مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۷۰/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۲

تمایز و بررسی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت تحت تأثیر مایع رویی سلول‌های اندوتلیال و عوامل بلوغ

کیکاوس غلامی[۱]، دکتر وحید نجاتی[۲]، دکتر نوروز دلیرژ[۳]، معصومه اسدی[۱]، میثم گنجی بخش[۱]

چکیده

مقدمه: سلول‌های دندریتیک (Dendritic cells یا DC) به طور مداوم از بافت‌های محیطی به مناطق حاوی لنفوسیت‌های T در غده‌های لنفاوی محیطی مهاجرت می‌کنند. بنابراین، DCهای فعال شده سلول‌های تخصصی هستند که مدام اطلاعاتی را از بافت‌های محیطی به دست می‌آورند و آن را به غده‌های لنفاوی انتقال می‌دهند. این سلول‌ها در مسیر مهاجرت از خون به داخل بافت‌های محیطی و سپس به داخل غده‌های لنفاوی با سلول‌های اندوتلیال و واسطه‌های محلول آن‌ها تماس پیدا می‌کنند. در این تحقیق، اثرات مایع رویی سلول‌های اندوتلیال (ECM یا Endothelial condition medium) بر روی شاخص‌های فنوتیپی و عملکردی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: سلول‌های دندریتیک نابالغ از کشت سلول‌های مونوسیت در محیط کشت RPMI حاوی FCS (Fetal calf serum)، IL-4 (Interlukin-4) و GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) برای مدت ۵ روز به دست آمد. سپس سلول‌های دندریتیک نابالغ همراه با عوامل بلوغ MCM (Monocyte conditioned medium)، TNF-α (Tumor necrotizing factor alpha) و Poly I-C به مدت ۴۸ ساعت، در محیط کشت RPMI و FCS ۱۰ درصد کشت داده شد (گروه شاهد). مایع رویی سلول‌های اندوتلیال در روزهای پنجم و در آغاز کشت (روز صفر) به گروه شاهد اضافه شد (تیمارها). بلوغ سلول‌های دندریتیک برداشت شده در روز توسط دستگاه فلوسایتومتری، دستگاه بتاکانتر و توسط کیت ELISA بررسی شد.

یافته‌ها: سلول‌های اندوتلیال از طریق واسطه‌های محلول با سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت ارتباط برقرار کردند. این ارتباط باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک از طریق افزایش بیان CD83، CD80 و HLA-DR و کاهش بیان CD14، کاهش فاگوسیتوز، افزایش تولید سایتوکاین‌های تحریکی و تحریک لنفوسیت‌های T در مقایسه با عوامل بلوغ به تنهایی شد.

نتیجه‌گیری: این داده‌ها نشان داد که سلول‌های اندوتلیال ورید ناف که در مسیر مهاجرت سلول‌های دندریتیک از بافت‌های محیطی به غده‌های لنفاوی قرار دارند می‌توانند به عنوان تنظیم کننده‌های بالقوه‌ی عملکرد و تمایز سلول‌های دندریتیک به حساب آیند.

واژگان کلیدی: سلول‌های دندریتیک، مایع رویی سلول‌های اندوتلیال، مونوسیت، تمایز

مقدمه

سلول‌های دندریتیک (Dendritic cells یا DC) مهم‌ترین سلول‌های پردازش کننده‌ی آنتی‌ژن می‌باشند که نقش مهمی در شروع پاسخ‌های ایمنی به خصوص در تحریک سلول‌های T دست نخورده دارند. آن‌ها از سلول‌های بنیادی مغز استخوان منشأ می‌گیرند (۱) و حدود ۵-۲ درصد از لکوسیت‌های خون را تشکیل می‌دهند (۲). عوامل خطر نظیر عوامل میکروبی و واسطه‌های التهابی باعث القای بلوغ DC و افزایش بیان ملکول‌های HLA-DR، کمک تحریکی، تولید سایتوکاین و ظرفیت مهاجرتی آن‌ها می‌شوند (۳). سلول‌های دندریتیک به طور مداوم از بافت‌های محیطی

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۳] استادیار، گروه ایمونولوژی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: کیکاوس غلامی
Email: keyka.gholami@yahoo.com

www.mui.ac.ir

و از طریق عروق لنفاوی به مناطق لنفوسیت‌های T در غده‌های لنفاوی ثانویه حرکت می‌کنند (۴). هنگام حرکت DC از بافت‌های محیطی به بافت‌های لنفاوی، با محیط های کوچک استرومایی که از ماتریکس خارج سلولی، عوامل محلول و انواع مختلف سلول‌ها (شامل ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، اندوتلیال، اپی‌تلیال و غیره) تشکیل شده‌اند، تماس پیدا می‌کنند (۵). شواهد زیادی وجود دارد که سلول‌های اندوتلیال نقش مهمی را در لانه گزینی و به کارگیری گرانولوسیت‌ها (۶)، لنفوسیت‌ها (۷)، مونوسیت‌ها (۸) و همچنین تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک در هنگام عبور آن‌ها از طریق اندوتلیوم ایفا می‌کنند (۹). سلول‌های اندوتلیال همچنین از طریق ترشح سایتوکاین و تماس مستقیم سلولی از تکثیر و تمایز سلول‌های پیش ساز مغز استخوان (CD34) حمایت می‌کنند (۱۰). تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که سلول‌های اندوتلیال با تولید فاکتور مهارکننده‌ی رشد اندوتلیال عروق و مهارکننده‌ی رگ‌زایی باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شوند (۱۱). در مطالعاتی که از سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با TNF-α (Tumor necrotizing factor alpha) استفاده شده بود، مشخص شد که TNF-α از طریق افزایش تولید فاکتور مهار کننده‌ی رشد اندوتلیال عروق باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شود (۱۱). با توجه به این داده‌ها هدف از انجام این تحقیق، بررسی مایع رویی سلول‌های اندوتلیال چسبیده به سطح و تحریک نشده با سایتوکاین در حضور عوامل بلوغ بر روی بلوغ و عملکرد سلول‌های DC بود.

روش‌ها

هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی اثرات مایع رویی سلول‌های اندوتلیال بر روی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت بود. برای این منظور سه گروه مطالعاتی در نظر گرفته شد که شامل دو گروه تیمار و یک گروه شاهد بود.

گروه شاهد با تولید سلول‌های دندریتیک از کشت مونوسیت‌های خون طی یک دوره‌ی ۷ روزه در محیط کشت RPMI حاوی عوامل تمایز (GM-CSF یا Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor و IL-4 یا Interlukin-4)، عوامل بلوغ MCM (Monocyte conditioned medium) و TNF-α تهیه شد. گروه تیمار ۱، توسط تولید سلول‌های دندریتیک حاصل از اضافه کردن ۵۰ درصد مایع رویی سلول‌های اندوتلیال از روز صفر به محیط کشت گروه شاهد به دست آمد. برای تهیه‌ی گروه تیمار ۲، تولید سلول‌های دندریتیک حاصل از اضافه کردن ۵۰ درصد مایع رویی سلول‌های اندوتلیال از روز پنجم به محیط کشت گروه شاهد انجام شد.

آنتی‌بادی‌های CD14 FITC، CD80 FITC، CD83 FITC، CD86 FITC، HLA-DR PE و بید لاتکس (Latex beads) فلورسانت (کنژوگه با FITC) از شرکت سیگما خریداری شد. کیت اندازه گیری سایتوکاین‌های IFN-γ (Interfrone)، IL-4، IL-10 و IL-12 از شرکت Peprotech خریداری گردید.

برای تولید مایع رویی سلول‌های اندوتلیال، رده‌ی سلول‌های اندوتلیال ورید انسان (HUVEC یا Human umbilical vein endothelial cell) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و در فلاسک کشت سلولی T75 در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استروپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ۲ME ($۲/۵ \times ۱۰^{-۵}$ مول) و FCS (Fetal calf serum) (۱۰ درصد) داخل انکوباتور (۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و

www.mui.ac.ir

رطوبت ۹۰ درصد) کشت داده شدند. بعد از آن که ۸۰ درصد از کف فلاسک‌ها به وسیله‌ی سلول‌ها پوشیده گردید، مایع رویی دور ریخته شد و مقدار ۸ میلی لیتر محیط کشت تازه ی بدون سرم، به فلاسک اضافه گردید و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، مایع رویی جمع‌آوری و سانتریفیوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه) انجام گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری شد و با فیلتر سر سرنگی (۲۲ میکرون) استریل گردید و برای استفاده‌ی بعدی در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

برای کشت سلول‌های دندریتیک ابتدا جهت به دست آوردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell یا PBMC) با سرنگ آغشته به هپارین از افراد داوطلب خون کشیده شد، سپس با همان حجم از محیط کشت RPMI رقیق گردید و به آرامی روی فایکول برده شد، و با سرعت g ۸۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. در مراحل بعدی برای حذف فایکول و پلاکت‌ها به ترتیب سانتریفوژ با سرعت ۴۵۰ گراویتی به مدت ۱۰ دقیقه و ۲۰۰ گراویتی به مدت ۱۰ دقیقه دوباره انجام شد. از سلول‌های PBMC به دست آمده در مراحل قبل، تعداد $۱/۵-۳ \times ۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر و به مقدار ۵ میلی‌لیتر در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت PRMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استروپتومایسین، $۲/۵ \times ۱۰^{-۵}$ مول ۲ME و FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام جدا شدند، به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها را منوسیت‌ها تشکیل می‌دادند، محیط کشت جدید به اضافه‌ی GM-CSF (۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و IL-4 (۵۰۰ واحد در میلی‌لیتر) اضافه گردید و کشت داده شد. در روز سوم به طور مجدد مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به فلاسک‌های حاوی سلول اضافه گردید. عصاره‌ی سلول‌های توموری خون k562 که پیش از آن به عنوان آنتی‌ژن تهیه شده بود، روز ۴ اضافه گردید. در روز پنجم عوامل بلوغ TNF-α (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) و PLY-IC (۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) و ۲۵ درصد مایع رویی مونوسیت (MCM) جهت کمک به فرایند بلوغ سلول‌های دندریتیک اضافه گردید و تا ۴۸ ساعت دیگر در انکوباتور انکوبه شد (گروه شاهد). مایع رویی سلول‌های اندوتلیال در آغاز کشت یعنی روز صفر (تیمار یک) و در روز ۵ (تیمار دو) به گروه شاهد اضافه شد. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بافر PBS حاوی ۰/۵ میکرومول (Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA برداشت شد و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ، قدرت بیگانه خواری، تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و تولید سایتوکین‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

عصاره‌ی سلول‌های توموری از سوسپانسیون سلولی K۵۶۲ تهیه گردید. به منظور سنجش میزان ارائه‌ی آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک از آنتی‌ژن سلول‌های توموری K۵۶۲ استفاده شد. سوسپانسیون سلول‌های توموری K۵۶۲ به تعداد $۱۱-۱۰^{۶}$ سلول تهیه و دو بار با محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ شسته شد. بعد از آخرین شستشو حجم سوسپانسیون سلولی به ۱/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سوسپانسیون سلولی چهار دور با قرار دادن در نیتروژن مایع و آب ۳۷ درجه‌ی

www.mui.ac.ir

سانتی‌گراد، هر کدام به مدت ۵ دقیقه Freeze/thaw گردید. محصولات به دست آمده به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری گردید و به طور مجدد به مدت یک ساعت، با سرعت ۱۳۰۰۰ گراویتی سانتریفوژ شد و با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ (میکرون) استریل گردید.

مورفولوژی سلول های کشت داده شده از اولین مرحله‌ی کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تا مرحله‌ی نهایی برداشت سلول‌های دندریتیک بالغ به وسیله‌ی میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فنوتیپ سطحی سلول به وسیله‌ی فلوسایتومتری انجام شد. در روز هفتم کشت، اکثریت سلول‌های دندریتیک به سلول‌های اندوتلیال چسبیده بودند و تعداد کمی به حالت شناور در آمدند. با اضافه کردن بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵ میکرومول) و انکوبه کردن در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برداشت گردیدند و سلول‌های به دست آمده بعد از یک بار شستشو با بافر FACS در همین بافر که حاوی ۲ درصد سرم موش بود به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. در پایان زمان انکوباسیون سلول‌ها به طور مجدد با بافر FACS شستشو شد و بعد از رساندن حجم آن‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر مقدار ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مربوط یا کنترل ایزوتیپ اضافه به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌ها یک بار با بافر FACS شسته شدند و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتری FACSCalibor (Becton-Dickinson آمریکا) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصل با نرم‌افزار CellQuest مورد آنالیز قرار گرفت.

به منظور سنجش قدرت سلول‌های دندریتیک تولید شده در گروه شاهد وگروه تیمار از نظر تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T (سلول‌های پاسخ دهنده) واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن و اتولوگ انجام گرفت. برای انجام این کار لنفوسیت‌های T آلوژن از PBMC افراد داوطلب و با خلوص بیش از ۸۰ درصد تهیه گردید. تعداد 10^5 لنفوسیت T با سلول‌های دندریتیک در نسبت‌های مختلف (۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۲۰) مخلوط و به مدت ۵ روز در پلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ به اضافه‌ی ۱۰ درصد سرم AB انسانی در حجم ۲۰۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شد. در خانه‌های حاوی سلول‌های دندریتیک تنها، لنفوسیت‌های T تنها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در روز پنجم به هر خانه مقدار Ciμ ۱ متیل تیمیدین نشاندار شده با $[^3H]$ (Amersham) اضافه و به مدت ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گردید. سلول‌ها توسط دستگاه Cell Harvester (شرکت ICN، انگلستان) بر روی فیلتر نیتروسلولزی منتقل گردید. بخش‌هایی از فیلتر که حاوی سلول‌های برداشت شده بود جدا و در ویال مخصوص قرار گرفتند. مقدار ۲ میلی‌لیتر محلول سنتیلاسیون به هر ویال اضافه گردید. میزان تابش پرتو بتا از هر نمونه به مدت یک دقیقه توسط دستگاه شمارشگر بتا (شرکت Wallac، فنلاند) شمارش و ثبت گردید. تمامی آزمایشات به صورت سه تایی انجام شد و نتایج به دست آمده به صورت CPM (Count per minute) محاسبه و گزارش گردید.

برای اندازه‌گیری قدرت بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک، ۲۰ L از بید لاتکس فلورسانت (Sigma)

www.mui.ac.ir

(کنژوگه با FITC) با غلظت $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ در هر میلی‌لیتر در ۵ میکرولیتر سرم AB^{+} به مدت ۷/۵ دقیقه اپسونیزه شد. سپس بید اپسونیزه شده با ۲۰ میکرولیتر از سلول‌های دندریتیک بالغ (روز هفتم) با غلظت $۱/۲۵ \times ۱۰^{۷}$ در هر میلی‌لیتر مخلوط شد و با اضافه کردن ۶۰ میکرولیتر بافر مخصوص بیگانه خواری (PBS، ۵ میکرومول گلوکز، ۰/۹ میکرومول $CaCl_2$، ۰/۵ میکرومول $MgSO_4$ و ۰/۵ FBS درصد) به حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر رسید (در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد). میکروپلیت حاوی گروه تیمار به همراه گروه شاهد حاوی تمام مواد به جز بید لاتکس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شد. بعد از اتمام ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها برداشت شدند و به منظور خاموش شدن فلورسانت سطح سلول با بافر خاموش کننده (Quenching buffer) (NaCl ۰/۹ درصد، بافر سیترات ۱۳ میلی‌مول و تریپان بلو ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) شسته شدند (g × ۳۰۰، ۱۰ دقیقه).

آزمایش مربوط به IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 به صورت جداگانه به وسیله‌ی کیت اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12 (Peprotech) طبق پروتکل کارخانه‌ی سازنده انجام گرفت. میزان تولید IFN-γ و IL-4 در مایع رویی تست MLR و میزان تولید IL-10 و IL-12 در مایع رویی روز هفتم کشت سلول‌های دندریتیک مورد سنجش قرار گرفت. تغییر رنگ پلیت با استفاده از دستگاه قرائت‌گر ELISA (Awerness) و با طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. با استفاده از متوسط OD (Optical density) به دست آمده از برنامه‌ی Curve expert نسخه‌ی ۰/۷ مقدار IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-12موجود در نمونه تعیین و به صورت نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش شد.

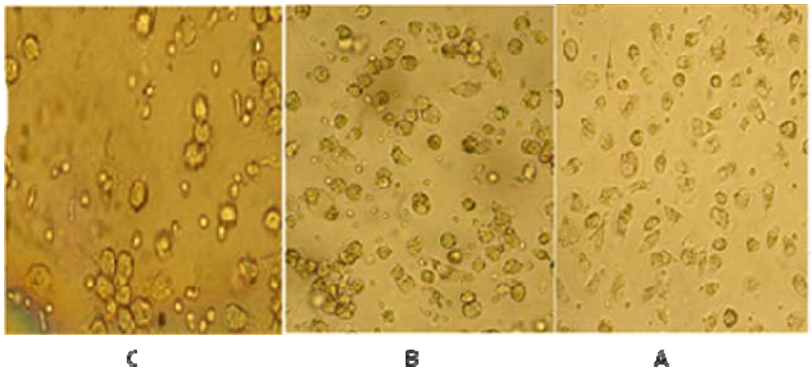
تمامی آزمایش‌ها با سه مرتبه تکرار به ثبت رسیدند و تفسیر و بررسی نتایج با برنامه‌ی SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. مقایسه‌ی بین گروه‌ها توسط آزمون‌های Paired t و ANOVA انجام گردید و مقدار $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین نتایج تست ELISA توسط نرم‌افزار Curve expert نسخه‌ی ۰/۷ مورد آنالیز قرار گرفت و مقدار $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

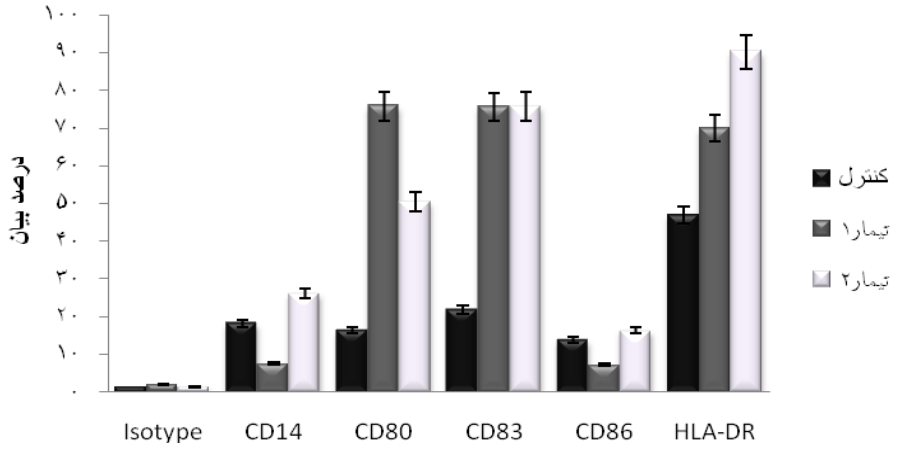
بررسی مورفولوژیکی: کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت باعث شد تا اکثریت سلول‌ها که درصد بیشتر آن‌ها مونوسیت بودند به ته فلاسک بچسبند و بعد از ۳ روز کشت سلول‌های چسبنده در حضور IL-4 و GM-CSF چسبندگی خود را از دست دادند و شناور شدند. این سلول‌ها بزرگ‌تر از مونوسیت‌ها شده بودند و زواید سیتوپلاسمی پیدا کرده بودند. این روند تا روز ۵ ادامه یافت. در روز پنجم با افزودن عوامل بلوغ TNF-α، PLY-IC و TCM افزایش قابل ملاحظه‌ی اندازه‌ی سلول و تعداد زواید سیتوپلاسمی و روند شناور شدن آن‌ها دیده شد (گروه شاهد). DC تولید شده در گروه تیمارها شناور و کروی شکل بودند و زواید سیتوپلاسمی بلند داشتند (شکل ۱).

ویژگی‌های فنوتیپی سلول‌های دندریتیک: درصد بیان مولکول‌های CD14، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به صورت میانگین

www.mui.ac.ir



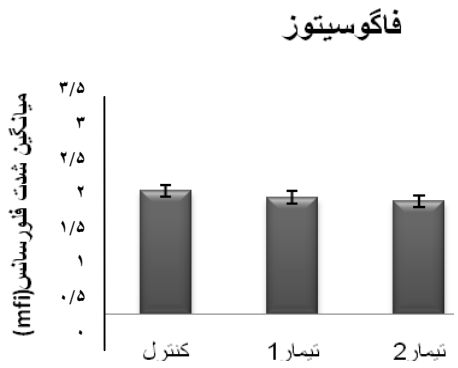
شکل ۱. بررسی مورفولوژیک DCs در گروه شاهد (A)، تیمار یک (B) و تیمار دو (C)



شکل ۲. میانگین بیان نشانگرهای ملکولی در سلول‌های دندریتیک گروه شاهد و تیمارها (*: اختلاف معنی‌دار)

درصد بیان مولکول‌ها، در شکل ۲ ارائه شده است.

قدرت بیگانه خواری سلول‌ها: سنجش این تست با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت؛ اما در این تحقیق تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول‌های دندریتیک به وسیله‌ی دستگاه فلوسایتومتری که به صورت میانگین شدت فلورسانس (MFI) نشان داده می‌شود، مورد سنجش قرار گرفت و مشخص گردید تعداد ذرات فلورسانس بلعیده شده توسط هر یک از سلول‌های دندریتیک تیمار نسبت به گروه شاهد به میزان اندکی کاهش داشت ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳).

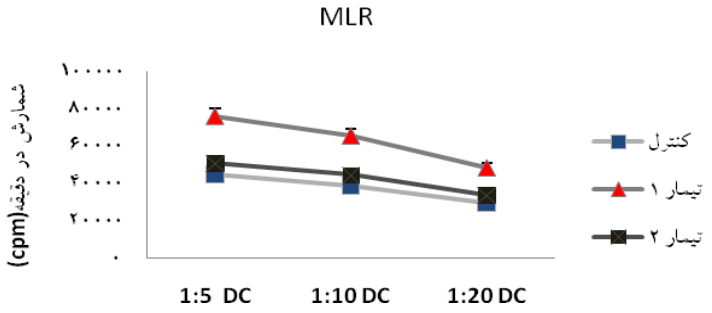


شکل ۳. میانگین شدت فلورسانس بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک

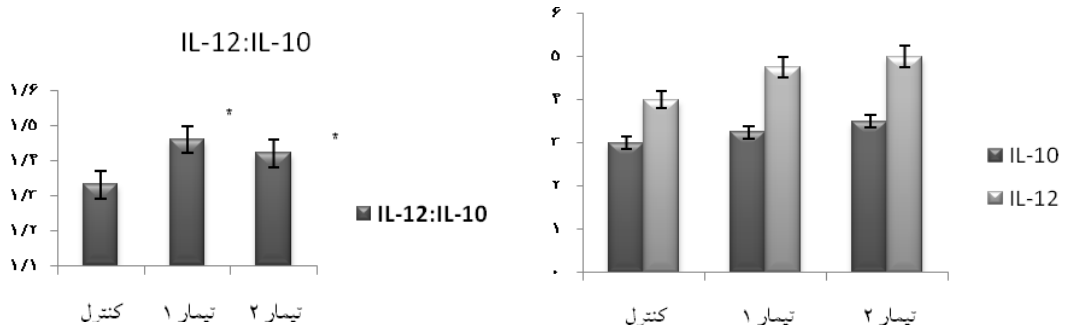
سنجش تحریک لنفوسیت T (MLR): به منظور سنجش عملکرد سلول‌های دندریتیک تولید شده در

تیمار و گروه شاهد، توانایی آن‌ها در القای واکنش لوکوسیتی آلوژنیک مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های دندریتیک تولید شده در تیمار یک دارای توانایی بیشتر در القای تکثیر سلول‌های آلوژن نسبت به سلول‌های دندریتیک گروه شاهد بودند (نتایج به صورت میانگین CPM در شکل ۴ نمایش داده شده است) که تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).

بررسی توانایی تولید سایتوکین‌ها توسط سلول‌ها: میزان ترشح سایتوکین INF-γ و IL-4 از لنفوسیت‌های T، که در مجاورت سلول‌های دندریتیک گروه شاهد و تیمارها به مدت پنج روز قرار گرفته بودند، به وسیله‌ی کیت ELISA مورد سنجش قرار گرفت. میزان ترشح IL-12 در تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود. همچنین میزان ترشح IL-10 در تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش خیلی کمی نشان می‌داد، که در هر دو مورد اختلاف آماری معنی‌دار نبود، اما نسبت IL-12 به IL-10 در تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) یافته بود (شکل ۵). این نسبت شاخص مهم تری برای تعین سلول های دندریتک تحریکی (DC1) و تنظیمی (DC2) بود. نتایج نشان داد میزان ترشح INF-γ توسط لنفوسیت‌های T، در تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود؛ در حالی که میزان IL-4 در تیمارها نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد، اما داده‌های مربوط به پروفایل سایتوکاین‌های لنفوسیت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۶).

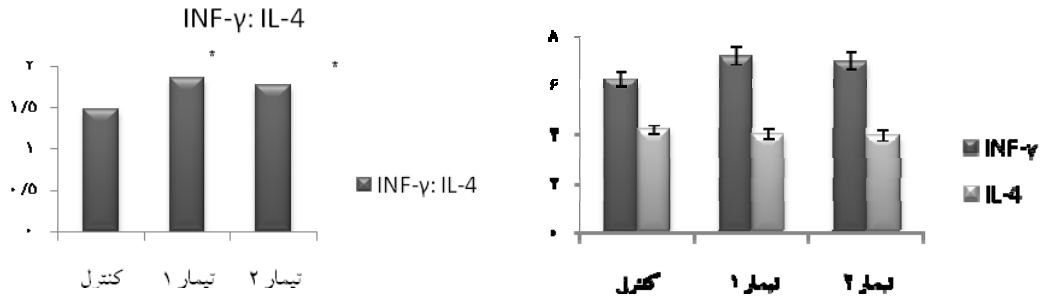


شکل ۴. واکنش مختلط لنفوسیتی در رقت‌های مختلف DC در گروه شاهد و تیمارها



شکل ۵. میانگین تولید سایتوکاین‌ها در سلول‌های DC در گروه شاهد و تیمارها (*: اختلاف معنی‌دار)

www.mui.ac.ir



شکل ۶. میانگین تولید سایتوکاین‌ها در لنفوسیت‌های مجاورت شده با سلول‌های DC گروه شاهد و تیمار (*: اختلاف معنی‌دار)

همچنین می‌توان از نسبت INF-γ:IL-4 برای تعیین لنفوسیت‌های تحریکی (Th1) و تنظیمی (Th2) استفاده کرد، که این نسبت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

بحث

اندوتلیوم از نظر متابولیکی تخصصی و فعال است و یک سد بین خون و بافت زیرین می‌باشد. همچنین نقش مهمی در انتقال پیام‌های التهابی و جذب سلول های سیستم ایمنی به مکان های التهاب دارد (۱۲). سلول های اندوتلیال نقش مهمی را در چسبیدن، مهاجرت و تمایز سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان دارند (۱۳). بر اساس داده های فلوسایتومتری مربوط به آنالیز فنوتیپ DCs به این نتیجه رسیدیم که DCs حاصل از تیمارها، ملکول‌های کمک تحریکی بیشتری نسبت به گروه شاهد بیان می‌کنند. این نتایج با مطالعات گذشته در انطباق بود.

Tian و همکاران نشان دادند که سلول‌های اندوتلیال با ترشح فاکتور مهار کننده‌ی رشد اندوتلیال عروق (Vascular endothelial growth factor یا VEGI) و مهار کننده‌ی رگ‌زایی (Antiangiogenic) باعث بلوغ سلول‌های دندریتیک و افزایش بیان ملکول‌های کمک تحریکی CD83، CD80 و HLA-DR می‌شوند (۱۱).

Methe و همکاران نشان دادند سلول‌های اندوتلیال غیر چسبنده و مایع رویی آن‌ها (سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده در محلول نمک) باعث افزایش بیان CD80، CD83 و HLA-DR می‌شوند. آن‌ها همچنین گزارش دادند سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده در ماتریکس دو بعدی و سه بعدی همراه با مایع رویی آن‌ها باعث کاهش بیان نشانگرهای یاد شده در سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت می‌شوند (۱۲). در ارزیابی تولید سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی سلول‌های اندوتلیال نتایج نشان داد که میزان IL-10 نسبت به گروه شاهد افزایش خیلی کمی یافته بود. همچنین میزان تولید IL-12 در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود. IL-10 به طور عمده توسط ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T تنظیمی (۱۴) و نیز سلول‌های دندریتیک تنظیمی تولید می‌شود (۱۵). IL-12 را عامل محرک لنفوسیت‌های T و لنفوسیت‌های NK (Natural killer) برای ترشح INF-y می‌دانند. IL-12 موجب پیشبرد تمایز لنفوسیت های T یاور با نشانگر CD4 تحریک نشده به زیر گروه تولید کننده ی INF-y

(TH1) می‌شود (۱۶).

اگر چه میزان IL-10 در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت، اما نسبت IL-12:IL-10، که شاخص مهم‌تری در ارزیابی پروفایل سایتوکاینی سلول های دندریتیک می‌باشد، اختلاف معنی داری را در گروه شاهد و تیمار نشان داد. افزایش IL-10 در گروه تیمارها نسبت به گروه شاهد به علت وجود تعداد کم سلول‌های دندریتیک نابالغی می‌باشد که IL-10 بیشتری تولید می‌کنند، به همین خاطر از شاخص نسبت سایتوکاین‌ها استفاده می‌شود. شاید بتوان با به کار بردن نسبت بیشتری از مایع رویی اندوتلیال (که ما در این مطالعه از نسبت ۱:۱ با محیط کشت RPMI استفاده کردیم)، درصد این سلول های دندریتیک نابالغ را کاهش داد. در بررسی MLR سلول‌های دندریتیک حاصل از گروه شاهد و گروه تیمار مشخص شد که سلول‌های دندریتیک گروه تیمار توانایی بیشتری در تحریک لنفوسیت‌های T و تکثیر آن‌ها دارند.

بررسی مایع رویی تست MLR برای اندازگیری IL-4 و INF-γ نشان داد که میزان IL-4 نسبت به INF-γ کاهش یافته بود. منبع سلولی IL-4 زیر گروه Th2 تنظیمی از لنفوسیت‌های T فعال شده با نشانگر CD4 می‌باشد (۱۷). از طرف دیگر، اینترفرون-گاما سایتوکاین شاخص زیر گروه لنفوسیت‌های T_H1 کمکی می‌باشد. اینترفرون-گاما سایتوکاین اصلی فعال کننده‌ی ماکروفاژها است و عملکردهای مهمی در ایمنی ذاتی و ایمنی سلولی تطبیقی در مقابل میکروب‌های داخل سلولی دارد (۱۸). با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری سایتوکاین های ترشح شده از لنفوسیت‌ها (INF-γ و IL-4) و نسبت آن‌ها مشخص شد که لنفوسیت‌های T تحریک شده از نوع Th1 تحریکی می‌باشند. سلول‌های دندریتیک به دست آمده در گروه تیمارها با ترشح بیشتر IL-12 نسبت به گروه شاهد، لنفوسیت‌های T تحریک نشده را به سمت زیرگروه T_H1 تحریکی هدایت می‌کنند و این سلول‌های T_H1 با ترشح INF-γ نسبت به IL-4 بیشتر باعث تحریک لنفوسیت‌های T می‌شوند که در MLR به خوبی مشخص بود.

نتیجه‌گیری

محققین استفاده از سلول‌های دندریتیک برخورد کرده با آنتی‌ژن‌های تومروی را به صورت واکسن و نیز حساس سازی لنفوسیت‌های اختصاصی به آنتی‌ژن تومروی توسط سلول‌های دندریتیک در in vitro را به عنوان ایمونوتراپی غیر فعال در کنار سایر روش‌های درمانی متداول سرطان یعنی شیمی درمانی، جراحی، هورمون درمانی و پرتو درمانی توصیه می‌کنند (۱۹). از مطالعاتی که نتایج بخشی از آن ها بیان گردید، چنین بر می‌آید که در ایمونولوژی تومور، القای پاسخ Th1 و به تبع آن تقویت ایمنی سلولی با واسطه‌ی سیتوکین‌هایی چون IFN-γ، IL-12 و غیره با تقویت پاسخ ضد تومروی و تحلیل تومور همراه است (۲۱-۲۰). چیزی که مشخص است این است که واکسن مبتنی بر سلول های دندریتیک نه تنها ساده و قابل اجرا است بلکه باعث القای پاسخ ایمنی ضد تومروی در شرایط محیط بدن و شرایط ازمایشگاهی می‌شود. با توجه به یافته‌های ما در این تحقیق، می‌توان از مایع رویی سلول‌های اندوتلیال همراه با سایر عوامل بلوغ جهت تولید سلول‌های دندریتیک که دارای بهترین عملکرد بیولوژیک باشند، به منظور استفاده در

www.mui.ac.ir

فرایند ایمونوتراپی غیر فعال استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این کار تحقیقاتی در قالب پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد با شماره ی ۱۱۳۸-۲ انجام شد. تصویب و پرداخت هزینه‌ی طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه صورت گرفت.

References

1. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. Nature 1979; 282(5736): 324-6.
2. Thomas DB. Viruses and the Cellular Immune Response. New York: Marcel Dekker; 1993.
3. Tan JK, O'Neill HC. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. J Leukoc Biol 2005; 78(2): 319-24.
4. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. Eur J Immunol 1999; 29(5): 1617-25.
5. D'Amico G, Bianchi G, Bernasconi S, Bersani L, Piemonti L, Sozzani S, et al. Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. Blood 1998; 92(1): 207-14.
6. Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. J Exp Med 1997; 186(4): 517-27.
7. Thornhill MH, Kyan-Aung U, Haskard DO. IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils. J Immunol 1990; 144(8): 3060-5.
8. Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. Blood 1998; 92(11): 4167-77.
9. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. Science 1998; 282(5388): 480-3.
10. Rafii S, Shapiro F, Rimarachin J, Nachman RL, Ferris B, Weksler B, et al. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. Blood 1994; 84(1): 10-9.
11. Tian F, Grimaldo S, Fujita M, Cutts J, Vujanovic NL, Li LY. The endothelial cell-produced antiangiogenic cytokine vascular endothelial growth inhibitor induces dendritic cell maturation. J Immunol 2007; 179(6): 3742-51.
12. Methe H, Hess S, Edelman ER. Endothelial cell-matrix interactions determine maturation of dendritic cells. Eur J Immunol 2007; 37(7): 1773-84.
13. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 2003; 425(6960): 841-6.
14. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Annu Rev Immunol 2004; 22: 929-79.
15. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, Wu W, Colvin BL, de CA, et al. "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. J Immunol 2006; 177(9): 5868-77.
16. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. Trends Immunol 2003; 24(4): 207-12.
17. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. Annu Rev Immunol 2004; 22: 503-29.
18. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem 1998; 67: 227-64.
19. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. J Exp Med 1996; 183(1): 317-22.
20. 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(10): 5071-9.
21. Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei P. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. Cell Immunol 2009; 257(1-2): 23-31.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 170, 2nd week, March 2012 Received: 17.3.2011 Accepted: 3.12.2011

Differentiation and Assessment of Monocyte-Derived Dendritic Cells in the Presence of Endothelial Cells Conditioned Media and Maturation Factors

Keykavos Gholami MSc[1], Vahid Nejati PhD[2], Nowruz Delirezh PhD[3], Masoumeh Asadi MSc[1], Meysam Ganjibakhsh MSc[1]

Abstract

Background: Dendritic cells (DCs) migrate from the periphery to the T cell zone of secondary lymphoid organs. Thus, activated DCs are specialized cells that obtain information from the periphery and transfer it to lymphoid organs. During their migration from the blood into peripheral tissues and then into the lymph nodes, DCs interact with endothelial cells and their soluble mediators. Therefore, we studied the effects of the endothelial condition medium (ECM) on phenotypic and functional characteristics of monocyte- driven dendritic cells.

Methods: DCs were generated by culture of monocyte cells for 5 days in RPMI medium (RPMI 1640) supplemented with 10% FCS (fetal calf serum), IL-4 (interlukin-4), and GM-CSF (granulocyte, macrophage-colony stimulating factor). They were then incubated for 48 hours in MCM (monocyte conditioned medium), TNF-α (tumor necrotic factor alpha), and polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC; control). ECM was added on day 5 and the beginning of the culture (day-0) to the control. The maturation of harvested DCs on day 7 was evaluated via flow cytometry, beta-counter and ELISA kits.

Findings: DCs generated from peripheral blood monocytes specifically interact with ECM via soluble mediators. This induced the phenotypic maturation of DC via increased expression of CD83, CD80, HLA-DR, down-regulation of CD14, decreased phagocytic activity, and producing stimulatory cytokines in comparison with maturation factors alone. Moreover, ECM-matured DCs potently induced T cell activation reflected by increased T cell proliferation.

Conclusion: Our results demonstrated that human endothelial cells with which DCs can encounter during their trafficking from tissue to lymph nodes can act as potent regulators of DC differentiation and function.

Keywords: Dendritic cell, Endothelial cell condition medium, Monocyte, Differentiation

[1] Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Immunology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Keykavos Gholami MSc, Email: keyka.gholami@yahoo.com