

# جداسازی و تخلیص زیرمجموعه‌های سلولهای کشنده طبیعی با استفاده از مایع رویی کشت سلولهای تک هسته‌ای به کمک PHA و ارزیابی قدرت کشندگی آنها

دکتر نریمان مصفا، استادیار گروه ایمنولوژی، 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<sup>+</sup>, 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 nonimmunological 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 rosette 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<sub>562</sub> 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 culture; PHA; cytotoxicity

## چکیده

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 ایمنوتراپی آداپتیو می‌باشند.

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

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 مینوژنیک، قادر به ادامه حیات در محیط‌های کشت آزمایشگاهی نمی‌باشند. سلول‌های کشته شده طبیعی از آنجایی که، تاکنون پاسخ قابل برآوردی در مقابله با چنین تحریکاتی از خود بروز ندادند 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 کشته شده طبیعی تخلیص شده از خون محیطی به کمک فاکتور فوق، مراحل چسبندگی و افزایش خاصیت کشتندگی را از خود بروز خواهند داد.

### ۱- تهیه مایع رویی کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای

محیط کشت مورد استفاده Complete tissue culture medium شامل:

RPMI 1640 + 10% FCS + 50 IU/ml Penicillin + 5  $\mu$ g/ml Streptomycin

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

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 activity مایع رویی، با دو گروه NA-NK و Resting-NK مقایسه گردیدند که در نهایت، سلول‌های A-NK دارای توان کشتندگی بالاتری به نسبت سلول‌های NA-NK داشته و بخصوص اختلاف واضحی را با سلول‌های NK که در طول کشت، مایع رویی دریافت نموده 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 کشتندگی می‌باشند. این سلول‌ها شامل سلول‌های کشته شده طبیعی (NKCs) (Natural Killer Cells)، 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 ضد توموری، 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 و ویروس‌ها را دارا بوده و علاوه بر این فعالیت‌ها، در تنظیم سیستم ایمنی و کنترل رشد سلول‌های هماتوپوئیتیک 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 کشته شده طبیعی به عنوان

(CTCM). گروه دوم یا همان کنترل تحقیق، فلاسک دریافت کننده سلولهای کشته طبیعی بدون مایع رویی کشت و سلول feeder بودند.

در طول مدت انکوباسیون، بعد از ۲۴ ساعت، فلاسک اول، حاوی دو زیرگروه عمده سلولهای کشته طبیعی تحت عنوان Adherent-NK cells (چسبیده 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 زیرگروه سلولهای کشته طبیعی تخلیص و آماده ارزیابی قدرت کشتندگی گردیدند.

## ب - ارزیابی قدرت کشتندگی Cytotoxicity سلولهای

### کشته طبیعی

۱- کشت و آماده سازی سلولهای K562 (سلولهای هدف) این سلولها، مناسبترین هدف سلولی به منظور برآورد سیتوتوکسیته سلولهای کشته طبیعی می باشند. سلول K562. لاین لوکمیاوی لنفوبلاستوئیدی می باشد که در برخی منابع آن را از نوع Hairy cell leukemia معرفی نموده اند. سلولهای منجمد شده با DMSO (دی متیل 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 می گردیدند. و Viability بالای ۹۵٪ تأیید کننده کیفیت کار تحقیق بوده است.

## ۲- انجام آزمون سایتوتوکسیته به کمک دو روش

### آزمایشگاهی

#### ۱- روش Single-Cell Cytotoxicity

اصول این روش، بر مبنای اتصال سلول افکتور به سلول هدف می باشد که متعاقباً بر اساس توان کشتندگی سلول افکتور، مرگ و تخریب سلول هدف را به همراه خواهد داشت. با تهیه اسلایدهای پوشیده شده با ژل آگاروز ۱٪ و ضخامت ۱ میلی متر که به منظور تثبیت دو مجموعه افکتور و تارگت مورد استفاده قرار گرفت، می توان قدرت کشتندگی زیرمجموعه های سلول کشته طبیعی را ارزیابی نمود.

محیطی (PBMNC) به کمک استفاده از گرادیان غلظتی فایکول هپاک (1074) از خون هپارینه جداسازی گردیدند. و به منظور فعال سازی و القاء ترانسفورماسیون لنفوسیتی از مایوژن (PHA) (فیتوماگلو تینین A) و روش L.T.T استفاده گردید. (به ازای هر ۱۰<sup>۶</sup> سلول در هر میلی لیتر، ۰/۲۵ میلی گرم PHA اضافه گردید. (پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته در دستگاه CO2 Incubator، مایع رویی در کرایوتیوپهای مخصوص، جمع آوری گردید و در دمای استفاده ۷۰<sup>+</sup> C قرار گرفت تا برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گیرد.

## ۲- جداسازی سلولهای کشته طبیعی و

### تخلیص آنها

خون مورد استفاده در این مرحله نیز از منابع فوق الذکر تهیه می گردد و به منظور جمع آوری سلولهای تک هسته ای خون محیطی، از گرادیان غلظتی فایکول استفاده گردید. به کمک ستونهای پر شده از نایلون وول، و مطابق روش استاندارد، لنفوسیت های T و سلولهای کشته طبیعی جداسازی گردیدند و با انجام تکنیک روزت، و بر اساس وجود گیرنده با تمایل بالا برای گلبول قرمز گوسفند در سطح لنفوسیت های T، سلولهای کشته طبیعی که در همان مدت انکوباسیون، تشکیل روزت نداده اند، تفکیک می گردند. طبق تجربه این تحقیق طول مدت انکوباسیون ۳ ساعت و دمای آن ۳۷<sup>+</sup> C در نظر گرفته شد.

بدین ترتیب مجدداً با استفاده از گرادیان غلظتی فایکول، لنفوسیت های T که تشکیل روزت داده اند از سلولهای کشته طبیعی که تشکیل روزت نداده اند (به دلیل سنگین تر شدن) تفکیک گردیده و نهایتاً سلولهای کشته طبیعی تخلیص گردیدند.

## ۳- جداسازی زیرگروه های سلولهای کشته

### 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 چسبیده به سطوح پلاستیکی اند، قرار گرفتند و دریافت کننده مایع رویی کشت لنفوسیت های فعال شده به کمک PHA بودند. (به ازای هر ۱۰<sup>۶</sup> سلول)، ۱ میلی لیتر مایع رویی کشت در ۱۰ میلی لیتر

چند سلول عمل کننده به سلول هدف چسبیده است یعنی درصد سلولهای عمل کننده تشکیل دهنده کونزوگه E/T، به کل ۲۰۰ سلول عمل کننده محاسبه می‌شود.

در فرمول B، درصد کونزوگه‌های 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 کونزوگه‌ها می‌کنیم.

فرمول C

$$\frac{\text{درصد کونزوگه‌های جاری سلولهای مرده فرمول B} \times \text{درصد کونزوگه‌های فرمول A}}{100} =$$

درصد جمعیت سلولهای کشته به کل سلولهای عمل کننده

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

### ۳- روش اندازه‌گیری LDH activity

پس از طی مرحله انکوباسیون مجموعه تارگت و افکتور E/T، و انجام سانتریفیوژ، سلولهای ته‌نشین شده، مورد ارزیابی سیتوتوکسیته 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 از میکروپلیت‌های مخصوص ته‌گرد اضافه گردید، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر سوپسترا تحت عنوان و میزان:

$$5/4 \times 10^{-2} \text{ML}(+) \text{ Lactate, } 6/6 \times 10^{-4} \text{ M2-P}$$

-Iodophenyle -3-P nitro phenyl Tetrazolium chloride,  $2/8 \times 10^{-4}$  Mephenazin methosulfate,  $1/3 \times 10^{-3}$  M NAD/ $0/2$  M tris butter

با  $\text{pH} = 8/2$  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 سیتوتوکسیته

همانگونه که در مراحل قبلی ذکر گردید، سلولهای شناور در فلاسک کنترل، با سلولهای تفکیک شده از حیث خاصیت چسبندگی در 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 سیتوتوکسیته 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  $37^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۳ ساعت، انکوبه گردیدند. سپس به کمک افزودن تریپان بلو ۰/۴ درصد؛ بر روی گسترش سلولها، مشاهده میکروسکوپی یک 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 کشته طبیعی مورد محاسبه قرار گرفتند:

فرمول A

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلولهای عمل کننده متصل به هدف}}{\text{کل تعداد سلولهای عمل کننده}}$$

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

فرمول B

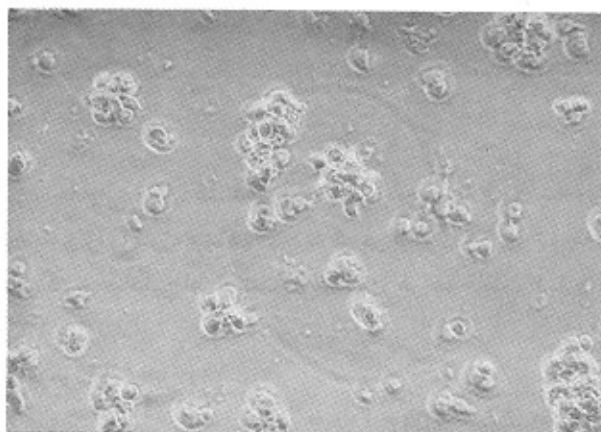
$$100 \times \frac{\text{تعداد سلولهای عمل کننده متصل به سلول هدف مرده}}{\text{تعداد سلولهای عمل کننده متصل به هدف}}$$

درصد سلولهای کشته در کونزوگه‌ها

در هر مجموعه محاسبه فوق، ۲۰۰ سلول E را شمارش می‌کنیم، فرمول A به ما نشان می‌دهد که در ۲۰۰ سلول عمل کننده،

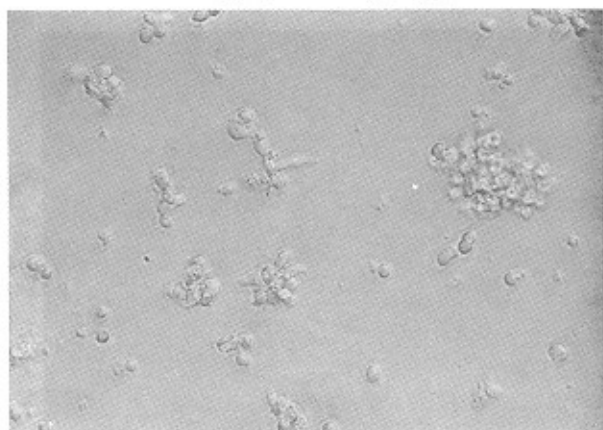
همانگونه که در تصویر ۱ ملاحظه می‌گردد، تغییرات مورفولوژیک سلولهای کشت شده شامل واکوئولیزاسیون سیتوپلاسم، شفاف گردیدن کروماتین هسته، افزایش حجم سیتوپلاسم و تغییر اندکس حجم هسته به سیتوپلاسم و تکثیر قابل توجه سلولهای لنفوسیتی، بیانگر وقوع ترانسفورماسیون در آنهاست و مایع رویی غنی از سیتوکاتین‌های رشد سلولی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

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



نتایج حاصله از تفکیک زیرمجموعه‌های سلولهای کشته شده 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 ۳- هر دو زیرمجموعه (A-NK cells)، (NA-NK cells) قبل از خروج مایع محیط کشت از درون فلاسک



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

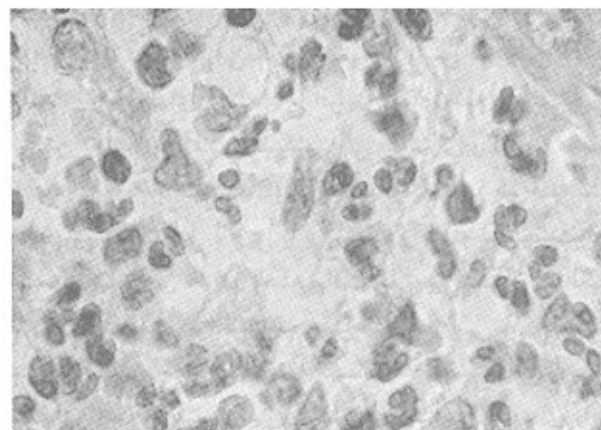
V: میزان لیز

## 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 بلاستوتز 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 ۱- واکوئولیزاسیون و افزایش حجم سیتوپلاسم، ایجاد هستک در

سلولهای ترانسفور شده در L.T.T که فعالیت لنفوسیتی و قدرت مایع رویی کشت را نشان می‌دهد.





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	

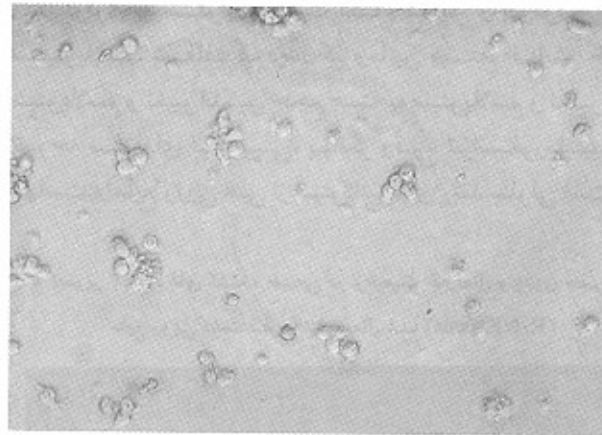
### بحث

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 IL-2، روش معمول آزمایشگاههای ایمنی سلولی، منبع طبیعی و قابل‌کنترلی از انواع فاکتورهای رشد ایمونولوژیک خصوصاً IL-2، IFN- $\gamma$  می‌باشد. و ما نیز، با انگیزه اثبات کاربردی بودن این محتوای سایتوکاینی، بر آن شدیم تا به جای استفاده از IL-2 بتوانیم، زیرمجموعه‌های مختلف سلولهای کشته 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 IL-2 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 IL-2 نشان می‌دهد. علاوه بر توان مایع رویی کشت در تخلیص و جداسازی زیرمجموعه‌های سلولهای کشته، 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،

تصویر ۴- سلولهای کشته طبیعی چسبیده 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:

$$A-NK = \frac{70}{200} \times 0.35 \times 100 = 12.25\%$$

$$NA-NK = \frac{20.55}{200} \times 0.27 \times 100 = 2.77\%$$

$$R-NK = \frac{23.0}{200} \times 0.115 \times 100 = 1.34\%$$

در فرمول B:

$$A-NK = \frac{34}{200} \times 0.71 \times 100 = 12.07\%$$

$$NA-NK = \frac{48}{200} \times 0.75 \times 100 = 18.0\%$$

$$R-NK = \frac{16.37}{200} \times 0.44 \times 100 = 3.64\%$$

فرمول C نهایی:

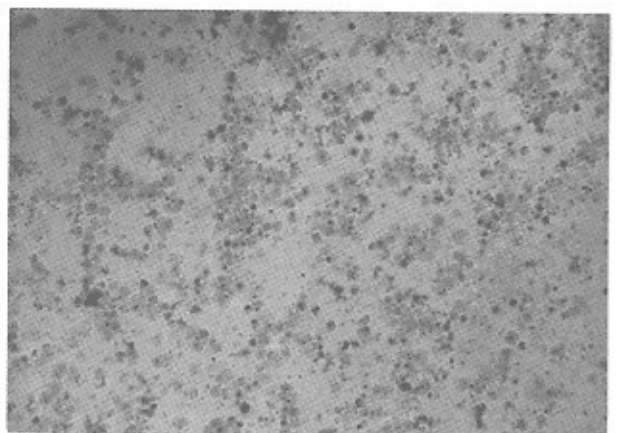
$$A-NK = \frac{12.25 \times 12.07}{100} = 1.47\%$$

$$NA-NK = \frac{2.77 \times 18.0}{100} = 0.5\%$$

$$R-NK = \frac{1.34 \times 3.64}{100} = 0.05\%$$

تصویر ۵- نمایی کلی از واکنش‌های سیتوتوکسیتی سلولهای عمل کننده و

هدف (لیز سلولها بخوبی نمایان است)



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* می باشد.

### سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر پرویز پاکزاد، دکتر علیرضا سالک مقدم، دکتر شاهپور شاهفاسمپور به دلیل همکاری و مساعدتهایشان و نیز از دکتر محمد زهرحسن که از راهنمایان ایشان 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، مسئول بخش کشت سلول مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون که در محضرشان تجربیات گرانقدری آموختم.

نتایج متفاوتی مشاهده می‌گردد (روش LDH) که بیانگر وقوع پدیده‌ای دیگر است بدین صورت که در نسبت RN-KN (1:3)، 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 می باشد.

بطور خلاصه می‌توان ادعا نمود که محتوای غنی از سایتوکاین مایع رویی کشت لنفوسیتی به کمک تحریک با PHA، توانسته است اولاً زیرمجموعه‌های سلولهای کشته شده 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 می باشد که نتایج فوق را در رابطه با استفاده از  $\alpha$ IL2

### منابع

- 1- Abul K. Abbas., Cellular and molecular immunology, 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 immunobiology, IRL press 1993.
- 6- Daniel P. Stites: Basic and clinical immunology seventh editions, Alange medical book 1991.
- 7- Garara Anne: The role of cytokin in determing T cell function. Current Opin in Immunology, 6(1994).
- 8- Hilary, S., NK cell proliferation and inflammation, 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 lymphokine 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  $\gamma$  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 interlekin-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.