

Effect of Epigallocatechin gallate (EGCG) on Production of Dendritic Cells from Peripheral Blood Monocytes

Mohammad Ali Mofid Nakhaei¹,

Nabiallah Mohammadi²,

Saeid Abediankenari³

¹ MSc Student in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² PhD Student in Immunology, Immunogenetics Research center, Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Immunogenetics Research center, Department of Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 13, 2020 ; Accepted September 23, 2020)

Abstract

Background and purpose: Dendritic cells are professional antigen presenting cells that initiate and modulate immune responses. Epigallocatechin gallate (EGCG) is identified as a prophylactic agent that can suppress tumor formation. This research aimed at investigating the effect of EGCG on differentiation of dendritic cells from monocytes and as a potential substitute for IL-4 in this process.

Materials and methods: In this experimental study, blood samples were drawn and peripheral blood mononuclear cells were isolated using FICOL. The monocytes CD14 + were purified by MACS. EGCG was added in 5 $\mu\text{mol} / \text{l}$ and 10 $\mu\text{mol} / \text{l}$. On days six and eight, the cells were analyzed and differentiation factors such as CD83, HLA-DR, and CD-b were evaluated using flow cytometry. In addition, IL-23 and IL-35 levels were measured.

Results: CD-11 and CD11b levels in mature and immature dendritic cells were significantly different between the two paths ($P < 0.05$), HLA-DR levels were also significantly different in dendritic cells ($P < 0.05$). IL-23 and IL-35 levels in mature and immature dendritic cells were not significantly different, whereas these levels in mature dendritic cells showed significant differences between the two paths ($P < 0.05$).

Conclusion: This study showed that EGCG compared to IL-4 can initiate monocyte differentiation to dendritic cells and this molecule can turn monocytes to dendritic cells with tolerogenic qualities compared to the classic path.

Keywords: EGCG, IL-35, IL-23

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (190): 1-10 (Persian).

* Corresponding Author: Saeid Abediankenari - Immunogenetics Research center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: Abedianlab@yahoo.com)

بررسی اثر ماده موثره epigallocatechin-gallate (EGCG) بر تولید سلول های دندریتیک از مونوسیت های خون محیطی انسانی

محمدعلی مفیدنخعی¹

نبی اله محمدی²

سعید عابدیان کناری³

چکیده

سابقه و هدف: سلول های دندریتیک، سلول های حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن هستند که آغازگر و تعدیل کننده پاسخ های ایمنی می باشند. ماده شیمیایی epigallocatechin gallate (EGCG) چای سبز یکی از عوامل سرکوبگر تومور شناخته شده است. از آنجایی که اینترلوکین 4 (IL-4) تولید سایتوکاین های پیش التهابی را مهار می کند و EGCG نیز دارای اثر ضد التهابی و تعدیل کننده ایمنی می باشد، لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثر EGCG در تمایز مونوسیت ها به سلول های دندریتیک به عنوان جایگزینی مناسب برای IL-4 بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های تک هسته ای خون محیطی با استفاده از فایکول جدا سازی و سلول های مونوسیت CD14⁺ به روش MACS جمع آوری شدند. EGCG در دو غلظت 5 $\mu\text{mol/l}$ و 10 $\mu\text{mol/l}$ اضافه شد. سلول ها در روز ششم و هشتم از جهت شاخص های تمایزی CD83، HLA-DR، و CD11b به روش فلو سیتمتری ارزیابی شدند. IL-23 و IL-35 نیز در مایع رویی کشت سلولی بررسی شدند.

یافته ها: مولکول های CD83 و CD11b در سلول های دندریتیک بالغ و نابالغ، تفاوت معنی داری بین دو روش داشت ($P < 0/05$) مولکول HLA-DR در سلول های دندریتیک نیز تفاوت معنی داری داشت ($P < 0/05$). IL-23 و IL-35 در مرحله نابالغ نسبت به سلول های دندریتیک بالغ تفاوت معنی داری نداشتند ولی در مرحله بالغ بین دو روش تفاوت معنی داری دیده شد ($P < 0/05$).

استنتاج: بر اساس نتایج این مطالعه، EGCG در مقایسه با IL-4 توانایی تمایز مونوسیت ها به سلول های دندریتیک نابالغ را دارد و به نظر می رسد این مولکول باعث تولید سلول هایی دندریتیک با خاصیت تورلوزنیک نسبت به روش کلاسیک می شود.

واژه های کلیدی: EGCG، اینترلوکین 35، اینترلوکین 23

مقدمه

سلول های دندریتیک، سلول های حرفه ای عرضه کننده آنتی ژن هستند که آغازگر و تعدیل کننده پاسخ های ایمنی می باشند. این سلول ها دارای عملکرد ایمونولوژیکی

E-mail: Abedianlab@yahoo.com

مؤلف مسئول: سعید عابدیان کناری - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشجوی دکترای ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/2/24 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/3/13 تاریخ تصویب: 1399/7/2

غیر لنفاوی قرار دارند و از پیش سازهای موجود در گردش خون مشتق می شوند. این پیش سازها به واسطه جریان خون در اندام های غیر لنفاوی به سلول های دندریتیک نابالغ تبدیل می شوند. سلول های دندریتیک بسته به نوع بافت هدف به اندام های لنفاوی مانند طحال و غدد لنفاوی مهاجرت کرده و در آن جا به سلول های دندریتیک بالغ تمایز پیدا می کنند. سلول های دندریتیک تحریک کننده های اصلی پاسخ های سلولی T ناآزموده هستند. این سلول ها دارای شاخص های مختلفی از جمله MIDC-8 و 2A1، M342، OX62، S100b، p55، CD83 بوده و سایتوکاین های اینترلوکین 12 (IL-12)، کموکاین ها و پروتئازها را ترشح می کنند (1). مونوسیت ها پیش ساز سلول های دندریتیک می باشند. تمایز مونوسیت ها در شرایط آزمایشگاهی با شرایط تمایز آن ها در داخل بدن متفاوت است. مطالعات نشان داده اند که مونوسیت های خون محیطی در محیط کشت RPMI تحت اثر اینترلوکین 4 و فاکتور تحریک کننده کلونی مونوسیت و گرانولوسیت (GM-CSF) به سلول های $CD1a^+CD14^{low/-}$ غیر چسبنده با مورفولوژی و ویژگی های سلول های دندریتیک (DC) تمایز پیدا می کند، اما این سلول ها به دلیل فقدان بیان CD83 نابالغ هستند. سلول های دندریتیک نابالغ مشتق از مونوسیت پس از تیمار با ترکیبات شناخته شده برای القای بلوغ مانند LPS و $TNF-\alpha$ بالغ می شوند. مونوسیت های انسان و موش کشت شده با GM-CSF و IL-4 به سلول های دندریتیک نابالغ تمایز پیدا می کنند که بیان MHC class II و مولکول های کمک تحریکی پایینی دارند (2). امروزه سلول های دندریتیک به دلیل توانایی تعدیل پاسخ های ایمنی از عوامل مهم درمانی در سرطان ها، بیماری های خودایمنی، آلرژی و جلوگیری از رد پیوند محسوب می شوند (3). واکسن های بر پایه سلول های دندریتیک (DC-Based Vaccine) شامل سلول های دندریتیک ارائه دهنده آنتی ژن مانند آنتی ژن های تومور بوده که اکثر آن ها برای تحریک پاسخ های ایمنی به ویژه علیه

سرطان استفاده می شود. امروزه برای اغلب مطالعات بالینی از سلول های دندریتیک مشتق از مونوسیت و سلول های $CD34^+$ استفاده می شود (3). مطالعات نشان داده اند که استفاده از برخی مواد مثل لیپوپلی ساکارید، می تواند سبب تغییر در مسیر بلوغ و تکامل سلول های دندریتیک شود (4-6).

چای سبز از ترکیبات پلی فنول از جمله epigallocatechin-gallate (EGCG)، epigallocatechin (EGC) و epicatechin (EC) تشکیل شده است. فراوان ترین پلی فنول چای سبز EGCG است که مسئول بسیاری از اثرات مفید چای سبز می باشد. EGCG به عنوان قوی ترین عامل پیشگیری کننده تومورها است که می تواند باعث القای سرکوب شکل گیری و رشد تومور از جمله در سرطان کولورکتال شود. نشان داده شده است که EGCG از مسیرهای مختلف رشد سلول های سرطانی، بقا، رگ زایی و متاستاز را تنظیم می کند. در مقایسه با مواد ضد سرطان رایج مانند رتینوئیدها و دوکسوروبیسین، این ترکیب دارای سمیت نسبتاً کم می باشد، بنابراین استفاده از EGCG در آزمایش های بالینی به عنوان یک ماده ضد سرطان حائز اهمیت بوده است. EGCG باعث ایجاد سطوح بالایی از سلول های دندریتیک مملو از آنتی ژن در گره های لنفاوی موش های مبتلا به سرطان شده است. علاوه بر این، ترکیبی از EGCG همراه با واکسن DNA منجر به افزایش پاسخ های ایمنی سلول های T ویژه تومور و اثرات ضد تومور شده و میزان درمان واکسن همراه با EGCG در مقایسه با گروه کنترل افزایش می یابد (7). از آنجایی که سایتوکاین IL-4 تولید سایتوکاین های پیش التهابی مانند IL-1، IL-6، $TNF-\alpha$ و IL-8 را مهار می کند و همچنین EGCG موجود در چای سبز دارای اثر ضد التهابی و تعدیل کننده ایمنی می باشد، لذا در این مطالعه اثر EGCG در تمایز سلول های دندریتیک از مونوسیت ها مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان افق تازه ای در تمایز سلول های دندریتیک ترسیم نمود.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، 25-20 سی سی خون محیطی در لوله حاوی ماده ضد انعقاد هپارین از افراد داوطلب پس از کسب رضایت آگاهانه اخذ گردید.

- جداسازی سلول های مونوسیت به روش (MACS) Magnetic activated cell sorter
به منظور جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) از فایکول با وزن مخصوص 1/077 (سیگما، امریکا) استفاده شد. نمونه خون گرفته شده پس از رقیق کردن در بافر فسفات به آرامی به فایکول اضافه گردید. سپس لوله ها به مدت 20 دقیقه در دور 2000 سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ، سلول های تک هسته ای خون محیطی که به صورت حلقه ای تشکیل شده بودند، جدا گردید. پس از شمارش سلول های تک هسته ای خون محیطی با استفاده از روش جداسازی سلولی مبتنی بر مگنت (MACS) مونوسیت های دارای شاخص CD14 خالص و جمع آوری شد. سلول ها پس از دوبار شستشو و شمارش، در محیط کشت RPMI1640 حاوی سرم جنین گوساله 10 درصد و پنی سیلین - استرپتو مایسین 1 درصد در یک پلیت شش خانه کشت شدند و در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد حاوی Co2 5 درصد به مدت 2/5 ساعت انکوبه شدند.

-تولید سلول های دندریتیک نابالغ از مونوسیت های CD14⁺

برای تولید سلول های دندریتیک به روش کلاسیک و روش آزمایشی (EGCG) پس از اتمام زمان انکوباسیون، سایتوکاین ها و ماده EGCG به صورت زیر اضافه شد:

در روش استاندارد به ازای هر میلی لیتر محیط کشت سلولی، 50 ng/mL اینترلوکین 4 و 100 ng/mL GM-CSF اضافه شد. برای ترکیب EGCG، دو غلظت متفاوت پس از اپتیمزاسیون در نظر گرفته شد که در این تحقیق به جای اینترلوکین 4، ماده موثره EGCG در

غلظت های 5 $\mu\text{mol/l}$ و 110 $\mu\text{mol/l}$ همراه با GM-CSF با غلظت 100 ng/mL اضافه شد.

در روز سوم تعویض محیط انجام شد و در روز ششم سلول ها به سلول دندریتیک نابالغ با زواید کشیده شده و ستاره ای شکل تمایز پیدا کردند. سپس مایع رویی چاهک (سوپر ناتانت) برای بررسی آنالیز سایتوکاین (Cytokine assay)، IL-23 و IL-35 جمع آوری شد و سلول های دندریتیک نابالغ به روش فلوسیتومتری و بررسی مارکرهای CD83 و CD11b و HLA-DR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای تبدیل سلول های نابالغ به سلول های دندریتیک بالغ، سایتوکاین TNF- α با غلظت 100 ng/mL اضافه شد و به مدت 2 روز در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون سلول ها جهت بررسی شاخص های بلوغ به روش فلوسیتومتری جمع آوری گردیدند.

- ارزیابی مولکول های سطحی سلول های دندریتیک نابالغ و بالغ به روش فلوسیتومتری

در روز ششم پس از کشت سلولی، سلول های دندریتیک نابالغ که تحت اثر اینترلوکین 4 و GM-CSF به روش استاندارد و نیز تحت اثر EGCG و GM-CSF در روش آزمایشی قرار گرفته بودند، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (Partec, Germany) مارکرهای CD83 و CD11b و HLA-DR همراه با ایزوتیپ کنترل جهت تعیین هویت مورد ارزیابی قرار گرفتند. علاوه بر این در روز هشتم، 3 چاهک باقیمانده از کشت سلول های دندریتیک از دو غلظت EGCG و روش استاندارد برای بررسی بلوغ سلول های دندریتیک جمع آوری شدند. ابتدا مایع رویی (سوپر ناتانت) برای بررسی آنالیز سایتوکاین IL-23 و IL-35 جمع آوری شد و سپس برای به دست آوردن سلول ها برای آماده سازی جهت فلوسیتومتری با پی پتاژ کردن و در نهایت با اضافه نمودن PBS سرد تخلیه شدند. سپس به مدت 10 دقیقه در دور 400 سانتریفوژ شد به طوری که در روز هشتم، مایع رویی هر

3لوله را به آرامی خالی و پس از آن سلول‌ها را برای مارکرهای CD83 و CD11b و HLA-DR به روش فلوسیتومتری بررسی کرده و نتایج به دست آمده توسط نرم افزار Flow Max آنالیز شد.

- بررسی سایتوکاین‌ها در سوپرناتانت کشت سلولی به روش الیزا

در این مطالعه به منظور ارزیابی نقش EGCG، میزان ترشح سایتوکاین‌های IL-23 و IL-35 در مایع‌رویی محیط کشت سلول بالغ پس از جمع‌آوری با استفاده از کیت الایزا (Biowest, Germany) براساس پروتکل شرکت سازنده در هر دو گروه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

- تعیین غلظت مناسب EGCG جهت استانداردسازی روش
نتایج کشت غلظت‌های مختلف EGCG با سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مقایسه با کنترل نشان داد که غلظت $5 \mu\text{mol/l}$ بهینه‌ترین غلظت جهت حیات سلولی پس از اضافه کردن ماده موثره بوده است که همانند غلظت $1 \mu\text{mol/l}$ بالاترین غلظت معقول جهت حفظ سلول بوده است. علاوه بر این، در مطالعه حاضر از غلظت $10 \mu\text{mol/l}$ نیز جهت مقایسه استفاده گردید.

- نتایج فلوسیتومتری

به منظور بررسی توانایی EGCG در القای تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک، شاخص CD11b در سلول‌های دندریتیک بالغ و نابالغ در غلظت‌های مختلف EGCG مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین میزان CD11b در سلول‌های دندریتیک بالغ و نابالغ، بین دوروش وجود دارد ($P < 0/05$).
لاوه بر این بررسی نتایج فلوسیتومتری برای تعیین مارکر CD11b در سلول‌های دندریتیک نابالغ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری با روش استاندارد بوده است. بدین معنی که EGCG در هر دو غلظت همانند گروه استاندارد موجب بیان مارکر CD11b شده است (جدول شماره 1).

به علاوه اختلاف معنی‌داری بین سطح شاخص CD83 در سلول‌های دندریتیک نابالغ با روش استاندارد دیده شده است. بدین معنی که EGCG در هر دو غلظت همانند گروه استاندارد موجب بیان شاخص CD83 شده است. علاوه بر این سطح CD83 در سلول‌های دندریتیک بالغ دارای تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد بوده است (جدول شماره 2).

جدول شماره 1: میانگین فراوانی مارکر CD11b در سطح سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ، که نشان دهنده میزان تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک در گروه‌های مختلف است.

گروه‌ها	انحراف معیار $\pm$ میانگین	سطح معنی‌داری
سلول دندریتیک نابالغ		
روش استاندارد	$101/4 \pm 0/5774$	
EGCG غلظت 5	$90/06 \pm 0/5774$	0/0002***
EGCG غلظت 10	$93/73 \pm 0/5774$	0/0007***
سلول دندریتیک بالغ		
روش استاندارد	$117/4 \pm 0/5774$	
EGCG غلظت 5	$81/73 \pm 0/5774$	<1/00001 ****
EGCG غلظت 10	$85/14 \pm 0/5774$	<0/0001 ****

نتایج حاصل، میانگین و انحراف معیار به دست آمده از MFI بروش فلوسیتومتری در مقایسه بین دو روش در غلظت‌های مختلف است که ($P < 0/05$) معنی‌دار در نظر گرفته شده است

بررسی نتایج فلوسیتومتری برای تعیین سطح HLA-DR در سلول‌های دندریتیک نابالغ تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد داشته است. بدین معنی که EGCG در هر دو غلظت همانند گروه استاندارد موجب بیان مارکر CD83 شده است. علاوه بر این سطح CD83 در سلول‌های دندریتیک بالغ دارای تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد بوده است (جدول شماره 3).

جدول شماره 2: میانگین فراوانی مارکر CD83 در سطح سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ، که حضور سلول دندریتیک و میزان تمایز مونوسیت به دندریتیک را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد

گروه	انحراف معیار $\pm$ میانگین	سطح معنی‌داری
سلول دندریتیک نابالغ		
روش استاندارد	$76/19 \pm 0/5774$	
EGCG غلظت 5	$12/87 \pm 0/5774$	0/0011 **
EGCG غلظت 10	$10/81 \pm 0/5774$	0/00004
سلول دندریتیک بالغ		
روش استاندارد	$36/29 \pm 0/5774$	
EGCG غلظت 5	$11/79 \pm 0/5774$	<0/0001 ****
EGCG غلظت 10	$13/54 \pm 0/5774$	<0/0001 ****

جدول شماره 3: میانگین فراوانی مارکر HLA-DR در سطح سلول های دندرتیک نابالغ و بالغ، که نشان دهنده میزان تمایز مونوسیت ها به سلول های دندرتیک در گروه های مختلف است.

گروه	انحراف معیار $\pm$ میانگین	سطح معنی داری
سلول دندرتیک نابالغ	روش استاندارد	
EGCG غلظت 5	$126/4 \pm 0/5774$	$0/00001$ ****
EGCG غلظت 10	$186 \pm 0/5774$	$<0/0001$ ****
سلول دندرتیک بالغ	روش استاندارد	
EGCG غلظت 5	$278/7 \pm 0/5774$	$0/0013$ **
EGCG غلظت 10	$272/1 \pm 0/5774$	$<0/0001$ ****

نتایج حاصل میانگین و انحراف معیار به دست آمده از MFI به روش فلوسایتمتری با مقایسه بین دو روش در غلظت های مختلف است که $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شده است

- سطح سایتوکاین ها IL-23, IL-35 به روش الیزا

نتایج مربوط به اندازه گیری سایتوکاین ها نشان می دهد که میانگین غلظت سایتوکاین ها در مقایسه با روش استاندارد نزدیک به هم بوده است، از این رو میانگین غلظت اینترلوکین 35 در مقایسه با روش استاندارد، قبل از بلوغ، تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0/05$). در حالی که در زمان بلوغ تفاوت معنی داری نشان داده است (جدول شماره 4).

جدول شماره 4: میانگین غلظت اینترلوکین 35 در دو غلظت EGCG در مقایسه با روش کلاسیک.

گروه	انحراف معیار $\pm$ میانگین	سطح معنی داری
سلول دندرتیک نابالغ	روش استاندارد	
EGCG غلظت 5	$7/54 \pm 0/5774$	$(ns) 0/3798$
EGCG غلظت 10	$8/343 \pm 0/5745$	$(ns) 0/7747$
سلول دندرتیک بالغ	روش استاندارد	
EGCG غلظت 5	$10/05 \pm 0/5774$	$0/0367$ *
EGCG غلظت 10	$7/53 \pm 0/5774$	$0/0220$ *

نتایج به صورت $Mean \pm SD$ نمایش داده شده است و $P > 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شده است

بحث

در این مطالعه برای اولین بار از ماده موثره EGCG جهت تبدیل مونوسیت ها به سلول های دندرتیک نابالغ به جای اینترلوکین 4 استفاده شد. مطالعات متعدد نشان داده اند که سلول های دندرتیک در القای

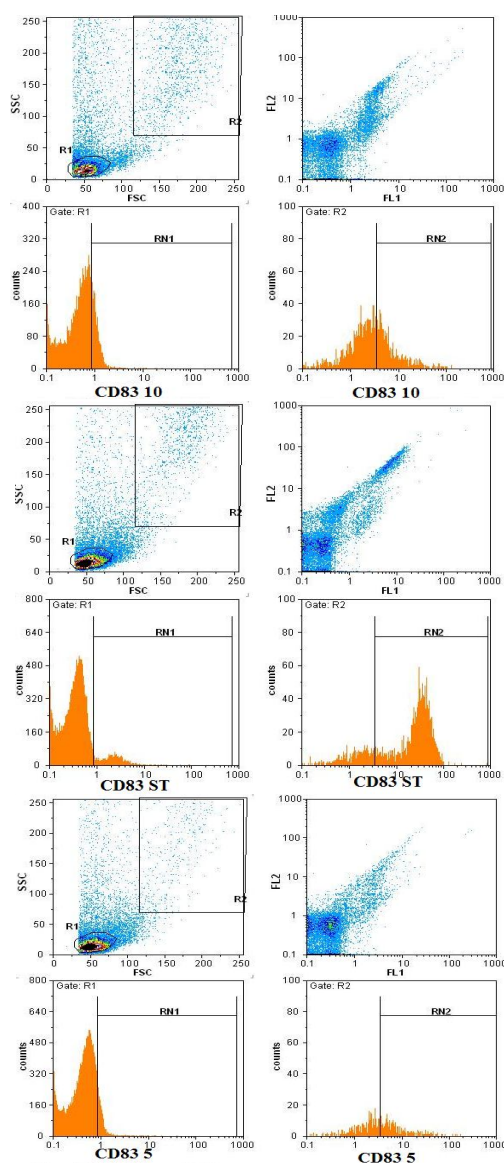
پاسخ های ایمنی با واسطه سلول های T دخیل هستند و به عنوان عوامل مهم برای درمان های مبتنی بر سلول مورد توجه قرار گرفته اند. از این رو، سلول های دندرتیک مشتق از مونوسیت (Mo-DC) در پروتکل های بالینی برای درمان انواع بیماری ها از جمله سرطان ها استفاده شده است.

Min و همکاران (2015) نشان دادند که EGCG

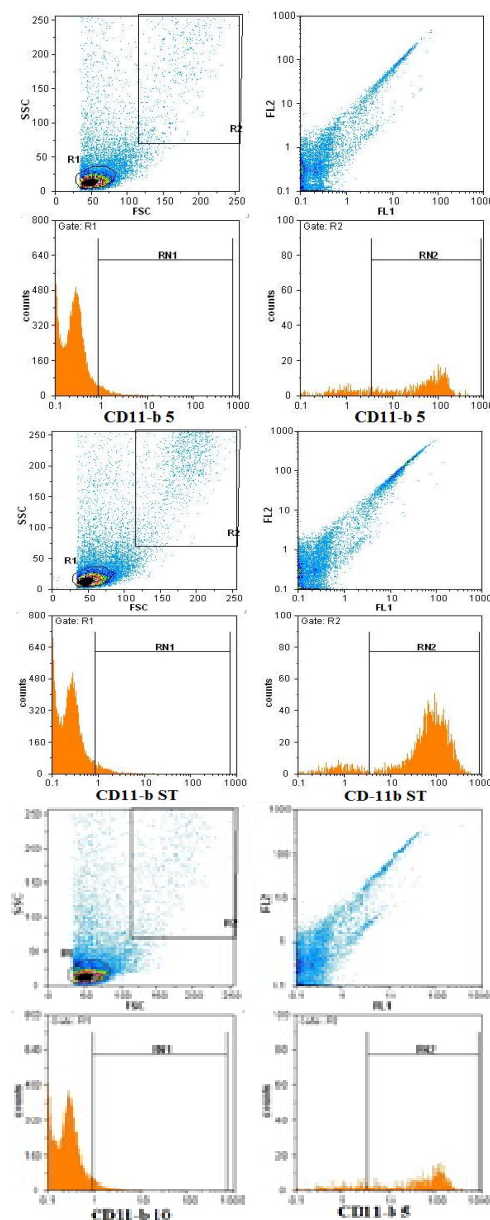
با افزایش سلول های T تنظیمی باعث تعدیل پاسخ ایمنی می گردد (8). در شرایط آزمایشگاهی، DC ها را می توان از منابع مختلف سلولی از جمله سلول های پیش ساز $CD34^+$ از مغز استخوان (BM) و خون بند ناف (CB) و مونوسیت های به دست آمده از سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) تمایز داد. DC های نابالغ در کشت به مدت 5 روز در محیط بدون سرم حاوی IL-4 و GM-CSF، از مونوسیت ها تولید می شوند این سلول های نابالغ با قرار گرفتن در معرض محرک بلوغ تحریک می شوند و همزمان با آنتی ژن توموری به مدت 1-2 روز بارگیری می شوند (9).

نتایج مطالعه نشان داد پس از کشت مونوسیت ها در روش استاندارد و روش آزمایشی در دو غلظت (غلظت های 5 و $10 \mu\text{mol/Lit}$ از ترکیب EGCG)، میزان $CD11b$ در هر دو حالت بالغ و نابالغ، اختلاف معنی داری بین دو روش دارد. براساس این نتایج EGCG در بروز $CD11b$ نقش کمتری نسبت به روش استاندارد داشته است. بر اساس داده های این مطالعه، میزان بیان در حضور EGCG به طور معنی داری کم تر از روش استاندارد است. از این رو تمایز و ایجاد سلول های دندرتیک کم تر از روش استاندارد می باشد و میانگین مارکر $CD11b$ میان این دو گروه (روش استاندارد و روش آزمایشی در هر دو غلظت) در هر دو حالت بالغ و نابالغ دارای تفاوت معنی دار می باشد (جدول شماره 1 و نمودار شمار 1).

در این مطالعه میزان تظاهر CD83 و HLA-DR تفاوت معنی‌داری با روش استاندارد در مقایسه با EGCG در هر دو غلظت، در حالت‌های بالغ و نابالغ داشته است (نمودار شماره 2 و 3، جداول شماره 2 و 3). این نتایج نشان می‌دهد که EGCG نسبت به روش استاندارد سبب بروز کم‌تر CD83 و HLA-DR می‌شود ($P < 0/05$) که از دلایل آن می‌تواند القای آپوپتوز در سلول‌های مونوسیت و کاهش بروز شاخص‌های بلوغ در سلول‌های دندریتیک باشد.



نمودار شماره 2: نمودار فلوسیتومتری شاخص بلوغ CD83 در دو غلظت از EGCG در مقایسه با روش استاندارد

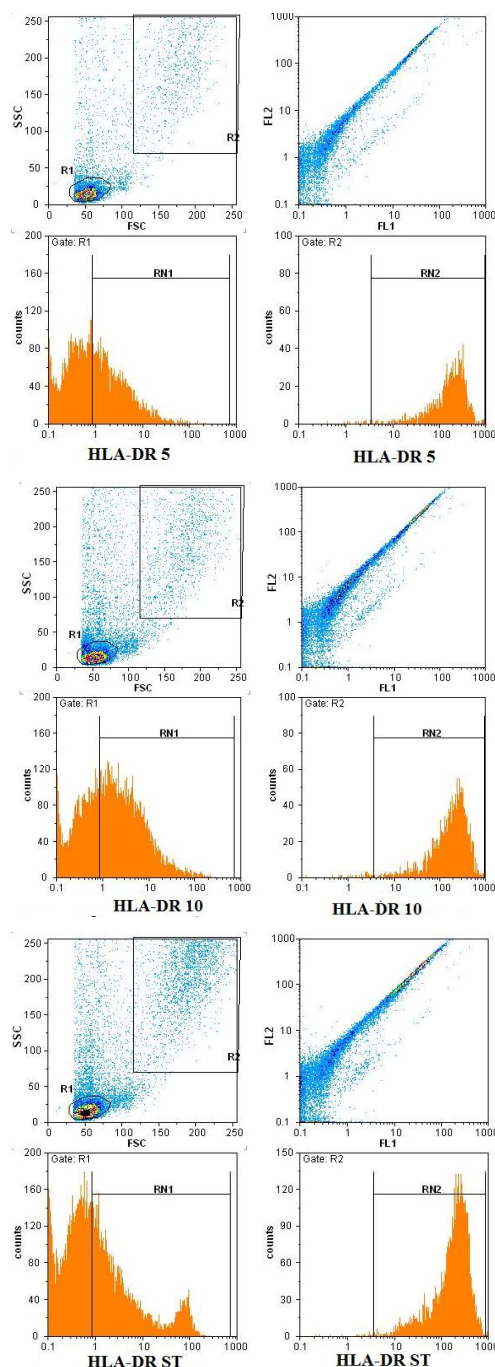


نمودار شماره 1: نمودار فلوسیتومتری از مارکر CD11b در دو غلظت EGCG در مقایسه با کنترل

مطالعه‌ای که Yoneyama و همکاران (2008) انجام دادند نشان می‌دهد که EGCG بر فنوتیپ سلول‌های دندریتیک بالغ با اثر بر روی CD83، CD80، CD11c، و HLA-DR نقش دارد و با تاثیر بر مولکول‌های کمک تحریکی می‌تواند در عرضه آنتی‌ژن موثر باشد. به‌طوری که EGCG سبب تعدیل توانایی آندوسیتوز در سلول‌های دندریتیک می‌شود (10).

می گذارد (10). آن ها بیان کردند که DC های بالغ تحت تیمار با EGCG، فعالیت تحریکی سلول های T آلورژنیک را با ترشح اینترلوکین 10 مهار می کنند. در همین راستا و موافق با نتایج مطالعه حاضر، Roger و همکاران نشان دادند که EGCG بیان MHC II را در سلول های DC مهار می کند (11،12). علاوه بر این EGCG می تواند سبب افزایش تماس سلول به سلول و تعدیل پاسخ های ایمنی شود (11،13).

در راستای نتایج مربوط به شاخص های سطحی سلول های دندریتیک، سایتوکاین های اینترلوکین 23 و 35 در روش EGCG، در مقایسه با روش استاندارد در حالت نابالغ دارای تفاوت معنی داری نبود، ولی در حالت بالغ میانگین این سایتوکاین ها در گروه آزمایشی، کم تر از روش استاندارد بوده است. از آن جایی که IL-23 یک سایتوکاین التهابی می باشد، انتظار می رود پس از بلوغ، سلول های دندریتیک، افزایش بیان داشته باشد و در مقابل، بیان سایتوکاین IL-35 پس از بلوغ کاهش یابد که این نتایج در مطالعه حاضر مشاهده شد. با توجه به اثرات ضد التهابی EGCG، مشاهده شد که این ترکیب موجب کاهش بیان این سایتوکاین در کشت مربوطه، به خصوص بعد از بلوغ شده است. به طوری که بین میانگین غلظت اینترلوکین 23 در روش آزمایشی و روش استاندارد، قبل از بلوغ، تفاوت معنی داری وجود ندارد در حالی که بعد از بلوغ، این تفاوت معنی دار دیده می شود. موافق با مطالعه حاضر، sun و همکاران در مطالعه خود مشاهده نمودند که EGCG سطح سایتوکاین های IL-17، IL-22، IL-23 و مالون دی آلدئید (MDA) را در پلاسما کاهش می دهد و همچنین سبب افزایش تعداد د سلول های T CD4⁺ می شود (14). با توجه به ماهیت این سایتوکاین ها، این شواهد نشان می دهد که تغییرات این سایتوکاین ها نشان از نقش ضد التهابی EGCG دارد. بنابراین با توجه به نتایج حاصل به نظر می رسد که ترکیب مورد آزمایش می تواند با مکانیسمی شبیه IL-4 و GM-CSF، با اثر بر M-CSF و گیرنده آن



نمودار شماره 3: نمودار فلوسیتومتری: درصد بروز HLA-DR در دو غلظت 5 و 10 $\mu\text{mol/l}$ EGCG در مقایسه با روش استاندارد

موافق با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، در یک مطالعه نشان داده شده که EGCG موجب القای آپوپتوز در مرحله تبدیل سلول های نابالغ به سلول های بالغ در سلول های DC شده و در فنوتیپ آن ها اثر

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی ایمونولوژی است که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد طرح 32-96 و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1398.1015 انجام شد.

و یا با اثر بر میزان بیان IL-4 و GM-CSF موجب تمایز مونوسیت ها به سلول های دندریتیک شود و لذا می تواند ترکیبی مناسب در تمایز مونوسیت ها به سلول های دندریتیک با ویژگی تعدیل پاسخ ایمنی باشد.

References

1. Leichsenring A, Bäcker I, Furtmüller PG, Obinger C, Lange F, Flemmig J. Long-Term Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Pristane-Induced Arthritis (PIA) in Female Dark Agouti Rats. *PloS One* 2016; 11(3): e0152518.
2. Saleh F, Raghupathy R, Asfar S, Oteifa M, Al Saleh N. Analysis of the effect of the active compound of green tea (EGCG) on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014; 14(1): 322.
3. Wang T, Xiang Z, Wang Y, Li X, Fang C, Song S, et al. (-)-Epigallocatechin Gallate Targets Notch to Attenuate the Inflammatory Response in the Immediate Early Stage in Human Macrophages. *Frontiers In Immunology* 2017; 8: 433.
4. Abediankenari S, Janbabaei Mollae G, Ghasemi M, Yousefzadeh Y, Bahrami M, Alimoghaddam K. Vaccination of diffuse large B-cell lymphoma patients with antigen-primed dendritic cells. *Acta Med Iran* 2013; 51(5): 284-288 (Persian).
5. Abediankenari S, Mohammad Bagher Eslami, Abdolfattah Sarrafnejad, Mehrnosh Mohseni, Bagher Larijani. Dendritic Cells Bearing HLA-G Inhibit T-Cell Activation in Type 1 Diabetes. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2007; 6(1): 1-7 (Persian).
6. Abediankenari S, Yousefzadeh Y, Azadeh H, Vahedi M. Comparison of several maturation inducing factors in dendritic cell differentiation. *Iran J Immunol* 2010; 7(2): 83-87 (Persian)
7. Wang ZM, Gao W, Wang H, Zhao D, Nie ZL, Shi JQ, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TNF- α -induced production of monocyte chemoattractant protein-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33(5): 1349-1358.
8. So Youn Min, Mei Yan, Bum Kim S, Ravikumar S, Ryuel kwon S, Vanarsa K, et al. Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Autoimmune Arthritis Through Indoleamine-2,3-Dioxygenase Expressing Dendritic Cells and the Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 Antioxidant Pathway. *J Inflamm* 2015; 12: 53.
9. Chung CYJ, Ysebaert D, Berneman ZN, Cools N. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 972865.
10. Yoneyama S, Kawai K, Tsuno NH, Okaji Y, Asakage M, Tsuchiya T, et al. Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(1): 209-214.

11. Bell G, Anderson A, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry R, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2017; 76(1): 227-234.
12. Rogers JL. Major tea catechin inhibits dendritic cell maturation in response to microbial stimulation. 2007.
13. Kenji Kuriya, Masahiro Nishio*, Tomoko Matsuda, Hayato Umekawa., Tea extract increases cell fusion via regulation of cell surface DC-STAMP. *Biochem Biophys Rep* 2020; 22: 100759.
14. Sun B, Wang W, He Z, Zhang M, Kong F, Sain M, et al. Improvement of Stability of Tea Polyphenols: A Review. *Curr Pharm Des* 2018; 24(29): 3410-3423.