

## سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی باز شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده: بررسی اثر سیتو توکسیک در موش‌های مبتلا به سرطان

عباس آزادمهر<sup>۱</sup>، علی‌اکبر پورفتح‌الله<sup>۲\*</sup>، زهرا امیرغفران<sup>۳</sup>، سیدمحمد مؤذنی<sup>۳</sup>، زهیر محمد حسن<sup>۳</sup>، عقیل تبار ملاحسن<sup>۴</sup>

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: ۸۸/۰۵/۰۷  
پذیرش مقاله: ۸۸/۰۲/۰۲

### 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 باز شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده در مدل تومور فیروسارکوما ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های Balb/C. ده روز قبل از ایمن‌سازی با سلول‌های دندریتیک با تزریق رده سلولی Wehi-164 به صورت زیر پوستی مبتلا به تومور فیروسارکوما 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 باز شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده، حرارت ندیده و بدون عصاره سلول توموری به صورت زیر پوستی تزریق شد و حجم تومور، طول عمر و آثار سیتو توکسیک بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که واکسن سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی باز شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده، سبب کاهش معنی دار حجم تومور و افزایش طول عمر در موش‌های ایمن شده، شد. اینمنی درمانی با سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی باز شده با عصاره سلول‌های توموری شوک حرارتی دیده، منجر به افزایش معنی دار فعالیت سلول‌های T سیتو توکسیک در بافت توموری شد.

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

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

### ۱- مقدمه

امروزه سرطان به عنوان یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر انسان‌ها در جهان است، اینمنی درمانی (Immunotherapy) ایمنی در صورت فعل شدن قادر به ایجاد پاسخ اختصاصی

\*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۱۱

Email: Pourfa@modares.ac.ir

سیتوکسیک از DCs لغنوئیدی ( $CD80\alpha^+$ ) برای پاسخ علیه تومور قابل انتظار است. استفاده از آنتیژن‌های توموری سبب القای پاسخ ایمنی سلول T علیه تومور می‌شود [۱۵، ۱۶]. از طرفی دیگر پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat Shock Proteins: HSPs) در حالت افزایش دما در سلول‌ها به مقدار زیاد بیان می‌شوند و می‌توانند به عنوان چاپرون (Chaperone) به آنتیژن‌های تومور متصل شده و سبب گرفتار شدن آنتیژن‌های توموری CD40 متصل شده به خود از طریق گیرنده‌هایی از قبیل CD91 و CD40 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 لغنوئیدی ( $CD80\alpha^+$ ) و عصاره سلول تومور شوک حرارتی دیده در مدل تومور فیروسارکوما (Fibrosarcoma) برای القای پاسخ ضد توموری سیستم ایمنی استفاده شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۱- کشت و تکثیر رده سلولی فیروسارکومای

#### موسی (Wehi-164)

رده سلولی فیروسارکومای موسی (Wehi-164) از انسیتیو پاستور تهران خریداری شد. سلول‌ها در محیط ۱۶۴۰ RPMI (Fetal Bovine Serum) FBS (Gibco, USA) (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

ضد تومور شده و بر بافت‌های طبیعی بی‌اثر است. از آنجایی که پاسخ ایمنی سلولی در کترول تومور اهمیت زیادی دارد، بنابراین یکی از راهکارهای مهم و با ارزش در این درمانی سرطان، استفاده از سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells: DCs) به عنوان ادجوان (Adjuvant) و تقویت‌کننده پاسخ ایمنی سلولی ضد تومور است. DCs از سلول‌های مهم پردازش و عرضه‌کننده آنتیژن بوده، سبب پاسخ و تکثیر سلول‌های سیتوکسیک و لمفوسيت‌های کمکی T با عرضه آنتیژن از طریق مولکول‌های (Major Histocompatibility Complex class I) MHC-I و MHC-II می‌شود [۱-۴]. 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 [۶-۸]. براساس بیان نشانگرهای DCs CD8α, CD4 (Markers) طحال موش به سه رده  $CD4^-CD8\alpha^+$ ,  $CD4^-CD8\alpha^-$ ,  $CD4^+CD8\alpha^+$  تقسیم می‌شود [۹، ۱۰]. بر این اساس مشخص شده است که DCs لغنوئیدی ( $CD80\alpha^+$ ) سبب ایجاد پاسخ ایمنی سلولی و بر عکس DCs میلوبئیدی ( $CD8\alpha^-$ ) سبب ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود [۸، ۱۱]. در مدل آزمایشگاهی (In vitro) نشان داده شده که سلول‌های اصلی تولیدکننده سیتوکین ایترلوکین ۱۲ (Interleukin 12: IL-12) DCs لغنوئیدی ( $CD80\alpha^+$ ) هستند [۱۲]. تحقیقات در مدل در بدن (In vivo) هم ثابت نمودند که سلول‌های اصلی تولیدکننده سیتوکین ۱۲ (IL-12) در طحال، در موش‌هایی که با عصاره توکسoplasmagondii (Toxoplasma gondii) یا لیپو پلی‌ساقارید مواجهه شدند، DCs لغنوئیدی ( $CD80\alpha^+$ ) هستند [۱۳]. تولید سیتوکین ایترفرنون گاما (IFN-γ) (Interferon gamma) هم از این رده DC مشاهده شد [۱۴]. بنابراین ایجاد و القای پاسخ ایمنی سلولی و

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

به طور کلی سه جمعیت اصلی DC در طحال موش وجود دارند که DC لنفوئیدی یکی از آن‌هاست، این رده از DC نشانگر  $CD8\alpha^+$  است که دو گروه دیگر قادر این نشانگر هستند. به منظور جداسازی و تخلیص، کیت جداسازی Mouse CD8 $\alpha^+$  Dendritic Cell (CD8 $\alpha^+$ ) DC لنفوئیدی (Isolation Kit Cat No:130-091-169 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 کلاژنаз D (Boehringer Mannheim, Germany) (Collagenase D) 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 Separator MidiMACS از سوسپانسیون سلولی حذف شده که نتیجه این مرحله، DCs تخلیص شده با نشانگر  $CD11c^+$  بود. در مرحله دوم (انتخاب مثبت: Positive selection DCs)، DCs لنفوئیدی ( $CD11c^+ CD8\alpha^+$ ) با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی CD8 $\alpha$ ، ستون CD8 $\alpha$  و MiniMACS Separator MS با استفاده از DCs از R&D System HSP70 (۱/۱۰۰) ضد  $CD11c^+$  در سلول‌های شوك

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

## ۲-۵- ایجاد شوک حرارتی و تهیه عصاره سلول‌های توموری

به منظور 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 به مدت 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 سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه غشای سلول‌ها را رسوب داده و مایع رویی (عصاره سلولی) با فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد [۲۳].

## ۳-۱- ارزیابی HSP70 با روش ایمونوبلات (Immunoblot)

برای نشان دادن باند مربوط به HSPs در عصاره سلول تومور حرارت دیده از الکتروفوروز SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) و برای تأیید آن از وسترن بلاط (Western blot) استفاده شد. میزان پروتئین عصاره سلول تومور حرارت دیده با روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری شد. پس از لود (Load) نمودن مقادیر یکسانی از عصاره سلول تومور در گروه‌های مختلف، الکتروفوروز انجام و پس از انتقال به غشای Polyvinylidene Fluoride (PVDF) با استفاده از آنتی‌بادی HSP70 (R&D System ۱/۱۰۰) در سلول‌های شوك ضد حرارتی دیده، بررسی شد [۲۲].

تنهای،  $CD8\alpha^+$  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  $3 \times 10^5$  سلول در  $100$  میکرولیتر PBS به صورت زیر پوستی تزریق شد. هر پنج روز یکبار مقدار حجم سلولی با کولیس (Colis) اندازه‌گیری و با فرمول طول $\times$ (ارتفاع) $\times$  $\pi/6$  بر حسب میلی‌متر مکعب محاسبه شد. هر روز (تا یک دوره زمانی هشتاد روزه) در هر گروه مرگ و میر موش‌ها مشاهده و ثبت شد و طول عمر با روش آماری Log-Rank test ارزیابی شد [۲۴].

## ۸-۲- بررسی اثر سیتوکسیسیتی اختصاصی

### پاسخ ایمنی بعد از واکسیناسیون علیه تومور

به منظور بررسی اثر سیتوکسیسیتی اختصاصی پاسخ ایمنی بعد از واکسیناسیون علیه تومور از کیت لاكتات دهیدروژناز (LDH cytotoxicity detection kit) استفاده شد. آنژیم لاكتات (Roche Applied Scienc, Germany) دهیدروژناز، یک آنژیم داخل سیتوپلاسمی است که در صورت آسیب دیدن غشای سلولی رها می‌شود. در مرحله اول لاكتات موجود در سوبسترا تحت اثر آنژیم لاكتات دهیدروژناز به پیرووات تبدیل شده و طی این روند  $NADH, H^+$  حاصل موجب احیای ماده رنگی ترازولیوم (Tetrazolium) (زرد رنگ به فورمازان 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 به عنوان عامل (Effector) و سلول‌های توموری به عنوان سلول‌های هدف (Target) در نظر گرفته شدند. برای هر آزمون سلول‌های طحالی در غلاظت‌های  $1/25 \times 10^5$ ،  $2/5 \times 10^5$  و  $5 \times 10^5$  و سلول‌های هدف در غلاظت‌های  $10^4$  در  $100$  میکرولیتر محیط کامل حاوی ۱ درصد آلبومین تهیه شدند. در ضمن برای حذف تولید خود به خودی آنژیم در نمونه سلول هدف و محاسبه تعداد سلول مناسب برای بهترین اثر عامل به هدف، تعداد و نسبت‌ها با آزمون‌های متفاوت

## ۲-۵- بررسی تخلیص DCs لنفوئیدی با روش فلوسیتومتری

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

## ۶-۲- 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 به عصاره سلول توموری به مدت یک کشت شبانه در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $5$  درصد مجاور شدن. غلظت مناسب عصاره سلول تومور  $100$  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.

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

ده روز بعد از تزریق سلول‌های Wehi-164 به صورت زیر جلدی در قسمت پهلوی راست موش، تومور ایجاد شد. در چهار گروه مختلف از موش‌های مبتلا به تومور (هر گروه حاوی  $5$  رأس موش) به ترتیب PBS به گروه کنترل منفی،  $CD8\alpha^+$  DC

ANOVA و SPSS انجام شد و P-value کوچکتر یا مساوی ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

### ۳- نتایج

#### ۱-۳- ارزیابی میزان HSP70

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

#### ۲-۳- بررسی تخلیص DCs لنفوئیدی

بعد از جداسازی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های فلورسنت شامل anti-CD11c (PE-conjugated)، ایزوتوپیک کترل مربوطه و anti-CD8α (FITC-conjugated) فلوسیتومتری خوانده شد. نتایج نشان دادند که این رده DC لنفوئیدی با خلوص بیش از ۹۶ درصد جداسازی شده‌اند (شکل ۲).

تنظیم و استانداردسازی شده تاثر و مقدار واقعی سیتو توکسیستی معلوم شود. برای انجام آزمون، سلول‌ها در پلیت ته گرد کشته و کلیه نمونه‌ها سه بار تکرار و برای مدت ۶ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. از تریتون X-100 (Triton X-100) به عنوان کترول لیزکننده سلول و محاسبه حداکثر تولید آنزیم استفاده شد. بعد از سپری شدن زمان مذکور پلیت‌ها با دور ۲۵۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۱ میکرولیتر از سوب‌های رویی به پلیت‌های ته صاف متقل شد و به کلیه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سویسترا اضافه و در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و سپس جذب نوری با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) با طول موج ۴۹۰ نانومتر و رفانس ۶۰۰ قرائت شد. برای محاسبه درصد لیز سلول‌ها از فرمول زیر استفاده شد [۲۵].

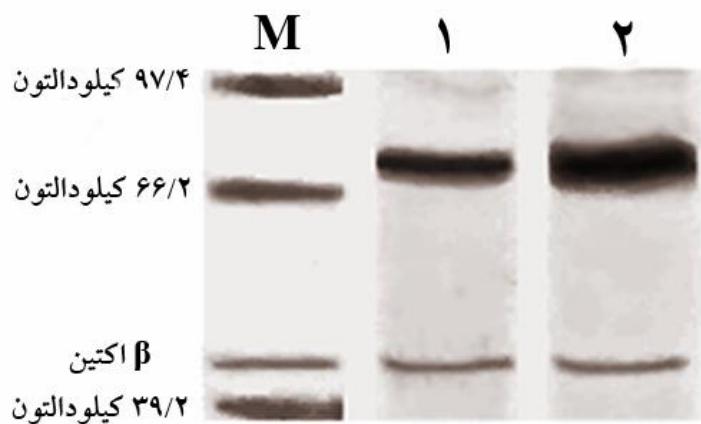
- (مقدار LDH آزاد شده آزمون) = درصد سیتو توکسیستی

(مجموع مقدار LDH آزاد شده خودبه‌خودی بهوسیله سلول‌های هلف و عامل بیشترین مقدار LDH آزاد شده از سلول‌های هلف /

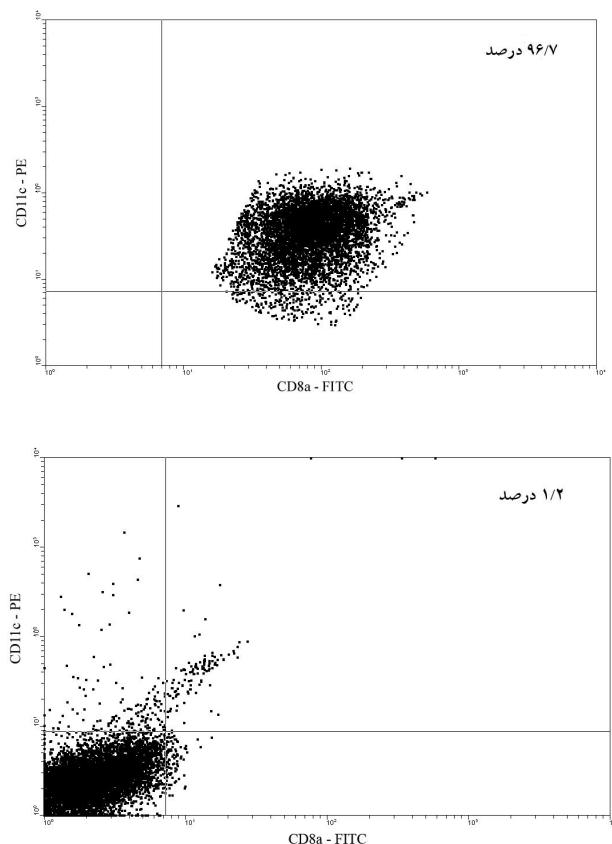
× ۱۰۰ [LDH آزاد شده خودبه‌خودی از سلول‌های هلف]

#### ۹-۲- آزمون‌های آماری

آنالیز نتایج حاصل با روش آماری آنالیز واریانس



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

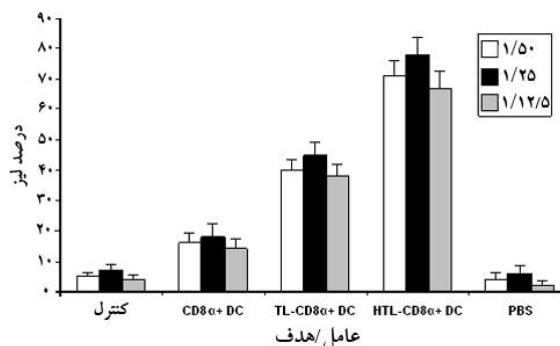


شکل ۲ فلوسیتومتری DC لغوئیدی: MACS با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال فلورسنت و ایزوپت کنترل رنگ‌آمیزی شدند. الف) نمودار فلوسیتومتری نمونه DCs لغوئیدی با نشانگرهای مثبت از لحاظ  $CD11c^+ CD8a^+$  با درجه خلوص ۹۶ درصد، ب) نمودار فلوسیتومتری ایزوپت کنترل

دربافت واکسن در گروه‌های DC لغوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت ندیده و DC لغوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت دیده به طور معنی‌دار  $P < 0.05$  کاهش یافت (شکل ۳). همچنین نتایج نشان داد در گروهی از موش‌های مبتلا به تومور که واکسن DC لغوئیدی 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 لغوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت ندیده را دریافت کردند به ۶۵ روز افزایش و در گروه DC لغوئیدی به ۴۰ روز افزایش در مقایسه با گروه کنترل منفی (گروهی که فقط PBS دریافت نمودند) با طول عمر ۳۰ روز رسید.

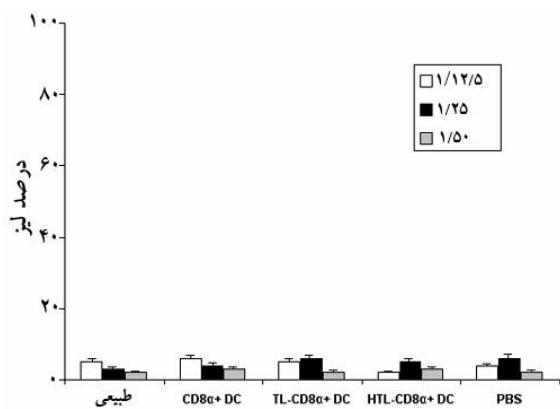
### ۳-۳- نتایج اثر واکسن بر حجم تومور و طول عمر

نتایج نشان دادند که حجم تومور در گروهی از موش‌های مبتلا به فیبروسارکوما که DC لغوئیدی تنها را دریافت نمودند  $4822 \pm 571$  میلی‌متر مکعب (تقریباً ۱۷ درصد کاهش)، در گروه واکسن DC لغوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت ندیده  $3397 \pm 748$  میلی‌متر مکعب (تقریباً ۴۲ درصد کاهش) شد و در گروهی که واکسن DC لغوئیدی بار شده با عصاره سلول توموری حرارت دیده را دریافت نمودند حجم تومور  $2415 \pm 333$  میلی‌متر مکعب (تقریباً ۵۸ درصد کاهش حجم تومور) در مقایسه با گروه کنترل منفی با حجم  $5860 \pm 385$  میلی‌متر مکعب شد. این نتایج نشان دادند که حجم تومور بعد از

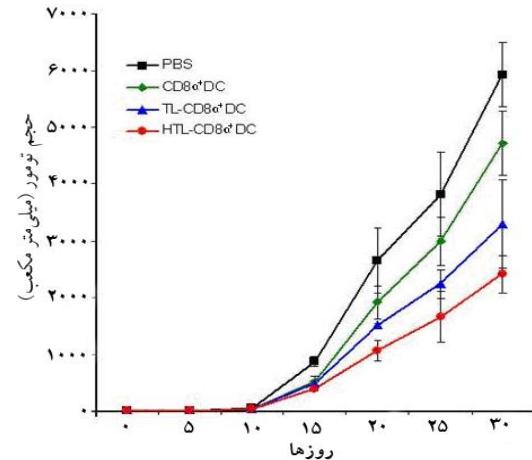


شکل ۴ اثر سیتو توکسیسیتی اختصاصی بر رده سلولی Wehi-164

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 سیتو توکسیسیتی اختصاصی معنی داری (P<0.05) را بر رده توموری فیروسارکوما نشان دادند؛ همچنین با گروهی از موش های مبتلا به تومور که PBS دریافت نمودند به عنوان کنترل متفاوت و گروهی دیگر که موش های سالم فاقد تومور بودند، مقایسه شدند. این نتایج نشان دادند که مناسب ترین نسبت هدف به عامل ۱ به ۲۵ بود و گروهی از موش ها که واکسن CD8 $\alpha^+$  DC بار شده با عصاره سلول شوک حرارتی دیده را دریافت نمودند، بیشترین اثر سیتو توکسیسیتی را داشتند.



شکل ۵ اثر بر رده سلولی CT26



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 موش های مبتلا به تومور که فقط PBS دریافت نمودند و گروههای دیگر به ترتیب CD8 $\alpha^+$  DC تنها و گروه آخر شده با 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، به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافت.

#### ۳-۴- نتایج اثر سیتو توکسیسیتی واکسن علیه تومور

نتایج کلی به دست 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 سیتو توکسیسیتی قابل ملاحظه ای 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 شکل های ۴ و ۵ نشان داده شده است.

می‌شوند [۳۵، ۳۶]. DCs لغنوئیدی (CD8 $\alpha^+$  DC) از عمده‌ترین و مهم‌ترین رده‌های DC هستند که سبب عرضه متقاطع و به وجود آوردن پاسخ‌های ایمنی سیتو توکسیک به‌واسطه سلول‌های TCD8 $\alpha^+$  می‌شوند. تحقیقات مختلفی نشان دادند که سلول‌های سیتو توکسیک در بیماری‌های عفونی می‌شوند [۳۷-۳۸]. در مطالعه حاضر، نشان داده شد که سلول‌های CD8 $\alpha^+$  DC باعث القای پاسخ‌های سیتو توکسیک در مدل توموری فیبروسارکوما می‌شود. نتایج نشان دادند که واکسیناسیون با CD8 $\alpha^+$  DC باز شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری ( $P < 0.01$ ) 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 باز شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده، CD8 $\alpha^+$  DC باز شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی ندیده به‌طور معنی داری CTL ( $P < 0.001$ ) سبب افزایش پاسخ سیتو توکسیک سلول‌های (Wehi-164) (Cytotoxic T cell) بر علیه تومور فیبروسارکوما می‌شود. با استفاده از رده سلول توموری کارسینومای کولون (CT26) نشان داده شد که این اثر سیتو توکسیک اختصاصی تومور فیبروسارکوما بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که آثار سیتو توکسیک اختصاصی و مهار تومور در واکسیناسیون با CD8 $\alpha^+$  DC باز شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی دیده بسیار قوی‌تر از کاربرد واکسیناسیون با CD8 $\alpha^+$  DC باز شده با عصاره سلول توموری شوک حرارتی ندیده است. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که استفاده همزمان رده لغنوئیدی HSPs و عصاره سلول توموری با هم می‌تواند سبب تقویت اثر هم‌دیگر در به وجود آوردن پاسخ ایمنی قوی‌تر در مهار تومور باشد و استفاده از عصاره سلول شوک حرارتی دیده به همراه رده CD8 $\alpha^+$  DC (به عنوان یک ناقل فعال برای عرضه آنتی‌ژن‌های ایمونوژنی) می‌تواند یک راهکار مناسب برای ایمنی درمانی تومور شود. مطالعات بیشتر در شناسایی مکانیسم و دیگر سلول‌های ایمنی درگیر در این نوع پاسخ‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در این نمودار اثر اختصاصی بودن سیتو توکسیسیتی 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 سیتو توکسیسیتی بر رده فیبروسارکوما اختصاصی بوده است.

#### ۴- بحث

DCs از مهم‌ترین APC‌ها در به وجود آوردن پاسخ‌های مؤثر سیستم ایمنی هستند [۲۶]. کاربرد گسترده از این سلول‌ها در ایمنی درمانی سرطان با آنتی‌ژن‌های اختصاصی به دلیل ویژگی مهم آن‌ها در ایجاد پاسخ‌های اولیه سیستم ایمنی در مدل‌های آزمایشگاهی و در بدن است [۲۷، ۲۸]. در سال ۱۹۹۸ برای اولین بار اثر ضد توموری، DCs باز شده با عصاره سلول تومور گزارش شد [۲۹]. تاکنون از DCs در درمان بیماری‌های بدخیم مثل تومورهای کلیه، کولون و لیمفوما (Lymphoma) استفاده شده است [۳۰-۳۲]. تحقیقات قبلی نشان دادند که استفاده از DCs باز شده با عصاره سلول تومور، هیچ تأثیری در به وجود آوردن بیماری‌های خودایمن ندارد [۳۳]. استفاده از عصاره سلول توموری که شامل آنتی‌ژن‌های تومور (Tumor-Associated Antigens: TAAs) 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 توموری شده از سلول‌های توموری دچار شوک حرارتی شده نشان داد که مولکول‌های HSPs به خصوص 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 به وجود آوردن پاسخ سلول‌های ایمنی سلولی و سیتو توکسیک علیه تومور

تحقیق حاضر با شماره ۴۱۴۴ و دانشگاه تربیت مدرس تشکر و  
قدردانی می‌گردد.

۵- تشکر و قدردانی  
از همکاری دانشگاه علوم پزشکی شیراز در حمایت مالی

## ۶- 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. Superior 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'Keefe 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

- 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<sup>+</sup> 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 chaperone-rich 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 cells: Chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *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 Prevention 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.

- [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.