

بهبودسازی کشت سلول‌های دندریتیک نابالغ از سلول‌های مغز استخوان موش در شرایط عاری از اندوتوکسین

عاطفه صادقی شرمه^۱، سیما حبیب‌زاده^۱، عادلہ تقی‌خانی^۲، سیما رأفتی^۱، نگار سید^{۱*}

(۱) گروه تحقیقات انگل‌شناسی، قارچ‌شناسی و ایمنولوژی، بخش ایمنوترایی و تحقیقات واکنش لیشمانیا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

(۲) گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۶

چکیده

مقدمه: سلول‌های دندریتیک در مطالعات پایه و همچنین تحقیقات دربارهٔ واکنش بسیار اهمیت دارند؛ اما جداسازی و کشت این سلول‌ها به علت تعداد اندک در بافت‌ها، با چالش‌هایی روبروست. با توجه به اینکه روش استاندارد وجود ندارد، در این پژوهش، به برخی از عوامل مؤثر در افزایش بازدهی جداسازی سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان موش BALB/c پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: پس از جداسازی سلول‌های مغز استخوان از فمور و تیبا و هم‌جواری با سایتوکاین GM-CSF، در روز سوم، نیمی از سلول‌ها به پلیت جدید انتقال داده و در روز پنجم، از اولیگونوکلیوتید CpG برای تحریک سلول‌ها استفاده شد. در روزهای پنجم و هفتم، بقای سلول‌ها و همچنین شاخص‌های فنوتیپی CD11c، MHC-II و CD86 با فلوسایتومتری بررسی گردید.

یافته‌های پژوهش: در این مطالعه مشخص شد که حضور اندوتوکسین در مراحل کشت سلول‌های نابالغ، به‌طور معنی‌دار ($P < 0.05$) سبب کاهش بازایی سلول‌های دندریتیک می‌شود. علاوه بر این، تعداد کمتر از یک میلیون سلول در پلیت‌های غیرچسبنده سبب بقای بیشتر و بازدهی بالا می‌گردد. انتقال سلول‌ها در روز سوم به پلیت جدید هم به‌عنوان راهکاری برای جلوگیری از بلوغ زودرس سلول‌های دندریتیک و مرگ ناشی از آن معرفی شد. پس از دستیابی به سلول‌های نابالغ در مجاورت GM-CSF، می‌توان برای القای مسیر Th1 از اولیگونوکلیوتید CpG در روز هفتم استفاده کرد. اختلاف معنادار ($P < 0.05$) با کنترل نشان داد که CpG می‌تواند به‌عنوان محرک در القای بلوغ پس از تیمار با GM-CSF به‌کار گرفته شود.

بحث و نتیجه‌گیری: بهبودسازی کشت سلول‌های دندریتیک به لحاظ شرایط مختلف کشت، نقش مهمی در بازدهی بازایی این سلول‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی: مغز استخوان، سلول‌های دندریتیک، بهبودسازی کشت، اندوتوکسین

* نویسنده مسئول: گروه تحقیقات انگل‌شناسی، قارچ‌شناسی و ایمنولوژی، بخش ایمنوترایی و تحقیقات واکنش لیشمانیا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

Email: negarse@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سلول‌های دندریتیک گروهی از عرضه‌کننده‌های تخصصی آنتی‌ژن هستند که به‌صورت نابالغ در همه بافت‌های محیطی حضور دارند و مسئول دریافت آنتی‌ژن‌های بیگانه به هنگام عفونت و عرضه آن‌ها به سلول‌های لنفوسیت در حال استراحت در بافت‌های لنفاوی ثانویه هستند. به دنبال برخورد با الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن (AMP) یا مولکول‌های آسیب بافتی (DAMP) و تماس با سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و واکنش متقابل CD40/CD40L، توانایی عرضه آنتی‌ژنی در مجموعه سازگاری بافتی اصلی (MHC) افزایش می‌یابد. در نهایت، سلول‌های بالغ با عرضه آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های T، پاسخ آن‌ها را تحریک و جهت‌دار می‌کنند (۱). در سال ۱۹۷۳، Cohen و Steinman سلول‌های دندریتیک را شناسایی کردند (۲) و از آن پس، پروتکل‌های متعددی برای جداسازی و کشت این سلول‌ها در شرایط برون‌تنی بررسی شده است. به دنبال پیشرفت‌های به‌دست‌آمده، این سلول‌ها اکنون به‌عنوان ابزار نیرومندی در ایمونوتراپی (۳) و طراحی واکسن (۴) مطرح هستند، به‌طوری‌که تحقیقات درباره طراحی واکسن‌های درمانی گسترش فراوانی یافته و اولین واکسن در سال ۲۰۱۰، به تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا رسیده است. به علت ویژگی‌های منحصر به فرد این سلول‌ها و اهمیتی که در تحقیقات گوناگون دارویی و واکسن دارند، اصول کار در شرایط آزمایشگاهی با این سلول‌ها الزاماتی را ایجاد می‌کند.

تهیه سلول‌های دندریتیک از سلول‌های مغز استخوان موش به روش کشت چندین روزه در مجاورت فاکتور محرک کلونی-گرانولوسیت-مونوسیت (GM-CSF)، به‌تنهایی (۵) یا GM-CSF به همراه اینترلوکین-۴ (۶، ۷) و سپس القای بلوغ با استفاده از لیپو پلی‌ساکارید (LPS) باکتری گرم منفی، متداول‌ترین روش برای دستیابی به این گروه سلولی ارزشمند است؛ اما فنوتیپ سلول‌های دندریتیک حاصل به غلظت سایتوکاين‌های استفاده‌شده و به عواملی نظیر گونه موش استفاده‌شده، سن و جنس موش، نحوه جداسازی مغز استخوان، شرایط محیط کشت و سرم غنی‌کننده آن و

همچنین طول مدت کشت بستگی دارد که بر بازدهی بازیابی این سلول‌ها از سلول‌های مغز استخوان تأثیر می‌گذارد (۸)؛ به همین علت، روش کاملاً استاندارد برای کشت سلول‌های دندریتیک وجود ندارد و در مطالعات برون‌تنی، تفاوت‌های بسیاری در روش کار مشاهده می‌شود که بر اساس دو روش قدیمی Lutz (۹) و Inaba (۱۰) تغییراتی ایجاد شده است؛ بدین سبب، کشت سلول‌های نابالغ با بازدهی بالا نیازمند ملزوماتی است که شناخت آن‌ها اهمیت فراوان دارد.

هدف از مطالعه پیش رو، نشان دادن اهمیت شرایط بهینه و عاری از لیپو پلی‌ساکارید (اندوتوکسین) برای استخراج سلول‌های مغز استخوان موش و افزایش بازدهی کشت این سلول‌ها و تهیه سلول‌های نابالغ دندریتیک است که به‌صورت یک پژوهش تحلیلی-مداخله‌ای طراحی شده است. برای این منظور، سلول‌های مغز استخوان موش BALB/c بر اساس روش‌های استاندارد جداسازی و بازدهی بازیابی سلول‌های دندریتیک، پیش و پس از حذف LPS از مراحل کشت سلول‌های نابالغ مغز استخوان موش BALB/c به روش فلوسیتومتری و با استفاده از شاخص‌های دندریتیک CD11c، MHC-II و CD86 مقایسه شد؛ همچنین بهینه‌سازی تعداد سلول‌ها در کشت و انتقال سلول‌ها به پلیت‌های جدید در حین کشت، به‌عنوان عاملی برای بازیابی بهینه سلول‌های نابالغ معرفی گردید. در ادامه، استفاده از اولیگونوکلوئوتید CpG که به گیرنده شبه‌تول-۹ (Toll Like Receptor-9/TLR-9) متصل می‌شود، به‌عنوان جایگزین مناسبی برای LPS به‌عنوان محرک بلوغ معرفی شد که می‌تواند به‌عنوان کنترل مثبت در کشت سلول‌های دندریتیک در کنار محرک‌های اصلی استفاده گردد و سلول‌ها به مدت کافی در کشت زنده باقی می‌مانند و خطر از دست دادن سلول‌های کنترل به کمترین میزان می‌رسد.

مواد و روش‌ها

شرایط عاری از اندوتوکسین: بافر لیزکننده آمونیوم-کلرید-پتاسیم (ACK)، بافر HEPES، جنتامایسین، ال-گلوتامین و الکل ۷۰ درصد مورد نیاز برای شستشوی استخوان‌ها با آب مقطر تزریقی استریل تهیه شد (همه نمک‌ها و پودرهای به‌کاررفته متعلق به

گردیدند. در مرحله بعد، دو سر استخوان‌های فمور در یک پتری دیش استریل با سر سوزن با گاز ۲۳ سوراخ شده و ۵cc محیط کشت استریل توسط سرنگ و با فشار به داخل مجرای استخوان تزریق و مغز استخوان‌ها در داخل یک فالكون استریل (بر روی ظرف حاوی یخ) جمع‌آوری گردید؛ همچنین دوسر استخوان‌های تیبیا به آهستگی برش داده شد و مغز استخوان با تزریق ۵cc محیط کشت استریل به داخل فالكون تخلیه گردید. سوسپانسیون سلولی به‌دست‌آمده به مدت ۷ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. یک میلی‌لیتر بافر لیزکننده ACK (۱۵۵ میلی‌مولار NH₄Cl، ۱۰ میلی‌مولار KHCO₃، ۱۱۰ میلی‌مولار Na₂EDTA) به رسوب سلولی اضافه و پس از ۲ دقیقه، با اضافه کردن محیط RPMI غنی‌شده با ۵ درصد FBS، بافر ACK خنثی و لوله حاوی سلول دوباره سانتریفوژ گردید. محیط رویی خارج و سلول‌ها در یک میلی‌لیتر محیط RPMI غنی‌شده با ۱۰ درصد FBS سوسپانسیون و شمارش شدند.

تهیه سلول‌های دندریتیک نابالغ و القای بلوغ: سلول‌های مغز استخوان در پلیت ۶-خانه non-treated RPMI (Jetbiofil) حاوی دو میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 غنی‌شده با HEPES (۱۰mM)، ال-گلوتامین (۲mM)، جنتامایسین (۱۰۰µg/mL)، FBS ۱۰ درصد، بتا مرکاپتواتانول (۵۰µM) و GM-CSF ۲۰ng/mL در انکوباتور ۳۷°C و ۵ درصد CO₂ کشت گردیدند. پس از سه روز، محتوی هر چاهک ۱-۲ بار پیتاژ و یک میلی‌لیتر به پلیت ۶-خانه non-treated جدید منتقل شد و دوباره یک میلی‌لیتر محیط کامل حاوی GM-CSF (۲۰ng/mL) نیز، به محتویات چاهک‌های پلیت جدید اضافه گردید (غلظت نهایی ۱۰ng/mL). در روز پنجم، بخشی از سلول‌ها برای بررسی فنوتیپ سلولی، با فلوسیتومتری جمع‌آوری شد. برای القای بلوغ در سلول‌های دندریتیک، در روز پنجم سلول‌ها با اولیگونوکلوئوتیدهای CpG به‌عنوان محرک بلوغ (T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G) و non-CpG (*A*C*G*T) به‌عنوان کنترل (TCCAGGACTTCTCTCAGG)، در دو غلظت ۵µg/ml و ۱۰µg/ml تحریک گردیدند. به این

شرکت سیگما بوده است). سرم جنین گاوی (FBS) با اندوتوکسین کمتر از 1EU/ml و محیط کشت RPMI مایع از شرکت biowest فراهم گردید و بافر فسفات نمکی (PBS) به‌صورت مایع تجاری (biowest) استفاده شد. مواد به‌کاررفته در کشت و محیط‌های کشت غنی‌شده، با فیلترهای سرسرنگی (Sartorius) استریل گردید. برای تهیه آب فاقد پیروژن از فیلتر ۰/۰۲ میکرونی (Millipore) استفاده شد. برای محلول‌سازی سایتوکاین GM-CSF (Peprotech) آب مقطر تزریقی حاوی ۰/۱ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA-) (Sigma low LPS) به‌کار رفت؛ همچنین محلول اولیگونوکلوئوتیدهای CpG (Murine ODN-1826) (Biomatik non-CpG) در آب مقطر تزریقی تهیه شد. همه وسایل شیشه‌ای پیش از مصرف با اسید شسته و در دو مرحله با دمای ۱۸۰°C در فور، استریل شدند. همه وسایل از جمله ابزار جراحی، سمپلرها و سرسمپلرهای عاری از اندوتوکسین (ExtraGENE) به مدت ۴۵ دقیقه، در زیر هود بیولوژیک تحت اثر اشعه UV قرار گرفتند.

موش‌های آزمایش‌شده و شرایط نگهداری: موش‌های ۶ هفته‌ای BALB/c از انستیتو پاستور ایران خریداری و در حیوان‌خانه، با شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور- ۱۲ ساعت خاموشی) تا پیش از آزمایش نگهداری گردید. همه پروتکل‌های به‌کاررفته مورد تأیید کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران بوده است (کد مصوب: IP.PIL.REC.1395.99).

جداسازی سلول از مغز استخوان موش: در این پژوهش، از دستورالعمل‌های Lutz (۵) و Inaba (۱۰) با تغییرات مناسب استفاده شد. به این منظور در هر دورکاری، یک یا دو موش BALB/c ۶-۸ هفته‌ای به روش اخلاقی نخاعی گردید. استخوان‌های فمور و تیبیا از هر دو پای موش جدا و با تیغ جراحی و گاز استریل، ماهیچه پاک‌سازی گشت. استخوان‌ها به مدت ۱-۲ دقیقه، در داخل الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند؛ سپس در PBS استریل شستشو داده و در نهایت، به محیط RPMI-1640 غنی‌شده با FBS ۵ درصد، HEPES (۱۰mM)، ال-گلوتامین (۲mM)، جنتامایسین (۱۰۰µg/mL) و بتا مرکاپتواتانول (۵۰µM) منتقل

منظور، یک میلی‌لیتر از محیط حاوی CpG و non-CpG با غلظت مناسب تهیه و با غلظت نهایی $10\mu\text{g/ml}$ و $5\mu\text{g/ml}$ ، به چاهک‌های مربوطه به‌طور جداگانه اضافه شد. در روز هفتم، بلوغ بخشی از سلول‌ها برای بررسی فنوتیپ سلولی با فلوسیتومتری جمع‌آوری گردید.

ارزیابی فنوتیپ سلول‌ها با روش فلوسایتومتری:
برای بررسی فنوتیپ، سلول‌ها از پلیت‌های کشت در لوله‌های فلوسیتومتری جمع‌آوری و ۵ دقیقه با دور 1700rpm و دمای محیط سانتریفوژ شد. پس از شستشو با بافر نمکی PBS-1%FBS، سلول‌ها بسته به نوع مطالعه، با مقادیر کافی از آنتی‌بادی‌های ضد CD11C کونژوگه با FITC (eBioscience)، MHC-II کونژوگه با PE (eBioscience) و CD86 کونژوگه با PE-Cy5 (eBioscience)، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4°C رنگ‌آمیزی گردیدند. پس از شستشوی مجدد با بافر PBS-1%FBS، رسوب سلولی در بافر یادشده سوسپانسیون گشته و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری CyFlow (Partec-Germany)، فنوتیپ سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ بررسی شد. اطلاعات با نرم‌افزار Tree Star-USA FlowJo vol.7.6 بررسی و آنالیز گردید.

آزمون‌های آماری: تحلیل‌های آماری برای بررسی میزان بروز شاخص‌های بلوغ بر سطح سلول‌های دندریتیک در شرایط گوناگون، با استفاده از t-test صورت گرفته و نتایج ارائه‌شده مربوط به دو تکرار در مراحل مختلف بوده است.

یافته‌های پژوهش

بررسی بازدهی سلول‌های دندریتیک نابالغ در شرایط بدون اندوتوکسین: اندوتوکسین ازجمله مولکول‌هایی است که به علت داشتن گیرنده‌های مناسب در سطح سلول‌های دندریتیک، به فعال‌سازی این سلول‌ها و بلوغ منجر می‌شود. یکی از شاخص‌های اصلی این سلول‌ها، مولکول‌های MHC-II است که برای شناسایی به‌کار می‌رود. حذف اندوتوکسین سبب افزایش چشمگیر بازده سلول‌های زنده نابالغ دندریتیک، در روز پنجم پس از کشت سلول می‌شود که با شاخص MHC-II قابل ارزیابی است. همان‌گونه که در شکل

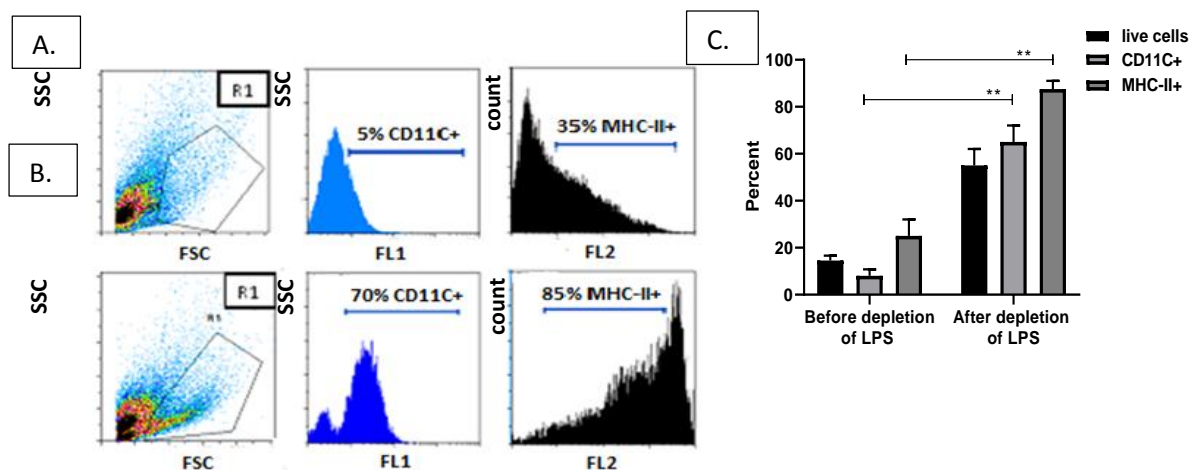
شماره ۱ مشاهده می‌شود، سلول‌های دندریتیک نابالغ (CD11C^+) در روز پنجم کشت، در شرایط غیر بهینه از نظر اندوتوکسین، میزان بسیار اندکی از مولکول‌های MHC-II را بیان می‌کنند، درحالی‌که پس از حذف پیروژن از مراحل مختلف، درصد سلول‌های زنده افزایش می‌یابد و بیان بالایی از مولکول‌های MHC-II مشاهده می‌شود. به عبارت بهتر، در شرایطی که اندوتوکسین در مواد گوناگون مصرفی به‌ویژه محیط کشت و افزودنی‌های آن وجود دارد، بازدهی تولید سلول‌های نابالغ از کشت سلول‌های مغز استخوان بسیار اندک است و سلول‌ها در حضور LPS، پیش از موعد بالغ می‌شوند و از بین می‌روند. رعایت شرایط عاری از اندوتوکسین، بازدهی تولید سلول‌های نابالغ را به‌شدت افزایش می‌دهد، به‌طوری‌که پس از حذف LPS از مراحل کشت، درصد سلول‌های $\text{CD11C}^+/\text{MHC-II}^+$ به‌طور معناداری افزایش می‌یابد.

بهینه‌سازی تعداد سلول‌ها در کشت: تعداد سلول‌های کشت داده‌شده در پلیت، از عوامل بسیار مهم در زنده ماندن سلول‌های دندریتیک است و افزایش سلول‌ها در یک فضای مشخص، به مرگ‌ومیر زود هنگام سلول‌ها منجر می‌شود. شکل شماره ۲، رابطه تعداد سلول کشت داده‌شده و میزان مرگ‌ومیر سلولی را نشان می‌دهد. در این پژوهش، پس از بررسی‌های متعدد، تعداد 8×10^5 سلول برای انجام مراحل بعدی مناسب تشخیص داده شد. در این حالت، با افزایش تعداد سلول‌های زنده، بازدهی سلول‌های دندریتیک نابالغ بیان‌کننده شاخص CD11C به بیش از ۵۰ درصد افزایش می‌یابد، بیان MHC-II بالاست و بیان شاخص بلوغ CD86 به محدوده ۱۰-۱ بر روی نمودارها کاهش می‌یابد که با میانگین شدت فلورسنت (MFI) معادل $3/89$ نشان داده‌شده است و نشان از بیان اندک این مولکول بر سطح سلول‌های نابالغ دارد (شکل شماره ۳).

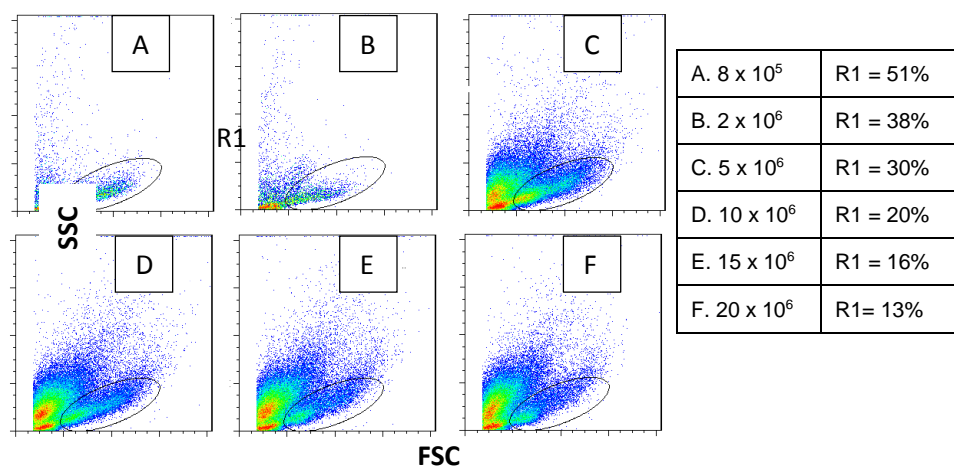
تأثیر تعویض پلیت در روز سوم کشت: در مراحل جداسازی سلول‌های مغز استخوان و تبدیل آن به سلول‌های نابالغ، به‌طور متداول، مقداری از محیط کشت جمع‌آوری و معادل آن، محیط کشت تازه حاوی سایتوکاین اضافه می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که چنانچه در این مرحله، بخشی از سلول‌ها از پلیت اول

بیشتر از پلیت دوم است (۹۴ درصد در برابر ۶۹ درصد). اگر به MFI بر روی محور FL3 توجه شود (CD86⁺), سلول‌ها در پلیت دوم MFI پایین را (در محدوده ۱-۱۰) نشان می‌دهند، درحالی‌که در پلیت اول، این محدوده به ناحیه ۱۰۰-۱۰۰۰ بر روی نمودار کشیده شده است.

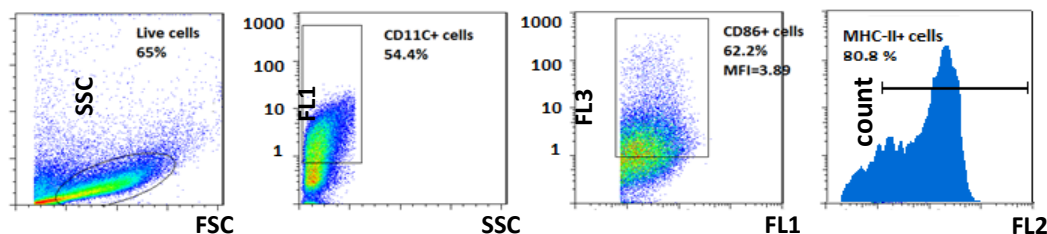
کشت به پلیت دیگری انتقال داده شود، درصد کمتری از سلول‌ها دچار بلوغ زودرس و خودبه‌خودی می‌شوند (شکل شماره ۴) که با بیان کمتر شاخص‌های بلوغ در روز پنجم، در سلول‌های منتقل‌شده به پلیت دوم مشخص می‌شود (ناحیه Q2). این در حالی است که در پلیت اول، بیان شاخص‌های بلوغ ناخواسته در ناحیه Q2



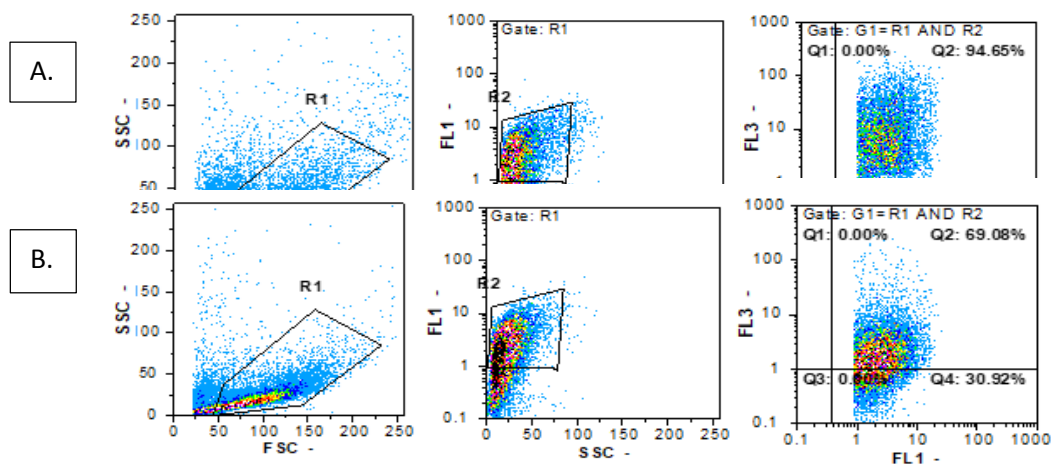
شکل شماره ۱. تأثیر LPS در شرایط کشت سلول‌های دندریتیک؛ A. پیش از حذف و B. پس از حذف LPS؛ FL1 مربوط به مولکول‌های CD11C و FL2 مربوط به MHC-II است. ناحیه R1 سلول‌های زنده را نمایش می‌دهد. نمودار C، اختلاف در شرایط پیش و پس از حذف LPS از نظر تعداد سلول زنده CD11C⁺ و MHC-II⁺ را بیان می‌کند. P<0.05 به‌عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شده است.



شکل شماره ۲. مقایسه تعداد سلول زنده در پلیت کشت ۶-خانه. جدول تعداد سلول اولیه تقسیم‌شده در پلیت و درصد سلول‌های زنده در روز پنجم پس از کشت (ناحیه R1) را نشان می‌دهد. نمودارها نماینده دو بار تکرار کاری هستند.



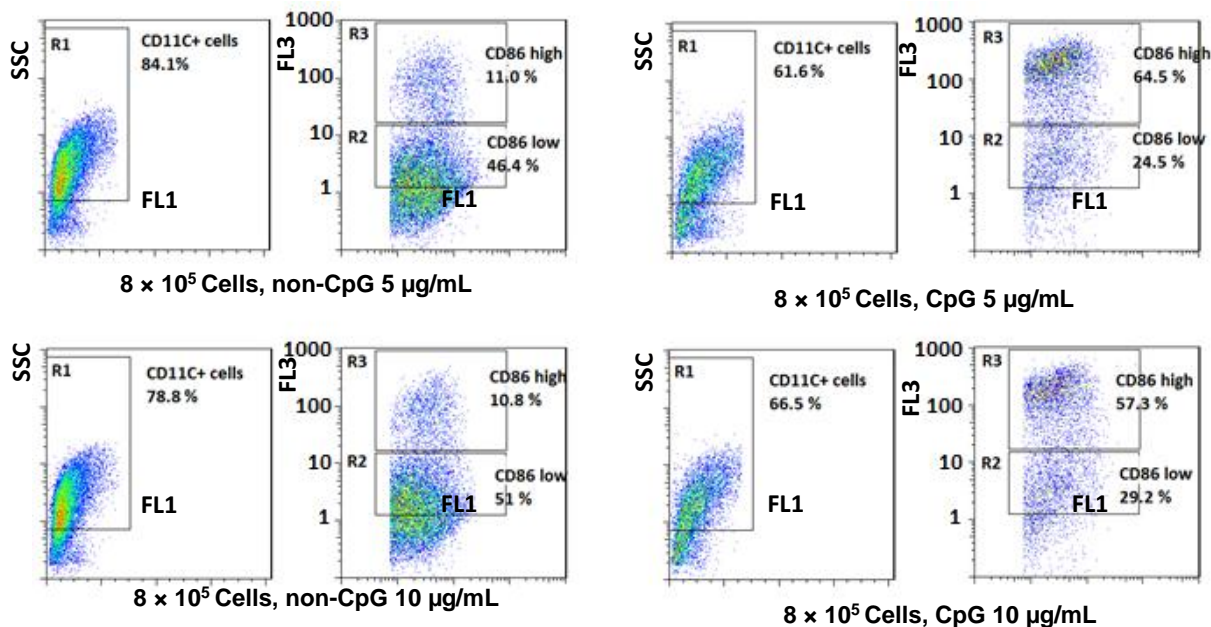
شکل شماره ۳. وضعیت تعداد سلول زنده، بیان MHC-II، شاخص دندریتیکی CD11C و شاخص بلوغ CD86 با استفاده از 8×10^5 سلول



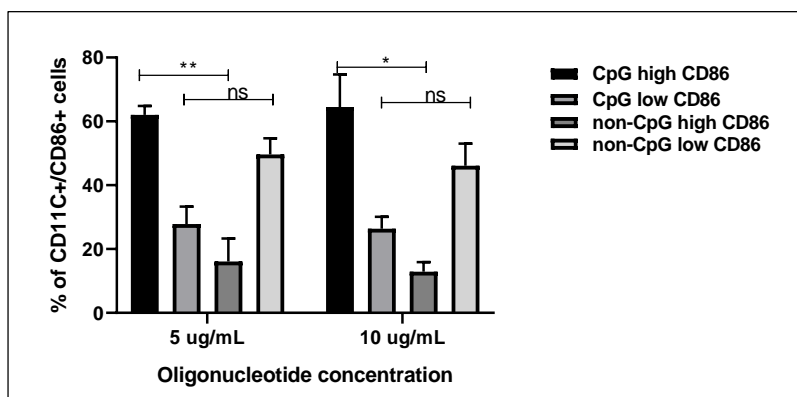
شکل شماره ۴. مقایسه وضعیت شاخص‌های بلوغ سلول‌های دندریتیک در روز پنجم؛ A. وضعیت سلول‌ها در پلیت اول و B. وضعیت سلول‌های انتقال داده‌شده به پلیت دوم (در روز سوم پس از کشت). ناحیه R2 سلول‌های دندریتیک CD11C+ (FL1) را نشان می‌دهد. ناحیه Q2 بر روی نمودارهای سوم هر ردیف، سلول‌های زنده CD11C+/CD86+ را بیان می‌کند. نمودارها نماینده دو بار تکرار کاری هستند.

CpG است. همان‌گونه که در شکل شماره ۵ مشاهده می‌شود، پس از تحریک با اولیگونوکلوئوتید non-CpG، توده سلولی در ناحیه R2 تجمع دارد (بیان پایین شاخص CD86)، درحالی‌که پس از تحریک با اولیگونوکلوئوتید CpG، افزایش چشمگیری در بیان شاخص بلوغ و انتقال توده سلولی به ناحیه R3 دیده می‌شود. نکته قابل توجه این است که با افزایش غلظت CpG از $5 \mu\text{g/mL}$ به $10 \mu\text{g/mL}$ ، میزان بیان شاخص CD86 افزایش شدیدی نشان نمی‌دهد؛ همچنین پس از تحریک با اولیگونوکلوئوتید CpG، بخش عمده‌ای از سلول‌ها بالغ شده‌اند، درحالی‌که کنترل non-CpG قادر به بالغ‌سازی بخش فراوانی از سلول‌ها نبوده است. شکل شماره ۶، اختلاف تحریک با اولیگونوکلوئوتید CpG و non-CpG در غلظت‌های $5 \mu\text{g/mL}$ و $10 \mu\text{g/mL}$ را بر اساس بیان شاخص بلوغ CD86 نشان می‌دهد.

لقای بلوغ در سلول‌های دندریتیک: از نتایج آشکار شد که در روز پنجم پس از کشت، سلول چه از نظر میکروسکوپی (سلول‌های گرد و زنده) و چه از نظر فلوسیتومتری (مقادیر بالای CD11c و MHC-II و مقادیر پایین CD86)، پروفایل کامل و صحیح سلول دندریتیک نابالغ را دارد. با توجه به اینکه تأثیر بالقوه LPS در مراحل گوناگون کشت به صورت القای بلوغ زودرس و مرگ زود هنگام محرز گردید، در ادامه، تیمار با اولیگونوکلوئوتید CpG به عنوان محرک بلوغ و non-CpG به عنوان کنترل در دو غلظت $5 \mu\text{g/mL}$ و $10 \mu\text{g/mL}$ (برای هردو اولیگونوکلوئوتید) انجام شد. استفاده از محرک CpG به شکل چشمگیری به افزایش بیان شاخص CD86 نسبت به غلظت مشابه از اولیگونوکلوئوتید non-CpG کنترل منجر گردید که نشان‌دهنده بلوغ سلول‌های دندریتیک در اثر برخورد با



شکل شماره ۵. بررسی فلوسیتومتریکی وضعیت بلوغ در روز هفتم پس از تحریک سلول‌های نابالغ با آگونیست ریسپتور TLR-9؛ A مربوط به غلظت ۵ µg/mL از محرک CpG و کنترل non-CpG و B مربوط به غلظت ۱۰ µg/mL از محرک CpG و کنترل non-CpG. ناحیه R1 سلول‌های زنده را تعیین می‌کند. ناحیه R2 مربوط به شاخص CD11C و FL3 مربوط به شاخص CD86 است. ناحیه R3 بیان شاخص در منطقه با شدت زیاد را نمایش می‌دهد.



شکل شماره ۶. مقایسه آماری بیان شاخص CD86 بر روی سلول‌های بالغ شده با ۵ µg/mL و ۱۰ µg/mL از اولیگونوکلوئید CpG در مقایسه با non-CpG. P < 0.05 معنادار تلقی شده است (ns = non-significant).

بحث و نتیجه‌گیری

GM-CSF برای چندین روز متوالی، متداول‌ترین روش است (۱۱، ۱۲)؛ سپس محرک‌های بلوغ به کشت افزوده می‌شود تا سلول‌های بالغ دندربیتیکی به دست آید که نوع محرک بر فنوتیپ و نوع سلول‌های دندربیتیکی تولیدشده تأثیر می‌گذارد (۱۳). یکی از محرک‌های استفاده‌شده LPS باکتری‌های گرم منفی است (۱۴، ۱۵).

نتایج به دست آمده از این پژوهش آشکار کرد که شرایط کشت در تهیه سلول‌های دندربیتیکی نابالغ بسیار اهمیت دارد. برای دستیابی به سلول‌های نابالغ دندربیتیکی در آزمایشگاه، روش‌های گوناگونی هست که کشت سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان موش در حضور

اندوتوکسین‌ها محرک‌های نیرومندی هستند که سبب تحریک پاسخ ایمنی میزبان حتی در مقادیر بسیار کم می‌شوند (۱۶). مولکول LPS به‌عنوان لیگاند گیرنده TLR-4 که در سلول‌های دندریتیک به‌وفور یافت می‌شود، به تولید سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین-۱۲ منجر می‌گردد (۱۷، ۱۸). با اینکه از اندوتوکسین باکتری به‌عنوان یکی از عوامل بلوغ سلول‌های دندریتیک استفاده می‌شود، حضور زودهنگام آن در مراحل اولیه کشت (از هنگام جداسازی سلول‌های مغز استخوان موش)، شرایط را برای رسیدن به سلول‌های بالغ مناسب برای ادامه کار غیرممکن می‌سازد. وجود مقادیر بالا از LPS در مواد مصرفی از قبیل آب، محیط‌های کشت سلولی، وسایل مصرفی مانند سرسمپلرها، لوله‌های فالکون و وسایل شیشه‌ای می‌تواند روند تبدیل سلول‌های مغز استخوان به سلول‌های دندریتیک نابالغ را به‌شدت تحت تأثیر قرار دهد. این نکته در منابع گوناگون به‌وضوح شرح داده نشده است، درحالی‌که مهم‌ترین عامل در موفقیت کشت سلول‌های دندریتیک است. در این مطالعه نشان داده شد که پیش از حذف LPS از مواد مصرفی به‌ویژه آب در کشت سلول‌های دندریتیک، درصد بقای سلول‌ها و بیان شاخص‌های دندریتیکی به‌طور معناداری کمتر از زمانی است که LPS از شرایط کشت حذف می‌شود. به‌کارگیری تجهیزات عاری از پیروژن و یک‌بارمصرف در آزمایشگاه و نیز استفاده از روش‌های شستشوی مناسب برای تجهیزات شیشه‌ای (شستشو با اسید و فور کردن) می‌تواند با کاهش میزان LPS، از بلوغ ناخواسته و مرگ‌ومیر جلوگیری کند. همه مواد مصرفی کشت و وسایل شامل سرسمپلرها می‌بایست بدون اندوتوکسین باشند. اکیداً توصیه می‌شود از دستگاه‌های اتوکلاو آزمایشگاهی که برای مصارف روزانه استریلیزاسیون استفاده می‌شوند، برای استریل کردن استفاده نگردد. در این پژوهش، در موارد ضروری، فیلترهای سرسرنگی برای استریل کردن مایعات و تابش UV برای استریل کردن سرسمپلرها و وسایل به‌کار رفت؛ همچنین استفاده از آب مقطر تزریقی استریل در مصارف کم‌حجم و آب مقطر فیلترشده با فیلترهای ۰/۰۲ میکرونی در موارد مصرف با حجم بالا جایگزین گردید.

نکته دیگر، تعداد سلول‌ها در کشت است. این تعداد حدود 2×10^6 سلول در پلیت کشت میکروبی (روش لوتس) و $10^5 \times 10^5 - 7/5$ سلول در پلیت کشت ۲۴-خانه (روش اینابا) است. با اینکه در بیشتر مطالعات مربوط به سلول‌های دندریتیک از این تعداد بهره گرفته می‌شود (۲۰، ۱۹)، در برخی موارد مشاهده شده که از تعداد سلول‌های بیشتری مثلاً 10^8 سلول در فلاسک‌های T۲۵ استفاده می‌گردد (۸). نتایج این مطالعه نشان داد که هرچه تعداد سلول کشت داده‌شده در یک فضای مشخص افزایش یابد، نه‌تنها سبب افزایش بازدهی نمی‌شود، بلکه تعداد سلول‌های زنده دندریتیکی در روز پنجم به‌مراتب کاهش می‌یابد. در این پژوهش، با استفاده از پلیت‌های کشت ۶-خانه غیرچسبنده (non-treated) که سبب کاهش تمایز به‌سوی ماکروفاژ می‌شود، بالاترین بازدهی با استفاده از 8×10^5 سلول اولیه مغز استخوان به‌دست آمد. این نتایج با مطالعات مشابه مطابقت دارد که از پلیت کشت ۶-خانه بهره گرفته‌اند (۲۱). سلول‌های دندریتیک مانند همه سلول‌ها میان‌کنش سلول-سلول را می‌پسندند؛ اما افزایش تعداد سلول‌ها، نه‌تنها سبب مرگ پیش از موعد می‌شود، بلکه حساسیت سلول‌های دندریتیکی به محرک‌های بلوغ را نیز کاهش می‌دهد (۲۲).

نکته دیگر، نحوه کشت است که در پروتکل‌های گوناگون، متفاوت است. برخی بر اساس روش لوتس، در روز سوم، محیط تازه به پلیت‌ها اضافه می‌کنند و سپس ۲-۳ روز یک‌بار، ۷۰-۵۰ درصد محیط را با محیط کشت تازه جایگزین می‌سازند (۲۳). برخی مانند روش اینابا، در روزهای تعویض، ۷۵ درصد محیط کشت را برمی‌دارند و با محیط کشت تازه جایگزین می‌نمایند (۲۴) و برخی از روز سوم، محیط کشت جمع‌آوری‌شده را سانتریفوژ می‌کنند و به رسوب سلول محیط تازه اضافه و به پلیت اولیه برمی‌گردانند (۲۵) در سایر موارد که کمتر به آن پرداخته می‌شود، سلول‌های غیرچسبان در روز سوم (۲۲، ۱۲) و یا روز پنجم (۲۶) یا ششم (۲۴)، از پلیت اول جمع‌آوری و همراه محیط کشت تازه به پلیت جدید انتقال داده می‌شود. در این حالت، بازدهی بازبایی سلول‌های نابالغ به‌مراتب افزایش می‌یابد. در این مطالعه نشان داده

فاکتورهایی نظیر CpG به کار رود. استفاده از این محرک علاوه بر حذف ماده‌ای نظیر LPS از کشت سلول‌ها، مزایای دیگری نیز دارد. مطالعات مختلف که با هدف بالغ‌سازی سلول‌های دندریتیک برای تهیه واکسن القاکننده پاسخ‌های Th1 انجام گرفته است، نشان می‌دهد که کشت سلول‌های دندریتیک در مجاورت GM-CSF به‌تنهایی (و بدون استفاده از IL-4) و سپس بالغ‌سازی با استفاده از CpG، در القای پاسخ‌های Th1 مؤثر است (۳۰). در این شرایط، سلول‌ها از نیمه-عمر کافی برای تزریق به داخل بدن برخوردار خواهند بود. این در حالی است که استفاده از LPS در مطالعات واکسن، علی‌رغم القای مسیر Th1، امکان تزریق به بدن حیوان یا انسان را منتفی می‌سازد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از سرکار خانم معتمدی (بخش ویروس‌شناسی مولکولی انستیتو پاستور ایران) برای انجام فلوسیتومتری و جناب آقای غلام علیزاده (بخش ایمونوترابی و تحقیقات واکسن لیسمانیا انستیتو پاستور ایران) برای تهیه عکس‌ها اعلام می‌دارند. این پژوهش حاصل طرح شماره ۹۵۶ مصوب انستیتو پاستور ایران با کد اخلاقی IR.PII.REC.1395.99 است که بدین وسیله از انستیتو پاستور ایران قدردانی می‌گردد.

کد اخلاق: IR.PII.REC.1395.99

References

1. Qian C, Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Semin Immunol* 2018;35:3-11.
2. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 1979;149:1-16. doi.10.1084/jem.149.1.1
3. Shang N, Figini M, Shangguan J, Wang B, Sun C, Pan L, et al. Dendritic cells based immunotherapy. *Am J Cancer Res* 2017;7:2091.
4. Gu YZ, Zhao X, Song XR. Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2020;2:1-11.

شد که انتقال نیمی از محیط کشت پس از سوسپانسیون ملایم به پلیت کشت جدید و افزودن محیط تازه، سبب جلوگیری از بلوغ سلول‌های دندریتیک نابالغ در پلیت جدید می‌شود و فضای بیشتری برای رشد دندریتیک‌ها با کاهش گرانولوسیت‌ها و ماکروفاژها فراهم می‌گردد. این در حالی است که در پلیت اول، شاخص‌های بلوغ بیشتری بیان می‌شوند. علت این مسئله را می‌توان به افزایش تعداد سلول‌ها در پلیت اول نسبت داد که سبب القای بلوغ خودبه‌خودی و مرگ سلول‌های دندریتیک می‌گردد (۲۵، ۱۱)

نکته دیگر، محرک‌های استفاده‌شده در القای بلوغ در سلول‌های دندریتیک نابالغ است که بر اساس روش لوتس، معمولاً از LPS استفاده می‌شود؛ اما اولیگونوکلوئید CpG نیز امروزه کاربرد فراوان دارد. CpG به‌عنوان یک محرک نیرومند سیستم ایمنی توسط TLR-9 سلول‌های دندریتیک شناسایی می‌شود (۲۷) که با القای بلوغ و ترشح IL-۱۲ توسط این سلول‌ها، القای پاسخ سلول‌های Th1 را هدایت می‌کند (۲۸، ۲۹) در پژوهش حاضر نشان داده شد که استفاده از اولیگونوکلوئید CpG به‌طور معناداری سبب افزایش بیان مقادیر MHC-II و CD86 در سلول‌های دندریتیک در مقایسه با non-CpG می‌شود؛ به همین علت توصیه می‌گردد به‌جای استفاده از LPS که با بلوغ سریع سبب افزایش مرگ‌ومیر سلول‌ها می‌شود،

5. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Röbner S, et al. 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;30:1813-22. doi.10.1002/1521-4141(200007)30:7<1813
6. Menges M, Baumeister T, Rössner S, Stoitzner P, Romani N, Gessner A, et al. IL4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *J Leukoc Biol* 2005;77:535-43. doi.10.1189/jlb.0804473
7. Yokota A, Takeuchi H, Maeda N, Ohoka Y, Kato C, Song SY, et al. GM-CSF and IL4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid producing capacity. *Int*

- Immunol 2009;21:361-77. doi.10.1093/intimm/dxp003
8. Gosavi RA, Salwe S, Mukherjee S, Dahake R, Kothari S, Patel V, et al. Optimization of ex vivo murine bone marrow derived immature dendritic cells: A comparative analysis of flask culture method and mouse cd11c positive selection kit method. *Bone Marrow Res* 2018;2:123-7. doi.10.1155/2018/3495086
9. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Roßner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Meth* 1999;223:77-92. doi.10.1016/s0022-1759(98)00204-x.
10. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693-702. doi.10.1084/jem.176.6.1693
11. Arab S, Motamedi M, Khansari N, Moazzeni SM, Gheflati Z, Hadjati J. Dendritic cell maturation with CpG for tumor immunotherapy. *Iran J Immunol* 2006;3:99-105.
12. Arab S, Motamedi M, Hajati J. Culture and proliferation of dendritic cells from mouse bone marrow progenitors *J Anim Biol* 2008;1:35-40.
13. Dewitte H, Verbeke R, Breckpot K, Vandebroucke RE, Libert C, De Smedt SC, et al. Choose your models wisely: how different murine bone marrow derived dendritic cell protocols influence the success of nanoparticulate vaccines in vitro. *J Cont Release* 2014;195:138-46.
14. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor dependent long term cultures. *J Exp Med* 1997;185:317-28.
15. Rescigno M, Citterio S, Thery C, Rittig M, Medaglini D, Pozzi G, et al. Bacteria induced neo biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:5229-34. doi.10.1073/pnas.95.9.5229.
16. Nomura Y, Fukui C, Morishita Y, Haishima Y. A biological study establishing the endotoxin limit for in vitro proliferation of human mesenchymal stem cells. *Reg Ther* 2017;7:45-51. doi.10.1016/j.reth.2017.08.004.
17. Felzmann T, Huttner KG, Breuer SK, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, et al. Semi mature IL-12 secreting dendritic cells present exogenous antigen to trigger cytolytic immune responses. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:769-80. doi.10.1007/s00262-004-0637-2
18. Michael Dohnal A, Luger R, Paul P, Fuchs D, Felzmann T. CD40 ligation restores type 1 polarizing capacity in TLR4-activated dendritic cells that have ceased interleukin12 expression. *J Cell Mol Med* 2009;13:1741-50. doi.10.1111/j.1582-4934.2008.00584.x.
19. Taghikhani A, Hassan ZM, Ebrahimi M, Moazzeni SM. MicroRNA modified tumor derived exosomes as novel tools for maturation of dendritic cells. *J Cell Physiol* 2019;234:9417-27. doi.10.1002/jcp.27626.
20. Wang W, Li J, Wu K, Azhati B, Rexiati M. Culture and identification of mouse bone marrow derived dendritic cells and their capability to induce T lymphocyte proliferation. *Med Sci Int J Exp Clin Res* 2016;22:244-50. doi.10.12659/msm.896951
21. Bonab SF, Salehi TZ, Khansari N, Hadjati J, Massoud A. An optimized method for ex vivo generation of dendritic cells. *J Vet Res* 2014;69:17-23.
22. Aghdami N, Moazeni S, Gharib Doust M, Mahdavi M. Comparison of different methods for dendritic cell generation from mouse bone marrow. *Cell J* 2007;9:81-90.
23. Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Forouzandeh-Moghaddam M. Chitosan nanoparticles effect in activating of mouse bone marrow derived dendritic cells. *J Birjand Uni Med Sci* 2014;21:160-8.
24. Haase C, Jorgensen TN, Michelsen BK. Both exogenous and endogenous interleukin10 affects the maturation of bone marrow derived dendritic cells in vitro and strongly influences T cell priming in vivo. *Immunology* 2002;107:489-99.
25. Jin D, Sprent J. GM-CSF culture revisited: preparation of bulk populations of

highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol* 2018;201:3129-39.

26. Gholizadeh Z, Tavakkolafshari J, Nikpoor AR, Jalali SA, Jaafari MR. Enhanced immune response induced by P5 HER2 neu derived peptide pulsed dendritic cells as a preventive cancer vaccine. *J Cell Mol Med* 2018;22:558-67. doi.10.1111/jcmm.13343.

27. Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998;161:3042-9.

28. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, et al. Interleukin12 is produced by dendritic cells

and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996;26:659-68. doi.10.1002/eji.1830260323.

29. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071-9.

30. Agallou M, Pantazi E, Tsiftsaki E, Toubanaki DK, Gaitanaki C, Smirlis D, et al. Induction of protective cellular immune responses against experimental visceral leishmaniasis mediated by dendritic cells pulsed with the Nterminal domain of *Leishmania infantum* elongation factor2 and CpG oligodeoxynucleotides. *Mol Immunol* 2018;103:7-20. doi. 10.1016/j.molimm.2018.08.004.

Optimized Mouse BMDC Isolation and Culture under Endotoxin-Free Conditions

Sadeghishermeh A¹, Habibzadeh S¹, Taghikhani A², Rafati S¹, Seyed N^{1*}

(Received: November 7, 2020

Accepted: February 14, 2021)

Abstract

Introduction: Dendritic cells are very important in basic studies and vaccine research, but isolation and culture of these cells face challenges due to their small number in tissues. Since there is no standard method, we addressed some of the factors affecting the efficiency of dendritic cell isolation and culture from BALB/c mouse bone marrow.

Materials & Methods: Bone marrow cells isolated from femur and tibia, were seeded in plates and treated with GM-CSF. On day 3, half of the media was transferred to a new plate with fresh media plus GM-CSF. On day 5, cells were induced with CpG oligonucleotide. Cell survival as well as maturation markers of CD11C, MHC-II and CD86 were investigated by flow cytometry on day 5 (immature cells) and day 7 (mature cells).

Ethics code: IR.PII.REC.1395.99

Findings: It was found that the presence of endotoxin in the culture of immature cells, significantly reduces the recovery of dendritic cells (p value <0.05). Less than one million cells seeded in non-treated 6-well plates and transfer of cells to a new plate on day 3 increased the efficiency of immature cell retrieval by preventing early maturation and premature death. Further treatment of immature cells with CpG on day 7 was used to induce the Th1 pathway. Significant difference (p value <0.05) with control group showed that CpG induces maturation after treatment with GM-CSF (without IL-4).

Discussion & Conclusions: Optimization of dendritic cell culture in terms of different culture conditions highly impacts the efficiency of immature cell formation and maturation.

Keywords: Bone marrow, Dendritic cells, Cell culture optimization, Endotoxin

1.Dept of Immunotherapy and Leishmania Vaccine Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2.Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: negarse@gmail.com