



## کشت و تکثیر سلولهای دندریتیک از پیش سازهای مغز استخوان موش *Balb/c*

سمانه عرب<sup>۱</sup>، معصومه معتمدی<sup>۲</sup>، جمشید حاجتی<sup>۳</sup>

### چکیده

سلولهای دندریتیک با برداشت و پردازش آنتی ژن پاسخهای ایمنی را آغاز، جهت دهی و کنترل می کنند، این سلولها قابلیت ایجاد هدایت انواع مختلفی از پاسخهای ایمنی (نوع ۱ یا ۲) را با توجه به عوامل و پیامهای محیطی دارند. هدف این مطالعه کشت، تکثیر و بلوغ سلولهای دندریتیک از پیش سازهای مغز استخوان موش می باشد. برای این منظور سلولهای مغز استخوان را بعد از جداسازی در محیط کشت حاوی سایتوکاین قرار داده و بعد از کشت ۵ روزه به منظور بلوغ، سلولها با لیپو پلی ساکراید دیواره باکتریهای گرم منفی (LPS) و توکسین وبا مواجه شدند. سلولها از نظر بروز مارکرهای سطحی و تولید سایتوکاین ارزیابی گردیدند. نتایج نشان داد که سلولها بالغ شده بودند. در بررسی سایتوکاین حضور LPS در محیط کشت سلولها موجب تولید IL-12 و حضور CT موجب تولید IL-10 از سلولها شد. با انجام این مطالعه اثبات شد که با کشت ۷ روزه سلولهای مغز استخوان موش می توان سلولهای دندریتیک کارآمدی را تولید کرد و با اضافه کردن ترکیباتی به محیط کشت سلولهای دندریتیک می توان سلولهایی را ایجاد کرد که پاسخ مناسب نوع ۱ یا ۲ را القاء کنند.

**کلمات کلیدی:** سلولهای مغز استخوان، کشت، تکثیر، بلوغ، سلولهای دندریتیک

### مقدمه

سلولهای دندریتیک<sup>۱</sup>، سلولهای عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن بدن<sup>۲</sup> هستند که نقش مهمی در آغاز و جهت دهی پاسخهای ایمنی ایفاء می کنند [۱]. سلولهای دندریتیک قابلیت ایجاد و هدایت انواع مختلفی از پاسخهای ایمنی را با توجه به عوامل و پیامهای محیطی دارند و بر حسب شرایط رشد و بلوغ می توانند پاسخهای نوع ۱ یا نوع ۲ را جهت دهی کنند [۲ و ۳]. بدلیل نقش مهم این سلولها از آنها در تهیه واکسن و انجام ایمنی درمانی<sup>۳</sup> برای بیماریهای مختلف اعم از سرطانها، آسم و آلرژی، بیماریهای خود ایمن<sup>۴</sup> و نقص ایمنی<sup>۵</sup> استفاده می گردد [۴].

برای ایجاد واکسن های مبتنی بر DC در انسان باید این سلولها در مقادیر بالا خارج از بدن تهیه کنیم. در ابتدا از سلولهای دندریتیک خون محیطی بعنوان منبع این سلولها استفاده می شد. در این روش از محصول لوکوفرز خون محیطی استفاده میشود. مزیت این روش عدم نیاز به شرایط کشت و سایتوکاین است اما مشکل آن محدود بودن تعداد سلولهای دندریتیک خون محیطی است. سلولهای دندریتیک ۰/۷ تا ۰/۱۵ درصد سلولهای تک هسته ای خون محیطی را تشکیل می دهند [۵]. امروزه در اغلب کارآزمایی های بالینی از مونوسیت های خون محیطی بعنوان منبع تولید سلولهای دندریتیک استفاده می گردد. به این صورت که پس از جداسازی مونوسیتها، آنها در حضور سایتوکاینهای فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت مونوسیت (GM-CSF) و اینترلوکین ۴ (IL4)

۱- Dendritic Cells (DCs)

۲- Antigen Presenting Cells (APCs)

۳- Immunotherapy

۴- Auto Immune Diseases

۵- Immune Deficiency

۱- کارشناس ارشد ایمونولوژی

۲- کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۳- دانشیار ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

## مواد و روش کار

### حیوانات

در این تحقیق از موشهای BALB/C ماده ۸-۶ هفته استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیده و تا زمان انجام آزمایش در محل نگهداری حیوانات گروه ایمونولوژی دانشگاه تهران نگهداری شدند.

### جداسازی سلول از مغز استخوان موش

ابتدا موش کشته شد و به مدت ۵ دقیقه در الکل<sup>۰</sup> ۷۰ غوطه ور گردید. سپس با مقید کردن حیوان پوست ناحیه استخوان ساق و ران کنده شد و در شرایط استریل عضله این نواحی کاملاً از استخوان جدا گردید. استخوانها به الکل منتقل و ظرف ۳-۱ دقیقه استخوانها با بافر فسفات استریل شستشو داده شدند. بعد از این مرحله استخوانها به پلیت استریل حاوی محیط کشت (SIGMA) RPMI 1640 منتقل شدند. دو انتهای آنها با سرسوزن ۲۵ سوراخ شد و با سرنگ ۱۰ سی سی محیط کشت به داخل استخوانها تزریق گردید و این کار آنقدر ادامه داده شد تا استخوانها کاملاً سفید شدند. سوسپانسیون سلولی بمدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰G سانتریفوژ گردید. با استفاده از آب مقطر و بافر فسفات 10X گلبولهای قرمز حذف شدند و سلولها سه بار شستشو داده شدند و ذرات اضافی با پی پت خارج گردید. تعداد و بقا سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو ۰.۵٪ و به کمک هموسیستمتر تعیین شد.

### کشت سلولهای دندریتیک

۱۰۶ × ۱-۱/۵ سلول پیش ساز جدا شده از مغز استخوان موش BALB/C به پلیت ۲۴ چاهکی محتوی محیط کشت (SIGMA) RPMI 1640 حاوی پنی سلین ۱۰۰ واحد در میلی لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر، سدیم بیکربنات ۲ گرم در لیتر، ۱۰٪ سرم غیرفعال شده جنین گاو (GIBCO) و ۱٪ ال-گلوتامین بهمراه ۲۰ نانوگرم (۱۰۰ واحد) در میلی لیتر (GM-CSF) (BENDERMED SYSTEM) و

کشت می دهند تا به سلولهای دندریتیک تبدیل شوند. این روند کشت از ۵ تا ۹ روز در مطالعات متغیر است [۶].

این سلولها نابالغ هستند، قدرت آندوسیتوزی بالایی دارند اما مولکولهای MHC و کمک محرک CD80 و CD86 را در سطح پایینی عرضه می کنند. در حضور عوامل بلوغی مثل  $\alpha$ -TNF، اینترلوکین ۱، 7PGE2، محیط مشتق از مونوسیت ۸، لیپوپولی ساکارید دیواره باکتریها<sup>۹</sup> و ترکیبات میکروبی مختلف می توان سلولهای دندریتیک بالغ را ایجاد کرد. این سلولها قدرت برداشت آنتی ژنی پایینی دارند، اما مولکولهای MHC و کمک محرک را در سطح بالایی عرضه می کنند و قادرند سلولهای T را به طرز مناسبی فعال کنند. شرایط کشت و نحوه بلوغ سلولهای دندریتیک نقش مهمی در القاء پاسخ ایمنی مناسب بر ضد تومور بازی می کند. در بیشتر مطالعات استفاده از سلولهای دندریتیک بالغ بر نابالغ ترجیح داده شده است. زیرا معتقدند سلولهای دندریتیک بالغ قدرت بیشتری در تحریک پاسخهای ایمنی دارند و احتمالاً سلولهای نابالغ موجب القاء تولرانس می شوند [۷].

در مدل‌های موشی از سلولهای پیش ساز مغز استخوان یا سلولهای دندریتیک طحال به عنوان منبع سلولها استفاده می گردد و شرایط کشت مشابه سلولهای انسانی را باید طی کنند [۸].

روشهای مختلفی جهت کشت و تکثیر سلولهای دندریتیک از مغز استخوان موش در دنیا وجود دارد. مادر مطالعه خود از روش کشت ۵ روزه جهت تولید سلولهای دندریتیک نابالغ و به دنبال آن ۲ روز کشت با مواد بلوغ که شامل لیپوپولی ساکارید دیواره باکتریها (LPS) و سم باکتری ویبریولکوره<sup>۱۰</sup> (CT) بود، استفاده کردیم. سلولهای دندریتیک کشت داده شده با این مواد را از نظر بروز مارکرهای سطحی و تولید سایتوکاین بررسی کردیم.

<sup>6</sup> -Tumor Necrosis Factor

<sup>7</sup> -Prostaglandin E2

<sup>8</sup> - Monocyte Conditioned Medium(MCM)

<sup>9</sup> - Lipopolysaccharide ( LPS)

<sup>10</sup> -Cholera toxin



سلول‌ها با بافر فسفات ۲ بار شست‌شده شده و در خاتمه ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات و یا محلول فیکس کننده (در صورتی که بخواهیم روز بعد نتایج را قرائت کنیم) اضافه شد و نتایج با دستگاه قرائت گردید. نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار WINMDI مورد بررسی قرار گرفت.

#### ارزیابی میزان سایتو کاین های تولید شده توسط سلولهای دندریتیک

سوپ رویی سلولهای دندریتیک در روز پنجم و هفتم جمع آوری شد و میزان تولید اینترلوکین ۱۰ و ۱۲ با استفاده از کیت الایزا ۱۱۱ (BENDER MEDSYSTEMS) ارزیابی شد. تمام نمونه‌ها بصورت سه تایی انجام گردید و غلظت سایتوکاین‌ها براساس منحنی استاندارد و برحسب پیکوگرم در میلی لیتر گزارش شدند.

#### روش تجزیه و تحلیل داده ها

(۱) توصیف داده ها با جدول و نمودار

(۲) تعیین ارتباط متغیرها با استفاده از آزمون آنووا ۱۲

#### نتایج

##### ۱- بررسی مارکر های سطحی سلولهای دندریتیک

سلولهای حاصل از کشت ۵ روزه و سلولهای مواجه شده با LPS و CT با آنتی بادیهای مونوکلونال مربوطه رنگ آمیزی شده و با دستگاه فلوسایتومتر از نظر بروز مارکرهای سطحی بررسی شدند. شکل ۱ بروز مارکرهای مختلف از جمله CD11C, CD86, CD40, CD80, MHC-II بر سطح سلولهای دندریتیک در روز پنجم و هفتم کشت را نشان می دهد. مارکر CD11C که مارکر اختصاصی سلولهای دندریتیک می باشد، بر سطح ۷۰ درصد سلولهای کشت ۵ روزه و ۷ روزه عرضه شده است. بروز مارکرهای MHC کلاس دو، CD86, CD40, CD80 که مارکرهای بلوغ

۵ نانوگرم (۱۰۰ واحد) در میلی لیتر IL-4 (BENDER MED SYSTEM) منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO<sub>2</sub> ۵٪ قرار داده شد. روز سوم سلولهای غیر چسبان توسط پیپتاژ ملایم جمع آوری گردیدند و به سلولها محیط کشت جدید با نصف غلظت اولیه GM-CSF, IL-4 اضافه شد. سلول‌ها با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> × ۵ در ۶ میلی لیتر محیط به پلیت های ۶ چاهکی منتقل شدند. در روز پنجم سلولهای جهت بررسی فنوتایپ سلولی و مرفولوژی جمع آوری گردیدند.

#### تولید سلولهای دندریتیک بالغ

در روز پنجم، به ازای هر ۱۰<sup>۶</sup> سلول ۱ میکروگرم در میلی لیتر LPS (CAT. NO: L-6526 SIGMA) و ۱ میکروگرم در میلی لیتر توکسین ویا (BIOMOL RESEARCH LAB) اضافه شد. بعد از سپری شدن ۴۸ ساعت سلولهای دندریتیک بالغ جهت ارزیابی مرفولوژی و فنوتایپ جمع آوری گردیدند.

#### ارزیابی فنوتایپ سلولهای دندریتیک بالغ و نابالغ

فنوتایپ سلولهای دندریتیک توسط فلوسایتومتری با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال کنژوگه شامل: CD11 C, PE, MHCII FITC, CD80 FITC, CD86 FITC, CD40 FITC و ایزوتایپ کنترل (BD PHARMINGEN) در روز ۵ و ۷ تعیین شد. جهت انجام تست، سلولهای دندریتیک نابالغ (سلولهای دندریتیک روزهای پنجم) و سلولهای دندریتیک بالغ شده (سلولهای دندریتیک روزهای هفتم) جمع آوری گردید. ۵ لوله برای تست و ۳ لوله برای ایزوتایپ کنترل انتخاب گردید و به هر لوله ۱۰<sup>۵</sup> سلول اضافه و لوله‌ها در ظرف حاوی یخ قرار داده شدند. ۱ میکرولیتر از آنتی بادیهای کنژوگه به لوله اضافه کرده و به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در تاریکی و سرما قرار گرفت. بعد از این مدت لوله‌ها با دور ۱۵۰۰G به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی کاملاً خالی گردید. سپس

11-ELISA

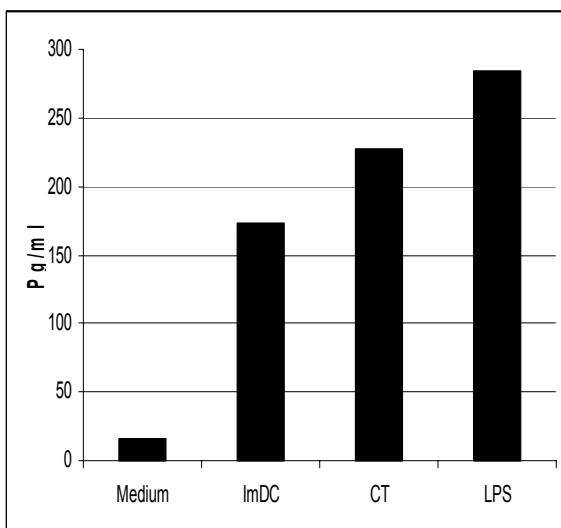
12-ANOVA

## ۲- تولید سایتوکاین توسط سلولهای دندریتیک

محلول رویی حاصل از کشت ۵ روزه و ۷ روزه سلولهای دندریتیک جمع آوری و از نظر تولید سایتوکاین های IL-12 و IL-10 با استفاده از روش الیزا بررسی شد. بعد از بررسی جذب نوری (OD13)، میزان تولید این سایتوکاین ها برحسب پیکوگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

### ۲-۱- ایتترلوکین ۱۲ (IL12)

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده تولید IL-12 در سلولهای دندریتیک مواجه شده با LPS نسبت به سلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای مواجه شده با CT به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) بالاتر بود.



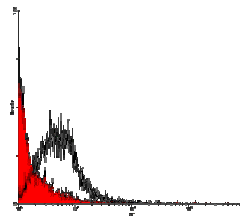
شکل ۲. میزان تولید IL-12 از سلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای دندریتیک مواجه شده با LPS و CT

### ۲-۲- ایتترلوکین ۱۰ (IL-10)

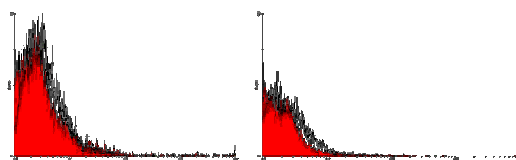
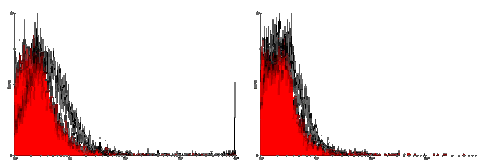
همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده تولید IL-10 در سلولهای دندریتیک مواجه شده با CT نسبت به سلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای مواجه شده با LPS به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) بالاتر بود. سلولهای مواجه شده با LPS به طرز معنی داری ( $P < 0.05$ ) از تمام گروهها بجز سلولهای تنها مقدار IL-10 پایبندتری تولید کرده بودند.

سلولهای دندریتیک می باشند، در گروه LPS-DC در مقایسه با گروه CT-DC کمی بالاتر بود اما نسبت به DC نابالغ (۵ روزه) هر دو گروه بالاتر بودند.

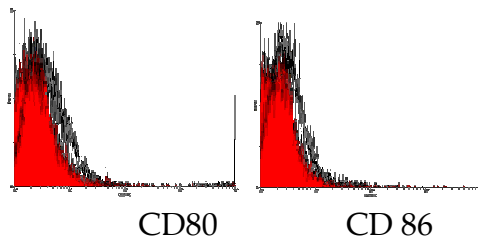
(الف)



(ب)

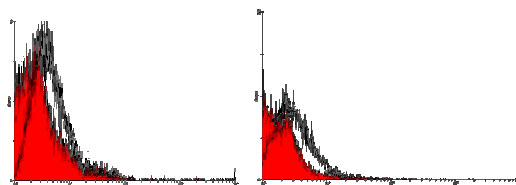


CT



CD80

CD86



LPS

MHCII

CD40

شکل ۱. بروز مارکر CD11C روی سطح سلولهای دندریتیک در مقایسه با ایزوتایپ کنترل (الف) و بروز مارکرهای بلوغ MHC-II, CD80, CD86, CD40 بر روی سلولهای دندریتیک بالغ (سفید) در مقایسه با نابالغ (قرمز)

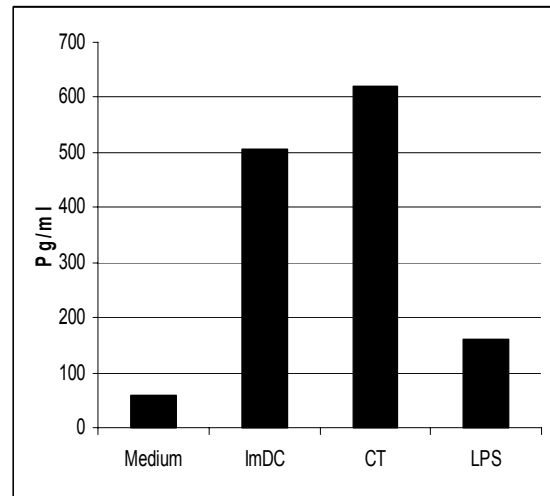
تولید سایتوکاین هایی مانند IL12 و IL18 و برای القاء پاسخهای تیپ ۲ (TH2) تولید IL4, IL-10 از سلولهای دندریتیک الزامی است [۱۲]. در این مطالعه بلوغ سلولهای دندریتیک با استفاده از LPS موجب تولید مقادیر بالایی از IL-12 توسط سلولها شد. IL12 مهمترین سایتوکاین در جهت دهی پاسخهای ایمنی به سمت TH1 به شمار می رود و مهمترین منبع تولید آن سلولهای دندریتیک فعال هستند. این سایتوکاین با تحریک سلولهای T و NK موجب تحریک تولید IFN- $\gamma$  می شود. IL-18 نیز در همراهی با IL-12 در القاء پاسخ TH1 نقش مهمی ایفاء می کند [۱۳].

LPS از طریق گیرنده های شبه تول نوع ۴ (TLR-4) توسط سلولهای دندریتیک شناسایی می شود و این شناسایی موجب بلوغ این سلولها، ترشح سایتوکاینهایی مانند IL-12, IL18 و جهت دهی پاسخ ایمنی به سمت پاسخهای TH1 می شود [۱۴ و ۱۵].

در مقابل IL-10 بعنوان یک سایتوکاین ضد التهابی عمل کرده و از طریق سرکوب پاسخ TH1 به رشد و توسعه TH2 کمک می کند. IL-10 از تولید IFN- $\gamma$  و TNF-A توسط سلولهای ایمنی جلوگیری می کند [۱۶]. در این مطالعه مواجهه سلولهای دندریتیک با CT موجب تولید مقادیر بالایی IL-10 از این سلولها شد.

مطالعات زیادی نشان داده است که سم وبا عامل القای بلوغ در سلولهای دندریتیک و قادر به جهت دهی پاسخ ایمنی به سمت ایجاد سلولهای تنظیمی یا TH2 است [۱۷]. همچنین سم وبا موجب ممانعت از بروز گیرنده های اینترلوکین ۱۲ بر سطح سلولهای T می شود. تاثیر این سم بر تولید اینترلوکین ۱۲ و گیرنده های آن به عنوان یکی از دلایل اصلی ممانعت از بروز پاسخ های TH1 در نظر گرفته شده است [۱۸].

با انجام این مطالعه اثبات شد که با کشت در نهایت ۷ روزه سلولهای مغز استخوان موش می توان سلولهای دندریتیک کارآمدی را تولید کرد و با اضافه کردن ترکیباتی به محیط کشت سلولهای دندریتیک می توان سلولهایی را ایجاد کرد که



شکل ۳. میزان تولید IL-10 از سلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای دندریتیک مواجهه شده با LPS و CT

## بحث

سلولهای دندریتیک قابلیت ایجاد و هدایت انواع مختلفی از پاسخهای ایمنی را با توجه به عوامل و پیامهای محیطی دارند و بر حسب شرایط رشد و بلوغ می توانند پاسخهای ایمنی نوع ۱ یا ۲ را جهت دهی کنند [۲]، که در ایمنی ضد توموری [۹] و در درمان آسم و آلرژی پاسخهای نوع ۱ [۱۰] و در درمان بیماریهای خود ایمن پاسخهای نوع ۲ [۱۱] بسیار موثر و کارآمد می باشند.

در این مطالعه هدف، تولید سلولهای دندریتیک از پیش سازهای مغز استخوان موش، بلوغ آنها با مواد مختلف، بررسی وضعیت فنوتیپی و تولید سایتوکاین توسط این سلولها بود.

در بررسی فنوتایپ سلولها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری نتایج حاصله از مطالعه نشان داد که مورد استفاده موجب افزایش بروز مولکولهای MHCII, CD40, CD80, CD86 بر سطح سلولهای دندریتیک میشود. نتیجه طبیعی این امر بلوغ سلولهای دندریتیک و افزایش توان عرضه آنتی ژنی این سلولها خواهد بود.

همانطور که ذکر شد سلولهای دندریتیک با تولید سایتوکاینهای مختلف پاسخهای ایمنی را هدایت می کنند به این صورت که برای ایجاد و تداوم پاسخ تیپ ۱ (TH1)



11. Bistrizter T, Weintrob N, Ofan R, Koren-Morag N, Rapoport MJ. TH1/TH2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma..Cytokine. 2006 May;34(3-4)
12. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, et al. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* .2000;18:451-94.
13. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* .2000;165:2665-70.
14. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003 Jan 22; 85(2):85-95
15. Tsuneyasu Kaisho and Shizuo Akira. Regulation of Dendritic cell Function Through Toll-Like Receptors. *Current Molecular Medicine*. 2003;3:759-771
16. Sharma, S. et al. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J. Immunol*.1999; 163: 5020-5028 .
17. Braun MC, He J, Wu CY, Kelsall BL. Cholera Toxin Suppresses Interleukin (IL)-12 Production and IL-12 Receptor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 Chain Express. *J. Experimental Medicine* .1999; 189(3) : 541-552
18. Bagley KC, Abdelwahad SF, Tuskan RG. Cholera Toxin and Heat-Labile Enter toxin Activated Human Monocyte -Derived Dendritic cells and Dominantly Inhibit Cytokine Production through a Cyclic AMP-Dependent Pathway. *Infection and Immunity*. 2002; 5533-553

سایتوکاینهای القاء کننده پاسخ نوع ۱ یا ۲ را تولید کنند و با این کار کارایی ایمنوترایی را بر علیه بیماریهای مختلف و به ویژه انواع سرطانها را تقویت نمود.

## منابع

1. YONG-JUN LIU. Dendritic cell subset and lineages , and their functions in innate and adoptive immunity. *Cell* .2001;106:259-62.
2. Antonia Ian zavecchia. Federica sallus to. Regulation of T cell immunity by dendritic cell. *Cell* 2001;106:263-66.
3. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. 2000. Sep;1(3):199-205.
4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*; 18:767-811.
5. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994;180:83-93.
6. Svane IM, Soot ML, Buus S, Johnsen HE. Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. *APMIS*. 2003 Jul-Aug;111(7-8):818-34
7. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;193:233-238.
8. Rice AM, Jones KL, Hart DN. DC preparations for therapy. *Cytotherapy*. 2004;6(2):99-104
9. Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, et al. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci*. 2004 Sep;95(9):697-703.
10. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J*. 2005 Dec;26(6):1119-37.