Original Article

Comparison of Different Methods for Dendritic Cell Generation from Mouse Bone Marrow

N. Aghdami, M.D.[1], S.M. Moazzeni, Ph.D.[1,*], F. Gharibdoost, M.D.[2], M. Mahdavi, M.Sc.[1]

1. Immunology Departmrnt, Tarbiat Modarres University
2. Rheumatology Research Center, Tehran University of Medical Sciences

*Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Immunology Department, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Email: moazzeni@modares.ac.ir

Abstract

Received: 7/Jun,2007, Accepted: 16/Aug/2007

Objective: Dendritic cells (DCs) are the most effective antigen-presenting cells with many applications. However, DCs can be generated in vitro by various methods from bone marrow cells, each with varying pros and cons. Thus, we evaluated three different methods to generate DCs from mice bone marrow cells.

Materials and Methods: BM cells from C57BL/6 mice were cultured in the presence of 1000 U/ml of GM-CSF either with or without 500 U/ml of IL-4 for 6 days as first and second method respectively. In the third method, BM cells were cultured in bacterial plates in the presence of 200 U/ml GM-CSF for 10 days. For further maturation, the cultures were extended for two more days using 50ng/ml TNF-α. The purity of the obtained DCs, their subtypes and maturation states were determined using flow cytometric analysis and the capacity to induce the allogenic T cell proliferation was determined using [^{3}H]-thymidine incorporation.

Results: The purity of generated DCs ($CD11c^+$) in both methods of GM-CSF plus IL-4 and culturing in bacterial plates was more than that of GM-CSF method. Culturing in bacterial plates resulted in the generation of higher number of DCs. However, DCs were resistant to maturation induction by maturation factors. Expression of maturation markers (CD86 and MHC class II) on DCs was up-regulated in the presence of IL-4 compared to the other two methods and the cells acted more efficiently in the induction of allogenic T cells proliferation. All the three methods resulted in the successful generation of myeloid ($CD11b^+$) DCs.

Conclusion: A combination of GM-CSF and IL-4 results in the generation of more pure, more mature, and functionally more effective DCs.

Keywords: Dendritic Cell, Mouse Bone Marrow, Dendritic Cells Generation Methods

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages: 81-90

مقایسه روش‌های مختلف تولید سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان موش

ناصر اقدمی .M.D[1]، سیدمحمد مؤذنی .Ph.D[1,*]، فرهاد غریب‌دوست .M.D[2]، مهدی مهدوی .M.Sc[1]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات روماتولوژی
* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: Moazzeni@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۳/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۲۵

* **هدف:** ارزیابی کارایی سه روش متفاوت تولید سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مغز استخوان موش
* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های مغز استخوان از موش C57BL/6 استخراج و در فلاسک کشت در حضور GM-CSF(U/ml1000) با IL-4(U/ml500) و بدون IL-4 به مدت ۶ روز کشت داده شدند. کشت سلول‌های مغز استخوان در پلیت کشت میکروبی به صورت سلول‌های شناور و در حضور مقدار کم GM-CSF(U/ml200) و به مدت ۱۰ روز به عنوان سومین روش کشت مورد بررسی قرار گرفت. در هر سه روش مذکور سلول‌ها به منظور بالغ شدن به مدت دو روز دیگر در حضور TNF-α (۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شدند. میزان خلوص سلول‌های دندریتیک به دست آمده، زیر گروه سلول‌ها و میزان بلوغ آنها با استفاده از فلوسایتومتری و توان سلول‌ها در القای پاسخ تکثیری در لنفوسیت‌های T آلوژن با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب تایمیدین رادیو اکتیو سنجیده شد.
* **یافته‌ها:** میزان خلوص سلول‌های دندریتیک به دست آمده ($CD11c^+$) در حضور GM-CSF و IL-4 و در روش کشت سلول‌ها در پلیت کشت میکروبی نسبت به روش GM-CSF به تنهایی به صورت معنی‌دار بیشتر بود (به ترتیب ۶±۷۲ و ۳±۶۹ درصد در مقابل ۴±۶۰). در ضمن در روش پلیت کشت میکروبی تعداد زیادتری سلول دندریتیک از هر موش قابل تولید بود، اما این سلول‌ها در برابر فاکتورهای بلوغ اضافه شده به محیط کشت مقاومت می‌کردند. میزان بیان شاخص‌های بلوغ سلول‌های دندریتیک (MHC class II و CD86) نیز در حضور GM-CSF و IL-4 بیشتر از دو روش دیگر بود و این سلول‌ها در القای پاسخ‌های تکثیری در لنفوسیت‌های T آلوژن نیز قوی تر از دو گروه دیگر عمل می‌کردند. در ضمن همه روش‌های به کار گرفته شده در این تحقیق منجر به تولید سلول‌های دندریتیک میلوئید ($CD11b^+$) شدند.
* **نتیجه‌گیری:** به طور کلی استفاده همزمان از GM-CSF و IL-4 باعث تولید سلول‌های دندریتیک خالص‌تر، بالغ تر و از نظر عملکردی کاراتر نسبت به دو روش دیگر می‌شود. هر چند روش کشت سلول‌های مغز استخوان به صورت سلول‌های شناور و در پلیت کشت میکروبی می‌تواند تعداد بیشتری سلول دندریتیک تولید کند که درپاره‌ای مطالعات نظیر استفاده از سلول‌های دندریتیک تولروژنیک در ایمنی درمانی بیماری‌های خودایمن یا در جلوگیری از رد پیوند می‌توانند کاربرد داشته باشند.

کلیدواژگان: سلول دندریتیک، مغز استخوان موش، روش‌های تولید سلول دندریتیک

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۹۰-۸۱

مقدمه

سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells: DCs) تنها سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که توانایی تحریک سلول‌های T دست نخورده (Naive T Cell) را دارند. عملکرد زیر گروه‌های مختلف این سلول‌ها (همانند نوع میلوئیدی یا لنفوئیدی، DC1 یا DC2 و DC طحالی یا اپیدرمال) مورد مطالعه قرار گرفته است و به نظر می‌رسد که خصوصیت مشترک انواع زیر گروه‌های DC عبور از چندین مرحله تکاملی است (۱، ۲). سلول‌های دندریتیک نابالغ میزان کمتری از مولکول‌های MHC class II و کمک تحریکی را بیان می‌کنند ولی بیان این مولکول‌ها در حین بلوغ به صورت چشمگیری افزایش می‌یابد. سلول‌های دندریتیک بالغ قادرند سلول‌های T از نوع CD4 و CD8 را تحریک کنند. ویژگی‌های عملکردی سلول‌های DC اخیرا توجه محققان را در استفاده از این سلول‌ها به عنوان درمان کمکی در سرطان‌ها به خود معطوف کرده است (۲، ۳).

برای به دست آوردن DCs در شرایط آزمایشگاهی روش‌های مختلفی وجود دارد. جداسازی این سلول‌ها از اعضای لنفاوی و خون محیطی به دلیل فراوانی کم آنها مشکل است. به عنوان مثال در موش تعداد سلول‌های لانگرهانس به دست آمده از اپیدرمیس هر موش ۶×۱۰^۴ سلول (۴) و تعداد DCs جداشده از طحال و یا تیموس $۱-۱۰\times۱۰^۵$ سلول است (۵). کشت سلول‌های خون محیطی موش در محیط حاوی GM-CSF می‌تواند تعداد ۱×۱۰^۶ سلول ایجاد نماید در حالی که تعداد DCهای تولید شده در کشت سلول‌های مغز استخوان بسته به نوع کشت و زمان کشت می‌تواند از ۵×۱۰^۶ تا $۱-۳\times۱۰^۸$ سلول به ازای هر موش متغیر باشد (۶). تولید سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان اولین بار توسط اینابا و همکارانش شرح داده شد (۷). در این روش بعد از حذف سلول‌های واجد شاخص‌های MHC-II, CD3, CD19 بقیه سلول‌ها در محیط حاوی

(Mouse Recombinant Granulocyte Monocyte Colon Stimulatory Factor: mrGM-CSF) کشت داده می‌شوند. این روش به دلیل استفاده از آنتی‌بادی برای حذف سلول‌های ناخواسته، ضمن آسیب رساندن به سلول‌ها، پرهزینه نیز است. استفاده از mrGM-CSF بدون حذف سایر سلول‌ها، اضافه کردن (Mouse Recombinant Interleukin-4: mrIL-4) به محیط کشت (۸، ۹) و استفاده از پلیت کشت میکروبی به جای استفاده از فلاسک کشت سلولی از انواع روش‌های کشت DCs است (۶) که بعدها شرح داده شدند.

مطالعات اینابا، لوتز و مندوزا (۸-۶) عمده‌ترین مقالات مربوط به معرفی روش‌های جدید تولید سلول‌های دندریتیک هستند هریک از این روش‌ها مزایا و معایب خاصی دارند که طبعا انتخاب روش را برای محققانی که می‌خواهند نسبت به تولید سلول‌های دندریتیک و استفاده از آنها در سایر مطالعات اقدام کنند، با مشکل روبرو می‌کند. از طرفی با توجه به هزینه بالای سایتوکاین‌های نوترکیب مورد استفاده در این فرآیند امکان بررسی هر سه روش برای همگان مقدور نیست. لذا در این مطالعه هر سه روش به طور همزمان و در یک آزمایشگاه انجام گرفت و نتایج به دست آمده مقایسه شد. گزارش این نتایج از این جهت قابل استفاده و ضروری است که به محققان کمک می‌کند روش مورد نظر خود را بدون نیاز به تکرار همه روش‌ها، انتخاب کنند. علاوه بر آن در مطالعهٔ لوتز تنها به روش تولید سلول‌های دندریتیک با استفاده از پلیت میکروبی اشاره شده است. اهمیت این روش و ذکر آن در این مطالعه، به دلیل امکان استفاده از این روش در تولید انبوه سلول‌های دندریتیک خصوصا با استفاده از بیوراکتورها است، معمولا در این سیستم لازم است سلول‌ها به صورت شناور کشت داده شوند که عملا با روش کشت معمول سلول دندریتیک در حضور GM-CSF با یا بدون IL-4 امکان پذیر نیست.

مواد و روش‌ها

موش

موش‌های C57BL/6 ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران، جهت انجام این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

محیط کشت، آنتی‌بادی‌ها و سایتوکاین‌های مورد استفاده

برای کشت سلول‌ها از محیط کشت کامل RPMI (Gibco) حاوی ۱۰درصد Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Gibco)، ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco) و یک میلی‌مول سدیم پیروات (Sigma) استفاده شد. در تولید و تیمار سلول‌های دندریتیک سایتوکاین‌های mrGM-CSF(R&D system)، mrIL-4(R&D system) و mrTNF-α(Bender Medsystem) مورد استفاده قرار گرفتند.

آنتی‌بادی‌های مورد استفاده عبارت بودند از Hamster anti-mouse CD11c(PE-conjugated) برای بررسی میزان خلوص سلول‌های دندریتیک، Rat anti-mouse CD11b(FITC-conjugated) و Rat anti-mouse CD8α (PE-conjugated) برای بررسی زیر گروه‌های سلول‌های دندریتیک تولید شده و آنتی‌بادی‌های Rat anti-mouse MHC class II I-AE(FITC-conjugated)، Rat anti-mouse CD40(PE-conjugated) و Rat anti-mouse CD86(PE-conjugated) برای مطالعهٔ میزان بلوغ سلول‌ها و از آنتی‌بادی Rat anti-mouse CD3 (PE-conjugated) نیز برای میزان خلوص سلول‌های T استفاده شد. کلیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از شرکت BD Biosciences تهیه شدند.

جداکردن سلول‌های مغز استخوان

موش‌ها با استفاده از بیهوشی و قطع نخاع کشته شدند و بعد از ثابت کردن حیوان در ظرف تشریح، پوست ناحیه شکم و ران‌ها باز شد. بعد از بریدن عضلات این ناحیه استخوان‌های فمور و تیبیا آزاد و جدا شد. سپس ماهیچه‌های اطراف استخوان‌ها کاملا تمیز و استخوان‌ها به مدت ۲ دقیقه در الکل ۷۰درصد قرار داده شد تا میکروب‌زدایی شود. در این مرحله استخوان‌ها بعد از دو بار شستشو با PBS، در پتری‌دیش ۶۰میلی‌متر حاوی ۱۰ سی‌سی از محیط کشت قرار داده شدند. سپس یک طرف از استخوان‌ها با استفاده از قیچی بریده شد و با استفاده از سرنگ با تزریق محیط کشت سلول‌های مغز استخوان با کمک فشار مایع از استخوان خارج و سلول‌ها بعد از پیپتاژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۸۰گرم سانتریفیوژ شدند. گلبول‌های قرمز با استفاده از آمونیوم کلراید (۲ دقیقه در دمای اتاق) لیز شدند و یک سوسپانسیون سلولی ۱×۱۰^{۶} در محیط RPMI کامل تهیه شد.

کشت سلول‌های مغز استخوان با GM-CSF و IL-4 و یا GM-CSF تنها

ابتدا یک سوسپانسیون سلولی حاوی $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول بر میلی‌لیتر از سلول‌های مغز استخوان در محیط RPMI حاوی ۱۰درصد FBS، تهیه و سپس ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق به فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع انتقال داده شد. ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر از سیتوکاین mrGM-CSF و ۵۰۰ واحد بر میلی‌لیتر از سیتوکاین mrIL-4 به کشت سلول‌ها اضافه شد. فلاسک‌ها در شرایط ۳۷درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 برای مدت ۶ روز انکوبه شدند. در روز سوم انکوباسیون بعد از خارج کردن محیط و سانتریفیوژ، محیط جدید حاوی سایتوکاین‌های مذکور با نصف مقدار اولیه به همراه سلول‌ها به فلاسک‌ها برگردانده شدند. سایتوکین TNF-α برای القای بلوغ در DCs به میزان ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. به این صورت که روز ششم ۹۰ درصد از محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری شد و بعد از سانتریفیوژ کردن، سلول‌های آن در محیط کشت کامل حاوی سایتوکاین TNF-α با مقدار ذکر شده و همچنین mrGM-CSF به مقدار ۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر به صورت سوسپانسیون در آمده و به فلاسک برگرداننده و به مدت ۴۸ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵درصد CO_2 انکوبه شد. برای جمع‌آوری سلول‌ها در پایان کار بعد از خارج کردن

سلول‌های شناور، فلاسک‌ها به مدت نیم ساعت با PBS حاوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس همه سلول‌ها جمع‌آوری و برای مطالعات فلوسایتومتری و یا آزمون MLR مورد استفاده قرار گرفتند. در روش GM-CSF تنها روش کار همانند GM-CSF و IL-4 بود با این تفاوت که در همهٔ مراحل IL-4 از سایتوکاین‌های اضافه شده به محیط حذف شده بود.

کشت سلول‌های مغز استخوان در پلیت کشت میکروبی

در این روش ابتدا یک سوسپانسیون سلولی حاوی ۲×۱۰^{۵} سلول به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت کامل تهیه و سپس این سلول‌ها به پلیت کشت میکروبی (Falcon, USA) ۱۲ میلی‌متری منتقل شد. بعد از اضافه کردن ۲۰۰ واحد GM-CSF به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، سلول‌ها به انکوباتور حاوی ۵درصد CO_2 و ۳۷درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در این روش سلول‌ها به صورت شناور کشت داده می‌شوند و در هربار تعویض محیط برای جایگزینی محیط جدید، کل محیط خارج و بعد از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰g) سلول‌ها به پلیت جدید منتقل می‌شدند. در هر تعویض محیط GM-CSF به همان میزان اولیه به محیط اضافه شد. طول مدت کشت در این روش برای تولید DCs نابالغ ۱۰ روز بود و محیط هر ۳ روز یک‌بار تعویض می‌گردید و روز دهم بعد از کشت سلول‌ها همانند روش‌های قبلی با استفاده از سایتوکاین TNF-α بالغ شدند تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند (۶).

بررسی Flow cytometry

بررسی فلوسایتومتری با هدف بررسی خلوص DCs و یا سایر سلول‌های جدا شده همانند سلول‌های T، بررسی فنوتیپی DCs از نظر میزان بلوغ و بررسی فنوتیپی DCs از نظر زیرگروه (لنفوئید و یا میلوئید) انجام شد. از آنجایی که این مطالعه بر روی موش انجام گرفته برای بررسی خلوص DCs از شاخص CD11c، برای بررسی بلوغ نیز از شاخص‌های CD86 و MHC class II و نیز برای بررسی زیر گروه‌های به وجود آمده از شاخص‌های CD8α و CD11b استفاده شد. در هر مورد از ایزوتیپ کنترل مناسب، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی و فلوسایتومتری در خصوص هریک از شاخص‌های فوق با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده عمل شد. به طور خلاصه و صرف‌نظر از نوع شاخص به کار رفته، ابتدا یک سوسپانسیون سلولی با غلظت ۲×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر تهیه و بعد از بلوکه کردن گیرنده‌های غیراختصاصی با استفاده از سرم مناسب، مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن با ۱ میکروگرم از آنتی بادی مخلوط شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در حمام یخ و شستشوی سلول‌ها، نتایج با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری Partec III و برنامه Partec Flomax آنالیز شد.

انجام آزمون MLR برای بررسی عملکرد سلول‌های دندریتیک

واکنش مختلط لنفوسیتی (Mixed Lymphocyte Reaction: MLR) یک آزمون استاندارد برای بررسی عملکردی سلول‌های دندریتیک است. از آنجایی که در این مطالعه منشاء سلول‌های دندریتیک از موش گونه C57BL/6 بود، لذا از موش گونه BALB/c به عنوان منبع سلول‌های T آلوژنیک استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا سلول‌های گره‌های لنفاوی موش BALB/c استخراج شد و بعد از تخلیص لنفوسیت‌های T توسط ستون نایلون ول به عنوان سلول‌های پاسخ دهنده مورد استفاده قرار گرفت. پس از مهار قدرت تکثیر سلول‌های دندریتیک با استفاده از اشعه گاما (۳۰۰۰ راد)، این سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت در پلیت‌های ته گرد ۹۶ خانه‌ای با سلول‌های T و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شدند. سپس به مدت ۱۸ ساعت با $[^{3}H]$-thymidine کشت داده شدند و میزان تکثیر با استفاده از مایع سنتیلاسیون و دستگاه بتاکانتر براساس شمارش در دقیقه (cpm) ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

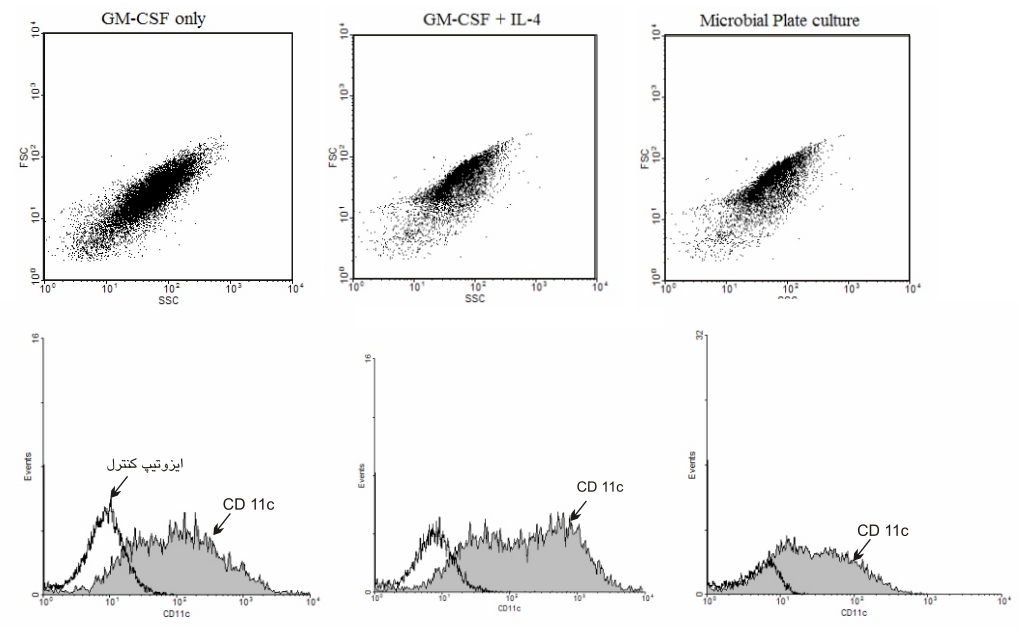
داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون غیر پارامتریک (Mann-whitney U) و برنامهٔ آماری SPSS-10 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه آزمایش‌ها حداقل ۵ بار تکرار شده و داده‌های ارائه شده به صورت Mean±SD حداقل ۵ بار تکرار آزمایش است. مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جداسازی سلول‌های مغز استخوان موش

در این مطالعه تنها یکی از اپی‌فیزهای استخوان جدا شد و با فشار مایع وارد شده به مغز استخوان سلول‌های موجود در اپی‌فیز استخوانی باقی‌مانده نیز شسته و از آن خارج شد. در این روش متوسط سلول‌های به دست آمده از چهار استخوان پای موش (۲ استخوان فمور و ۲ استخوان تیبیا) $۴۰\pm۳/۴\times۱۰^{۶}$ بود. این در حالی است که تعداد سلول‌های به دست آمده در روش معمول که هر دو طرف استخوان‌ها بریده می‌شود کمتر از روش مورد استفاده در این مطالعه بود ($۴۰\pm۳/۴\times۱۰^{۶}$ در مقابل $۲۸/۵\pm۹\times۱۰^{۶}$، $p=۰/۰۰۰۲$).

مطالعه فلوسایتومتری سلول‌های به دست آمده از مغز استخوان نشان داد که تنها ۴±۱/۶ درصد از این سلول‌ها شاخص CD11c را که شاخص اختصاصی سلول‌های دندریتیک است، بیان می‌کنند. سلول‌های واجد MHC class II ۳۰±۳/۳ درصد سلول‌های مغز استخوان را تشکیل می‌داد و شاخصه CD11b که به تنهایی یکی از شاخص‌های سلول‌های ماکروفاژ و منوسیت است و همچنین نشان دهنده رده میلوییدی سلول‌های دندریتیک است توسط ۱۱±۱/۴ درصد سلول‌ها بیان می‌شد. اما CD8α که نشان دهنده رده لنفوییدی سلول‌های دندریتیک است و در سطح لنفوسیت‌های T نیز بیان می‌شود، در ۵±۱ درصد سلول‌های مغز استخوان بیان می‌شد. شاخص‌های CD86 و CD3 به ترتیب روی ۲±۸ و ۰/۸±۵ درصد سلول‌های جداشده از مغز استخوان موش بیان می‌شدند.



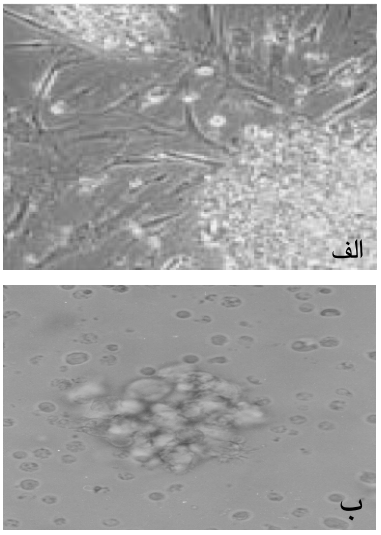
شکل ۱: آنالیز فلوسایتومتری میزان بیان CD11c درهر یک از روش‌های کشت سلول‌های دندریتیک. نمودارهای بالا نشان دهنده توزیع و هم شکلی سلول‌های تولید شده در هر یک از روش‌ها و نمودارهای پایین نشان دهنده میزان بیان شاخص CD11c بر روی سلول‌های تولید شده است.

کشت سلول‌های مغز استخوان با mrGM-CSF تنها

تعداد سلول‌های اولیه $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ سلول به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت کامل بود، در روز دوم کشت دو گروه از سلول‌ها در فلاسک کشت قابل مشاهده بودند؛ سلول‌های چسبان و سلول‌های شناور. تا روز سوم بعد از کشت تکثیر قابل ملاحظه‌ای در بین سلول‌ها مشاهده نمی‌شد (نمودار ۱). از روز سوم بعد از کشت در مطالعه میکروسکوپی می‌توان کانون‌های تکثیر را در تمام کف پلیت مشاهده کرد. تعداد سلول‌های کشت داده شده در محیط حاوی GM-CSF در روز ششم بعد از کشت به طور متوسط ۲/۳±۰/۲ برابر سلول‌های اولیه بود. اضافه کردن TNF-α به محیط تعداد این سلول‌ها را کاهش می‌داد. مطالعه فلوسایتومتری سلول‌ها نشان می‌دهد که میزان خلوص سلول‌های دندریتیک (سلول‌های واجد CD11c) در این روش بعد از ۸ روز کشت و تیمار با TNF-α حدود ۴±۶۰ درصد بود (شکل ۱).

کشت سلول‌های مغز استخوان با GM-CSF و IL-4

برای کشت سلول‌های مغز استخوان در محیط حاوی GM-CSF و IL-4 همانند روش قبلی تعداد اولیه سلول‌های کشت داده شده مغز استخوان $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ سلول به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت کامل بود. کل سلول‌های جدا شده از مغز استخوان، بعد از حذف گلبول‌های قرمز با استفاده از محلول لیز کننده، برای کشت به فلاسک انتقال داده می‌شدند. در این روش نیز همانند کشت سلول‌ها در محیط GM-CSF میزان تکثیر تا روز سوم بعد از کشت تغییر محسوسی را نشان نمی‌داد ولی از روز سوم به بعد میزان تکثیر افزایش می‌یافت. با این وجود این تکثیر تا اندازه‌ای کمتر از زمانی است که سلول‌ها با GM-CSF تنها کشت داده می‌شوند. در بررسی میکروسکوپی، سلول‌های کشت شده در محیط حاوی GM-CSF و IL-4 نسبتا بزرگتر از سلول‌های کشت داده شده با GM-CSF تنها بودند. مراکز رشد در این سلول‌ها را می‌توان به صورت کلونی سلولی در حال رشد در کف فلاسک مشاهده کرد (شکل ۲).



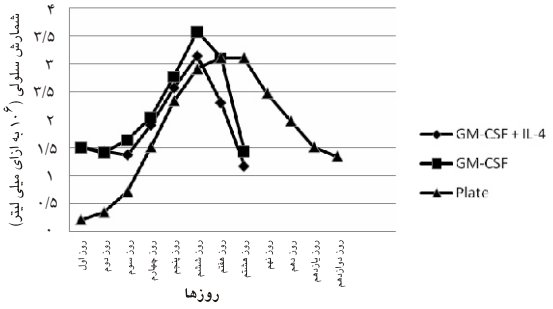
شکل ۲: کشت سلول‌های مغز استخوان
الف) کشت سلول‌های مغز استخوان در روز پنج بعد از کشت، کانون‌های تکثیری سلول‌های مغز استخوان به صورت توده سلولی مشخص هستند (X۱۰۰) (ب) سلولهای دندریتیک بعد از بالغ شدن که به صورت تجمع‌هایی بر سطح محیط کشت قابل مشاهده هستند (X۴۰۰)

این کلونی‌ها به تدریج بعد از بلوغ از سطح فلاسک جدا شده و تجمع‌های سلولی شناور را در محیط کشت تشکیل می‌دهند. در هربار تعویض محیط بعد از سانتریفیوژ و انتقال مجدد سلول‌ها به فلاسک کشت، سلول‌ها طی ۴ تا ۶ ساعت اولیه بعد از دستکاری و یا سانتریفیوژ

به سطح فلاسک می‌چسبند. به نظر می‌رسد که تغییر دمای محیط میزان چسبیدن این سلول‌ها را افزایش می‌دهد و با بالا رفتن درجه حرارت محیط، سلول‌ها به تدریج از کف فلاسک کشت جدا می‌شوند. با این حال حتی بعد از اضافه کردن فاکتور بالغ کننده TNF-α در محیط می‌توان سلول‌ها را در دو گروه چسبان و شناورمشاهده کرد.

مطالعه با استفاده از فلوسایتومتری نشان می‌دهد که میزان خلوص (درصد CD11c) در این روش روز ششم کشت قبل از اضافه کردن TNF-α به طور متوسط ۲/۶±۵۱/۶ درصد بود که این میزان بعد از هشت روز کشت بدون اضافه کردن فاکتور بلوغ به ۲/۷±۶۶ درصد افزایش می‌یابد و درصورت اضافه کردن TNF-α بعد از روز ششم این میزان در روز هشتم کشت به ۶±۷۲ درصد افزایش می‌یابد (شکل ۱).

تعداد سلول‌های مغز استخوان منتقل شده به فلاسک کشت قبل از اضافه کردن سایتوکین $۸-۷\times۱۰^{۶}$ سلول به ازای هر ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت داخل فلاسک‌ها بود این تعداد برای روز ششم کشت قبل از اضافه کردن فاکتور بلوغ به $۱۶\pm۱\times۱۰^{۶}$ به ازای هر فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌مترمربع افزایش می‌یابد ولی بعد از بلوغ میزان آن به $۵/۵\pm۱\times۱۰^{۶}$ رسید. (نمودار ۱). تعداد سلول‌های نهایی بعد از ۸ روز کشت بدون اضافه کردن فاکتور بلوغ به طور متوسط $۶/۳\pm۱/۱\times۱۰^{۶}$ سلول به ازای هر فلاسک کشت بود.



نمودار ۱: منحنی رشد سلول‌های مغز استخوان در هر یک از روش‌های مورد مطالعه.

تکثیرسلول‌ها در هر یک از روش‌های مورد استفاده معمولا از روز سوم بعد از کشت آغاز می‌گردد و این روند تا روز قبل از اضافه کردن فاکتور بلوغ ادامه می‌یابد ولی بعد از اضافه کردن فاکتور بلوغ تعداد سلول‌ها کاهش می‌یابد. با این تفاوت که تکثیر سلول‌ها در روش پلیت میکروبی تا روز ۶ بعد از کشت روند صعودی دارد و بعد از آن تا روز ۸ کشت روند ثابتی را طی می‌کند و در مراحل بعدی تعداد آنها کاهش می‌یابد. برای تعیین روند رشد سلول‌های مغز استخوان بعد از کشت در هریک از روش‌های مورد مطالعه، سلول‌ها در روزهای متفاوت با استفاده از EDTA نیم میلی مولار و پیپتاژ شدید جمع‌آوری و تعداد سلول‌ها و میزان بقای آنها با استفاده از تریپان‌بلو سنجیده می‌شد.

کشت سلول‌های مغز استخوان در پلیت کشت میکروبی

در این روش سلول‌های مغز استخوان به جای کشت در فلاسک در پلیت کشت میکروبی کشت داده می‌شوند. در این روش کشت تعداد سلول‌های منتقل شده به پلیت تقریبا ۱۰ برابر کمتر از دو روش قبلی است. میزان GM-CSF اضافه شده نیز تنها ۲۰۰ واحد به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت بود. شروع به رشد ناگهانی همانند روش‌های قبلی از روز سوم بعد از کشت قابل مشاهده بود با این تفاوت که گاه به علت تکثیر زیاد و تراکم سلولی لازم بود سلول‌ها پاساژ شوند و به پلیت دیگری منتقل شوند. نسبت رشد سلول‌های مغز استخوان در این روش در نمودار ۱ آمده است. در مطالعه میکروسکوپی استطاله‌های سلولی همانند دو روش قبلی در کف پلیت قابل مشاهده نیست اما تجمع سلول‌های شناور کاملا مشهود است. میزان خلوص سلول‌های دندریتیک بعد از ۶ روز کشت، کمتر از دو روش قبلی و حدود ۷±۴۸ درصد بود. برای بالابردن میزان خلوص در این روش لازم بود تا طول مدت کشت افزایش یابد ضمن آنکه برای حذف ناخالصی در روز دهم کشت همزمان با اضافه کردن TNF-α و بعد از آن باید میزان GM-CSF به نصف کاهش یابد. هرچند که این روش می‌تواند میزان خلوص سلول‌های دندریتیک را تا حد قابل قبولی افزایش دهد (۳±۶۹ درصد) ولی در عین حال باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک نیز می‌شود و آنها را نسبت به سایر فاکتورهای بلوغ مقاوم می‌کند و اضافه کردن TNF-α بعد از روز دهم کشت تاثیر چندانی در افزایش میزان شاخص‌های بلوغ ندارد. تعداد سلول‌های به دست آمده به ازای هر پلیت میکروبی با ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی $۶/۶\pm۱\times۱۰^{۶}$ بود . بنابراین با توجه به تعداد سلول‌های اولیه به ازای هر موش $(۴۰\pm۳/۴\times۱۰^{۶})$ در کل با این روش می‌توان تعداد $۲/۵\times۱۰^{۸}$ سلول دندریتیک با خلوص ۳±۶۹ درصد به دست آورد. این در حالی است که این تعداد برای روش GM-CSF تنها ۳۷×۱۰^{۶} سلول با خلوص ۴±۶۰ درصد و برای روش GM-CSF به همراه IL-4 ۳۰×۱۰^{۶} سلول با خلوص ۶±۷۲ درصد بود.

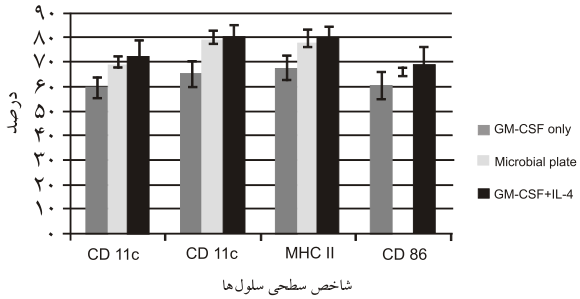
بالغ کردن سلول‌های دندریتیک

برای بلوغ سلول‌های دندریتیک از فاکتورهای متعددی می‌توان استفاده کرد. در این مطالعه از TNF-α به عنوان فاکتور بلوغ استفاده شده است. فاکتور بلوغ TNF-α در گروهی از سلول‌ها که با GM-CSF و IL-4 کشت داده شده بودند میزان خلوص سلول‌های دندریتیک را از ۲±۵۰ درصد در روز ششم کشت به ۶±۷۲ درصد در روز هشتم افزایش داد. اضافه کردن TNF-α بعد از ۴۸ ساعت می‌توانست درصد سلول‌های واجد MHC class II را از ۴/۷±۵۶ درصد قبل از اضافه کردن آن، به ۴/۸±۸۰ درصد (p=۰/۰۰۴) و میزان سلول‌های واجد CD86 را از ۱۲/۶±۴۴ درصد به ۶/۸±۶۹/۵ درصد افزایش دهد (p=۰/۰۱). اما آنچه که بیش از درصد سلول‌های واجد MHC class II و یا CD86 تحت تاثیر اضافه کردن فاکتور TNF-α قرار می‌گرفت، افزایش شدت بروز این شاخص‌ها بر روی سلول‌های تیمار شده بود. میانگین شدت فلورسانس (MFI) شاخصی است که نشان دهنده شدت بروز یک مولکول بر روی هریک از سلول‌های مورد مطالعه است، درخصوص شاخص MHC class II میزان MFI از مقدار ۴۸±۱۴۱ قبل از اضافه کردن فاکتور بلوغ به ۵۴±۲۲۳ بعد از ۴۸ ساعت رسید (p=۰/۰۱). این موضوع را می‌توان در خصوص CD86 نیز مشاهده کرد که مقدار آن از ۳۱/۸±۶۶ به ۵۰±۴۲۸ افزایش می‌یابد (p=۰/۰۱).

جدول ۱. مقایسهٔ نتایج حاصل از سه روش متفاوت تولید سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان موش

شاخص	GM-CSF only	GM-CSF + IL_4	Bacterial Plate
حذف سلول‌های Lin^+	ندارد	ندارد	ندارد
تعداد اولیهٔ سلول‌ها (BMCell/ml)	$۱/۵ \times ۱۰^۶$	$۱/۵ \times ۱۰^۶$	۲×۱۰^۵
ظرف کشت	فلاسک کشت سلول	فلاسک کشت سلول	پتری دیش کشت باکتری
محیط کشت	RPMI+10% FCS	RPMI+10% FCS	RPMI+10%FCS
مقدار GM-CSF	۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر	۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر	۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر
طول دورهٔ کشت	۸ روز	۸ روز	۱۲ روز
میزان خلوص (درصد)	۶۰±۴	۷۲±۶	۶۹±۳
تعداد سلول‌های تولیدی از یک موش	۳۷×۱۰^۶	۳۰×۱۰^۶	۲۵×۱۰^۷
میزان بیان MHC II (درصد)	۶۷/۵±۵	۸۰±۴/۸	۷۸±۵
میزان بیان CD86 (درصد)	۶۰/۵±۵	۶۹/۵±۶/۸	۶۶/۳±۱/۵
توان القاء تکثیر در آزمون MLR(cpm)	۲۰۸۹۰±۱۳۴۰	۳۰۱۴۸±۸۷۳	۱۹۶۲۱±۹۰۵

مقایسه شاخص‌های بلوغ (میزان بروز مولکول‌های MHC class II و CD86) در نمودار ۲ نشان می‌دهد علاوه بر بالا بودن میزان خلوص (۶۰±۴در مقابل ۷۲±۶، p=۰/۰۲) در گروه GM-CSF+IL-4 نسبت به گروه GM-CSF تنها، میزان بیان CD86 (۶۹/۵±۶/۸ در مقابل ۶۰/۵±۵، p=۰/۰۴) و MHC class II (۸۰±۴/۸ در مقابل ۶۷/۵±۵، p=۰/۰۱) نیز در گروه GM-CSF+IL-4 بیشتر بود. با این حال در مقایسه گروه GM-CSF+IL-4 با گروهی که در پلیت میکروبی به مدت ۱۰ روز کشت داده شده بودند، چنین ارجحیتی را تنها می‌توان در میزان خلوص (۷۲±۶ در مقابل ۶۹±۳، p=۰/۰۵) و تا حدودی در میزان بیان MHC class II (۸۰±۴/۸ در مقابل ۷۸±۵، p=۰/۰۷) برای گروه GM-CSF+IL-4 مشاهده کرد. دو گروه GM-CSF تنها و پلیت میکروبی اختلافی از نظر شاخص‌های مورد مطالعه نشان نمی‌دادند.



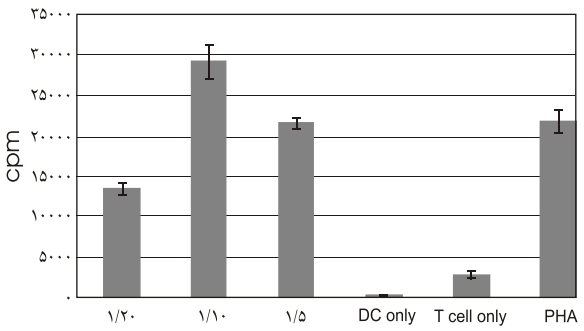
نمودار ۲: میزان بیان شاخص‌های سلول‌های دندریتیک موش توسط سلول‌های تولید شده در هریک از روش‌های مورد مطالعه.
برای بررسی شاخص‌های بیان شده بر سطح سلول‌های دندریتیک، سلول‌ها بعد از ۸ روز کشت و تیمار با TNF-α از فلاسک و یا پلیت کشت جمع‌آوری و با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مربوطه رنگ‌آمیزی شدند. در خصوص شاخص CD11c میزان بیان در کل سلول‌ها بعد از خارج کردن ناحیه مربوط به سلول‌های مرده مورد محاسبه قرار گرفت. برای بقیه شاخص‌ها میزان بیان بر روی سلول‌های $CD11c^+$ اندازه گیری شد. میزان بیان شاخص‌های CD11c، MHC class II،CD11b در دو روش GM-CSF+IL-4 و پلیت میکروبی نسبت به GM-CSF تنها به صورت معنی‌دار بالا بود (p<۰/۰۵). در خصوص CD86 این اختلاف بین دو گروه GM-CSF+IL-4 و GM-CSF تنها مشاهده شد. مقادیر به صورت درصد سلول‌های واجد شاخص بیان شده اند.

زیر گروه سلول‌های دندریتیک تولید شده از مغز استخوان

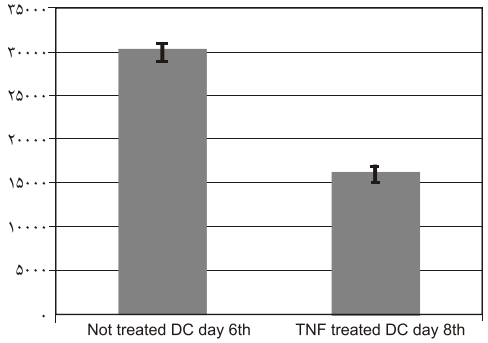
سلول‌های دندریتیک موش را می‌توان به دو زیرگروه لنفوییدی و میلوییدی تقسیم‌بندی کرد. مهمترین شاخص سطحی برای این تمایز بیان و عدم بیان زنجیره آلفای CD8 در سطح سلول‌های دندریتیک است. علاوه بر آن سلول‌های زیرگروه میلوییدی در موش شاخص سطحی CD11b را بر سطح خود بیان می‌کنند که زیرگروه لنفوییدی فاقد این ویژگی هستند. تولید سلول‌های دندریتیک به روش فوق نشان می‌دهد که در هر سه روش مورد مطالعه تنها زیر گروه تولید شده، زیر گروه میلوییدی است و سلول‌های به دست آمده شاخص CD8α را بر سطح خود بیان نمی‌کنند و این میزان تنها ۰/۵±۰/۱ درصد است. با این حال میزان بیان CD11b در گروه GM-CSF+IL-4 نسبت به گروه GM-CSF تنها (۸۰±۵ در مقابل ۶۵/۵±۵، p=۰/۰۱) بیشتر بود ولی تفاوتی با روش کشت با پلیت میکروبی نداشت.

افزایش تکثیر در گروه GM-CSF+IL-4 نسبت به سایر روش‌های مورد مطالعه در آزمون MLR

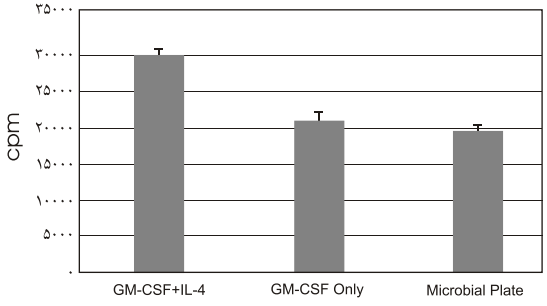
برای بررسی عملکرد سلول‌های دندریتیک تولید شده در هریک از روش‌های مورد استفاده از آزمون MLR که یک آزمون استاندارد در این خصوص می‌باشد استفاده شد. در این آزمون سلول‌های T گره‌های لنفاوی موش BALB/c پس از استخراج و تخلیص توسط نایلون ول، با نسبت‌های مختلف با سلول‌های دندریتیک تیمار شده با اشعه، کشت داده شدند و میزان تکثیر آنها با استفاده از تیمیدین نشان‌دار مورد ارزیابی قرار گرفت. چنانچه نمودار ۳ نشان می‌دهد بهترین تکثیر مربوط به گروهی بود که در آن نسبت محرک به پاسخ‌دهنده ۱ به ۱۰ بود. بنابراین در سایر آزمون‌ها نیز از این نسبت استفاده شد. مقایسه نتایج تکثیر در گروه GM-CSF+IL-4 نشان می‌دهد (نمودار ۴) که سلول‌های دندریتیک بالغ میزان تکثیر را نسبت به سلول‌های تیمار نشده با فاکتور بلوغ در روز ششم تا دو برابر افزایش می‌دهد (۳۰۱۴۸±۸۷۳ در مقابل ۱۶۲۱۸±۷۸۴، p=۰/۰۰۱).



نمودار۳. نتایج آزمون MLR در نسبت‌های متفاوت سلول‌های تحریک کننده به سلول‌های پاسخ دهنده، در گروه GM-CSF+IL-4.
سلول‌های دندریتیک بعد از تیمار با TNF-α جمع‌آوری شدند و بعد از اشعه دادن، به تعداد ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ با ۱۰۵ سلول T آلوژنیک جدا و تخلیص شده از گره‌های لنفاوی موش BALB/c کشت داده شدند و میزان تکثیر با استفاده از تایمیدین نشان‌دار سنجیده شد. آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام شد و هر نمودار نشان دهنده حداقل سه بار تکرار آزمایش است. میزان تکثیر در نسبت ۱ به ۱۰ حداکثر مقدار خود را داشت و افزایش و یا کاهش این نسبت، میزان تکثیر را کاهش می‌داد. بنابراین در بقیه آزمایش‌ها از نسبت ۱ به ۱۰ استفاده شد. نتایج به صورت شمارش در دقیقه نشان داده شده اند.



نمودار ۴: مقایسه القای تکثیر در لنفوسیت‌های T آلوژن توسط سلول‌های دندریتیک تیمار شده و تیمار نشده با TNF-α
میزان تکثیر لنفوسیت‌های T در آزمون MLR برای سلول‌های کشت داده شده به روش GM-CSF+IL-4، نشان می‌دهد که قدرت القای تکثیر سلول‌های دندریتیک به طور محسوسی بعد از تیمار با TNF-α افزایش می‌یابد (p=۰/۰۰۱) (در این آزمون از نسبت ۱ به ۱۰ سلول دندریتیک به سلول T استفاده شده است)



نمودار ۵: مقایسه القای تکثیر در لنفوسیت‌های T آلوژن توسط سلول‌های دندریتیک تولید شده با روش‌های مختلف
نتایج آزمون MLR نشان می‌دهد که سلول‌های تولید شده با روش GM-CSF+IL-4 نسبت به دو روش دیگر عملکرد تکثیری بهتری دارند. چنین تفاوتی بین دو گروه GM-CSF تنها و پلیت میکروبی مشاهده نشد (در این آزمون از نسبت ۱ به ۱۰ سلول دندریتیک به سلول T استفاده شده است).

بحث

سلول‌های دندریتیک (DCs) جزء سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن همچون ماکروفاژها و لنفوسیت‌های B هستند (۱۰) که توان این سلول‌ها در تحریک سلول‌های T دست نخورده آنها را از سایر سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن متمایز می‌کند (۱۱). در این مطالعه روش‌های مختلف تولید تعداد زیادی از سلول‌های دندریتیک برای مطالعه عملکرد و ساختار آنها شرح داده شده است. سلول‌های دندریتیک در بسیاری از بافت‌ها به تعداد اندک وجود دارد که مطالعه آنها را مشکل می‌کند. امکان تولید آنها در آزمایشگاه باعث شده مطالعات زیادی برای شناسایی عملکرد آنها صورت گیرد (۱۲). در موش از نظر عملکردی حداقل ۳ زیرگروه از سلول‌های دندریتیک شناسایی شده‌اند (۱۳)، سلول‌های دندریتیک میلوییدی ($CD11b^+B220^-CD11c^+$)، سلول‌های دندریتیک لنفوییدی واجد $CD8\alpha^+$ ($CD8\alpha^+B220^-CD11c$) و سلول‌های دندریتیک پلاسموسیتوییدی ($B220^+CD11c^+$). هریک از این زیرگروه‌ها، انواع متفاوتی از سلول‌های T پاسخ دهنده را ایجاد می‌کنند. سلول‌های دندریتیک میلوییدی از پیش‌سازهای خونی مشتق شده و در بافت‌های التهابی مستقر می‌شوند، این سلول‌ها باعث تحریک سلول‌های T واجد CD4 (سلول‌های T کمکی) می‌شوند (۱۳). تولید سلول‌های دندریتیک در این مطالعه با به کار بردن GM-CSF باعث شده است که عمده سلول‌های تولید شده در هر سه روش متعلق به زیرگروه میلوییدی باشد. با این حال نشان داده شده است که استفاده از GM-CSF برای تولید سلول‌های دندریتیک در موش الزامی نیست (۱۴، ۱۵) و با اضافه کردن Flt3 لیگاند به محیط کشت سلول‌ها می‌توان سلول‌های دندریتیک واجد CD8α را که قدرت مهاجرتی کمی دارند ولی در گره‌های لنفاوی، مسئول ایجاد پاسخ‌های سایتوتوکسیک سلول‌های T هستند را نیز تولید کرد (۱۴).

تولید سلول‌های دندریتیک از سلول‌های فاقدMHC class II مغز استخوان، اولین بار توسط اینابا و همکارانش شرح داده شد. در این روش، ابتدا سلول‌های واجد شاخصه‌های رده‌ای (Lin^+) با استفاده از آنتی‌بادی علیه CD4، CD8، Ia و B220/CD45R و کمپلمان خرگوشی حذف می‌شوند و سپس سلول‌ها با غلظت $۱۰^۵ \times ۱۰$–۷/۵ سلول بر میلی‌لیتر در حضور ۱۰۰۰–۵۰۰ واحد بر میلی‌لیتر از mrGM-CSF کشت داده می‌شدند و هر دو روز یک بار ۷۵درصد محیط خارج و با محیط جدید جایگزین می‌شد. هرچند در این مطالعه میزان خلوص سلول‌های به دست آمده گزارش نشده بود ولی گزارش‌های بعدی نشان می‌داد میزان خلوص سلول‌های تولیدی در این روش بعد از ۸ روز کشت بدون تیمار با TNF-α نزدیک به ۶۰ درصد است و بعد از تیمار تا ۷۰درصد افزایش می‌یابد (۶). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که میزان خلوص سلول‌های دندریتیک به دست آمده در حضور GM-CSF تنها بعد از ۸ روز کشت و تیمار با TNF-α ۶۰درصد است. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از آنتی‌بادی به منظور حذف سلول‌های ناخواسته تاثیر چندانی در کاهش و یا افزایش میزان خلوص این سلول‌ها نداشته باشد. در واقع مقاله مروری هارت (۱۶) نشان

می‌دهد که استفاده از آنتی‌بادی برای حذف سلول‌های مغز استخوان قبل از کشت، علاوه بر آسیب رساندن به سلول‌ها باعث حذف برخی از پیش‌سازهای کمتر شناسایی شده سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان می‌شود. از طرفی جدا کردن سلول‌های چسبان با کشت دو ساعته قبل از اضافه کردن سایتوکاین‌ها در این مطالعه، میزان تولید سلول‌های دندریتیک را به شدت تحت تاثیر قرار می‌داد و میزان مرگ و میر این سلول‌ها در محیط کشت افزایش می‌یافت (داده‌ها ارائه نشده است).

اضافه کردن IL-4 به محیط کشت ضمن این که خلوص سلول‌ها را افزایش می‌دهد، میزان بلوغ این سلول‌ها را نیز بعد از تیمار با TNF-α افزایش داد. در مطالعه‌ای که توسط لوتز و همکارانش صورت گرفته نیز نشان داده شده که اضافه کردن IL-4 به محیط کشت سلول‌های دندریتیک در مقادیر کم GM-CSF می‌تواند باعث افزایش بلوغ سلول‌های دندریتیک تولیدی شود (۹). افزایش مشاهده شده در میزان خلوص را می‌توان به خاصیت این سایتوکاین در کاهش تمایز سلول‌ها به منوسیت و ماکروفاژ نسبت داد (۱۷). همچنین استفاده از IL-4 به همراه GM-CSF در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نه تنها میزان بلوغ سلول‌های تولید شده در این روش نسبت به دو روش بعدی بهتر است بلکه قدرت این سلول‌ها در تحریک تکثیر سلول‌های T آلوژن نیز بیش از دو گروه دیگر است. یافته‌ای که مطالعات دیگر نیز آن را تایید می‌کند (۱۸، ۱۹).

نکته مهم دیگری که در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت تعداد سلول‌های تولید شده بر حسب هر موش در هریک از روش‌ها است. متوسط تعداد سلول‌های جدا شده از مغز استخوان‌های تیبیا و فمور هر موش C57BL/6 نزدیک به ۴۰ میلیون سلول است. بنابراین تعداد سلول‌های دندریتیک تولید شده در روش GM-CSF با IL-4 و بدون آن نزدیک به ۲۲ میلیون است. در حالی که این میزان برای روش کشت در پلیت میکروبی ۱۸۰ میلیون سلول دندریتیک به ازای هر موش است. مطالعات اخیر در خصوص استفاده از سلول‌های دندریتیک در ایمنی‌درمانی نشان می‌دهد که افزایش تعداد سلول‌های تزریق شده و همچنین بهبود کیفیت سلول‌های تولید شده می‌تواند نتایج درمانی بهتری را دربرداشته باشد. به عنوان مثال در یک مطالعه برای به دست آوردن نتایج بهتر در پیشگیری از ایجاد تومور حداقل به دو تزریق با تعداد ۶×۱۰^{۵} از سلول‌های دندریتیک پالس شده با آنتی‌ژن توموری نیاز بود (۲۰، ۲۱) و این میزان برای مشاهده اثرات درمانی در حدود $۱۰^{۶}$ سلول است (۲۲، ۲۳). بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از این روش برای تولید سلول‌های دندریتیک در مقادیر بالا مناسب باشد ولی نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که هرچند این روش امکان تولید تعداد زیادی از سلول‌های دندریتیک را فراهم می‌کند ولی قدرت این سلول‌ها در تحریک تکثیر سلول‌های T آلوژن کمتر از سلول‌های تولید شده در روش GM-CSF+IL-4 است. علاوه بر آن سلول‌های تولید شده در این روش نسبت به ایجاد بلوغ توسط فاکتورهای بلوغ مقاوم هستند. این مساله در مواردی که هدف مطالعه بررسی اثر سایتوکاین‌ها و یا فاکتورهای مختلف بر بلوغ سلول‌های دندریتیک باشد، مشکل‌ساز خواهد بود. علت این امر می‌تواند به دلیل تاثیر GM-CSF در مقادیر پایین باشد که در این روش به کار گرفته می‌شود. این در حالی است که مقایسه نتایج به دست آمده با تیمار TNF-α و بدون آن در سلول‌های تولید شده با GM-CSF به همراه IL-4 نشان می‌دهد که این سلول‌ها به چنین تیماری حساس هستند.

مطالعه لوتز و همکارانش نیز نشان می‌دهد کشت سلول‌های مغز استخوان در مقادیر پایین GM-CSF برای تولید سلول‌های دندریتیک باعث ایجاد سلول‌های نابالغی می‌شود که به اثرات TNF-α، LPS و anti-CD40 مقاوم هستند (۹). با این حال به نظر می‌رسد استفاده از این روش در مواردی که نمی‌خواهیم سلول‌ها را با سایتوکاین خاصی تیمار کنیم، برای مشاهده اثرات ناشی از سلول‌های دندریتیک در بهبود علائم بیماری‌ها مناسب باشد. نزدیک به ۷۸ درصد سلول‌های تولید شده در پلیت میکروبی شاخص MHC class II را بر سطح خود بیان می‌کردند. ۷۳درصد سلول‌های دندریتیک تولید شده به روش مشابه در مطالعه لوتز و همکارانش، در روز دهم بعد از کشت این شاخص را بیان می‌کردند که بعد از دو روز کشت با LPS در روز ۱۲ این میزان به ۸۸ درصد افزایش می‌یافت. با این حال دیده شده است که اگر در روش فوق مقدار GM-CSF را به ۵ واحد بر میلی‌لیتر کاهش دهیم، سلول‌های تولید شده همانند سلول‌های دندریتیک نابالغ خاصیت تولروژنیک نشان می‌دهند و قادر خواهند بود از رد پیوند قلب در موشها جلوگیری کنند (۹).

نتیجه‌گیری

جمع بندی مشخصات اصلی روش‌های مورد بررسی در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. این نتایج نشان می‌دهد استفاده از روش GM-CSF+IL-4 با توجه به مزیت‌های زیر بهتر از دو روش دیگر در تولید سلول‌های دندریتیک به خصوص برای مطالعات مربوط به ایمنی درمانی است. هرچند استفاده از کشت با پلیت میکروبی نیز می‌تواند در مطالعات مولکولی و تولید سلول دندریتیک تولروژنیک مفید و مقرون به صرفه‌تر باشد.

۱. استفاده از این روش آسان‌تر از روش‌های قبلی است و نیازی به جداسازی سلول‌های مغز استخوان، قبل از کشت ندارد.

۲. میزان خلوص و همچنین میزان بلوغ در این روش بهتر از دو روش دیگر است.

۳. زمان کشت در این روش کمتر است.

۴. قدرت سلول‌ها در ایجاد پاسخ‌های تکثیری در سلول‌های T آلوژن بیشتر از دو روش دیگر است که نشان دهنده عملکرد قوی‌تر این سلول‌ها است.

۵. این روش به دلیل کوتاه بودن زمان کشت و عدم استفاده از آنتی‌بادی برای جداسازی سلول‌ها، با توجه به تعداد و کیفیت سلول‌های دندریتیک تولید شده از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه‌تر است.

References

1. Yao V, Platell C, Hall JC. Dendritic cells. ANZ J Surg, 2002; 72(7): 501-6

2. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2000; 18: 767-811

3. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. J Clin Immunol, 2005; 25(3): 177-188

4. Ortner U, Inaba K, Koch F, Heine M, Miwa M, Schuler G, Romani N. An improved isolation method for murine migratory cutaneous dendritic cells. J Immunol Methods, 1996; 193(1): 71-79

5. Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. J Exp Med, 1992; 176(1): 47-58

6. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, G. Schuler. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods, 1999; 223(1): 77-92

7. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med, 1992; 176(6): 1693-1702

8. Mendoza L, Bubenik J, Indrova M, Bieblova J, Vonka V, Simova J. Freezing and thawing of murine bone marrow-derived dendritic cells does not alter their immunophenotype and antigen presentation characteristics. Folia Biol (Praha), 2002; 48(6): 242-245

9. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, Schuler G, Austyn JM. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. Eur J Immunol, 2000; 30(7): 1813-1822

10. Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. Physiol Rev, 1996; 76(4): 927-947

11. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med, 1973; 137(5): 1142-1162

12. Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H. Origin and differentiation of dendritic cells. Trends Immunol, 2001; 22(12): 691-700

13. Yoneyama H, Matsuno K, Matsushimaa K. Migration of dendritic cells. Int J Hematol, 2005; 81(3): 204-207

14. Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. Blood, 2000; 96(9): 3029-3039

15. Saunders D, Lucas K, Ismaili J, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, Shortman K. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med, 1996; 184(6): 2185-2196

16. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood, 1997; 90(9): 3245-3287

17. Hart PH, Bonder CS, Balogh J, Dickensheets HL, Donnelly RP, Finlay-Jones JJ. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13. J Leukoc Biol, 1999; 66(4): 575-578

18. Wells JW, Darling D, Farzaneh F, Galea-Lauri K. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. Scand J Immunol, 2005; 61(3): 251-259

19. Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. J Immunol, 1999; 162(1): 168-175

20. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. Nat Med, 1995. 1(12): 1297-1302

21. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. J Exp Med, 1996; 183(1): 283-7

22. Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G, Endres S. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. J Immunol, 2000; 165(11): 6278-6286

23. Koido S, Kashiwaba M, Chen D, Gendler S, Kufe D, Gong J. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. J Immunol, 2000; 165(10): 5713-5719