جداسازی و تخلیص زیرمجموعه‌های سلولهای کشنده طبیعی با استفاده از مایع رویی کشت سلولهای تک‌هسته‌ای به‌کمک PHA و ارزیابی قدرت کشندگی آنها

دکتر نریمان مصفا، استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
فرزانه لیبی

Isolation and Purification of Natural Killer Cells Subpopulations Using Mononuclear Cells

ABSTRACT

Natural Killer (NK) cells are the main lymphocyte population expressing P75 B chain of the IL-2 receptor (IL-2R). Consequently, incubation of peripheral blood lymphocytes with IL-2 induce selective activation of NK cells and results in NK activity and generation of Tymphokine activated killer (LAK) cell activity and proliferation. One of the early events during IL-2 activation of peripheral blood lymphocyte in both rodents and humans is adherence of some NK cells to plastic surface. The cells adherent to plastic after 24 hr of culture with IL-2 are almost exclusively $CD56^+$, have the morphology large granular cells to yield a highly enriched population of activated NK cells that have been used for systemic adoptive immunotherapy.

To test these hypothesis, we used highly purified population of human peripheral NK cells through the biological and nonimmunclogical phenotyping technique. Blood mononuclear cells were separated by centrifugation of ficol-hypaque gradient from normal blood donor (20-30 years age). We depleted after purification of nonadherent cells with nylonwool. We collected with rossette technique to remove cells with high affinity SRBC receptors. These cells sparate in two parts A-NK and NA-NK by mononuclear celss avtivated supernatant media.

The main objective Result of this study show that the subpopulation of human NK cell which develope early adherent to Plastic surface in the presence of supernatant mononuclear celss activation media was functionally more cytotoxic and killed K_{562} Targets in single cell cytotoxicity manner and LDH activity assay than nonadherent NK cells and resting NK cells.

Key Words: NK Cells; plastic Adherence suppernatant cultnre; PHA; cytotoxicity

چکیده

سلولهای کشنده طبیعی، اصلی‌ترین جمعیت لنفوسیتی می‌باشند که با عرضه و بیان گیرنده اینترلوکین دو (IL2R) و از نوع تحت ساختمان بتای ۷۵ کیلودالتونی، قدرت پاسخ بالایی در مجاورت این فاکتور داشته و بخوبی درجات تکثیری و عملکردی توانمندی را در جهت ایجاد سلول کشنده فعال شده با لنفوکاین Lymphokine Activated Killer Cell نشان می‌دهند. یکی از وقایع زودرس در بروز این فعالیت، اتصال برخی از سلولهای NK به سطوح پلاستیکی می‌باشد (Adherent-NK cells) بطوری که ۲۴ ساعت بعد از کشت سلولها در مجاورت با IL2 و با افزایش مقادیر غلظتی، افزایش در عرضه مارکر CD56 صورت گرفته و بطور محسوسی قدرت کشندگی بالا در مقایسه با (Non-Adherent Cells) پیدا می‌نمایند. این چنین سلولهای چسبنده با قدرت سیتوتوکسیتی و ضدتوموری، مناسب برای ایمونوتراپی آداپتیو می‌باشند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-19]

در این بررسی، سعی گردیده که با بکارگیری از تکنیک‌های جداسازی و تخلیص سلولهای NK از محتویات (Peripheral Blood Mononuclear Cells) PBMNC خون افراد سالم، مرد و جوان، مجاورت آنها با مایع رویی کشت لنفوسیتهای تحریک شده با PHA که غنی از انواع سیتوکاین‌ها بخصوص IL2 می‌باشد، بطور اتولوگوس، سلولهای چسبنده به سطوح پلاستیکی (A-NK) تولید نموده و با ارزیابی قدرت سیتوتوکسیتی آنها به روش اسلاید ژل و نیز سنجش LDH acticity مایع رویی، با دو گروه NA-NK و Resting-NK مقایسه گردیدند که در نهایت، سلولهای A-NK دارای توان کشندگی بالاتری به نسبت سلولهای NA-NK داشته و بخصوص اختلاف واضحی را با سلولهای NK که در طول کشت، مایع رویی دریافت ننموده بودند، نشان دادند.

واژه‌های کلیدی : سلولهای NK؛ چسبندگی به سطوح پلاستیکی؛ مایع رویی کشت؛ PHA؛ سیتوتوکسیتی

مقدمه

در سلولهای تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان، گروههای مختلفی موجودند که دارای فعالیت کشندگی می‌باشند. این سلولها شامل سلولهای کشنده طبیعی (Natural Killer Cells) (NKCs) Cytotoxic T Cells ، Natural Cytotoxic cells (NCCs) (CTL) و cells می‌باشند. سلولهای NK، ۱۰ الی ۱۵ درصد سلولهای تک‌هسته‌ای خون محیطی را تشکیل می‌دهند و از حیث منشأ، سومین جمعیت لنفوسیتی (Third Population of Lymphocyte) قلمداد می‌گردند. از حیث مورفولوژیک متعلق به دودمان لنفوسیتی با گرانولهای درشت (Large granular lymphocyte) بوده و از نظر عملکرد، به عنوان سلولهایی با توان ضدتوموری، آن هم بدون نیاز به حساسیت قبلی، و تقریباً غیرمحدود به آنتی‌ژنهای سازگاری سنجی، معرفی می‌گردند. علاوه بر انهدام سریع سلولهای نئوپلاستیک، توان حذف سلولهای آلوده به انواع پاتوژنهای داخل سلولی منجمله ویروسها را دارا بوده و علاوه بر این فعالیتها، در تنظیم سیستم ایمنی و کنترل رشد سلولهای هماتوپوئتیک نقش بسزایی دارند.

در راستای کشف و تولید لنفوسیتهای توانمند و مؤثر تحت عنوان : Lymphokine Activated Killer Cells (LAKs) در آزمایشگاه که با Recombinant inter leukin 2 (rIL2) ، توان تومورکشی فراوان یافته‌اند، سلولهای کشنده طبیعی به عنوان اصلی‌ترین گروه سلولی در پاسخ به سیتوکاین فوق، قلمداد گردیدند.

Herberman و همکاران در دهه ۱۹۹۰، با انجام تحقیقات متعدد و وسیعی، تولید لمفوسیتهای افکتور و به کمک rIL2 را محدود به سلولهای NK در گردش نموده و با تکیه بر اصول خاصیت چسبندگی سلولهای فعال شده به سطوح پلاستیکی و افزایش عرصه مواکولهای چسبندگی بخصوص مارکر CD56 موفق به تولید دو زیرمجموعه Adherent-NK ، Non, Adherent-NK گردیدند.

آنچه مسلم است، سلولهای با خاصیت چسبندگی بالا به سطوح پلاستیکی، توان سیتوتوکسیتی افزایش یافته‌ای را نیز در مقابله با سلولهای هدف توموری نشان می‌دهند. و بنابراین زیرمجموعه‌های فوق می‌توانند در روش‌های ایمونوتراپی تحت عنوان :

Adaptive Cellular Immunotherapy به منظور درمان بیماران مبتلا به سرطان مورد استفاده قرار گیرند.

روش و مواد

لنفوسیتهای خون محیطی، بدون تحریک آنتی‌ژنیک یا میتوژنیک، قادر به ادامه حیات در محیط‌های کشت آزمایشگاهی نمی‌باشند. سلولهای کشنده طبیعی از آنجایی که، تاکنون پاسخ قابل برآوردی در مقابله با چنین تحریکاتی از خود بروز نداده‌اند و فقط در حضور مقادیر بالای rIL2 قادر به فعالیتند، مشکلاتی فراتر از توان کشت سایر لنفوسیتها در محیط آزمایشگاهی به همراه دارند. در این تحقیق یکی از منابع تأمین سیتوکاین فوق، مایع رویی کشت لنفوسیتهای فعال شده خون افراد سالم به کمک PHA می‌باشد که لزوماً بخش ابتدایی تحقیق را تشکیل می‌دهد. در مراحل بعد، سلولهای کشنده طبیعی تخلیص شده از خون محیطی به کمک فاکتور فوق، مراحل چسبندگی و افزایش خاصیت کشندگی را از خود بروز خواهند داد.

۱ـ تهیه مایع رویی کشت سلولهای تک‌هسته‌ای

محیط کشت مورد استفاده Complete tissue culture medium شامل :

RPMI 1640 + 10% FCS + 50 IU/ml Penicillin + 5 μ g/ml Streptomycin

منابع قابل دسترس به منظور تهیه خون سالم، داوطلبان سالم، مرد و جوان ۲۰ الی ۳۰ ساله بودند. سلولهای تک‌هسته‌ای خو

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-19]

محیطی (PBMNC) به کمک استفاده از گرادیان غلظتی فایکول هیاک (1074) از خون هپارینه جداسازی گردیدند. و به منظور فعال‌سازی و القاء ترانسفورماسیون لنفوسیتی از مایتوژن (PHA) (فیتوهماگلوتینین A) و روش L.T.T استفاده گردید. (به ازای هر 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر، ۰/۲۵ میلی‌گرم PHA اضافه گردید. (پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته در دستگاه CO2 Incubator، مایع رویی در کرایوتیوپهای مخصوص، جمع‌آوری گردید و در دمای استفاده $-70^{\circ}C$ قرار گرفت تا برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گیرد.

۲ـ جداسازی سلولهای کشنده طبیعی و تخلیص آنها

خون مورد استفاده در این مرحله نیز از منابع فوق‌الذکر تهیه می‌گردد و به منظور جمع‌آوری سلولهای تک‌هسته‌ای خون محیطی، از گرادیان غلظتی فایکول استفاده گردید. به کمک ستونهای پر شده از نایلون وول، و مطابق روش استاندارد، لنفوسیتهای T و سلولهای کشنده طبیعی جداسازی گردیدند و با انجام تکنیک روزت، و بر اساس وجود گیرنده با تمایل بالا برای گلبول قرمز گوسفند در سطح لنفوسیتهای T، سلولهای کشنده طبیعی که در همان مدت انکوباسیون، تشکیل روزت نداده‌اند، تفکیک می‌گردند. طبق تجربه این تحقیق طول مدت انکوباسیون ۳ ساعت و دمای آن $37^{\circ}C$ در نظر گرفته شد.

بدین ترتیب مجدداً با استفاده از گرادیان غلظتی فایکول، لنفوسیتهای T که تشکیل روزت داده‌اند از سلولهای کشنده طبیعی که تشکیل روزت نداده‌اند (به دلیل سنگین‌تر شدن) تفکیک گردیده و نهایتاً سلولهای کشنده طبیعی تخلیص گردیدند.

۳ـ جداسازی زیرگروههای سلولهای کشنده طبیعی

سلولهای بدست آمده از مرحله دوم به نسبت مساوی به دو فلاسک مخصوص کشت سلول، منتقل گردیدند. بدین ترتیب در بدو ورود به این مرحله، دو گروه سلول یکی به عنوان کنترل و دیگری گروه مورد آزمایش در نظر گرفته شدند. گروه اول در فلاسک حاوی سلولهای Allogenic Feeder که همان ماکروفاژهای چسبنده به سطوح پلاستیکی‌اند، قرار گرفتند و دریافت کننده مایع رویی کشت لنفوسیتهای فعال شده به کمک PHA بودند. (به ازای هر 10^6 سلول)، ۱ میلی‌لیتر مایع رویی کشت در ۱۰ میلی‌لیتر CTCM). گروه دوم یا همان کنترل تحقیق، فلاسک دریافت کننده سلولهای کشنده طبیعی بدون مایع رویی کشت و سلول feeder بودند.

در طول مدت انکوباسیون، بعد از ۲۴ ساعت، فلاسک اول، حاوی دو زیرگروه عمده سلولهای کشنده طبیعی تحت عنوان Adherent-NK cells (چسبنده به ته فلاسک) و Non-Adherent NK cells گردیدند. فلاسک دوم، بدون وقوع پدیده فوق، حاوی سلولهای غیرفعال شناور یا همان Resting NK cells بودند.

بدین ترتیب سه زیر گروه سلولهای کشنده طبیعی تخلیص و آماده ارزیابی قدرت کشندگی گردیدند.

ب ـ *ارزیابی قدرت کشندگی* Cytotoxicity *سلولهای کشنده طبیعی*

۱ـ کشت و آماده سازی سلولهای K562 (سلولهای هدف)

این سلولها، مناسب‌ترین هدف سلولی به منظور برآورد سیتوتوکسیتی سلولهای کشنده طبیعی می‌باشند. سلول K562، لاین لوکمیایی لنفوبلاستوئیدی می‌باشد که در برخی منابع آن را از نوع Hairy cell leukemia معرفی نموده‌اند. سلولهای منجمد شده با DMSO (دی‌متیل سولفاکساید) موجود در تانک ازت مایع، خارج و بلافاصله ذوب گردیدند و در فلاسک‌های مخصوص و با محیط کشت حاوی ۲۰٪ FCS در دستگاه CO2-Incubator نگهداری شدند.

لازم به توضیح است که در هر مرحله از تحقیق، سلولهای بدست آمده از عملیات تخلیص و جداسازی و نیز سلولهای K562، مرتباً شمارش و برآورد سلامت و حیات می‌گردیدند. و Viability بالای ۹۵٪ تأیید کننده کیفیت کار تحقیق بوده است.

۲ـ *انجام آزمون سایتوتوکسیتی به کمک دو روش آزمایشگاهی*

۱ـ روش Single-Cell Cytotoxicity

اصول این روش، بر مبنای اتصال سلول افکتور به سلول هدف می‌باشد که متعاقباً بر اساس توان کشندگی سلول افکتور، مرگ و تخریب سلول هدف را به همراه خواهد داشت.

با تهیه اسلایدهای پوشیده شده با ژل آگاروز ۱٪ و ضخامت ۱ میلی‌متر که به منظور تثبیت دو مجموعه افکتور و تارگت مورد استفاده قرار گرفت، می‌توان قدرت کشندگی زیرمجموعه‌های سلول کشنده طبیعی را ارزیابی نمود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-19]

همانگونه که در مراحل قبلی ذکر گردید، سلولهای شناور در فلاسک کنترل، با سلولهای تفکیک شده از حیث خاصیت چسبندگیدر فلاسک مورد، مجموعه‌های مختلف افکتور در این تحقیق، را تشکیل می‌دهند. هر یک از زیرگروههای فوق : سلولهای R-NK به سادگی از فلاسک خارج شده و برای انجام سیتوتوکسیتی آماده می‌گردند. سلولهای NA-NK نیز از فلاسک گروه آزمایش خارج گردیده و لیکن به منظور تخلیه سلولهای A-NK، به استفاده از شوک برودتی و نیروی واشینگ، به کندن سلولها از ته فلاسک مبادرت ورزیدیم و در حقیقت سلولهای A-NK با روش فوق، Decant گردیدند.

بلافاصله سلولهای هدف از قبل آماده شده و تعیین شمارش گردیده به نسبتهای ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳ با سه گروه سلول افکتور مجزا گردیده در میکروتیوبهای کونیکال مخلوط گردیدند و بدین ترتیب مجموعه (E/T) در طی ۱۲ ساعت انکوباسیون در شرایط استاندارد قرار گرفتند. توسط سانتریفیوژ (دور پایین) محتویات (E/T) از مایع رویی جدا گردیده و با رعایت اصول حجمی و به کمک پیپت پاستور، بر روی اسلایدهای پوشیده از ژل آگارز گسترش یافتند. قبل از انجام این عمل، به توسط میکروسکوپ، مجموعه‌های بهم چسبیده (E/T) و تأیید وقوع چسبندگی، مشاهده گردیدند. مجدداً لامهای پوشیده از سلولها در دمای $37^{\circ}C$ و به مدت ۳ ساعت، انکوبه گردیدند. سپس به کمک افزودن تریپان بلو ۰/۴ درصد؛ بر روی گسترش سلولها، مشاهده میکروسکوپیک مجموعه (E/T) صورت پذیرفت و در این حال، سلولهای هدف سیتولیز شده که دچار تخریب سیتوپلاسمیک گردیده‌اند، مشخص شدند.

به کمک سه فرمول زیر، عملکرد کشندگی سه تحت جمعیت سلولهای کشنده طبیعی مورد محاسبه قرار گرفتند:

فرمول A

$$\frac{\text{تعداد سلولهای عمل کننده متصل به هدف}}{\text{کل تعداد سلولهای عمل کننده}} \times ۱۰۰ =$$

درصد تشکیل دهنده کونژوگه (E:T) به کل جمعیت سلول عمل کننده یا E

فرمول B

$$\frac{\text{تعداد سلولهای عمل کننده متصل به سلول هدف مرده}}{\text{تعداد سلولهای عمل کننده متصل به هدف}} \times ۱۰۰ =$$

درصد سلولهای کشنده در کونژوگه‌ها

در هر مجموعهٔ محاسبه فوق، ۲۰۰ سلول E را شمارش می‌کنیم، فرمول A به ما نشان می‌دهد که در ۲۰۰ سلول عمل کننده، چند سلول عمل کننده به سلول هدف چسبیده است یعنی درصد سلولهای عمل کننده تشکیل دهنده کونژوگهٔ E/T ، به کل ۲۰۰ سلول عمل کننده محاسبه می‌شود.

در فرمول B، درصد کونژوگه‌های محتوی سلولهای هدف مرده را اینطور محاسبه می‌کنیم که تعداد سلولهای عمل کننده‌ای که به سلول هدف مرده چسبیده‌اند را شمارش کرده و تقسیم بر تعداد سلولهای عمل کننده تشکیل دهنده تمام کونژوگه‌ها می‌کنیم.

فرمول C

$$\frac{\text{درصد کونژوگه‌های حاوی سلولهای مرده فرمول B} \times \text{درصد کونژوگه‌های فرمول A}}{۱۰۰} =$$

درصد جمعیت سلولهای کشنده به کل سلولهای عمل کننده

در فرمول C، درصد جمعیت کشنده‌ها به کل سلولهای عمل کننده با استفاده از فرمول A، B صورت می‌گیرد.

۳ـ روش اندازه‌گیری LDH activity

پس از طی مرحله انکوباسیون مجموعه تارگت و افکتور E/T، و انجام سانتریفوژ، سلولهای ته‌نشین شده، مورد ارزیابی سیتوتوکسیتی به روش تثبیت در ژل آگارز قرار گرفتند و مایع رویی حاصله به منظور سنجش میزان LDH (لاکتات دهیدروژناز) مورد آزمایش قرار گرفت. LDH آزاد شده از سلولهای هدف کشته شده پس از انجام انکوباسیون فوق به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌های تهیه شده به ردیف‌های مشخص ازمیکروپلیت‌های مخصوص ته گرد اضافه گردید، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر سوبسترا تحت عنوان و میزان :

$۵/۴\times۱۰^{-۲}$ML(+) Lactate, $۶/۶\times۱۰^{-۴}$ M2-P -Iodophenyle -3-P nitro phenyl Tetrazolium chloride, $۲/۸\times۱۰^{۴}$ Mephenazin methosulfate, $۱/۳\times۱۰^{-۳}$ M NAD/ ۰/۲ M tris butter

با pH = ۸/۲ اضافه می‌شود. سپس بعد از ۵-۳ دقیقه، محتویات فوق در هر میکروپلیت و در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه Elisa Reader خوانده می‌شود و مقادیر LDH موجود طبق فرمول زیر محاسبه می‌گردد:

$$C\% \frac{E - S}{M - S}$$

که متذکر می‌شویم :

C : درصد سیتوتوکسیتی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-19]

M : حداکثر LDH آزاد شده از تخریب کامل سلول هدف

S : میزان LDH آزاد شده بطور خودبخود بدون حضور سلول افکتور

سپس در فرمول $\frac{C\%\ [T]}{100}$: V میزان لیز نهایی، مشخص می‌گردد.

با ذکر اینکه :

T : غلظت سلول در هر well

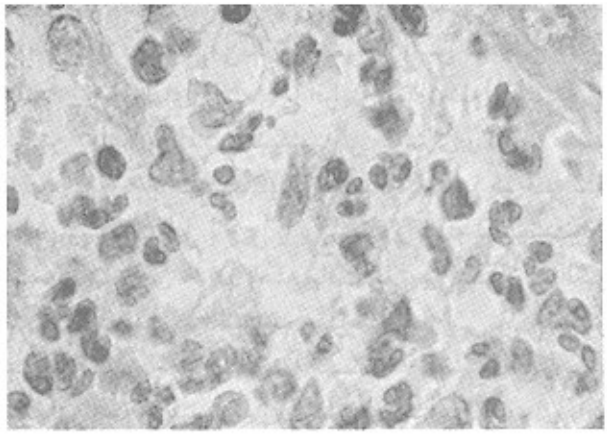
E : میزان LDH آزاد شده از سلول هدف در حضور لنفوسیت

V : میزان لیز

یافته‌ها

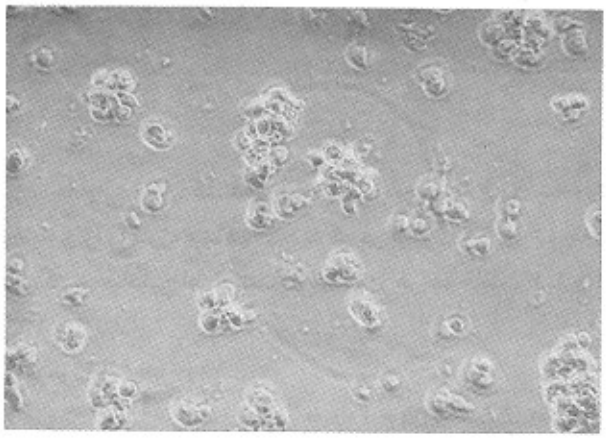
در اولین مرحله از مشاهده یافته‌ها، لازم بود تا اطمینان کامل از وضعیت سلولهای تحت کشت با PHA به منظور تهیه مایع رویی، بدست آوریم. و در حقیقت از وقوع ترانسفورماسیون و بلاستوژنز و تکثیر در سلولها اطمینان حاصل نماییم. از آنجایی که استفاده از تیمیدین نشاندار به منظور ارزیابی وضعیت ترانسفورماسیون، به سبب آلوده شدن محیط مزبور به عوامل رادیواکتیو و نیز آلودگیهای محیطی، مشکلاتی را در سر راه تحقیق قرار می‌داد، بر آن شدیم تا طبق روش سیتولوژیک، سلولهای تحت کشت را پس از اتمام انکوباسیون، توسط گیمسا رنگ‌آمیزی نموده و فاکتورهای مهم در ارزیابی شدت ترانسفورماسیون را مورد بررسی قرار دهیم.

شکل ۱ـ واکوئولیزاسیون و افزایش حجم سیتوپلاسم، ایجاد هستک در سلولهای ترانسفور شده در T.T.L که فعالیت لنفوسیتی و قدرت مایع رویی کشت را نشان می‌دهد.



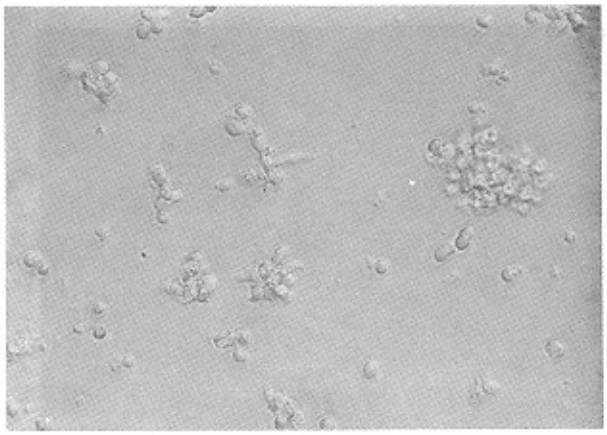
همانگونه که در تصویر ۱ ملاحظه می‌گردد، تغییرات مورفولوژیک سلولهای کشت شده شامل واکوئولیزاسیون سیتوپلاسم، شفاف گردیدن کروماتین هسته، افزایش حجم سیتوپلاسم و تغییر اندکس حجم هسته به سیتوپلاسم و تکثیر قابل توجه سلولهای لنفوسیتی، بیانگر وقوع ترانسفورماسیون در آنهاست و مایع رویی غنی از سیتوکاتین‌های رشد سلولی است.

تصویر ۲ـ سلولهای کشنده طبیعی در وضعیت غیرفعال و بدون حضور مایع رویی کشت لنفوسیتهای فعال شده (R-NK cells)



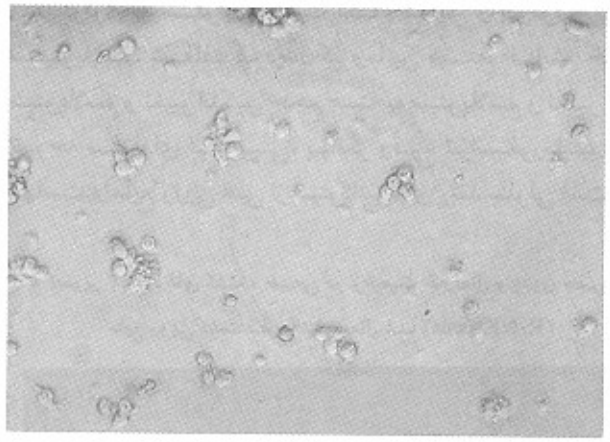
نتایج حاصله از تفکیک زیرمجموعه‌های سلولهای کشنده طبیعی با توجه به تصاویر ۲،۱ و ۳ نشان می‌دهد که در گروه مورد آزمایش، دو زیرمجموعه A-NK با توجه به چسبندگی به سطح ته فلاسک و NA-NK با توجه به شناور بودن آنها، از یکدیگر تفکیک گردیده و در فلاسک کنترل که منظور، انجام انکوباسیون مشابه شرایط گروه آزمایش ولی بدون مایع رویی و سلولهای feeder می‌باشد، تنها سلولهای R-NK به چشم می‌خورند.

تصویر ۳ـ هر دو زیرمجموعه (A-NK cells) و (NA-NK cells) قبل از خروج مایع محیط کشت از درون فلاسک



[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-19]

تصویر ٤ـ سلولهای کشنده طبیعی چسبنده به ته فلاسک (A-NK cells)



در مقایسه میزان کشندگی سه تحت مجموعه فوق به روش اسلاید و ژل آگارز، مشاهده گردید که در فرمول A و با توجه به اندازه‌گیری میانگین اعداد شمارش شده در هر سه غلظت ۱:۱ و ۱:۲ و ۱:۳ عبارتند از :

فرمول A:

$$\text{A-NK} = \frac{۷۰}{۲۰۰} \cdot ۰/۳۵ \times ۱۰۰ = ٪۳۵$$

$$\text{NA-NK} = \frac{۵۵}{۲۰۰} \cdot ۰/۲۷ \times ۱۰۰ = ٪۲۷$$

$$\text{R-NK} = \frac{۲۳}{۲۰۰} \cdot ۰/۱۱۵ \times ۱۰۰ = ٪۱۱/۵$$

در فرمول B:

$$\text{A-NK} = \frac{۳۴}{۴۸} \cdot ۰/۷۱ \times ۱۰۰ = ٪۷۱$$

$$\text{NA-NK} = \frac{۲۸}{۳۷} \cdot ۰/۷۵ \times ۱۰۰ = ٪۷۵$$

$$\text{R-NK} = \frac{۱۶}{۳۶} \cdot ۰/۴۴ \times ۱۰۰ = ٪۴۴$$

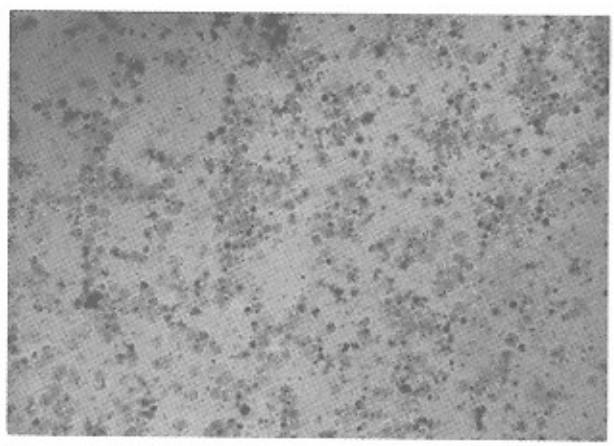
فرمول C نهایی :

$$\text{A-NK} = \frac{٪۳۵ \times ٪۷۱}{۱۰۰} = ۲۴/۸۵$$

$$\text{NA-NK} = \frac{٪۲۷ \times ٪۷۵}{۱۰۰} = ۲۰/۲۵$$

$$\text{R-NK} = \frac{٪۱۱/۵ \times ٪۴۴}{۱۰۰} = ۵/۰۶$$

تصویر ٥ـ نمایی کلی از واکنشهای سیتوتوکسیتی سلولهای عمل کننده و هدف (لیز سلولها بخوبی نمایان است)



در تصویر ۴، نمایی کلی از واکنشهای سیتوتوکسیتی سلولهای افکتور و هدف، نشان داده شده است.

نتایج حاصله از انجام روش LDH activity در جدول زیر آمده است :

نسبت E:T نوع سلول	۱:۱	۱:۲	۱:۳
A-NK	۰/۳۸۹	۰/۵۲۲	۰/۶۵۲
NA-NK	۰/۳۷۳	۰/۵۳۶	۰/۳۳۵
R-NK	۰/۳۱۱	۰/۳۵۶	۰/۳۷۶

بحث

مایع رویی کشت سلولهای لنفوسیتی، منبع اصلی در ردیابی و ارزیابی پروفایل سایتوکاینی چه در جهت تقویت ایمنی سلول و چه در هدایت ایمنی به سمت تولید آنتی‌بادی، مورد استفاده بسیار قرار می‌گیرد. و علاوه بر آن، آزمون L.T.T، روش معمول آزمایشگاههای ایمنی سلولی، منبع طبیعی و قابل کنترلی از انواع فاکتورهای رشد ایمونولوژیک خصوصاً IL2، IFN-γ می‌باشد. و ما نیز، با انگیزهٔ اثبات کاربردی بودن این محتوای سیتوکاینی، بر آن شدیم تا به جای استفاده از rIL2 بتوانیم، زیرمجموعه‌های مختلف سلولهای کشنده طبیعی را از یکدیگر تفکیک و متمایز گردانیم.

نتایج این تحقیق با مطالعات و کوششهای انجام شده توسط تیم Herberman و همکاران مقایسه گردید. اولاً اینکه، با استفاده از مایع رویی کشت لنفوسیتی، دو تیپ سلولی A-NK ، NA-NK بخوبی از یکدیگر تفکیک گردیده و عملکردی مشابه با rIL2 را نشان دادند. فقدان مرحله تکاملی فوق در غیاب مایع رویی کشت یعنی در سلولهای R-NK مؤید این کوشش است. و بخوبی جایگزین شدن این منبع طبیعی و غنی را بجای rIL2 نشان می‌دهد.

علاوه بر توان مایع رویی کشت در تخلیص و جداسازی زیرمجموعه‌های سلولهای کشنده، عملکرد سیتوتوکسیتی آنها نیز در مقایسه با R-NK، افزایش بالایی نشان داد، بطوری که در روش Single Cell Cytotoxicity ، میزان کشندگی سلولهای A-NK در مقایسه با NA-NK نیز بالاتر بوده و با نتایج تحقیق تیم Herberman، مطابقت می‌نماید. حتی در روش سنجش LDH Activity نیز سلولهای A-NK، با افزایش تعداد سلولهای هدف و بالا رفتن E:T Ratio درصد کشندگی بیشتری را نشان دادند. سلولهای NA-NK نیز با افزایش نسبت T:E تا مرحله 1:2، خاصیت سیتوتوکسیتی بالایی را بروز داده و البته در نسبت 1:3 میزان مرگ سلولهای هدف کاهش یافت. با تعیین میزان میانگین سیتوتوکسیتی در سه نسبت حاصله، باز می‌توان افزایش سیتوتوکسیتی را در مقایسه با R-NK نشان داد. البته سلولهای R-NK نیز میزان کشندگی افزایش یافته‌ای را در نسبت‌های بالاتر E به T نشان می‌دهند.

تنها در بین دو مجموعه R-NK و NA-NK در نسبت 1:3،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-19]

نتایج متفاوتی مشاهده می‌گردد (روش LDH) که بیانگر وقوع پدیده‌ای دیگر است بدین صورت که در نسبت (1:3) RN-KN، افزایش تعداد سلولهای هدف باعث جذب مواد غذایی محیط گشته و به دلیل فقدان مایع سایتوکاینی مورد نظر، سلولهای افکتور R-NK) نیز دچار مرگ گشته و مجموعاً موجب افزایش میزان LDH و نیز سلولی در مقایسه با نسبت 1:3 سلولهای NA-NK می‌باشد.

بطور خلاصه می‌توان ادعا نمود که محتوای غنی از سایتوکاین مایع رویی کشت لنفوسیتی به کمک تحریک با PHA، توانسته است اولاً زیرمجموعه‌های سلولهای کشنده طبیعی را تفکیک و تخلیص نموده و ثانیاً توان سیتوتوکسیتی سلولهای فوق را افزایش دهد و این نتایج قابل مقایسه با نتایج مرجع مورد تأکید ما، یعنی تیم Herberman می‌باشد که نتایج فوق را در رابطه با استفاده از rIL2، کسب نموده است.

پیشنهاد نهایی و اصلی این تحقیق، استفاده از مجموعه فعالیتی فوق به عنوان سلولهای با عملکرد LAK و اثبات نقش سیتوتوکسیتی آنها در بررسیهای in vivo می‌باشد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر پرویز پاکزاد، دکتر علیرضا سالک مقدم، دکتر شاهپور شاه‌قاسم‌پور به دلیل همکاری و مساعدتهایشان و نیز از دکتر محمد زهیرحسن که از راهنمائیهایشان بهره بسیار بردیم از سرکار خانم دکتر اردستانی، استاد گرانقدر I.B.B که با انجام روش LDH-Activity در آزمایشگاه گروهشان ، کمک ارزنده‌ای به این تحقیق نمودند و از جناب دکتر ضیایی که در همان دانشکده و با هدیه لاین K562، مسیر این تحقیق را یاری بسیار فرمودند. سرکار خانم شهلا سره، مسؤول بخش کشت سلول مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون که در محضرشان تجربیات گرانقدری آموختم.

منابع

1- Abul K. Abbas., Cellular and molecular immonology, second edition W.B. Saunders (1991).

2- Carol, K., An enzyme release assay for natural cytotoxicity, Journal of Immunological Method, 64 (1983) 313-320.

3- Chau-ching liu., Identification, isolation, and characterization of a novel cytotoxic in murin cytolytic lymphocytes, Cell, 51 (1987) 393-403.

4- Dalgleish, A.G., Tumor immunotherapy and cancer vaccin first published cambridge university press 1996.

5- Gallagher, G: Tumor immonobiology, IRL press 1993.

6- Daniel P. Stites: Basic and clinical immunology sevent editions, Alange medical book 1991.

7- Garara Anne: The role of cytokin in determing T cell furction. Current Opinin in Immunology, 6(1994).

8- Hilary, S., NK cell proliferation and inflamation, Immunology and cell Biology, 74(1996) 473-480.

9- January, Travers : Immunobiology first edition Black well 1994.

10- John, R., An improved method for the generation of human ly,phokine activated killer cells, Journal of Immunological Methods, 100 (1987) 137-145.

11- Nikola, L., Distine phenotypic and functional characteristics of human natural killer cells obtained by rapid interleukin 2-induced adherence to plastic, Cellular Immunology 151 (1993) 133-157.

12- Pai, K., Studies on the natural killer cell activity of human on adherent mononuclear celswith a tumor necrosis factor interleukin -1, interferon γ and ciplatin, Neoplasma, 39 (1992) 363-367.

13- Papa, S., Natural killer function in flowcytometry evaluation of NK lytic activity on K562 cell line, J. Immunol Meth, 107 (1988) 73-78.

14- Rose NR, Friedman, H: Manual of clinical Immunology, American society for Microbiology fourth edition washington press 1996.

15- Satoshiya, sumura, Immunotherapy of liver metastases of human gastric carcinoma with interlekine-2 activated natural killer cells, cancer. Reserach., 54 (1994) 3808-3816.

16- Theresa, L., Whiteside., The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer, Current Opinion in Immunology, 7(1990) 704-710.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-19]