- $\alpha$  و poly(I:C) دریافت کرده بودند نسبت به سلول‌هایی که فقط MCM و TNF- $\alpha$  دریافت کرده بودند، بیشتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود و افزایش جزئی آن بیانگر تأثیر poly(I:C)

در افزایش بیان این مولکول می باشد (نمودار شماره ۱). طبق یافته های Navabi و همکارانش، این ماده میزان بیان HLA-DR را افزایش می دهد به طوری که میزان این مولکول که در مونسیت ها ۴۲ درصد بود به ۹۶ درصد در سلول های دندرتیکی که به عنوان عامل بلوغ poly(I:C) دریافت کرده بودند، افزایش یافته بود (۳۲).

ویژگی مورد بحث بعدی قدرت بیگانه خواری سلول های دندرتیک است. انتظار می رود سلول های دندرتیک با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه خواری و تمامی ویژگی های لازم برای اخذ آنتی ژن از جمله گیرنده های سطحی لازم برای این کار را از دست داده، در عوض قدرت عرضه ی آنتی ژن و نهایتاً تحریک سلول های T را تقویت کنند. هم سو با نتایج سایر محققین (۳۳) در این مطالعه نیز مشخص شد درصد سلول های دندرتیک بالغی که بیگانه خواری کرده اند در گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF- $\alpha$  و poly(I:C) دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که فقط MCM و TNF- $\alpha$  دریافت کرده بودند، از ۱۶ درصد به ۳ درصد کاهش یافته است که این اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد ( $p \leq 0.05$ ) (نمودار شماره ۲). این کاهش را این گونه می توان توجیه نمود که با بلوغ سلول های دندرتیک قدرت بیگانه خواری آن ها کاهش می یابد (۳۱) پس poly(I:C) با القاء بلوغ بیشتر در سلول های دندرتیک سبب کاهش قدرت بیگانه خواری می شود. محققین یافته اند که ذرات PLGA (poly (d, l-lactic-co-glycolic acid)) پوشیده شده با poly(I:C) بلوغ پایداری را در سلول دندرتیک ایجاد کرده، فعالیت بیگانه خواری آن را کاهش می دهد. در مورد قدرت بیگانه خواری سلول های دندرتیک عامل دیگری که مورد توجه قرار گرفت تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول ها بود که به صورت میانگین شدت فلورسانس (MFI) نشان داده می شود. این بررسی نشان داد سلول هایی که poly(I:C) دریافت کرده بودند MFI بالاتری را نسبت به گروه

شاهد نشان دادند یعنی هر چند تعداد سلول های فاگوسیت کننده در گروه تیمار کمتر بود ولی قدرت فاگوسیتوز آن ها به ازای هر سلول بیشتر بود (نمودار شماره ۲).

بررسی نتایج MLR آلوزنیک سلول های دندرتیک حاصل نشان داد این سلول ها در هر دو گروه، لنفوسیت های مجاور شده را تحریک کرده و سبب تکثیر آن ها شدند ولی اختلاف معنی داری بین آن ها وجود نداشت که شاید به دلیل عدم وجود اختلاف معنی دار در بیان HLA-DR و احتمالاً مولکول های کمک تحریکی در بین دو گروه باشد (نمودار شماره ۳).

بالاخره آخرین عاملی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت میزان تولید سیتوکین توسط سلول های دندرتیک و لنفوسیت های T تحریک شده با آن ها بود. یکی از عواملی که در تعیین تیپ پاسخ های ایمنی مورد بررسی قرار می گیرد، نوع سیتوکینی است که توسط سلول های دندرتیک بالغ و یا لنفوسیت های T تحریک شده توسط آن ها تولید می شود. اگر سلول های دندرتیک 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 سلول های دندرتیک به سمت DC2 خواهند رفت. DC1 در القاء پاسخ ایمنی سلولی و مبارزه با پاتوژن های داخل سلولی مؤثر است و DC2 در تولید آنتی بادی و مبارزه با پاتوژن های خارج سلولی ایفاء نقش می کند. با این هدف در این مطالعه از poly(I:C) برای القاء پولاریزاسیون سلول های دندرتیک استفاده شده، همان گونه که در بخش نتایج بیان شد حضور poly(I:C) با این که باعث افزایش تولید هر دو سیتوکین IL-10 و IL-12 شده بود ولی تولید IL-10 بیشتر بود بنابراین نسبت IL-12 به IL-10 کاهش یافته بود (نمودار شماره ۴). طبق یافته های برخی محققین افزودن poly(I:C) به مخلوط سیتوکینی که به عنوان عامل بلوغ به سلول های دندرتیک نابالغ اضافه می شود، سبب افزایش تولید

و  $\gamma$ -IFN تحریک می‌کنند ولی میزان تولید IL-4 بیشتر از  $\gamma$ -IFN از این رو نسبت IL-4: $\gamma$ -IFN افزایش می‌یابد (نمودار شماره ۵). که با افزایش نسبت IL-12:IL-10 که توسط سلول‌های دندریتیک تولید شده‌اند هم‌خوانی دارد. برخی از محققین معتقدند که  $\text{poly(I:C)}$  باعث القاء TH1 می‌گردد که این گفته با نتایج این مطالعه مغایر است. این امر می‌تواند به دلیل استفاده ترکیبی از چند عامل بلوغ و یا مجاور کردن سلول‌های دندریتیک نابالغ با عصاره حرارت دیده سلول‌های توموری پستان در این مطالعه باشد.

آن چه در این مطالعه مشخص شد این است که افزودن  $\text{poly(I:C)}$  به MCM و  $\text{TNF-}\alpha$  می‌تواند باعث بلوغ بیشتر سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت شده و موجب القاء TH2 گردد. هرچند TH2 پاسخ ایمنی مناسبی در برابر تومور محسوب نشده ولی احتمالاً دارد به رشد بیشتر تومور منجر گردد، لذا سلول‌های دندریتیک که بدین ترتیب بالغ می‌شوند می‌توانند در ایمونوترابی آلرژی و بیماری‌های خودایمن که نیاز به فعال شدن TH2 دارند مفید واقع شود.

### سپاسگزاری

این طرح با همکاری و مساعدت مادی و معنوی مسئولین محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه و گروه بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی آن پژوهشکده انجام گرفته است. همچنین نویسندگان بر خود وظیفه می‌دانند از همکاری صمیمانه آقایان مجید عزیزی، یوسف حیدرثانی، اصغر علیاری، ساسان مشکی و فریدون سلیمی کمال تشکر و سپاسگزاری نمایند.

### References

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.
2. Lotz MB, Rover P, Kleijmeer MJ. Intracellular routes and selective retention of antigens in mildly acidic cathepsin D/Lysosome-associated

IL-12 می‌شود (۳۴). طبق برخی مقالات دیگر نیز  $\text{poly(I:C)}$  به تنهایی یا در ترکیب با سایر محرک‌ها ترشح IL-10 را القا می‌کند (۳۵) این تناقض می‌تواند به دلیل نوع آنتی‌ژنی که برای مجاور شدن سلول دندریتیک استفاده شده بود و یا تأثیر استفاده هم‌زمان از  $\text{poly(I:C)}$  و MCM و  $\text{TNF-}\alpha$  باشد.

لنفوسیت‌های T در پاسخ به تحریکات آنتی‌ژنی در داخل و خارج از بدن به تولید انواع سیتوکین‌ها می‌پردازند این سیتوکین‌ها به صورت اتوکراین و پاراکراین بر روی خود سلول‌های تولیدکننده و سلول‌های دیگر تأثیر گذاشته به همراه سایر واکنش‌های بین سلولی به القاء پاسخ ایمنی و تنظیم آن می‌پردازند بر اساس نوع، مقدار و مسیر عرضه آنتی‌ژن و نیز محیط ظریف اطراف سلول‌های T به همراه تحریکات سایر سلول‌ها دو نوع سلول T یعنی Th1 و Th2 را القاء می‌شود که هر کدام از آن‌ها انواع خاصی از سیتوکین را ترشح می‌کنند  $\gamma$ -IFN به عنوان سیتوکین شاخص Th1 و IL-4 به عنوان سیتوکین شاخص Th2 شناخته می‌شوند فعال شدن هر یک از این سلول‌ها به تقویت بیشتر بازوی سلولی و یا هومورال سیستم ایمنی می‌انجامد بنابراین آگاهی از نوع سیتوکین‌های تولید شده در پاسخ به تحریک سیستم ایمنی با آنتی‌ژنی خاص به اتخاذ تصمیم در مورد روند پاسخ ایمنی و پیش‌آگهی بیماری کمک به سزایی می‌کند. بر این مبنا در این مطالعه سنجش IL-4 و  $\text{IFN}\gamma$  به عنوان نمایندگان تیپ‌های سیتوکینی Th1 و Th2 مد نظر قرار گرفت نتایج این مطالعه نشان داد افزودن  $\text{poly(I:C)}$  به MCM و  $\text{TNF-}\alpha$  باعث تولید سلول‌های دندریتیک می‌شود که اگر با لنفوسیت‌های T مجاور گردند آن‌ها را به تولید هر دم نوع سیتوکین IL-4

- membrane protein-1/MHC class II. *J Immunology* 1997; 159: 3707-3716.
3. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantization, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137(5): 1142-1162.
  4. Redi CD, Stakpoole A, Tikerpae J. Interaction of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34<sup>+</sup> progenitors in human bone marrow. *J Immunology* 1992; 149: 2681-2688.
  5. Redi CD. The dendritic cell lineage in hematopoiesis. *J Hematology* 1997; 96: 217-233.
  6. Mohammadzadeh M, Lofting R. Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and vaccine development-A review. *J Immune Based Ther Vaccines* 2004; 2(1): 1.
  7. Mickel SM, Osterlund P, Julkunen I. TLR ligands induce synergistic interferon- $\alpha$  and interferon- $\beta$  gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol* 2011; 48(4): 505-515.
  8. Rouas R, Lewalle P, Ouriaghli FE, Nowak B, Duvillier H, Martiat P. Poly (I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. *Int Immunol* 2004; 16(5): 767-773.
  9. Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, et al. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med* 2010; 207(12): 2675-2687.
  10. Matsue H, Takashima A. Apoptosis in dendritic cell biology. *J Dermatol Sci* 1999; 20(3): 159-171.
  11. Colino J, Shen Y, Snapper CM. Dendritic cells pulsed with Intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein and polysaccharide specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J Exp Med* 2002; 195(1): 1-13.
  12. Sauter B, Albert L, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of Cell Death: Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not Primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells. *J Exp Med* 2000; 191(3): 423-433.
  13. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997; 185: 317-328.
  14. Knight SC, Farrant J, Bryan A. Non-adherent low density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocytes both with veiled morphology. *Immunology* 1986; 57: 595-603.
  15. Romani N, Gruner S, Brang D. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93.
  16. Robinson RA, DeVita VT, Levy HB, Baron S, Hubbard SP, Levine AS. A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleic-polycytidilic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57(3): 599-602.
  17. Babatz J, Rolling C, Oelschlagel U, Zhao S. Large scale immunomagnetic selection of CD14<sup>+</sup> monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study. *J Hematother Stem cell Res* 2003; 12(5): 515-523.
  18. Tazbirkova A, Okai M, Horkey DC, Crough TM, Maksoud A, Nieda M. Effects of

- leukopheresis protocol, cell processing and cryopreservation on the generation of monocyte-derived DC for immune therapy. *Cytotherapy* 2003; 5(1): 31-39.
19. Delirez 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.
  20. Mazzucchelli R, Amadio M, Curreli S, Denaro F, Bemis K, Reid W, et al. Establishment of an ex vivo model of monocytes-derived macrophages differentiated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-1 transgenic rats. *Mol Immunol* 2004; 41(10): 979-984.
  21. Bitton RJ. Cancer vaccines: a critical review on clinical impact. *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6(1): 17-26.
  22. Kubota N, Ebihara T, Matsumoto M, Gando S, Seya T. IL-6 and IFN-alpha from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(3): 1421-1426.
  23. Abdel-Wahab Z, DeMatos P, Hester D, Dong XD, Seigler HF. Human dendritic cells pulsed with either melanoma tumor cell lysate or the gp 100 peptide (280-288) induce pairs of T-cell culture with similar phenotype and lytic activity. *Cell Immunol* 1998; 186: 63-67.
  24. Roitt IM, Delves PJ. *Roitt's Essential Immunology*. 10<sup>th</sup> ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2001. p. 451-462.
  25. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. Interleukin 4 downregulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2375-2381.
  26. Zhou LJ, Tedder TF. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2588-2592.
  27. 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(6): 2599-2602.
  28. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, Damico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164(11): 5998-6004.
  29. Verdijk RM, Mutis T, Esendam B, Kamp J, Melief C, Brand A, Goulmy E. Polyribonucleic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induce stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* 1999; 163: 57-61.
  30. Nicodemus CF, Wang L, Lucas J, Varghese B, Berek JS. Toll-like receptor-3 as a target to enhance bioactivity of cancer immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202(6): 608.e1-8.
  31. Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert H, Nesselhut T, et al. Poly (I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm* 2009; 365(1-2) 61-68.
  32. Navabi H, Jasani B, Reece A, Calyton A, Tabi Z, Donniger C, et al. A clinical grade poly I: C-analogue promotes optimal DC maturation and Th1-type cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro. *Vaccine* 2009; 27(1): 107-115.
  33. Tirapu I, Giquel B, Alexopoulou L, Uematsu S, Flavell R, Akira S, et al. (Poly(I:C))-induced reduction in uptake of soluble

- antigen is independent of dendritic cell activation. *Int Immunol* 2009; 21(7): 871-879.
34. Zobywalskii A, Javorovic M, Frankenberger B, Pohla H, Kremmer E, Bigalke I. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* 2007; 5: 18-23.
35. Moller I, Michel K, Frech N, Burger M, Pfeifer D, Frommolt P, et al. Dendritic cell maturation with poly(I: C)-based versus PGE2-based cytokine combinations results in differential functional characteristics relevant to clinical application. *J Immunother* 2008; 31(5): 506-519.