مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۲: از ۱-۱۱
تابستان ۱۳۸۸

سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده: بررسی اثر سیتوتوکسیک در موش‌های مبتلا به سرطان

عباس آزادمهر[۱]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲*]، زهرا امیرغفران[۳]، سیدمحمد مؤذنی[۲]، زهیرمحمد حسن[۲]، عقیل تبارملاحسن[۱]

۱- دانشجوی دکتری، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیماری‌های خودایمن، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۲/۰۲ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۵/۰۷

چکیده

هدف: سلول‌های دندریتیک برای فعال‌سازی و قطبی شدن سلول‌های T در راستای پاسخ‌های ایمنی اکتسابی ضروری هستند. در تحقیق حاضر، اثر رده لنفوئیدی سلول‌های دندریتیک بار شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده در مدل تومور فیبروسارکوما ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های Balb/C، ده روز قبل از ایمن‌سازی با سلول‌های دندریتیک با تزریق رده سلولی Wehi-164 به‌صورت زیر پوستی مبتلا به تومور فیبروسارکوما شدند. بیان مولکول‌های HSP70 در سلول‌های توموری که شوک حرارتی دیدند با وسترن بلات بررسی شد. رده لنفوئیدی سلول‌های دندریتیک از طحال موش با روش بید مغناطیسی (MACS)، جداسازی و تخلیص شدند. سپس واکسن در گروه‌های مختلف شامل سلول‌های لنفوئیدی دندریتیک بار شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده، حرارت ندیده و بدون عصاره سلول توموری به‌صورت زیر پوستی تزریق شد و حجم تومور، طول عمر و آثار سیتوتوکسیک بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که واکسن سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده، سبب کاهش معنی‌دار حجم تومور و افزایش طول عمر در موش‌های ایمن شده، شد. ایمنی‌درمانی با سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت سلول‌های T سیتوتوکسیک در بافت توموری شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از رده لنفوئیدی سلول دندریتیک بار شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده می‌تواند باعث القای پاسخ سیتوتوکسیک ضد تومور فیبروسارکوما شده و راه‌کارهای جدیدی را در درمان سرطان معرفی می‌نماید.

کلیدواژگان: عصاره سلول توموری، سلول دندریتیک لنفوئیدی، پروتئین شوک حرارتی

۱- مقدمه

امروزه سرطان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر انسان‌ها در جهان است، ایمنی‌درمانی (Immunotherapy) یکی از راه‌های درمان سرطان است که در این روش سیستم ایمنی در صورت فعال شدن قادر به ایجاد پاسخ اختصاصی

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
Email: Pourfa@modares.ac.ir

ضد تومور شده و بر بافت‌های طبیعی بی‌اثر است. از آن‌جایی که پاسخ ایمنی سلولی در کنترل تومور اهمیت زیادی دارد، بنابراین یکی از راه‌کارهای مهم و با ارزش در ایمنی‌درمانی سرطان، استفاده از سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells: DCs) به‌عنوان ادجوان (Adjuvant) و تقویت‌کننده پاسخ ایمنی سلولی ضد تومور است. DCs از سلول‌های مهم پردازش و عرضه‌کننده آنتی‌ژن بوده، سبب پاسخ و تکثیر سلول‌های سیتوتوکسیک و لمفوسیت‌های کمکی T با عرضه آنتی‌ژن از طریق مولکول‌های MHC-I (Major Histocompatibility Complex class I) و MHC-II می‌شوند [۱-٤]. مطالعات نشان دادند که ایجاد پاسخ ایمنی سلولی Th1 (T helper 1) برای دفاع در مقابل تومور اهمیت دارد [۵]. فاکتورهای مختلفی از جمله نوع رده DCs و شرایط فعال شدن آن‌ها می‌توانند در قطبی شدن (Polarization) و جهت‌گیری پاسخ سیستم ایمنی به سمت ایمنی سلولی Th1 ایفای نقش نمایند. تحقیقات اخیر نشان دادند که انواع رده‌های DC می‌توانند سبب جهت‌گیری پاسخ سیستم ایمنی شوند [٦-۸]. براساس بیان نشانگرهای (Markers) CD4، CD8α و DCs، طحال موش به سه رده شامل $CD4^-CD8\alpha^+$، $CD4^+CD8\alpha^-$ و $CD4^-CD8\alpha^-$ تقسیم می‌شود [۹، ۱۰]. بر این اساس مشخص شده است که DCs لنفوئیدی ($CD8\alpha^+$) سبب ایجاد پاسخ ایمنی سلولی Th1 و بر عکس DCs میلوئیدی ($CD8\alpha^-$) سبب ایجاد پاسخ ایمنی Th2 می‌شود [۸، ۱۱]. در مدل آزمایشگاهی (In vitro) نشان داده شده که سلول‌های اصلی تولیدکننده سیتوکین اینترلوکین ۱۲ (Interleukin 12: IL-12)، DCs لنفوئیدی ($CD8\alpha^+$) هستند [۱۲]. تحقیقات در مدلِ در بدن (In vivo) هم ثابت نمودند که سلول‌های اصلی تولیدکننده سیتوکین IL-12 در طحال، در موش‌هایی که با عصاره توکسوپلاسما گوندی (*Toxoplasma gondii*) یا لیپو پلی‌ساکارید مواجهه شدند، DCs لنفوئیدی ($CD8\alpha^+$) هستند [۱۳]. تولید سیتوکین اینترفرون گاما (Interferon gamma: IFN-γ) هم از این رده DC مشاهده شد [١٤]. بنابراین ایجاد و القای پاسخ ایمنی سلولی و سیتوتوکسیک از DCs لنفوئیدی ($CD8\alpha^+$) برای پاسخ علیه تومور قابل انتظار است. استفاده از آنتی‌ژن‌های توموری سبب القای پاسخ ایمنی سلول T علیه تومور می‌شود [۱۵، ١٦]. از طرفی دیگر پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat Shock Proteins: HSPs)، در حالت افزایش دما در سلول‌ها به مقدار زیاد بیان می‌شوند و می‌توانند به‌عنوان چاپرون (Chaperone) به آنتی‌ژن‌های تومور متصل شده و سبب گرفتار شدن آنتی‌ژن‌های توموری متصل شده به خود از طریق گیرنده‌هایی از قبیل CD40 و CD91 در سطح سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen-Presenting Cells: APCs) شده و باعث عرضه آن‌ها در مسیرهای MHC-I و MHC-II و القای پاسخ‌های سیستم ایمنی شوند [۱۷]. HSPs باعث افزایش بلوغ و تولید کموکین‌ها (Chemokines) و سیتوکین از APCs می‌شود که این اثر سبب تقویت و افزایش پاسخ ایمنی می‌شود [۱۹-۲۱]. بنابراین القای شوک حرارتی و همراهی مولکول‌های HSPs با عصاره سلول توموری می‌تواند سبب تقویت پاسخ سلول‌های T علیه تومور شود. بنابراین در تحقیق حاضر با بهره‌گیری از ویژگی‌های DCs لنفوئیدی ($CD8\alpha^+$) و عصاره سلول تومور شوک حرارتی دیده در مدل تومور فیبروسارکوما (Fibrosarcoma) برای القای پاسخ ضد توموری سیستم ایمنی استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت و تکثیر رده سلولی فیبروسارکومای موشی (Wehi-164)

رده سلولی فیبروسارکومای موشی (Wehi-164) از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط RPMI 1640 (Gibco, USA) حاوی ده درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و ۲ میلی‌مولار ال گلوتامین، پنی‌سیلین (Penicillin) و استرپتومایسین (Streptomycin) در انکوباتور محتوی ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت

شدند. شرایط سلول‌های Wehi-164 موجود در فلاسک به‌صورت روزانه مشاهده و در صورت افزایش سلول‌ها به بیش از ۸۰ درصد سطح فلاسک، پاساژ سلولی انجام شد [۲۲].

۲-۲- ایجاد شوک حرارتی و تهیه عصاره سلول‌های توموری

به‌منظور افزایش میزان چاپرون‌های سلول‌های توموری (HSPs)، آن‌ها تحت شوک حرارتی غیرکشنده (Sublethal shock) قرار گرفتند. برای این منظور سلول‌های توموری را درون لوله آزمایش ریخته و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بن‌ماری حرارت داده و سپس ۱۲ ساعت در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سلول‌های توموری با روش انجماد (در نیتروژن مایع) و ذوب مجدد با استفاده از بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد (چهار مرتبه) نکروز (Necrosis) و لیز شدند. با استفاده از سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه غشای سلول‌ها را رسوب داده و مایع رویی (عصاره سلولی) با فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد [۲۳].

۲-۳- ارزیابی HSP70 با روش ایمونوبلات (Immunoblot)

برای نشان دادن باند مربوط به HSPs در عصاره سلول توموری حرارت دیده از الکتروفورز SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) و برای تأیید آن از وسترن بلات (Western blot) استفاده شد. میزان پروتئین عصاره سلول توموری حرارت دیده با روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری شد. پس از لود (Load) نمودن مقادیر یکسانی از عصاره سلول توموری در گروه‌های مختلف، الکتروفورز انجام و پس از انتقال به غشای PVDF (Polyvinylidene Fluoride) با استفاده از آنتی‌بادی ضد HSP70 (۱/۱۰۰۰؛ R&D System) در سلول‌های شوک حرارتی دیده، بررسی شد [۲۲].

۲-۴- جداسازی و تخلیص DC لنفوئیدی با روش بید مغناطیسی (Magnetic Cell Sorting: MACS)

به‌طور کلی سه جمعیت اصلی DC در طحال موش وجود دارند که DC لنفوئیدی یکی از آن‌هاست، این رده از DC دارای نشانگر $CD8\alpha^+$ است که دو گروه دیگر فاقد این نشانگر هستند. به‌منظور جداسازی و تخلیص، کیت جداسازی DC لنفوئیدی ($CD8\alpha^+$) (Mouse $CD8\alpha^+$ Dendritic Cell Isolation Kit Cat No:130-091-169) از شرکت Miltenyibiotec کشور آلمان خریداری شد.

MACS روشی است که سلولی خاص با کمک آنتی‌بادی مونوکلونال (Monoclonal) اختصاصی، بید مغناطیسی و ستون، جداسازی می‌شود. مزیت این روش در جدا نمودن سلول، دقت، حساسیت و درجه خلوص بالا است.

برای جداسازی و تخلیص این رده سلولی، بعد از کشتن موش، طحال را جدا کرده و با کمک آنزیم کلاژناز D (Collagenase D) (Boehringer Mannheim, Germany)، هضم بافت طحال و آزادسازی سلول‌ها انجام شد. در مرحله بعد برای تهیه سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای برای جداسازی DC از نایکودنز (Nycodenz) با ایجاد گرادیان خاص استفاده شد. سپس طبق دستور کیت جداسازی این سلول، در مرحله اول (Depletion)، سلول‌های T، B و NK (Natural Killer) با کمک آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی ضد شاخص‌های سلول‌های مورد نظر و با کمک ستون LD و MidiMACS Separator از سوسپانسیون سلولی حذف شده که نتیجه این مرحله، DCs تخلیص شده با نشانگر $D11c^+$ بود. در مرحله دوم (انتخاب مثبت: Positive selection)، DCs لنفوئیدی ($CD11c^+$ $CD8\alpha^+$) با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی CD8α، ستون MS و MiniMACS Separator از DCs به‌دست آمده با نشانگر $CD11c^+$ مرحله اول تهیه و جداسازی شدند.

۲-۵- بررسی تخلیص DCs لنفوئیدی با روش فلوسیتومتری

بعد از جداسازی تعداد 10^5 DCs لنفوئیدی در PBS (Phosphate Buffered Saline) محتوی آلبومین سرم گاوی ۱ درصد با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال فلورسنت FITC-anti CD8α (Fluorescein isothiocyanate)، PE-anti CD11c (Phycoerythrin) (BD Pharmingen) و ایزوتیپ کنترل مربوط (isotype-matched controls) روی یخ به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شده و سپس آنالیز فلوسیتومتری انجام شد (BD Biosciences, USA).

۲-٦- تهیه DCs لنفوئیدی بار شده به عصاره سلول توموری و عصاره سلول توموری شوک حرارتی

برای تولید DCs لنفوئیدی بار شده به عصاره سلول توموری و عصاره سلول توموری شوک حرارتی، سلول‌های تخلیص شده با عصاره سلول توموری به‌مدت یک کشت شبانه در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد مجاور شدند. غلظت مناسب عصاره سلول تومور ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای بار شدن با DCs لنفوئیدی مشخص شد؛ چون در این غلظت سلول‌ها بیشترین میزان زنده بودن (Viability) را با آزمون تریپان بلو (Trypan blue) بعد از کشت شبانه نشان دادند. بعد از مجاور شدن کشت شبانه عصاره سلول توموری با سلول‌ها، سلول‌های بار شده دو بار با PBS شستشو شده و برای ایمن‌سازی آماده شدند.

۲-۷- روش ایمن‌سازی، محاسبه حجم تومور و طول عمر (Survival)

ده روز بعد از تزریق سلول‌های Wehi-164 به‌صورت زیرجلدی در قسمت پهلوی راست موش، تومور ایجاد شد. در چهار گروه مختلف از موش‌های مبتلا به تومور (هر گروه حاوی ۵ رأس موش) به‌ترتیب PBS به گروه کنترل منفی، $CD8\alpha^+$ DC تنها، $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری حرارت ندیده و $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده سه بار (هفته‌ای یک تزریق) و به مقدار 3×10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به‌صورت زیر پوستی تزریق شد. هر پنج روز یک‌بار مقدار حجم سلولی با کولیس (Colis) اندازه‌گیری و با فرمول طول×(ارتفاع)^2×π/٦ بر حسب میلی‌متر مکعب محاسبه شد. هر روز (تا یک دوره زمانی هشتاد روزه) در هرگروه مرگ و میر موش‌ها مشاهده و ثبت شد و طول عمر با روش آماری Log-Rank test ارزیابی شد [۲۲، ۲٤].

۲-۸- بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی اختصاصی پاسخ ایمنی بعد از واکسیناسیون علیه تومور

به‌منظور بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی اختصاصی پاسخ ایمنی بعد از واکسیناسیون علیه تومور از کیت لاکتات دهیدروژناز (LDH cytotoxicity detection kit) (Roche Applied Scienc, Germany) استفاده شد. آنزیم لاکتات دهیدروژناز، یک آنزیم داخل سیتوپلاسمی است که در صورت آسیب دیدن غشای سلولی رها می‌شود. در مرحله اول لاکتات موجود در سوبسترا تحت اثر آنزیم لاکتات دهیدروژناز به پیرووات تبدیل شده و طی این روند $NADH,H^+$ حاصل موجب احیای ماده رنگی تترازولیوم (Tetrazolium) زرد رنگ به فورمازان (Formazan) آبی رنگ می‌شود. یک هفته بعد از آخرین واکسیناسیون موش‌های مبتلا به تومور، سلول‌های طحالی از موش‌ها در گروه‌های مختلف و موش‌های سالم تهیه شدند. سلول‌های طحالی به‌عنوان عامل (Efector) و سلول‌های توموری به‌عنوان سلول‌های هدف (Target) در نظر گرفته شدند. برای هر آزمون سلول‌های طحالی در غلظت‌های $1/25\times10^5$، $2/5\times10^5$ و 5×10^5 و سلول هدف در غلظت 10^4 در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کامل حاوی ۱ درصد آلبومین تهیه شدند. در ضمن برای حذف تولید خود به‌خودی آنزیم در نمونه سلول هدف و محاسبه تعداد سلول مناسب برای بهترین اثر عامل به هدف، تعداد و نسبت‌ها با آزمون‌های متفاوت

تنظیم و استانداردسازی شده تا اثر و مقدار واقعی سیتوتوکسیسیتی معلوم شود. برای انجام آزمون، سلول‌ها در پلیت ته گرد کشت و کلیه نمونه‌ها سه بار تکرار و برای مدت ٦ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. از تریتون X-100 (Triton X-100) به‌عنوان کنترل لیزکننده سلول و محاسبه حداکثر تولید آنزیم استفاده شد. بعد از سپری شدن زمان مذکور پلیت‌ها با دور g ۲۵۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوپ‌های رویی به پلیت‌های ته صاف منتقل شد و به کلیه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا اضافه و در دمای اتاق در تاریکی به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) با طول موج ٤۹۰ نانومتر و رفرانس ٦۰۰ قرائت شد. برای محاسبه درصد لیز سلول‌ها از فرمول زیر استفاده شد [۲۵].

– (مقدار LDH آزاد شده آزمون)] = درصد سیتوتوکسیسیتی

(مجموع مقدار LDH آزاد شده خودبه‌خودی به‌وسیله سلول‌های هدف و عامل)

– بیشترین مقدار LDH آزاد شده از سلول‌های هدف/

۱۰۰ × [(LDH آزاد شده خودبه‌خودی از سلول‌های هدف

۲-۹- آزمون‌های آماری

آنالیز نتایج حاصل با روش آماری آنالیز واریانس ANOVA و SPSS انجام شد و P-value کوچک‌تر یا مساوی ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

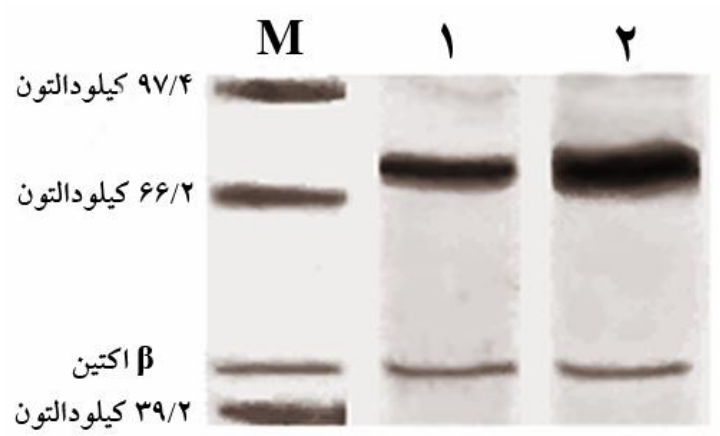
۳- نتایج

۳-۱- ارزیابی میزان HSP70

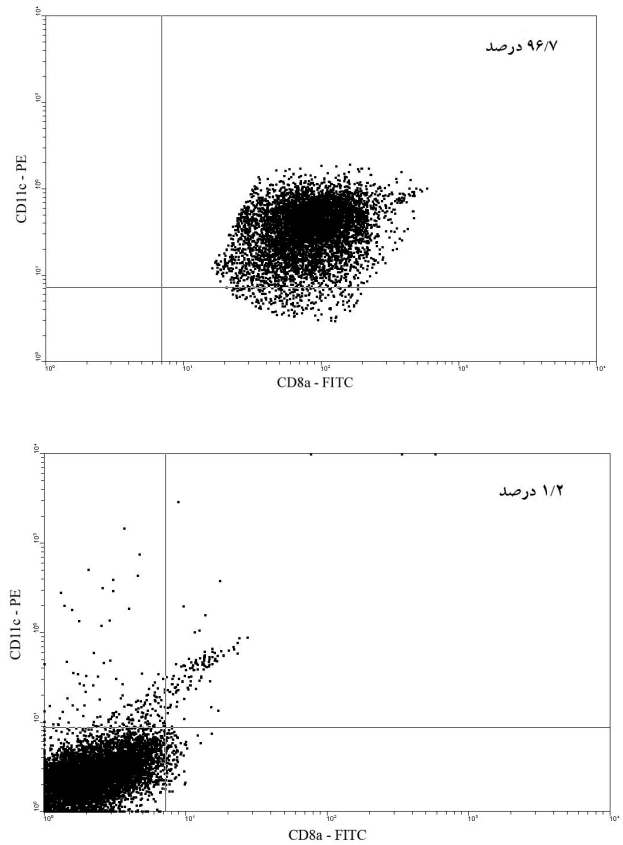
بعد از القای شوک حرارتی در سلول‌های توموری برای بررسی افزایش مقدار پروتئین‌های شوک حرارتی و به‌عنوان نمونه HSP70 از روش ایمونوبلات استفاده شد. نتایج، افزایش میزان HSP70 را در سلول‌هایی که به‌مدت یک ساعت شوک حرارتی دیده بودند در مقایسه با عصاره سلول‌هایی که حرارت ندیدند تأیید کرد (شکل ۱).

۳-۲- بررسی تخلیص DCs لنفوئیدی

بعد از جداسازی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های فلورسنت شامل anti–CD11c (PE-conjugated)، ایزوتیپ کنترل مربوطه و anti-CD8α (FITC-conjugated) رنگ‌آمیزی و با دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد. نتایج نشان دادند که این رده DC لنفوئیدی با خلوص بیش از ۹٦ درصد جداسازی شده‌اند (شکل۲).



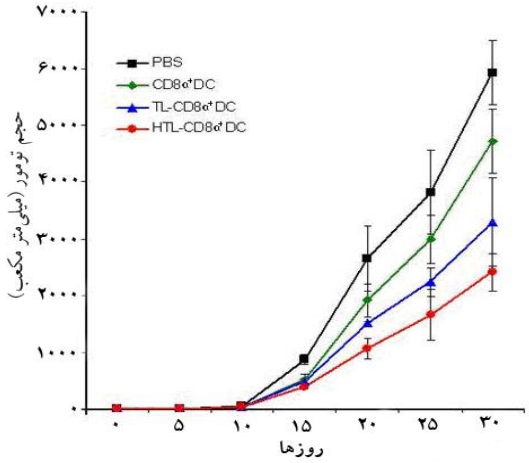
شکل ۱ نتایج حاصل از عصاره سلول توموری به روش ایمونوبلات؛ **ستون M)** نشانگرهای وزن ملکولی، **ستون ۱)** عصاره سلول توموری بدون شوک حرارتی، **ستون ۲)** عصاره سلول توموری که دچار شوک حرارتی شده است.



شکل ۲ فلوسیتومتری DC لنفوئیدی: DCs بعد از جداسازی با MACS با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال فلورسنت و ایزوتیپ کنترل رنگ‌آمیزی شدند. **الف)** نمودار فلوسیتومتری نمونه DCs لنفوئیدی با نشانگرهای مثبت از لحاظ $CD11c^{+}$ $CD8\alpha^{+}$ با درجه خلوص ۹۶ درصد، **ب)** نمودار فلوسیتومتری ایزوتیپ کنترل

۳-۳- نتایج اثر واکسن بر حجم تومور و طول عمر

نتایج نشان دادند که حجم تومور در گروهی از موش‌های مبتلا به فیبروسارکوما که DC لنفوئیدی تنها را دریافت نمودند ۵۷۱±۴۸۲۲ میلی‌متر مکعب (تقریباً ۱۷ درصد کاهش)، در گروه واکسن DC لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت ندیده ۷۴۸±۳۳۹۷ میلی‌متر مکعب (تقریباً ۴۲ درصد کاهش) شد و در گروهی که واکسن DC لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت دیده را دریافت نمودند حجم تومور ۳۳۳±۲۴۱۵ میلی‌متر مکعب (تقریباً ۵۸ درصد کاهش حجم تومور) در مقایسه با گروه کنترل منفی با حجم ۳۸۵±۵۸۶۰ میلی‌متر مکعب شد. این نتایج نشان دادند که حجم تومور بعد از دریافت واکسن در گروه‌های DC لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت ندیده و DC لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت دیده به‌طور معنی‌دار $P<0/05$ کاهش یافت (شکل ۳). همچنین نتایج نشان داد در گروهی از موش‌های مبتلا به تومور که واکسن DC لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت دیده را دریافت نمودند، طول عمر به بیش از ۸۵ روز افزایش یافت. طول عمر موش‌ها در گروهی که واکسن DC لنفوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت ندیده را دریافت کردند به ۶۵ روز افزایش و در گروه DC لنفوئیدی به ۴۰ روز افزایش در مقایسه با گروه کنترل منفی (گروهی که فقط PBS دریافت نمودند) با طول عمر ۳۰ روز رسید.

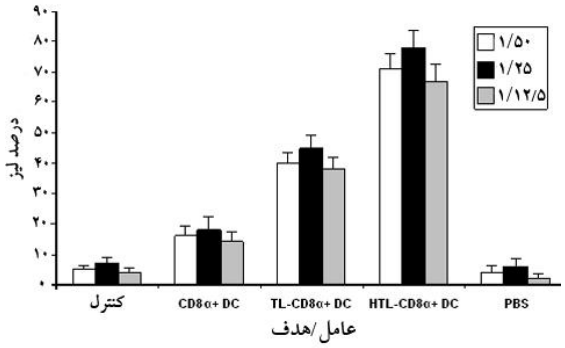


شکل ۳ نتایج اثر بر کاهش حجم تومور

چهار گروه (هر گروه حاوی پنج رأس موش) از لحاظ حجم تومور ارزیابی شدند. گروه کنترل منفی گروهی از موش‌های مبتلا به تومور که فقط PBS دریافت نمودند و گروه‌های دیگر به‌ترتیب $CD8\alpha^+$ DC تنها و $CD8\alpha^+$ DC بار شده با تومور عصاره سلول بدون شوک حرارتی و گروه آخر $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول شوک حرارتی دیده را دریافت نمودند. نتایج نشان داد که حجم تومور در گروهی که $CD8\alpha^+$ DC بار شده با تومور عصاره سلول بدون شوک حرارتی و گروهی که $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول شوک حرارتی دیده را دریافت کردند، به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافت.

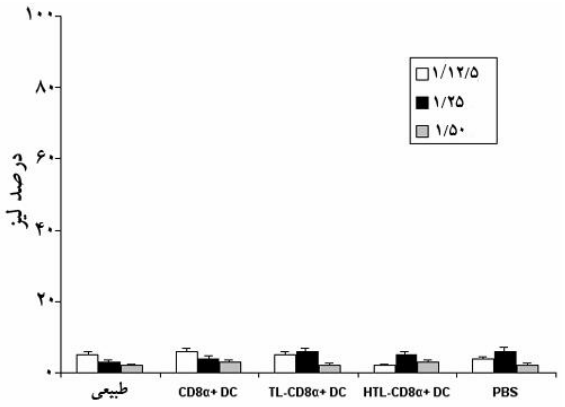
۳-٤- نتایج اثر سیتوتوکسیسیتی واکسن علیه تومور

نتایج کلی به‌دست آمده نشان دادند که واکسن مورد نظر در گروه $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول شوک حرارتی دیده نسبت به گروه‌های دیگر اثر سیتوتوکسیسیتی قابل ملاحظه‌ای داشت. در ضمن در تحقیق حاضر با انتخاب و بررسی اثر بر رده نامربوط نشان داده شد که این اثر ضد توموری اختصاصی بوده است. این نتایج در شکل‌های ٤ و ٥ نشان داده شده است.



شکل ٤ اثرسیتوتوکسیسیتی اختصاصی بر رده سلولی Wehi-164

نتایج نشان داد در گروه‌هایی از موش که $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری بدون شوک حرارتی و $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده را دریافت نمودند، اثر سیتوتوکسیسیتی اختصاصی معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را بر رده توموری فیبروسارکوما نشان دادند؛ همچنین با گروهی از موش‌های مبتلا به تومور که PBS دریافت نمودند به‌عنوان کنترل منفی و گروهی دیگر که موش‌های سالم فاقد تومور بودند، مقایسه شدند. این نتایج نشان دادند که مناسب‌ترین نسبت هدف به عامل ۱ به ۲۵ بود و گروهی از موش‌ها که واکسن $CD8\alpha^+$ DC بار شده با تومور عصاره سلول شوک حرارتی دیده را دریافت نمودند، بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی را داشتند.



شکل ٥ اثر بر رده سلولی CT26

در این نمودار اثر اختصاصی بودن سیتوتوکسیسیتی بر رده فیبروسارکوما با مقایسه اثر بر رده دیگر از کارسینومای کولون (CT26) در گروه‌های متفاوت واکسن DC و کنترل بررسی شدند و این نتایج نشان دادند که اثر بر این رده بسیار ناچیز بوده و اثر سیتوتوکسیسیتی بر رده فیبروسارکوما اختصاصی بوده است.

٤- بحث

DCs از مهم‌ترین APCها در به‌وجود آوردن پاسخ‌های مؤثر سیستم ایمنی هستند [٢٦]. کاربرد گسترده از این سلول‌ها در ایمنی‌درمانی سرطان با آنتی‌ژن‌های اختصاصی به دلیل ویژگی مهم آن‌ها در ایجاد پاسخ‌های اولیه سیستم ایمنی در مدل‌های آزمایشگاهی و در بدن است [٢٧، ٢٨]. در سال ١٩٩٨ برای اولین بار اثر ضد توموری، DCs بار شده با عصاره سلول تومور گزارش شد [٢٩]. تاکنون از DCs در درمان بیماری‌های بدخیم مثل تومورهای کلیه، کولون و لیمفوما (Lymphoma) استفاده شده است [٣٢-٣٠]. تحقیقات قبلی نشان دادند که استفاده از DCs بار شده با عصاره سلول تومور، هیچ تأثیری در به‌وجود آوردن بیماری‌های خودایمن ندارد [٣٣]. استفاده از عصاره سلول توموری که شامل آنتی‌ژن‌های تومور (Tumor-Associated Antigens: TAAs) است، یک مزیت مهم در به دام انداختن آنتی‌ژن‌های تومور توسط DCs، عرضه و شناساندن آن‌ها به سلول‌های ایمنی در ایجاد پاسخ‌های ضد توموری است. تحقیق حاضر در آزمایش وسترن بلات روی عصاره سلول تهیه شده از سلول‌های توموری دچار شوک حرارتی شده نشان داد که مولکول‌های HSPs به‌خصوص HSP70 در عصاره سلول توموری وجود داشته است. تحقیقات نشان داده‌اند که شکل‌گیری کمپلکس آنتی‌ژن‌های تومور و HSPs و اتصال آن از طریق گیرنده‌های HSPs از قبیل CD40، CD91 در سطح DCs سبب عرضه متقاطع همزمان (Cross presentation) از طریق مولکول‌های MHC-I و MHC-II شده و باعث به‌وجود آوردن پاسخ سلول‌های ایمنی سلولی و سیتوتوکسیک علیه تومور می‌شوند [٣٤، ٣٥]. DCs لنفوئیدی ($CD8\alpha^+$ DC) از عمده‌ترین و مهم‌ترین رده‌های DC هستند که سبب عرضه متقاطع و به‌وجود آوردن پاسخ‌های ایمنی سیتوتوکسیک به‌واسطه سلول‌های $TCD8^+$ می‌شوند. تحقیقات مختلفی نشان دادند که سلول‌های $CD8\alpha^+$ DC باعث به‌وجود آوردن پاسخ‌های ایمنی سلولی و سیتوتوکسیک در بیماری‌های عفونی می‌شوند [٣٦-٣٨]. در مطالعه حاضر، نشان داده شد که سلول‌های $CD8\alpha^+$ DC باعث القای پاسخ‌های سیتوتوکسیک در مدل توموری فیبروسارکوما می‌شود. نتایج نشان دادند که واکسیناسیون با $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<0/01$) سبب کاهش حجم تومور و افزایش طول عمر در موش‌های مبتلا به تومور می‌شود. علاوه بر این نتایج نشان دادند که واکسیناسیون با $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده، $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی ندیده به‌طور معنی‌داری ($P<0/001$) سبب افزایش پاسخ سیتوتوکسیک سلول‌های CTL (Cytotoxic T cell) بر علیه تومور فیبروسارکوما (Wehi-164) می‌شود. با استفاده از رده سلول توموری کارسینومای کولون (CT26) نشان داده شد که این اثر سیتوتوکسیک اختصاصی تومور فیبروسارکوما بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که آثار سیتوتوکسیک اختصاصی و مهار تومور در واکسیناسیون با $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده بسیار قوی‌تر از کاربرد واکسیناسیون با $CD8\alpha^+$ DC بار شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی ندیده است. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که استفاده همزمان رده لنفوئیدی $CD8\alpha^+$ DC، HSPs و عصاره سلول توموری با هم می‌تواند سبب تقویت اثر همدیگر در به‌وجود آوردن پاسخ ایمنی قوی‌تر در مهار تومور باشد و استفاده از عصاره سلول شوک حرارتی دیده به همراه رده $CD8\alpha^+$ DC (به‌عنوان یک ناقل فعال برای عرضه آنتی‌ژن‌های ایمونوژنی) می‌تواند یک راه‌کار مناسب برای ایمنی‌درمانی تومور شود. مطالعات بیشتر در شناسایی مکانیسم و دیگر سلول‌های ایمنی درگیر در این نوع پاسخ‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

۵- تشکر و قدردانی

از همکاری دانشگاه علوم پزشکی شیراز در حمایت مـالی تحقیق حاضر با شماره ٤١٤٤ و دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌گردد.

٦- منابع

[1] Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. J Immunol 1997; 158(7): 3270–6.

[2] Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. J Immunol 1997; 158(6): 2723–30.

[3] Porgador A, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. J Exp Med 1995; 182(1): 255–60.

[4] Kao JY, Zhang M, Chen CM, Chen JJ. SSuperior efficacy of dendritic cell-tumor fusion vaccine compared with tumor lysate-pulsed dendritic cell vaccine in colon cancer. Immunol Lett 2005; 101(2): 154–9.

[5] Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, Suzuki Y, Wakita D, Takeshima T, Nishimura T. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. Cancer Sci 2004; 95(9): 697-703.

[6] Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kaliński P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. J Immunol 2000; 164(9): 4507-12.

[7] MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. J Immunol 2001; 167(4): 1982-8.

[8] Maldonado-López R, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. J Immunol 2001; 167(8): 4345-50.

[9] Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. J Immunol 2000; 165(12): 6762–70.

[10] Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. J Immunol 2000; 164(6): 2978–86.

[11] Manickasingham SP, Edwards AD, Schulz O, Reis e Sousa C. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. Eur J Immunol 2003; 33(1): 101–7.

[12] Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(3): 1036–41.

[13] Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. In vivo microbial stimulation induces rapid

cells: Chaperoning of the innate and adaptive immune reponses. Annu Rev Immunol 2002; 20: 395–425.

[21] Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. Cancer Res 2001; 61(17): 6445–50.

[22] Hashemi SM, Hassan ZM, Soudi S, Ghazanfari T, Kheirandish M, Shahabi S. Evaluation of anti-tumor effects of tumor cell lysate enriched by HSP-70 against fibrosarcoma tumor in Balb/c mice. Int Immunopharmacol 2007; 7(7): 920-7.

[23] Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. Cancer Res 2001; 61(17): 6445–50.

[24] Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. Blood 2003; 101(11): 4485–91.

[25] Khamisabadi M, Arab S, Motamedi M, Khansari N, Moazzeni SM, Gheflati Z, Hadjati J. Listeria Monocytogenes Activated Dendritic Cell Based Vaccine for Pre-vention of Experimental Tumor in Mice. Iran J Immunol 2008; 5(1): 36-44.

[26] Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. Cancer Immunol Immunother 2004; 53(3): 240-8.

CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. J Exp Med 1997; 186(11): 1819–29.

[14] Ohteki T, Fukao T, Suzue K, Maki C, Ito M, Nakamura M, Koyasu S. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. J Exp Med 1999; 189(12): 1981–6.

[15] Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. Cancer Res 2004; 64(14): 4973–9.

[16] Chang AE, Redman BG, Whitfield JR, Nickoloff BJ, Braun TM, Lee PP, Geiger JD, Mule JJ. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. Clin Cancer Res 2002; 8(4): 1021–32.

[17] Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. Tissue Antigens 2004; 64(4):442–51.

[18] Graner MW, Zeng Y, Feng H, Katsanis E. Tumor-derived chaperonerich cell lysates are effective therapeutic vaccines against a variety of cancers. Cancer Immunol Immunother 2003; 52(4): 226-34.

[19] Kim HS, Choo YS, Koo T, Bang S, Oh TY, Wen J, Song SY. Enhancement of antitumor immunity of dendritic cells pulsed with heat-treated tumor lysate in murine pancreatic cancer. Immunol Lett 2006; 103(2): 142–8.

[20] Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting

[27] Chagnon F, Tanguay S, Ozdal OL, Guan M, Ozen ZZ, Ripeau JS, Chevrette M, Elhilali MM, Thompson-Snipes LA. Potentiation of a dendritic cell vaccine for murine renal cell carcinoma by CpG oligonucleotides. Clin Cancer Res 2005; 11(3): 1302-11.

[28] Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT, Aquino A, Prete SP, Tsang KY, Micheli L, Nencini C, La Placa M, Montagnani F, Terrosi C, Caraglia M, Formica V, Giorgi G, Bonmassar E, Francini G. Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro. J Immunol 2005; 175(2): 820-8.

[29] Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(16): 9482-7.

[30] Höltl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. Clin Cancer Res 2002; 8(11): 3369-76.

[31] Maier T, Tun-Kyi A, Tassis A, Jungius KP, Burg G, Dummer R, Nestle FO. Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. Blood 2003; 102(7): 2338-44.

[32] Rains N, Cannan RJ, Chen W, Stubbs RS. Development of a dendritic cell (DC)-based vaccine for patients with advanced colorectal cancer. Hepatogastroenterology 2001; 48(38): 347-51.

[33] Reinhard G, Marten A, Kiske SM, Feil F, Bieber T, Schmidt-Wolf IG. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy. Br J Cancer 2002; 86(10): 1529-33.

[34] Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70 and calreticulin. Immunity 2001; 14(3): 303–13.

[35] Becker T, Hartl FU, Wieland F. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. J Cell Biol 2002; 158(7): 1277–85.

[36] De Smedt T, Butz E, Smith J, Maldonado-Lopez R, Pajak B, Moser M, Maliszewski C. CD8alpha(-) and CD8alpha(+) subclasses of dendritic cells undergo phenotypic and functional maturation in vitro and in vivo. J Leukoc Biol 2001; 69(6): 951-8.

[37] Maroof A, Kaye PM. Temporal Regulation of Interleukin-12p70 (IL-12p70) and IL-12-Related Cytokines in Splenic Dendritic Cell Subsets during Leishmania donovani Infection. Infect Immun 2008; 76(1): 239–49.

[38] Bilenki L, Wang S, Yang J, Fan Y, Jiao L, Joyee AG, Han X, Yang X. Adoptive transfer of CD8alpha+ dendritic cells (DC) isolated from mice infected with Chlamydia muridarum are more potent in inducing protective immunity than CD8alpha- DC. J Immunol 2006; 177(10): 7067-75.