ORIGINAL ARTICLE

Comparison of the Effect of TNF-α, 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-α 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° 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-α were added to one group and MCM, TNF-α, 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-α 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-γ: 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-α 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-α, poly (I:C)

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

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۰ (۶۴-۵۰)

مقایسه تأثیر *Tumor Necrosis Factor-α*، *Monocyte Conditioned Medium* و *polyinosinic-polycytidylic acid* در بلوغ سلول‌های دندریتیک

نوروز دلیرژ

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-α را در القاء پاسخ لنفوسیت‌های T مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: مونوسیت‌های خون محیطی که پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°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 آلوژن و در روز پنجم عامل بلوغ شامل MCM و TNF-α به یک گروه و MCM، TNF-α و Poly(I-C) به گروه دیگر اضافه شد. مورفولوژی سلول‌های دندریتیک تولید شده با میکروسکوپ اینورت و فنوتیپ 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-α 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-γ 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-α باعث بلوغ بیشتر سلول‌های دندریتیک و هدایت لنفوسیت‌های تحریک شده با این سلول‌ها به طرف TH2 می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های دندریتیک، MCM, TNF-α, poly (I-C)

مقدمه

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

1. Dendritic cell

مولف مسئول: نوروز دلیرژ– ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی
گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
E-mail: n.delirezh@urmia.ac.ir

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

گوناگون یافت شده‌اند که شامل سلول‌های لانگرهانس[1] در اپیدرم، سلول‌های دندریتیک بینابینی[2] در بافت‌های مختلف، سلول‌های دندریتیک تیموس و جمعیت‌هایی از سلول‌های دندریتیکی که در سایر اندام‌های لنفاوی یافت می‌شوند، می‌باشند(۲).

سلول‌های دندریتیک اولین بار توسط Steinman در سال ۱۹۷۳ شناسایی شد وی سلول‌هایی با استطاله‌های فراوان را در طحال شناسایی نمود که وجه تسمیه‌ی این سلول‌ها نیز به خاطر این استطاله‌ها می‌باشد(۳). این سلول‌ها تحت تأثیر سیتوکین‌ها از سلول‌های ریشه‌ای خون‌ساز $CD34^+$ 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[3] شده، جای خود را به سلول های دیگر می‌دهند(۱).

سلول‌های دندریتیک، مجموعه‌ی پپتید غیرخودی و MHC^4 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 (۸،۷) نقش مهمی در ایمنی ذاتی به ویژه فعال شدن سلول‌های NK ایفاء کنند(۱۰،۹). 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، الیگونوکلئوتیدهای CpG و آلرژن‌های تماسی) (۱۲) یا سیتوکین‌های التهابی (TNF-α ، IL-1β ، PGE2 ، INF-α) 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 کمک تحریکی 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 آورده اند. حدود سه دهه قبل Knight و همکارانش(۱۴) مونوسیت‌هایی را توصیف کردند که بعد از جداسازی، ظاهری نقاب‌دار و دندانه‌دار کسب می‌کردند. اخیراً مشخص شده که مونوسیت‌ها تحت تأثیر GM-CSF و IL-4 به سلول‌های دندریتیک $CD1a^+$ تمایز می‌یابند. نقش GM-CSF و IL-4 در ایجاد DC های نابالغ به‌طور تجربی نیز اثبات و نشان داده شده است که GM-CSF عامل رشد، تحریک، بقاء و تکثیر پیش سازهای میلوئیدی و تمایز آن‌ها به رده‌های سلولی ماکروفاژ و گرانولوسیت بوده و IL-4 بلوک‌کننده‌ی تکامل ماکروفاژها می‌باشد(۱۵). سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت 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

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 حساس‌سازی سلول‌های T دست نخورده ضعیف است چنین سلول‌هایی در حضور LPS، TNF-α، IL-1 و یا CD40L بالغ می‌شوند(۱۶). به‌دنبال 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 حساس‌سازی 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 به‌دست 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 حساس‌سازی سلول‌های T، معادل سلول‌های لانگرهانس هستندکه در داخل بدن بعد از برداشت آنتی ژن به گره‌های لنفاوی مهاجرت می‌کنند(۱۸،۱۷).

امروزه دانشمندان از مواد و روش‌های بسیار متعددی جهت القاء بلوغ در سلول‌های دندریتیک استفاده می نمایند که از آن جمله می‌توان به IL-1β، PGE2[1]، IFN-α[2]، TNF-α[3]، ساختارهای میکروبی مانند لیپوپلی ساکارید و الیگونوکلوتیدهای CpG (۱۲)، MCM[4] (۱۹) اشاره کرد. پلی اینوزینیک- پلی سیتیدیلیک اسید[5] (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 عوارضی۳ (TLR3[6]) 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 سینرژیستی Poly(I-C) همراه با MCM و TNF-α در بلوغ سلول‌های دندریتیک در قالب گروه تیمار با گروه کنترل که به عنوان عامل بلوغ فقط MCM و TNF-α 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 دندریتیکی است که بتواند ضمن عرضه آنتی ژن‌های سلول‌های توموری پستان انسان به سلول‌های T اتولوگ آن‌ها را به سمت سلول‌های TH1 پولاریزه کند، از این‌رو 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

۱- برای کشت سلول‌های MCF-7 (رده سلولی سرطان پستان انسان) از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FCS استفاده شد.

۲- به ۱۰ فلاسک و هر فلاسک تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول اضافه شده به منظور القاء پروتئین‌های شوک حرارتی در

1. prostaglandin E_2
2. interferon-α
3. Tumor Necrosis Factor- α
4. Monocyte conditioned medium
5. Poly- inosinic: poly- cytidylic acid
6. Toll Like Receotor

دمای ۴۱°C به مدت یک ساعت دمادهی و سپس در دمای ۳۷°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 ۲×۱۰^{۶} سلول چهار دور با قرار دادن در نیتروژن مایع و آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۵ دقیقه Freeze/Thaw گردید.

۲- محصول به‌دست آمده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g و سپس به مدت یک ساعت با سرعت ۱۳۰۰۰g سانتریفیوژ شد.

۳- مایع رویی جمع‌آوری و با فیلتر ۰/۲۲ µm استریل گردیده، برای استفاده بعدی در دمای ۷۰°C- ذخیره گردید.

جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) و تولید سلول های دندریتیک

۱- از پنج فرد داوطلب بعد از اطلاع یافتن از هدف تحقیق و رعایت شرایط استریل، توسط سرنگ‌های هپارینه (۲۰۰IU/ml) به مقدار ۳۰ 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 $۲-۳\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی لیتر و به مقدار ml ۴ در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI تکمیل شده با پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml)، استروپتومایسین (۱۰۰ µg/ml)، سرم AB^{+} انسان (۱۰درصد) و pH تنظیم شده در حدود ۷، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C، ۵ درصد CO_2 و ۹۰ 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 نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام توسط محیط کشت RPMI جدا و دور ریخته شدند.

۵- به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها را مونوسیت‌ها تشکیل می‌دادند، ۴ml محیط کشت جدید حاوی (۸۷۵ IU/ml) GM-CSF و (۴۰۰ IU/ml) IL-

۶- اضافه شده به مدت ۵ روز کشت داده شدند. از فلاسک‌ها هر روز تا پایان روز هفتم، در زیر میکروسکوپ معکوس عکس برداری به‌عمل 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 ۵۰µg/ml به سلول‌های دندریتیک اضافه گردید.

۸- در روز پنجم به عنوان عامل بلوغ به گروه شاهد (۱۰ ng/ml) TNF- و MCM (مایع رویی حاصل از کشت ۲۴ ساعته مونوسیت‌های چسبیده به پتری دیش پوشیده از گاماگلوبولین انسانی) به مقدار ۲۵ درصد محیط کشت و به گروه تیمار(۱۰ ng/ml) TNF-، MCM به مقدار ۲۵ درصد محیط کشت µg/ml و ۳۰ poly(I:C) اضافه شد.

۹- در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بافر PBS حاوی (۰/۵mM) EDTA برداشت و تعداد و میزان زنده بودن آن‌ها تعیین گردید.

بررسی شکل و اندازه سلول های دندریتیک در طی مراحل تمایز

۱- به منظور به دست آوردن میزان تولید کمی سلول‌های دندریتیک، تعداد سلول‌های حاصل، بر تعداد PBMC به کار برده شده در ابتدای کشت تقسیم و حاصل در ۱۰۰ ضرب شد. عدد به دست آمده نشانگر درصد محصول سلول دندرتیک از PBMC اولیه بود.

۲- به منظور بررسی مشخصه‌های ظاهری سلول‌های دندریتیک، فلاسک‌های حاوی سلول به طور روزانه با میکروسکوپ معکوس بررسی و عکس‌برداری به عمل آمد. از لحاظ ظاهری سلول‌های نسبتاً بزرگ، گرد و دارای زوائد سلولی بسیار زیاد به‌عنوان سلول دندریتیک، سلول‌های کشیده و بی زائده، به‌عنوان ماکروفاژ (سلول‌هایی که در مسیر دیگری متمایز شده‌اند) و سلول‌های گردی که در طول مدت کشت دچار تغییر اندازه نشدند به‌عنوان لنفوسیت در نظر گرفته شدند(۲۰).

بررسی فنوتیپ سلول های دندریتیک

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

۲- حدود دویست هزار سلول به ازای هر آنتی‌بادی (CD14، CD83، HLA-DR و control Isotype) (شرکت DAKO – دانمارک) بعد از یک بار شستشو (۳۰۰ × g، 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 (۳۰۰ × g، ۱۰ دقیقه)، بعد از رساندن حجم آن‌ها به ۱۰۰ µl، مقدار ۱۰µl آنتی‌بادی ضد نشان‌گر 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، سلول‌ها یک بار با بافر FACS شسته شده (۳۰۰، ۱۰ × g دقیقه)، تا زمان سنجش بر روی یخ خرد شده قرار داده شدند. سپس با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (شرکت Partec - آلمان) سنجش و نتایج حاصل با نرم افزار FlowMax مورد آنالیز قرار گرفت.

اندازه‌گیری قدرت بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک بالغ

۱- ۲۰ µl از بید لاتکس فلورسانت (کنژوگه با FITC) با غلظت $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ بید در هر میلی لیتر در ۵ µl سرم AB^{+} به مدت ۷/۵ دقیقه اپسونیزه[1] شد.

۲- در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد، ۲۰ µl بید اپسونیزه شده با ۲۰ µl از سلول‌های دندریتیک (با غلظت $۱/۲۵ \times ۱۰^{۷}$ در هر میلی لیتر) مخلوط شده، با اضافه کردن ۶۰ µl بافر مخصوص بیگانه خواری (PBS، ۵ mM گلوکز، ۰/۹ mM $CaCl_2$، ۰/۵ mM $MgSO_4$ و ۰/۵ درصد FBS) به حجم کلی ۱۰۰ µl رسانده شد.

۳- میکروپلیت حاوی گروه‌های تیمار و شاهد به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C، ۵ درصد CO_2 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[2] (۰/۹ NaCl درصد، بافر سیترات ۱۳ µM و تریپان بلو ۰/۲۵ mg/ml) شسته شدند (۳۰۰ × g، 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 سلول‌ها با فرمول زیر محاسبه شد.

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

GreenDC : سلول های دندریتیک حاوی بید لاتکس.

TotalDC : تمامی سلول‌های دندریتیک.

واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن

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

۲- تعداد $۱۰^{۵}$ لنفوسیت با نسبت‌های مختلف

1. Opsonization
2. Quenching Buffer

(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 کامل، به اضافه ۱۰ درصد سرم AB^+ انسانی در حجم ۲۰۰µl در دمای ۳۷ °C، ۵ درصد CO_2 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 ۱/۵ µCi [1] متیل‌تیمیدین نشاندار شده با $[^3H]$ 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 شمارش‌گر بتا (شرکت Wallac – فنلاند)، شمارش و ثبت شد.

۶- تمامی آزمایش‌ها به صورت سه‌تایی انجام شد و نتایج به‌دست آمده با واحد CPM[2] به صورت Mean CPM ± SD گزارش شد.

اندازه‌گیری میزان تولید سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 به روش الیزا

۱- آزمایش مربوط به سنجش میزان IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 با استفاده از کیت تجارتی الیزا (شرکت R&D – آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به صورت جداگانه انجام گرفت. میزان تولید IFN-γ 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

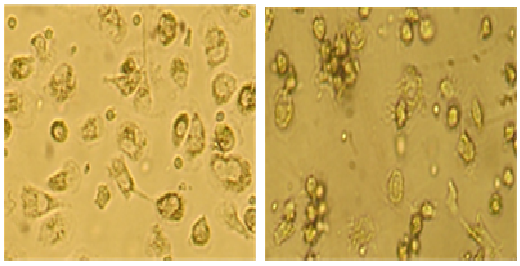
نتایج این مطالعه با برنامه Graph Pad Prism Software version 5.03. Graph Pad Software Inc. San Diego, California) تفسیر و بررسی شد. مقایسه بین گروه‌ها توسط paired t-test انجام شده، مقدار $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی مورفولوژی سلول‌های دندریتیک تولید شده

سلول‌های چسبنده بعد از ۳-۲ 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. اندازهٔ این سلول‌ها بزرگ‌تر از مونوسیت‌های اولیه بوده و زوائد سیتوپلاسمی پیدا کرده بود با گذشت زمان روند کنده شدن سلول‌های چسبنده، بزرگ شدن اندازهٔ آن‌ها و افزایش تعداد زوائد سیتوپلاسمی ادامه یافت به‌طوری که در روز پنجم که عامل القاء بلوغ اضافه شد ۷۰-۶۰ درصد سلول‌ها به صورت شناور در آمده بود. حضور عامل بلوغ به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش قابل ملاحظه اندازهٔ سلول و تعداد زوائد سیتوپلاسمی آن شد و روند شناور شدن آن‌ها را شتاب بخشید. بعد از ۷ روز به هنگام برداشت سلول‌ها ۹۰-۸۰ درصد آن‌ها آزاد و به صورت مجموعه‌های به‌هم 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-α و آن‌هایی که PolyI-C نیز دریافت کرده بودند وجود نداشت (تصویر شماره ۱).

1. Curie
2. Count per minute



MCM+TNF-α MCM+TNF-α+Poly (I:C)

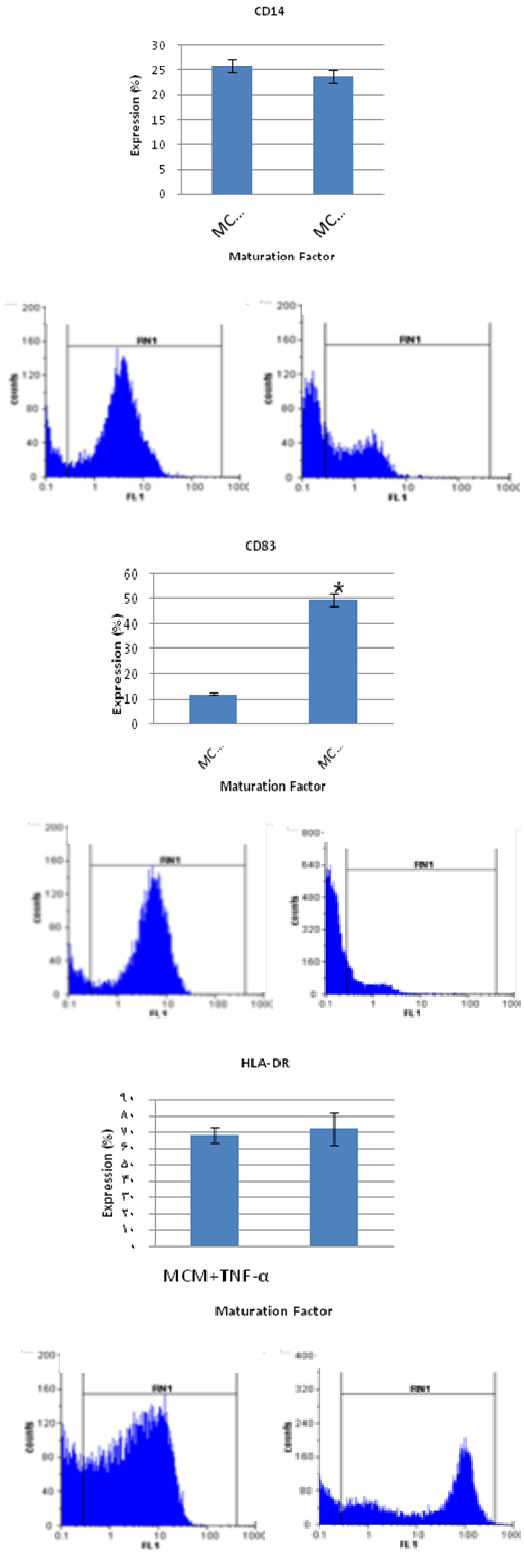
تصویر شماره ۱: مقایسه‌ی میکروسکوپی سلول‌های دندریتیک حاصل از دو گروه که عوامل بلوغ متفاوتی دریافت کرده بودند.

بررسی فنوتیپ سطحی سلول های 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 ۲/۹۵ ± ۲۳/۹۱، ۴/۳۹ ± ۴۹/۷۲، ۴/۸۵ ± ۷۱/۹۹ و در گروهی که فقط MCM و TNF-α دریافت کرده بودند ۳/۲۵ ± ۲۵/۷۱، ۱/۸۴ ± ۱۲/۰۱، ۶/۷۲ ± ۶۸/۰۱ 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 بیگانه خواری 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 بیگانه خواری انجام داده‌اند در مورد گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF-α و poly(I:C) دریافت کرده بودند به‌طور میانگین ۱/۳۵± ۲/۹۸ و د ر مورد گروهی که فقط MCM و TNF-αدریافت کرده بودند ۳/۱۸ ± ۱۵/۹ 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.

شدت فلورسانس(MFI) که نشان دهنده‌ی تعداد ذرات لاتک بلع شده به ازای هر سلول می باشد در مورد گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM و TNF-α دریافت کرده بودند به طور میانگین ۰/۲۷ ± ۳/۳ و در مورد گروهی که poly(I:C) نیز دریافت کرده بودند ۰/۱۷ ± ۵/۱۹ می‌باشد (نمودار شماره ۲).

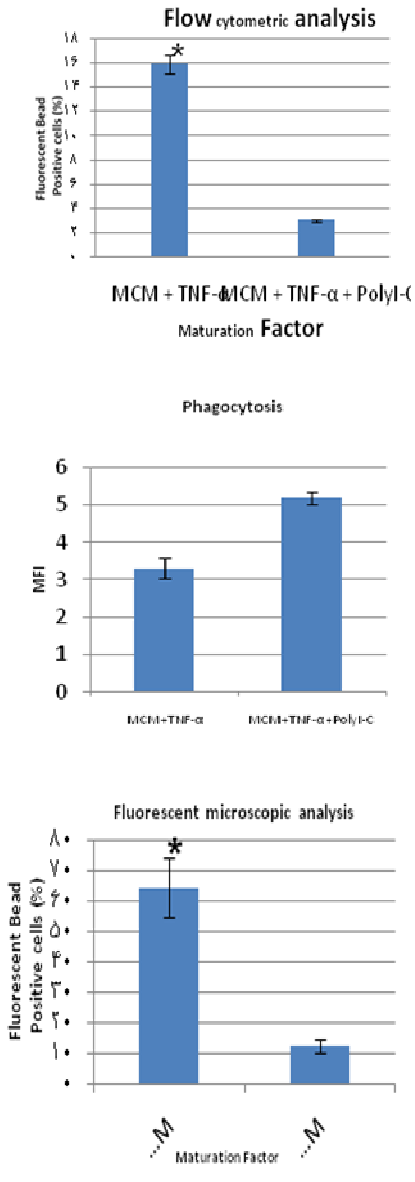
همچنین با بررسی‌های انجام شده با میکروسکوپ فلورسانت معلوم شد به‌طور میانگین ۹/۸۵ ± ۶۴/۴۹ درصد از سلول‌های دندریتیک حاصل از گروهی که به عنوان عامل بلوغ فقط MCM و TNF-α دریافت کرده بودند و ۲/۰۲ ± ۱۲/۳۶ درصد از سلول های دندریتیک حاصل از گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF-α و poly(I:C) دریافت کرده بودند، ذرات لاتکس فلورسنت را بیگانه‌خواری کرده‌اند (نمودار شماره ۲).

واکنش مختلط لوکوسیتی (MLR) آلوژن

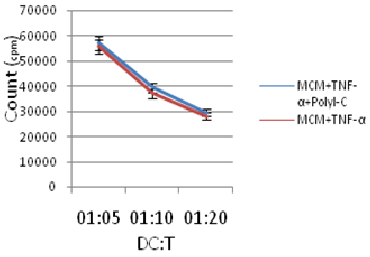
به منظور سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک حاصل از دو گروه، توانایی آن‌ها در القاء واکنش مختلط لوکوسیتی آلوژنیک مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که هر دو گروه به میزان تقریبا مساوی سبب تکثیر سلول‌های T شده اند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد (نمودار شماره ۳).

سنجش میزان سیتوکین‌های تولید شده توسط سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های T حساس شده

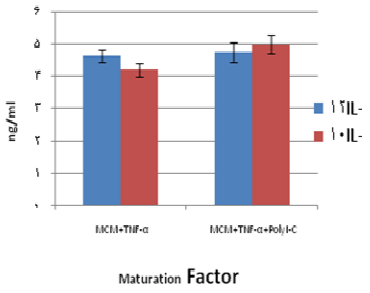
به منظور بررسی نوع سیتوکین‌های تولید شده توسط سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های T، مایع‌رویی سلول‌های دندریتیک در روز هفتم برای سنجش سیتوکین‌های IL-12 و IL-10 و مایع رویی واکنش MLR برای سنجش سیتوکین‌های IFN-γ و IL-4 به عنوان نمایندگان تیپ‌های سیتوکینی ۱ و ۲ مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری میزان تولید این سیتوکین‌ها نشان داد در اثر افزودن PolyI-C به عوامل بلوغ میزان تولید هر دو سیتوکین IL-12 و IL-10 افزایش یافته ولی میزان این افزایش معنی‌دار نبود. تحت این شرایط نسبت IL-12:IL-10 کاهش یافته بود (نمودار شماره ۴). بررسی میزان تولید سیتوکین‌های IFN-γ و IL-4 نیز نشان داد که در حضور PolyI-C تولید IL-4 بیشتر از IFN-γ افزایش یافته، نسبت IL-4: IFN-γ نیز کاهش نشان می‌داد (نمودار شماره ۵).

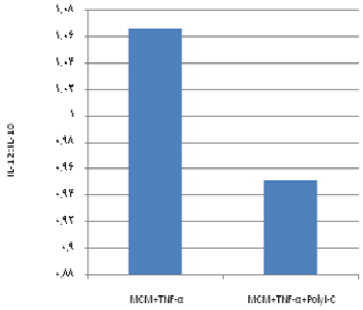


نمودار شماره ۲: مقایسه‌ی درصد سلول‌های دندریتیک بیگانه‌خواری کرده مربوط به دو گروه که عوامل بلوغ متفاوتی را دریافت کرده‌اند، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (درصد و MFI) و بررسی میکروسکوپی.

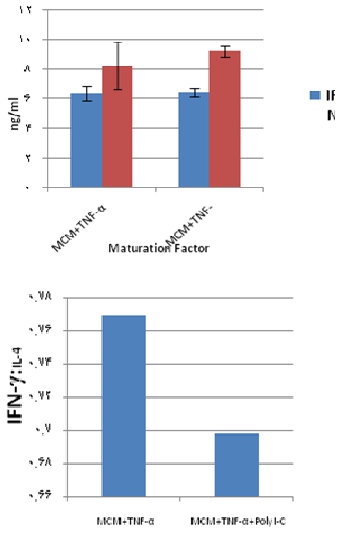


نمودار شماره ۳: نتایج حاصل از واکنش MLR با استفاده از متیل تایمیدین نشاندار





نمودار شماره ۴: میزان سیتوکین‌های تولید شده توسط سلول‌های دندریتیک



نمودار شماره ۵: میزان سیتوکین‌های تولید شده توسط لنفوسیت‌های T مجاور شده با سلول های دندریتیک.

بحث

در حال حاضر از سلول‌های دندریتیک برای القاء و بررسی پاسخ ایمنی در مدل‌های حیوانی، در شرایط in vitro و انسان استفاده می‌گردد. وجود تفاوت‌های فیزیولوژیک از یک طرف، ناهمگون بودن سلول‌های توموری انسان و فشار ناشی از درمان در القاء این ناهمگونی از طرف دیگر، باعث گردیده تا نتایج مطالعات به عمل آمده بر روی مدل‌های حیوانی به طور دقیق در مورد انسان قابل انطباق نباشد(۲۱). از طرف دیگر استفاده بالینی از واکسیناسیون با سلول‌های دندریتیک بدون انجام مطالعات پیش بالینی ضمن این‌که 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 لنفوسیت‌های T به آنتی‌ژن‌های توموری سرطان پستان عرضه شده توسط سلول‌های دندریتیکی که با استفاده از دو گروه متفاوت از عوامل القاء بلوغ در شرایط آزمایشگاهی تولید شده بودند مدنظر قرار گرفت تا این‌که بتوان پاسخ‌های ایجاد شده توسط لنفوسیت‌های T را مورد بررسی قرار داده، بهترین عامل القاء بلوغ را برای تولید سلول‌های دندریتیک کارا به منظور انجام ایمونوتراپی سرطان پستان تعیین و به کار گرفت.

انتخاب محرک بلوغ برای تولید سلول‌های دندریتیک ایمونوپوتنت بر پایه‌ی بسیاری از معیارها می‌باشد که شامل بیان نشان‌گرهای فنوتیپی آن‌ها، ترشح IL-12، ظرفیت القاء سلول‌های T سیتوتوکسیک و تنظیم‌کننده قوی و ثبات آن‌ها به منظور ایجاد پاسخ ایمنی قوی در طی تجویز به داخل بدن می‌باشد(۲۲). یکی از دغدغه‌های محققین در امر تولید سلول‌های دندریتیک، تولید انبوه و نسبتاً ارزان این سلول‌های پر کاربرد است، از این رو، محققین می‌کوشند روشی را رایج کنند که ضمن توجیه اقتصادی ابتداً درصد خلوص مونوسیت‌ها در آن بالا بوده، در مرحله‌ی بعد درصد تولید سلول‌های دندریتیک، نسبت به سلول‌های تک

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 می دارند. 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 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 نسخه‌برداری از ژن CD14 بر اثر IL-4 اضافه شده، رخ می‌دهد(۲۵). با بررسی نتایج فلوسیتومتری سنجش این نشان‌گر در سطح سلول‌های دندریتیک حاصل، معلوم شد با این‌که به‌طور کلی بروز این نشان‌گر در سطح سلول‌های دندریتیک حاصل از هر دو گروه نسبت به مقدار قابل انتظار آن در مونوسیت‌های اولیه (۸۵ درصد) بسیار کاهش یافته است (به‌ترتیب 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 دندریتیک، افزایش بیان CD83 به عنوان نشانگر اختصاصی سلول‌های دندریتیک بالغ می‌باشد(۲۶)، این نشانگر جزو ابرخانواده‌ی ایمنوگلوبولین‌ها بوده و هنوز نقش اصلی آن در هاله‌ای 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-α و poly(I:C) دریافت کرده بودند به‌طور چشم‌گیری این مولکول را بیشتر از سلول‌هایی که فقط MCM و TNF-α دریافت کرده بودند، در سطح خود بیان می‌کنند ($p\leq ۰/۰۵$) و این امر به معنی تأثیر poly(I:C) بر بلوغ سلول‌های دندریتیک حاصل است. poly(I:C) آنالوگ سنتزی RNA دو رشته‌ای ویروسی بوده و آگونیست TLR-3 می‌باشد(۲۸) و بلوغ پایداری را در سلول‌های دندریتیک انسان القاء می‌کند(۳۰،۲۹) 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 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-α و poly(I:C) دریافت کرده بودند نسبت به سلول‌هایی که فقط MCM و TNF-α دریافت کرده بودند، بیشتر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود و افزایش جزیی آن بیانگر تأثیر poly(I:C)

در افزایش بیان این مولکول می‌باشد (نمودار شماره ۱). طبق یافته‌های Navabi و همکارانش، این ماده میزان بیان HLA-DR را افزایش می‌دهد به طوری که میزان این مولکول که در مونوسیت‌ها ۴۲ درصد بود به ۹۶ درصد در سلول‌های دندریتیکی که به عنوان عامل بلوغ poly(I:C) دریافت کرده بودند، افزایش یافته بود(۳۲).

ویژگی مورد بحث بعدی قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک است. انتظار می‌رود سلول‌های دندریتیک با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه خواری و تمامی ویژگی‌های لازم برای اخذ آنتی‌ژن از جمله گیرنده‌های سطحی لازم برای این کار را از دست داده، در عوض قدرت عرضه‌ی آنتی‌ژن و نهایتاً تحریک سلول‌های T را تقویت کنند. هم سو با نتایج سایر محققین(۳۳) در این مطالعه نیز مشخص شد درصد سلول‌های دندریتیک بالغی که بیگانه‌خواری کرده‌اند در گروهی که به عنوان عامل بلوغ MCM، TNF-α و poly(I:C) دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که فقط MCM و TNF-α دریافت کرده بودند، از ۱۶ درصد به ۳ درصد کاهش یافته است که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($p\leq ۰/۰۵$) (نمودار شماره ۲). این کاهش را این گونه می‌توان توجیه نمود که با بلوغ سلول‌های دندریتیک قدرت بیگانه‌خواری آن‌ها کاهش می‌یابد(۳۱) پس poly(I:C) با القاء بلوغ بیشتر در سلول‌های دندریتیک سبب کاهش قدرت بیگانه‌خواری می‌شود. محققین یافته‌اند که ذرات poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) PLGA پوشیده شده با poly(I:C) بلوغ پایداری را در سلول دندریتیک ایجاد کرده، فعالیت بیگانه‌خواری آن را کاهش می‌دهد. در مورد قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های دندریتیک عامل دیگری که مورد توجه قرار گرفت تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول‌ها بود که به صورت میانگین شدت فلورسانس (MFI) نشان داده می‌شود. این بررسی نشان داد سلول‌هایی که poly(I-C) دریافت کرده بودند MFI بالاتری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند یعنی هر چند تعداد سلول‌های فاگوسیته کننده در گروه تیمار کمتر بود ولی قدرت فاگوسیتوز آن‌ها به ازای هر سلول بیشتر بود (نمودار شماره ۲).

بررسی نتایج MLR آلوژنیک سلول‌های دندریتیک حاصل نشان داد این سلول‌ها در هر دو گروه، لنفوسیت‌های مجاور شده را تحریک کرده و سبب تکثیر آن‌ها شدند ولی اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت که شاید به دلیل عدم وجود اختلاف معنی‌دار دربیان HLA-DR واحتمالاً مولکول‌های 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 سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های T تحریک شده با آن‌ها بود. یکی از عواملی که در تعیین تیپ پاسخ‌های ایمنی مورد بررسی قرار می‌گیرد، نوع سیتوکینی است که توسط سلول‌های دندریتیک بالغ و یا لنفوسیت‌های T تحریک شده توسط آن‌ها تولید می‌شود. اگر سلول‌های دندریتیک در طی بلوغ به سمت DC1 حرکت کنند میزان تولید IL-12 نسبت به IL-10 بیشتر خواهد بود و برعکس اگر میزان تولید IL-10 نسبت به IL-12 بیشتر باشد سلول‌های دندریتیک به سمت DC2 خواهند رفت. DC1 در القاء پاسخ ایمنی سلولی و مبارزه با پاتوژن‌های داخل سلولی مؤثر است و DC2 در تولید آنتی‌بادی و مبارزه با پاتوژن‌های خارج سلولی ایفاء نقش می‌کند. با این هدف در این مطالعه از poly(I:C) برای القاء پولاریزاسیون سلول‌های دندریتیک استفاده شده، همان‌گونه که در بخش نتایج بیان شد حضور poly(I:C) با این‌که 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 یافته‌های برخی محققین افزودن poly(I:C) به مخلوط سیتوکینی که به عنوان عامل بلوغ به سلول‌های دندریتیک نابالغ اضافه می‌شود، سبب افزایش تولید

IL-12 می‌شود(۳۴). طبق برخی مقالات دیگر نیز poly(I:C) به تنهایی یا در ترکیب با سایر محرک ها 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 هم زمان از poly(I:C)، MCM و TNF-α 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 می پردازند بر اساس نوع، مقدار و مسیر عرضهٔ 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 IFN-γ 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 پیش آگهی بیماری کمک به سزایی می‌کند. بر این مبنا در این مطالعه سنجش IL-4 و IFNγ به عنوان نمایندگان تیپ‌های سیتوکینی Th1 و Th2 مد نظر قرار گرفت نتایج این مطالعه نشان داد افزودن poly(I:C) به MCM و TNF-α باعث تولید سلول‌های دندریتیکی می‌شود که اگر با لنفوسیت‌های T مجاور گردند آن‌ها را به تولید هر دم نوع سیتوکین IL-4 و IFN- γ تحریک می‌کنند ولی میزان تولید IL-4 بیشتر از IFN- γ از این رو نسبت IL-4: IFN-γ 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 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 poly(I:C) به MCM و TNF-α 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 دندریتیکی که بدین ترتیب بالغ می‌شوند می‌توانند در ایمونوتراپی 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 وگروه 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

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 $CD34^+$ 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-α and interferon-β 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 resposes 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 trail of multiple-dose polyriboinosic-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 $CD14^+$ 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. Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei P. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. Cell Immunol 2009; 257(1-2): 23-31.
20. Mazzucchelli R, Amadio M, Curreli S, Denaro F, Bemis K, Reid W, et al. Establishment of an ex vivo model of monoctytes-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. 10th 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. $CD14^+$ blood monocytes can differentiate into functionally mature $CD83^+$ 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. Polyriboinosinic 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, Donninger 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.