ارزیابی قدرت سلول‌های دندریتیک مشتق‌شده از مونوسیت بیماران لوسمی مزمن در برداشت Tumor cell lysate با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری

پرویز کوخایی[1،5]*(M.Sc)، رضا مهدیان[1،2](M.D)، فاطمه پاک[3](M.Sc)، شیرین شهبازی[4](M.Sc)، بیژن صدیقی‌مقدم[5](M.Sc)

۱ - *انستیتو کارولینسکا، CCK، آزمایشگاه ایمنی و ژن‌درمانی، استکهلم، سوئد*

۲ - *انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی، تهران، ایران*

۳ - *بیمارستان کارولینسکا، CCK، بخش ایمونوپاتولوژی، استکهلم، سوئد*

۴ - *دانشکده بهداشت دانشگاه تهران، دپارتمان ژنتیک، تهران، ایران*

۵- *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، بخش ایمونولوژی، سمنان، ایران*

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های دندریتیک، کارآمدترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به سیستم ایمنی می‌باشند. آنها قویاً در شروع پاسخ اولیه ایمنی، بیماری‌های اتوایمیون، رد پیوند، عفونت با ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV) و پاسخ ایمنی ضدتومور نقش دارند. سلول‌های دندریتیک در شکل نابالغ خود مولکول‌های آنتی‌ژن را به طور فعال برداشت می‌کنند. اگر چه توانایی سلول‌های دندریتیک پالس شده با Tumor lysate در فعال‌سازی سلول‌های T اختصاصی تومور در بیماران لوسمی لنفوسیتیک مزمن (CLL) گزارش شده است اما تاکنون برداشت آنتی‌ژن‌های محلول موجود در Tumor lysate توسط سلول‌های دندریتیک به طور مستقیم نمایش داده نشده است. این مطالعه بر آن است تا با به‌کارگیری تکنیک فلوسیتومتری، برداشت مولکول‌های آنتی‌ژن را بررسی نماید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سلول‌های دندریتیک بیماران لوسمی لنفوسیتیک مزمن و افراد نرمال اهداءکننده خون بررسی شده‌اند. مونوسیت‌های خون محیطی با استفاده از ذرات مغناطیسی پوشیده شده با mAb anti-CD_{14} و عبور آنها از ستون‌های miniMACS در میدان مغناطیسی جدا شده و در حضور سیتوکین‌های GM-CSF و IL-4 به مدت پنج روز کشت داده شد تا سلول‌های دندریتیک نابالغ، تولید گردد. پروتئین‌های محلول Tumor lysate با FITC، نشان‌دار شدند و سپس میزان برداشت این پروتئین‌ها توسط سلول‌های دندریتیک با استفاده از سیستم فلوسیتومتری FACS تعیین گردید.

یافته‌ها: میزان فلورسانس سلول‌های دندریتیک پالس شده با Tumor lysate نشان‌دار؛ حتی بعد از خاموش نمودن فلورسانس سطحی آنها به طور قابل ملاحظه‌ای از سلول‌های دندریتیک پالس نشده بیشتر بود. این موضوع چه در مورد سلول‌های دندریتیک بیماران CLL و چه افراد نرمال مورد بررسی صادق بود.

نتیجه‌گیری: سلول‌های دندریتیک نابالغ مشتق شده از منوسیت‌ها قادرند مولکول‌های آنتی‌ژن محلول موجود در Tumor lysate تهیه شده از لنفوسیت‌های توموری بیماران CLL را برداشت کنند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های دندریتیک، Tumor Cell Lysate، فلوسیتومتری، Tumor Associated Antigens، lysate.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۶-۸-۵۱۷۷۶۸۸۹+، نمابر: ۰۴۶-۸-۳۱۸۳۲۷+

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

مقدمه

سلول‌های دندریتیک، کارآمدترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به سیستم ایمنی می‌باشد. آنها قویاً در شروع پاسخ اولیهٔ ایمنی، بیماری‌های اتوایمیون، رد پیوند، پاسخ ضدتومور، عفونت با ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV) و تولید آنتی‌بادی وابسته به سلول T نقش دارند[۱۸].

از سوی دیگر، اغلب تومورها به عنوان آنتی‌ژن عمل می‌کنند و در اکثر موارد آنتی ژن‌های توموری (TAAs) آنتی‌ژن‌های تمایز بافتی هستند که در ژن کدکنندهٔ آنها موتاسیون رخ نداده است، اگر چه میزان ابراز آنها نامتناسب می‌باشد. [۶،۱۰،۱۹]

هدف اصلی در روش‌های واکسیناسیون علیه تومور، القاء یک پاسخ ایمنی اختصاصی و پایدار بر علیه آنتی‌ژن‌های تومور (TAAs) می‌باشد که منجر به حذف تومور گردد.

در بیماران مبتلا به کانسر، عدم پاسخ ایمنی کارآمد بر علیه تومور براساس یکی از فرضیه‌های تحمل ایمونولوژیک، نادیده گرفتن تومور توسط سیستم ایمنی و همچنین فاکتورهای مرتبط با تومور، قابل توضیح می‌باشد. هر یک از سه علت فوق که مورد نظر باشد، اشکال اساسی در عرضه آنتی‌ژن خواهد بود و با در نظر گرفتن توانایی فوق‌العادهٔ سلول‌های دندریتیک در برداشت آنتی‌ژن از محیط و ارائهٔ آن به سلول‌های T و نقش منحصر به فرد آنها در القاء پاسخ ایمنی اولیه، می‌توان سلول‌های دندریتیک را به عنوان عاملی کارآمد در ایمونوتراپی تومور، به کار گرفت [۱۸،۲۰].

سلول‌های دندریتیک در شکل نابالغ خود، مولکول‌های آنتی‌ژن را از طریق یکی از مکانیزم‌های پینوسیتوز (مولکول‌های پروتئین)، ماکروپینوسیتوز، اندوسیتوز وابسته به رسپتور و فاگوسیتوز، برداشت می‌کنند [۱۰،۱۸] و بعلاوه، با استفاده از تکنیک‌های بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، تاکنون روش‌های مختلفی برای انتقال آنتی‌ژن‌های تومور به سلول‌های دندریتیک، به کار گرفته شده است.

استفاده از پپتیدهای دارای سکانس مشخص [۵،۱۵،۱۳]، به کارگیری وکتورهای رتروویرال، آدنوویرال حامل ژن کدکنندهٔ TAA و تهیه Tumor lysate از سلول‌های توموری و برداشت مولکول‌های پروتئین موجود در آن توسط سلول‌های دندریتیک [۱۷]، نمونه‌هایی از این روش‌ها می‌باشند. بعلاوه روش‌های مبتنی بر تخلیص RNA از سلول‌های تومور و انتقال آن به درون سلول‌های دندریتیک نیز در حال بررسی است. [۲،۳،۶،۱۴].

در این بین، توانایی سلول‌های دندریتیک پالس شده با Tumor lysate در فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک اختصاصی تومور، در بیماران لوسمی لنفوسیتیک مزمن نشان داده شده است [۷]، اما برخلاف موارد مبتنی بر استفاده از سلول‌های آپوپتوتیک به عنوان منبع آنتی‌ژن که در آنها برداشت آنتی‌ژن، توسط سلول‌های دندریتیک با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسانس نشان‌دار شده است [۴،۱۱]، برداشت آنتی‌ژن‌های محلول در Tumor lysate به طور مستقیم به اثبات نرسیده است. لذا این مطالعه اجرا شد تا، با به‌کارگیری تکنیک فلوسیتومتری، برداشت مولکول‌های آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک نمایش داده شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب بیمار. اجازه کمیته اخلاق تحقیق بیمارستان کارولینسکا برای انتخاب و نمونه‌گیری از خون بیماران مبتلا به Chronic lymphocytic leukemia (CLL)، کسب گردید. بیماران در هنگام نمونه‌گیری، مبتلا به نوع غیرپیشرونده بیماری بودند. مطالعه، شامل ۲ بیمار و ۲ اهداءکنندهٔ خون سالم بوده است.

جداسازی سلول‌های خون. خون محیطی بیماران در لوله‌های هپارینه و استریل، جمع‌آوری شد. Buffy coat اهداءکنندگان سالم خون، از مرکز بانک خون بیمارستان کارولینسکا تهیه گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی Peripheral blood mononuclear cell (PBMC)، با استفاده از سانتریفوژ

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

روی فایکول[Ficoll-Paqued/Amersham-Phamacia] در 2000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه جدا شدند[۱۶].

تولید سلول‌های دندریتیک از مونوسیت‌های خون محیطی. سلول‌های CD_{14}^+ با استفاده از ذرات مغناطیسی پوشیده شده با (Mouse Anti CD_{14}) و عبور آنها از ستون Mini MACS [Mini MACS beads/Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany] جدا شدند.

بدین منظور PBMC به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده و با ذرات مغناطیسی، انکوبه و سپس از ستون مربوطه عبور داده شد. سلول‌های CD_{14}^+ (مونوسیت‌ها) به تعداد 1,000,000/ml در محیط RPMI حاوی پنی‌سیلین [100 IU/ml] و استرپتومایسین [100 µg/ml] که سیتوکین‌های rh 1,000 U/ml ,IL-4 500 U/ml GM-CSF (Schering-Plaugh Research Institute, Kenilworth, Ng/USA) (Lucomay) به آن افزوده شده بود کشت داده شدند. در روز سوم، محیط کشت تعویض شد و سلول‌های دندریتیک نابالغ در روز پنجم برای مطالعه استفاده شدند[۲۱].

ایمونوفنوتیپینگ. سلول‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های فلورسانس CD_3 FITC/ CD_{14} FITC/ CD_{1a} PE/CD_{83} FITC/CD_{56} PE/CD_{80} PE CD_{86} FITC/HLA-DR FITC/CD_{19} PE رنگ‌آمیزی شدند. آنتی‌بادی‌های کنترل منفی با ایزوتیپ مشابه شامل IgG-FITC, IgG-PE مورد استفاده قرار گرفت. مراحل آماده‌سازی سلول‌ها جهت بررسی فلوسیتومتریک به طور خلاصه به این شرح می‌باشد. در هر مورد پس از سانتریفیوژ سلول‌ها در لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری، آنتی‌بادی مربوطه اضافه شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. جهت زدودن اتصال‌های غیراختصاصی آنتی‌بادی، سلول‌ها با بافر شسته و مجدداً در 0.5 ml بافر حل گردید؛ سپس توسط دستگاه فلوسیتومتری، [Becton. Dickinson/CA, USA] و نرم‌افزار Cell quest میزان فلورسنس سلول‌ها بررسی شد [۱۶].

جداسازی سلول‌های تومور (B cells). سلول‌های تک‌هسته‌ای خون دوبار در PBS شسته و سپس بر روی ستون‌های Nylon wool - که با استفاده از RPMI 1640 حاوی سرم AB^+ (5%) به مدت ۵۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت اشباع، انکوبه شده بود - قرار گرفت. ستون‌ها مجدداً در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه گردید؛ سپس با RPMI گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) به میزان چهار برابر حجم ستون، شستشو انجام شد. سلول‌های متصل به Nylon wool به عنوان جمعیت B cells در نظر گرفته و جهت تعیین خلوص آنها از مارکرهای CD_5 و CD_{19} در آنالیز فلوسیتومتری استفاده شد. این سلول‌ها در مراحل بعد به عنوان منبع سلول توموری جهت تهیهٔ Tumor lysate به کار گرفته شدند.

تهیه Tumor cell lysate. سلول‌های B بیماران مبتلا به CLL با استفاده از چهار دور انجماد (بر روی یخ خشک) و ذوب در (۳۷ درجه سانتی‌گراد) به طور متوالی، لیز شدند و سپس سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (300g/10min). مایع رویی برداشته شد و غلظت پروتئین موجود در آن با استفاده از کیت اندازه‌گیری پروتئین (Bio Rad, CA, USA) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، تعیین گردید. این Lysate پس از انجام مراحل نشان‌دار شدن با FITC (Flurescein isothiocyanate) با غلظت نهایی (120 mg/ml) به محیط کشت حاوی سلول‌های دندریتیک نابالغ ۵ روز افزوده شد [۸].

نشان‌دار کردن پروتئین‌های Tumor lysate به وسیله FITC. این مرحله با استفاده از خاصیت اتصال کوالانس FITC به اسیدآمینه لیزین موجود در ساختمان پروتئین‌ها، انجام شد [۹]. به طور خلاصه، بعد از تهیه lysate از سلول‌های توموری (B cell) محلول پروتئین به‌دست آمده، به نسبت یک به یک با محلول FITC (10 µg/ml) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شد تا اتصال مولکولی FITC به پروتئین

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

انجام شود.

جهت حذف مولکول‌های FITC متصل نشده به پروتئین‌ها، این محلول پروتئین در مقابل بافر حاوی، Na_2CO_3 $NaHCO_3$ به مدت ۲۴ ساعت دیالیز [Sigma/Dialysis bag/Cut off 12000] شد. در پایان، غلظت پروتئین با استفاده از کیت اندازه‌گیری غلظت پروتئین (Bio Rad CA, USA) در طول موج 595nm اندازه‌گیری شد.

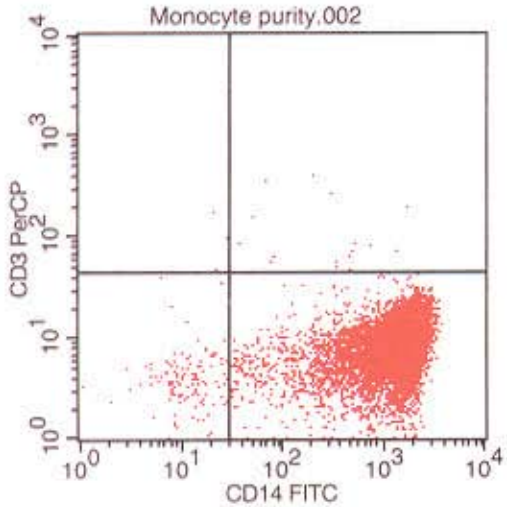
برداشت lysate نشان‌دار شده با FITC توسط سلول‌های دندریتیک. lysate نشان‌دار شده با FITC با غلظت نهایی 120 $\mu g/ml$ به مدت ۴ ساعت در مجاورت سلول‌های دندریتیک نابالغ (۵ روز) انکوبه شد (۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 5%). سلول‌های دندریتیک، دو بار شسته شدند و میزان فلورسانس آنها توسط دستگاه [Fluorescent acivated cell sortes] FACS بررسی و نتایج حاصل، بررسی شد. از محلول تریپان‌بلو [0.5 $\mu g/ml$ in Tris Hanks buffer] به‌عنوان خاموش‌کننده (Quencher) فلورسانس سطحی سلول‌هااستفاده شد. جهت کنترل موارد فوق، عیناً در مورد بافر دیالیز نیز تکرار گردید.

نتایج

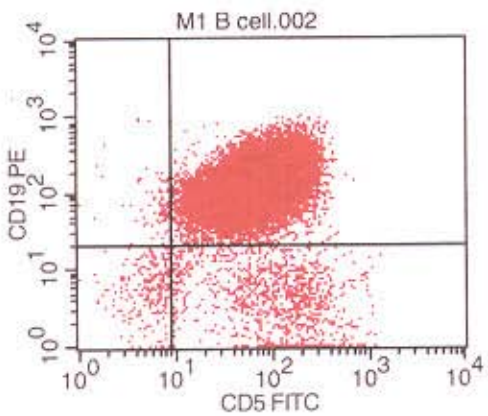
خلوص منوسیت‌ها. خلوص منوسیت‌ها برای نمونه‌های نرمال N_1 و N_2، ۹۸٪ بود، در بیماران M_1 و M_2 خلوص منوسیت‌ها به ترتیب، ۹۰٪ و ۹۸٪ بود.

در نمونه‌های بیمار و نرمال، خلوص منوسیت‌های جدا شده توسط ذرات مغناطیسی (Magnetic beads) با استفاده از anti CD_{14} کنژوگه شده و با FITC، اندازه‌گیری شدند و شکل ۱ نمایانگر درصد خلوص منوسیت‌های جدا شده می‌باشد.

خلوص سلول‌های تومور (B cell). پس از جداسازی سلول‌های B از PBMC بیماران، خلوص آنها با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسانس دوگانه توسط Anti-CD_{19}-PE و Anti CD_5 FITC تعیین گردید.(شکل ۲)



شکل ۱. درصد خلوص منوسیت‌ها



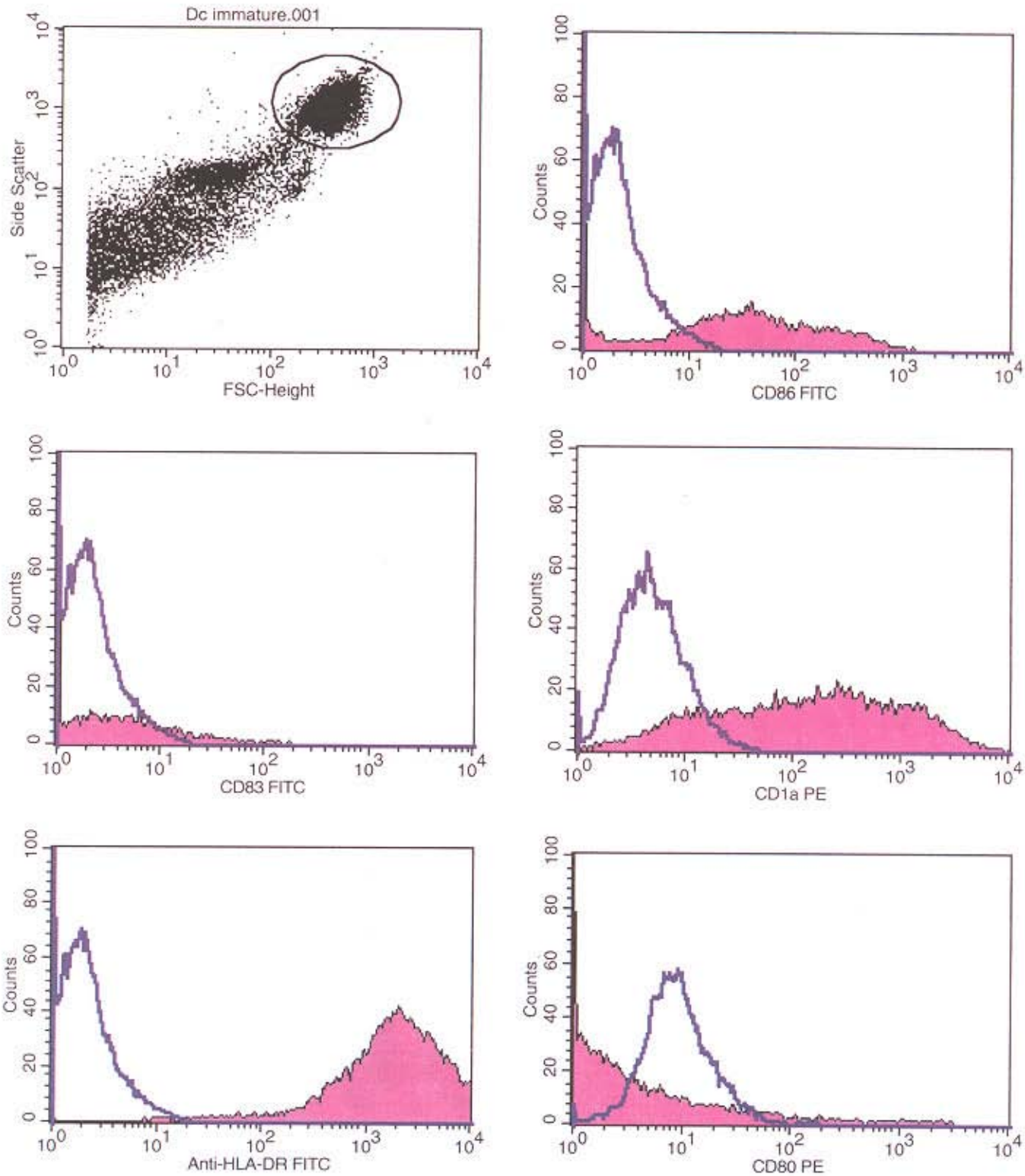
شکل ۲. درصد خلوص سلول‌های B تومورال در بیماران، بعد از تخلیص

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های سطحی دندریتیک نابالغ. پس از ۵ روز کشت مونوسیت‌ها در حضور سیتوکینین‌های IL-4, GM-CSF سلول‌های دندریتیک نابالغ از نظر بیان مارکرهای سطحی حائز اهمیت برای این سلول‌ها، مورد مطالعه قرار گرفتند. مارکرهای مورد مطالعه شامل HLA-DR, CD_{1a}, CD_{83}, CD_{80}, CD_{86} می‌باشند. جدول ۱ نشان دهنده میانگین مقادیر درصد سلول‌های مثبت برای هر مارکر می‌باشد.

جدول ۱. درصد سلول‌های دندریتیک مثبت برای هر مارکر مربوطه

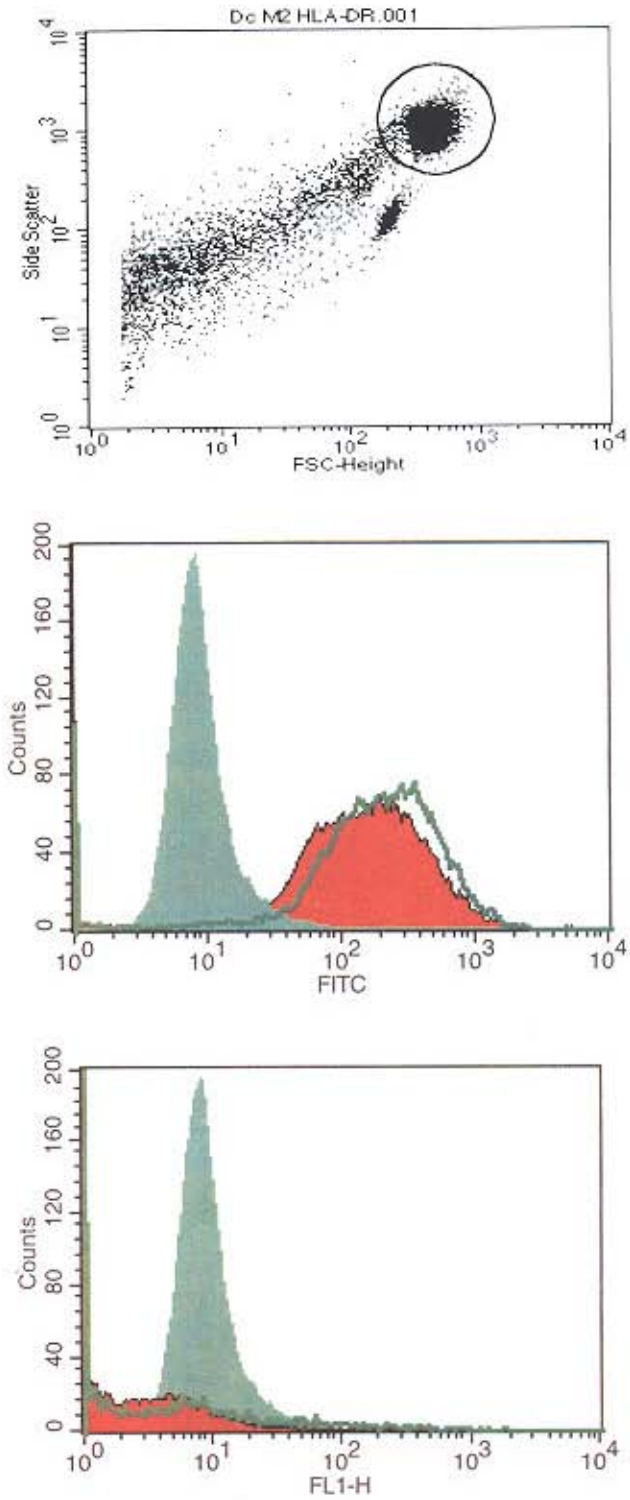
Marker	CD_{83}	CD_{80}	CD_{86}	CD_{1a}	HLA-DR
Percentage	4%	35%	75%	76%	99%

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



شکل ۳. مارکرهای سطحی سلول‌های دندریتیک نابالغ در بیماران *CLL* که با استفاده از فلوسیتومتری، تعیین گردیده است. منوسیت‌های خون محیطی در شرایط ذکر شده در متن (مواد و روش‌ها) به مدت ۵ روز کشت داده شدند سپس سلول‌های دندریتیک نابالغ حاصله با آنتی‌بادی‌های نشان‌دار، رنگ‌آمیزی و درصد سلول‌های مثبت برای هر مارکر تعیین شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



شکل ۴. *A: Forward scatter* و *Side scatter* سلول‌های دندریتیک را نشان می‌دهد. *B:* برداشت *Tumor lysate* نشان‌دار شده با فلورسنت را توسط سلول‌های دندریتیک نابالغ (هیستوگرام قرمز). سلول‌های دندریتیک نابالغ ۵ روزه با *Tumor Lysate* نشان‌دار شده با *FITC* به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. شدت فلورسنت سلول دندریتیک نابالغ پالس شده به طور مشخصی در مقایسه با کنترل پالس نشده (هیستوگرام سبز روشن) افزایش می‌یابد. هیستوگرام باز شدت فلورسنت سلول‌های دندریتیک را قبل از دریافت *Trypan blue* (به عنوان *Surface fluoresence quencher*) نمایش می‌دهد. *C:* میزان فلورسنت بافر حاوی *FITC* می‌باشد که جهت کنترل، آورده شده است.

بررسی میزان برداشت Tumor Lysate نشان‌دار توسط سلول‌های دندریتیک نابالغ.

سلول‌های دندریتیک ۵ روزه با Tumor Lysate کونژوگه شده با FITC پالس شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در شرایط کشت سلولی، سلول‌ها شسته شد و سپس توسط آنتی‌بادی فلورسانس اختصاصی، مارکرهای HLA-DR, CD_{1a} رنگ‌آمیزی شد. در این بررسی، سلول‌هایی که هر دو مارکر اختصاصی سلول‌های دندریتیک را دارا بودند مثبت تلقی شدند (جدول ۲).

جدول ۲. میانگین شدت فلورسانس *FITC* اندازه‌گیری شده با آنالیز *FACS*

	N1	N2	M1	M2
DC*	2	10	3	6
DC+Buffer	32	12	9	2
DC+Buffer+T.B.**	10	8	13	2
DC+Lysate-FITC	363	324	88	151
DC+Lysate-FITC+T.B.	87	139	79	104

*D.C = Dendritic cell

** T.B. = Trypan blue

بحث

اگر چه در سال‌های اخیر مطالعات بی‌شماری در جهت استفاده از سلول‌های دندریتیک به عنوان ادجوانت سلولی در ایمونوتراپی کانسر به انجام رسیده است و قریب به اتفاق این مطالعات، امیدوار کننده بوده‌اند، هنوز بسیاری نکات در رابطه با منشاء، نحوه عملکرد، شرایط بهینه کشت و نیز بهترین زیر جمعیت سلول‌های دندریتیک، جهت استفاده در ایمونوتراپی، مبهم باقی مانده است.

در این میان مهمترین مرحله، برداشت آنتی‌ژن از محیط و ارائه آن به سیستم ایمنی توسط سلول‌های دندریتیک می‌باشد. این که سلول‌های دندریتیک،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

خصوصاً در فرم نابالغ خود، مولکول‌های آنتی‌ژن تومور (TAAs) را از محیط پیرامون خود برداشت کرده و آنها را پس از پردازش، به سلول‌های T اختصاصی عرضه می‌دارند، تقریباً پذیرفته شده است. اما به همان میزان که مطالعات در زمینه بررسی القاء پاسخ ایمنی در مدل‌های حیوانی و مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های انسانی فراوان است، نمایش مستقیم مرحله برداشت آنتی‌ژن و اثبات این‌که آیا اساساً سلول‌های دندریتیک، مولکول‌های آنتی‌ژن را به همان روش‌های فرض شده، برداشت کرده‌اند یا نه، اندک می‌باشند.

برخی از محققان، در این راستا برداشت سلول‌های توموری آپوپتوتیک توسط سلول‌های دندریتیک نابالغ را به زیبایی نشان داده‌اند [۴،۱۱]؛ اما اثبات برداشت مولکول‌های پروتئینی موجود در Tumor cell lysate، تنها در یک مطالعه و بر روی مدل حیوانی انجام شده است [۱]. که در آنجا Lysate با استفاده از رنگ PKH-2 که یک رنگ Lipophilic [۱۲] می‌باشد رنگ‌آمیزی شده است که این رنگ برای نشان‌دار کردن پروتئین‌ها مناسب به نظر نمی‌رسد و عموماً رنگ‌پذیری غشاء سلولی و لیپوپروتئین‌های موجود در آن را باعث می‌گردد. ما در این مطالعه به منظور نمایش برداشت پروتئین‌های موجود در Tumor cell lysate، از تکنیک نشان‌دار کردن پروتئین با FITC که اختصاصاً به اسیدآمینه لیزین موجود در پروتئین به صورت کوالانس متصل می‌شود، استفاده نمودیم.

اگر چه مراحل کونژوگه کردن FITC با پروتئین و دیالیز متعاقب آن جهت حذف مولکول‌های FITC آزاد، تا زمان تعادل Buffer دیالیز و محلول Lysate-FITC ادامه داده شد، اما به منظور تعیین میزان ناچیز FITC آزاد که به هر حال در محلول Lysate-FITC باقی مانده بود، بافر خارجی کیسه دیالیز که از نظر میزان FITC آزاد دقیقاً غلظتی برابر FITC آزاد در محلول Lysate-FITC دارد را به عنوان کنترل در شرایط مشابه با سلول‌های دندریتیک، انکوبه و میزان فلورسانس سلول‌ها پس از این مرحله ارزیابی شد. این مقدار فلورسانس هر چند بسیار ناچیز، اما در مطالعه لحاظ شد.

از طرف دیگر، از آنجا که این امکان وجود داشت که مولکول‌های FITC آزاد و یا مولکول‌های پروتئین نشان‌دار شده با FITC به طور غیراختصاصی، باعث رنگ‌پذیری غشاء سلول‌های دندریتیک شوند و این باعث فلورسانس تشدیدیافته سلول‌ها گردد، از محلول بافری Trypan blue که باعث خاموش شدن فلورسانس سطحی سلول‌ها می‌گردد، جهت شستشوی سلول‌های دندریتیک، پیش از انجام فلوسیتومتری، استفاده شد.

ما نشان داده‌ایم که، چه سلول‌های دندریتیک مشتق شده از مونوسیت‌های بیماران CLL و چه آنهایی که از مونوسیت‌های افراد سالم تهیه شده‌اند، توانایی برداشت Tumor lysate را دارند و این یافته، مؤید یافتهٔ قبلی [۷،۱۶] می‌باشد که عملکرد سلول‌های دندریتیک مشتق شده از مونوسیت‌های بیماران مبتلا به CLL، طبیعی می‌باشد و از این لحاظ، تفاوت زیادی ندارد ولی برای مقایسه آماری معنی‌دار، بین افراد نرمال و بیمار تعداد نمونه بیشتری توصیه می‌گردد.

امکان استفاده همزمان از رنگ‌های فلورسانس دیگر غیر از FITC جهت رنگ‌آمیزی سلول‌های دندریتیک و بررسی همزمان سلول‌ها از نظر ابراز مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها، این امکان را فراهم می‌آورد که میزان برداشت آنتی‌ژن، توسط جمعیت خاصی از سلول‌های دندرتیک که دارای مارکر مشخصی باشد، تعیین گردد. این نکته می‌تواند در تعیین کارآمدترین جمعیت سلول‌های دندریتیک در برداشت آنتی‌ژن از محیط، راه‌گشا باشد.

منابع

[1] Asavaroengchai, W., Kotera, Y. and Mule, J.J., Tumor lysate-pulsed dendritic cells can

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (2002) 931-936.

[2] Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. and Palucka, K., Immunobiology of dendritic cells, Annu. Rev. Immunol., 18 (2000) 767-811.

[3] Bell, D., Young, J.W. and Banchereau, J., Dendritic cells, Adv. Immunol., 72 (1999) 255-324.

[4] Berard, F., Blanco, P., Davoust, J., Neidhart-Berard, E.M., Nouri-Shirazi., M. Taquet, N., Rimoldi, D., Cerottini, J.C., Banchereau, J. and Palucka, A.K., Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogenic melanoma cells, J. Exp. Med., 192 (2000) 1535-1544.

[5] Celluzzi, C.M., Mayordomo, J.I., Storkus, W.J., Lotze, M.T. and Falo, L.D Jr., Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity, J. Exp. Med., 183 (1996) 283-287.

[6] Gilboa, E.,' The makings of a tumor rejection antigen, Immunity, 11 (1999) 263-270.

[7] Goddard, R.V., Prentice, A.G., Copplestone, J.A. and Kaminski, E.R., Generation in-vitro of B-cell chronic lymphocytic leukaemia-proliferative and specific HLA class-II-restricted cytotoxic T-cell responses using autologous dendritic cells pulsed with tumour cell lysate, Clin. Exp. Immunol., 126 (2001) 16-28.

[8] Herr, W., Ranieri, E., Olson, W., Zarour, H., Gesualdo, L. and Storkus, W.J., Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in-vitro vaccine designed to elicit EBV-specific $CD_4(+)$ and $CD_8(+)$ T lymphocyte responses, Blood, 96 (2000) 1857-1864.

[9] Jhon, E., Coligan, Ada, M. and David H., Current Protocols in Immunology, 3th Wiley & Son (2000) 251-256.

[10] Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Fay, J. and Palucka, K., Dendritic cell based tumor vaccines, Immunol. Lett., 74 (2000) 5-10.

[11] Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Bell, D., Burkeholder, S., Kraus, E.T., Davoust, J. and Palucka, K.A., Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses, J. Immunol., 165 (2000) 3797-2803.

[12] Maines, J.Z., Sunnarborg, A., Rogers, L.M., Mandavilli, A., Spielmann, R. and Boyd, F.T., Positive selection of growth-inhibitory genes, Cell Growth Differ., 6 (1995) 665-671.

[13] Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., Deleo, A.B. and et al., Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

immunity, Nat. Med., 1 (1995) 1297-1302.

[14] Palucka, K., Fay, J. and Banchereau, J., Dendritic cells and tumor immunity, Curr. Opin. Oncol. Endocr. Metab. Investig. Drugs., 1 (1999) 282-290.

[15] Porgador, A. and Gilboa, E., Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes, J. Exp. Med., 182 (1995) 255-260.

[16] Rezvany, M.R., Jeddi-Tehrani, M., Biberfeld, P., Soderlund, J., Mellstedt, H., Osterborg, A. and Rabbani, H., Dendritic cells in patients with non-progressive B-chronic lymphocytic leukaemia have a normal functional capability but abnormal cytokine pattern, Br. J. Haematol., 115 (2001) 263-271.

[17] Santin, A.D., Bellone, S., Ravaggi, A., Roman, J.J., Pecorelli, S., Parham, G.P. and Cannon, M.J., Induction of tumour-specific $CD_8(+)$ cytotoxic T lymphocytes by tumour lysate-pulsed autologous dendritic cells in patients with uterine serous papillary cancer, Br. J. Cancer., 86 (2002) 151-157.

[18] Sewell, A.K. and Price, D.A., Dendritic cells and transmission of HIV-1, Trends. Immunol., 22 (2001) 173-175.

[19] Sogn, J.A., Tumor immunology: the glass is half full, Immunity, 9 (1998) 757-763.

[20] Steinman, R.M. and Dhodapkar, M., Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future, Int. J. Cancer, 94 (2001) 459-473.

[21] Zhou, L.J. and Tedder, T.F., $CD_{14}+$ blood monocytes can differentiate into functionally mature $CD_{83}+$ dendritic cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93 (1996) 2588-2592.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

Flowcytometric assessment of monocyte-derived dendritic cell efficiency for tumor cell lysate uptake in chronic lymphocytic leukemia patients

P.Kokhaei[*1,5](M.Sc), R. Mahdian[1,2](M.D), F. Pak[3](M.Sc), Sh. Shahbazi[4](M.Sc), B. Sadighi Moghadam[5](M.Sc)

1 - Immunology & Gene Therapy Lab, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

2 - Cell Bank Dept, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3 - Dept. of Immunopathology, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden

4 - Dept. of Genetic, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5 - Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan,Iran

Introduction: Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen presenting cells in the immune system. They are strongly involved in initiation of primary immune response, autoimmune disease, graft rejection, HIV infection and antitumor response. However, the capability of DCs to activate tumor specific T cells in chronic lymphocytic leukemia (CLL) has been reported, direct demonstration of soluble antigens of tumor lysate uptake had not been shown. In this study we have shown uptake of antigen molecules by immature DCs using Flow cytometric techniques.

Material and Methods: DCs of two CLL patients and two healthy donors have been evaluated in this study. Peripheral blood monocytes have been purified using mouse anti-CD14 coated magnetic beads and then undergone culture process in the presence of rhGM-CSF and rhIL-4. Generated DCs have been assessed for their ability of uptake FITC-labeled proteins of tumoural B cells lysate by flow cytometry.

Results: Fluorescence intensity in DCs pulsed with FITC-labeled tumor lysate, after using surface fluorescence quencher (trypan blue), were clearly more than unpulsed controls. This was true for both CLL patients DCs and healthy donors DCs.

Conclusion: Immature DCs are capable to uptake soluble protein molecules of tumor lysate prepared from B cells of CLL patients.

Keywords: Flowcytometry; Dendritic cell; Chronic Lymphocytic Leukemia; Lysate ; Tumor cell lysate

* Corresponding author. E.mail: parviz_kokhaei@cck.ki.se; Fax: +46 8 318327; Tel: +46 8 51776889

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]