ORIGINAL ARTICLE

Generating of Tolerogenic Dendritic Cells and Macrophage-like Cells Using Combination of Maturation Factors

Babak Beikzadeh[1],
Nowruz Delirezh[2]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

(Received November 9, 2013 ; Accepted January 20, 2013)

Abstract

Background and purpose: As professional antigen- presenting cells, dendritic cells are a bridge between innate and adaptive immunity by stimulating T lymphocytes. Recent research has demonstrated the extra ability of the myeloid cells plasticity into different cells in response to environmental stimuli. In the present study, the effect of using combination maturation factors (MCM, TNF-α, poly (I:C)) and ability of myeloid dendritic cell plasticity as fully differentiated cells were examined.

Material and Methods: Peripheral blood monocytes in effect of IL-4 and GM-CSF differentiated into immature dendritic cells during 4 days.On day 4 and day 5, the extracts of breast cancer tumor cells as antigen and mentioned maturation factors were added respectively. On day 7 upon confirmation of morphology and function, the culture of a group of them continued until the tenth day (without adding cytokines) and their morphology was compared with dendritic cells in day 7.

Results: The generated dendritic cells have been appropriate status in morphology and function and cytokines assay revealed high levels of IL-10 in compared with IL-12. The continuity of dendritic cells culture cause to convert them to morphological macrophage-like cells.

Conclusion: Our results support this idea that using a combination of mentioned maturation factors led to generate tolerogenic dendritic cells and in the absence of IL-4 and GM-CSF reuse, without medium exchange and high levels of IL-10 were known as the three factors that induced dendritic cell plasticity into macrophage-like cells.

Keywords: Dendritic cell, Plasticity, Macrophage-like cells

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(Supple 1): 9-19 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۲ (۱۹-۹)

تولید سلول های دندریتیک مهاری و سلول های شبه ماکروفاژی با استفاده ترکیبی از فاکتورهای بلوغ

بابک بیک زاده[۱]
نوروز دلیرژ[۲]

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های دندریتیک به عنوان سلول‌های عرضه‌کننده حرفه‌ای آنتی‌ژن، با تحریک لنفوسیت‌های T پل ارتباطی بین ایمنی ذاتی و اکتسابی محسوب می‌شوند. تحقیقات اخیر حاکی از توانایی بالای شکل پذیری سلول‌های رده میلوییدی به سلول‌هایی متفاوت در پاسخ به محرک‌های محیطی می‌باشند. در مطالعه حاضر تأثیر استفاده ترکیبی از فاکتورهای بلوغ MCM, TNF-α, poly (I:C) و قابلیت شکل پذیری سلول‌های دندریتیک به عنوان سلول‌های کاملاً تمایز یافته مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: مونوسیت‌های خون محیطی تحت تأثیر IL-4 و GM-CSF طی چهار روز به سلول‌های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند. در روز چهارم و پنجم به ترتیب عصاره سلول‌های توموری سرطان پستان به عنوان آنتی‌ژن و فاکتورهای بلوغ مذکور اضافه شد. در روز هفتم گروهی از سلول‌های بالغ بعد از تأیید مرفولوژی و عملکرد، تا روز دهم کشت داده شد (بدون اضافه کردن سایتوکاین) و مورفولوژی آن‌ها با سلول‌های دندریتیک هفت روزه مقایسه شد.

یافته‌ها: سلول‌های دندریتیک تولید شده از لحاظ مورفولوژی و عملکردی وضعیتی مناسب داشتند و سنجش سایتوکاین‌ها نشان دهنده افزایش میزان IL-10 نسبت به IL-12 بود. ادامه کشت منجر به تبدیل آن‌ها به سلول‌های شبه ماکروفاژی شد.

استنتاج: این مطالعه نشان داد که استفاده ترکیبی از فاکتورهای بلوغ مذکور منجر به تولید سلول‌های دندریتیک مهاری و عدم استفاده مجدد از IL-4 و GM-CSF، عدم تعویض محیط کشت و افزایش IL-10 عوامل القاء شکل‌پذیری در سلول‌های دندریتیک به سلول‌های شبه ماکروفاژی شناخته شد.

واژه های کلیدی: سلول دندریتیک، شکل‌پذیری، سلول‌های شبه ماکروفاژی

مقدمه

سلول‌های دندریتیکی که امروزه می‌شناسیم، نخستین بار در سال ۱۹۷۸ توسط Steinman و همکارانش به عنوان جمعیت محدودی از سلول‌های کمکی با مشخصه زوائد سیتوپلاسمی ستاره مانند معرفی گردید. این سلول‌ها با دارا بودن جمعیتی ناهمگن، در برداشت آنتی‌ژن، پردازش و عرضه آن به لنفوسیت‌های

مولف مسئول: بابک بیک زاده- ارومیه: جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دام پزشکی، گروه میکروب شناسی E-mail: bbeikzadeh@live.com
۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۸/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۱۰/۵ تاریخ تصویب :۱۳۹۲/۱۰/۳۰

T، القاء ایمنی و یا تحمل ایمنی نقش کلیدی را در ایمنی ذاتی و اکتسابی بازی می‌کنند(۱). بیش‌ترین اطلاعات ما در مورد انتوژنی این سلول‌ها در انسان بر پایه مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته روی سلول‌های بنیادی خون ساز (Hematopoietic Stem Cells) است که در کنار مدل‌های حیوانی و آزمایشات مقایسه‌ای امکان فهم آنتوژنی آن‌ها را در بدن انسان فراهم کرده است(۲). براین اساس سلول‌های دندریتیک از سلول‌های بنیادی خون ساز مغز استخوان مشتق شده و ۰/۰۱درصد سلول‌های هسته دار مغز استخوان را شامل می‌شوند(۳،۲). امروزه این سلول‌ها را بر اساس ترکیبی از گیرنده‌های سطحی، منشاء تکاملی، الگو مهاجرتی، لانه گزینی و محل سکونت بافتی طبقه‌بندی می‌کنند(۴). برخلاف ایده‌های رایج مبنی بر مشتق شدن سلول‌های دندریتیک از یک پیش ساز در مراحل اولیه خون‌سازی، این سلول‌ها از هر دو نوع رده میلوییدی ($CD8^-$) و لنفوییدی ($CD8^+$) منشاء می‌گیرند. این شکل‌پذیری (plasticity) در پیش‌ساز به حضور گیرنده سایتوکاینی به نام FMS-like tyrosine kinase3 (Flt3) به خصوص در رده میلوییدی وابسته است(۸،۵). اما این سلول‌ها به طور کلی به دو زیر گروه تقسیم می‌شوند: سلول‌های دندریتیک التهابی که از مونوسیت‌ها مشتق می‌شوند و سلول‌های دندریتیک موجود در مرحله ایستایی (steady-state) که شامل پلاسماسیتوییدی، مهاجر و لانگرهانس می‌شوند(۴).

از آن‌جایی که سلول‌های رده میلوئیدی به ویژه مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک به عنوان مهم‌ترین واسطه‌ها در التهاب، بهبود زخم و حفظ هموستاز پاسخ‌های ایمنی در حالت نرمال و بیماری شناخته می‌شوند، تنوع و شکل پذیری آن ها به سلول‌هایی با عملکردهای متفاوت و مستقل در حالت های ایستایی و التهابی از ویژگی‌های منحصر بفرد آن‌ها محسوب می‌شود(۹). این تغییرات با نام‌های متفاوت (تمایز، تمایززدایی، Transdifferentiation) شناخته می‌شوند، تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی در شرایط آزمایشگاهی و یا ریز محیطی در بدن صورت می‌گیرد(۱۰). به طور کلی تبدیل یک سلول به سلول دیگر از جنبه کلینیکی به دو علت اهمیت دارد. اولین دلیل آن متاپلاستیک بوده که بهترین مثال آن، جایگزینی سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای نای و برونش‌ها با اپیتلیوم سنگ‌فرشی مطبق در افراد سیگاری است(۱۱) و دلیل دوم آن در سلول درمانی است که به عنوان یکی از پایه‌های اصلی طب ترمیمی، مطالعات دارویی و بیماری‌ها شناخته می شود(۱۲) در سال ۱۹۹۴ که برای نخستین بار Romani و همکارانش موفق به تولید سلول‌های دندریتیک از مونوسیت‌های خون محیطی شدند(۱۳) تا به امروز روش‌ها و فاکتورهای بلوغ مختلفی برای تولید این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی ارائه شده است که از آن جمله می‌توان به فاکتور های بلوغ MCM Monocyte Condition Medium ، Tumor Necrosis Factor-α TNF-α Polyinosinic-polycytidylic acid Poly (I:C) اشاره کرد. مطالعات صورت گرفته روی هر کدام از فاکتورهای بلوغ مذکور، تأیید کننده توانایی القاء فرایند بلوغ و جهت گیری پاسخ ایمنی در سلول های دندریتیک بوده است. اما اطلاعات کمی در خصوص استفاده ترکیبی از این عوامل القاء کننده بلوغ در دست می‌باشد. لذا با توجه به نقش سلول‌های دندریتیک در هدایت پاسخ‌های ایمنی، درمان بیماران سرطانی و بیماری‌های مزمن عفونی(۱۴) و قابلیت شکل‌پذیری بالای سلول‌های مشتق شده از رده میلوئیدی(۱۵، ۱۶) به منظور یافتن روشی مناسب‌تر برای القاء فرآیند بلوغ در سلول‌های دندریتیک و به دنبال آن ارائه آنتی ژن به لنفوسیت‌های T اتولوگ، در این مطالعه از عصاره سلول‌های توموری سرطان پستان به عنوان آنتی‌ژن در کنار ترکیبی از فاکتورهای بلوغ MCM، TNF-α و Poly(I:C) استفاده شد. تا به عنوان یک مدل آزمایشگاهی نشان دهنده تأثیر استفاده هم‌زمان این

عوامل بر جهت‌گیری سلول‌های دندریتیک باشد. سپس به منظور بررسی توانایی شکل‌پذیری در سلول‌های دندریتیک میلوییدی به عنوان یک سلول کاملاً تمایز یافته (End cell) کشت گروهی از این سلول‌ها تا روز دهم ادامه یافت و تغییرات مورفولوژیک آن‌ها ثبت شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی- پژوهشی می‌باشد. روش مطالعه بر این اساس بود که نمونه‌های خون با آگاهی و رضایت داوطلبان در سه تکرار تهیه شد. مواد مورد استفاده شامل محیط کشت RPMI-1640 (Gibco-UK) به همراه ۲ میلی مول L- گلوتامین (Sigma-USA)، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین (Sigma–USA)،۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (Sigma–USA) و سرم AB ۱۰ درصد بود. به منظور تولید و القاء بلوغ در سلول‌های دندریتیک از سایتوکاین‌های GM-CSF (Peprotech-USA)، IL-4 ۵۰۰U/ml (Peprotech-USA)، عصاره توموری بافت پستان ۲۵ درصد از MCM تهیه شده مطابق با(۱۶)، ۱۰ng از TNFα (Peprotech-USA)، و ۲۰ µg از Poly:IC (Peprotech-USA)، استفاده شد. DNase (Sigma–USA)، کلاژناز III (Sigma–USA)، به منظور ارزیابی نشانگرهای سطحی سلول دندرتیک از آنتی‌بادی‌های ضد CD14، CD83، HLA-DR، CD86، CD80 شرکت AbD Serotec-UK با به کار گیری تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون سلولی از بافت توموری پستان

بافت توموری به دست آمده از طریق جراحی در ظروف استریل حاوی محیط کشت RPMI 1640 به آزمایشگاه منتقل شد. مدت زمان نگهداری بافت توموری تهیه شده تا تهیه سوسپانسیون سلولی نباید بیش از ۲۴ ساعت باشد و در طی این مدت در دمای ۴ ^{o}c نگهداری شد. با استفاده از اسکالپل قسمت‌های نکروز شده و چربی از بافت جدا و حذف گردید. سپس به برش‌های به قطر دو تا سه میلی‌متری تقسیم شد و در فلاسک‌های کشت ۲۵cm^2 حاوی محیط کشت RPMI 1640 همراه با آنزیم‌های کلاژناز III (mg/ml ۰/۱) و DNase (۱ mg/ml) قرار گرفت و به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در انکوباتور ۳۷ ^{o}c حاوی پنج درصد CO2 و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه گردید. هر شش ساعت یک بار فلاسک حاوی نمونه تکان داده شد. سپس به منظور جداسازی زوائد بافتی هضم نشده محلول با سرعت ۳۰۰ ×g به مدت یک دقیقه و سوسپانسیون سلولی یا سرعت ۱۰۰ ×g به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ گردید. سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده دوبار دیگر با سرعت ۲۰۰ ×g سانتریفوژ شد و به مدت پنج دقیقه شست و شو داده شد. میزان زنده بودن سلول‌های به دست آمده به روش تریپان بلو تعیین شد.

تهیه عصاره سلول‌های توموری از سوسپانسیون سلولی

سوسپانسیون سلول‌های توموری به تعداد ۱۰۶×۱۱-۱۰ سلول تهیه و دوبار با محیط کشت RPMI 1640 شسته شد. سپس حجم سوسپانسیون سلولی به ۱/۵ ml میلی متر رسانده شد و چهار مرتبه با قرار دادن در نیتروژن مایع و آب ۳۷ ^{o}c هر کدام به مدت پنج دقیقه Freeze/thaw شد. محصول حاصل به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ ×g سانتریفوژ شد و مایع‌رویی جمع‌آوری شد. مجدداً به مدت یک ساعت با سرعت ۱۳۰۰۰ ×g سانتریفوژ گردید. مایع‌رویی جمع‌آوری و با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ µm استریل گردید و برای استفاده بعدی در دمای ۸۰ ^{o}c- ذخیره شد.

تولید سلول های دندریتیک

از سه فرد داوطلب بعد از گرفتن رضایت نامه آگاهانه و رعایت شرایط استریل، با سرنگ‌های هپارینه (۲۰۰ U/ml) به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر خون‌گیری به عمل آمد. خون با مقدار هم حجم خودش از محیط کشت RPMI، در لوله فالکن ۵۰ میلی متر با هم مخلوط

گردید. خون رقیق شده به آرامی روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود، قرار گرفت. مجموعه خون رقیق شده و فایکول با سرعت g× ۸۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۲ سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده بودند، به آرامی جمع‌آوری شد و به منظور حذف فایکول همراه آن، با محیط کشت RPMI مخلوط و با سرعت g۴۵۰× به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت همراه آن با سرعت g۲۰۰× به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در نهایت تعداد و میزان زنده ماندن سلول‌های تک هسته ای بوسیله رنگ تریپان بلو تعیین گردید.

سلول‌های PBMC به تعداد $۲-۳ \times ۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر و به مقدار چهار میلی‌لیتر در هر فلاسک کشت به همراه محیط کشت RPMI تکمیل شده با پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml)، سرم AB^{+} انسان (۱۰ درصد) به مدت دو ساعت در دمای ۳۷°c، ۵درصد CO_2 و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شد. بعد از اتمام انکوباسیون، سلول‌های شناور با دو بار شست و شوی آرام توسط محیط کشت جدا شده و دور ریخته شدند. به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها مونوسیت بودند، چهار میلی‌لیتر از محیط کشت جدید به همراه GM-CSF (۱۰۰۰ IU/ml) و IL-4 (۵۰۰ IU/ml) اضافه شد. در روز سوم مجدداً مقادیر یکسانی از این دو سایتوکاین به فلاسک‌ها اضافه شد. در روز چهارم از آنتی‌ژن‌های توموری تهیه شده به نسبت ۱۰۰ µg/ml به سلول‌های دندریتیک اضافه گردید. روز پنجم جهت القای بلوغ TNF-α (۱۰ng/ml)، MCM ۲۵ درصد و Poly:IC (۲۰µg/ml) به محیط کشت اضافه شد. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵ mM) برداشت شدند. سلول‌های به‌دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو شمارش و میزان زنده بودن آن‌ها نیز بررسی گردید.

ارزیابی نشانگرهای سطحی سلول های دندریتیک

در روز هفتم کشت، سلول های شناور به همراه معدود سلول‌های چسبنده، با اضافه کردن بافر PBS حاوی EDTA (۰/۵ mM) سرد به مدت ۱۰ دقیقه برداشت گردید. سلول‌های برداشت شده با استفاده از تریپان بلو شمارش و میزان زنده بودن آن ها ثبت شد. سلول‌های به دست آمده بعد از یک بار شست و شو (g۳۰۰×، ۱۰ دقیقه) با بافر مخصوص فلوسیتومتری یا بافر FACS (PBS، سدیم آزاید ۰/۱ درصد و FBS یک درصد) در همین بافر که حاوی دو درصد سرم موش بود به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد انکوبه شد. در پایان زمان انکوباسیون سلول‌ها مجدداً با بافر FACS شست و شو شده (g۳۰۰×، ۱۰ دقیقه) و بعد از رساندن حجم آن‌ها به ۱۰۰ µL، مقدار ۱۰ µL آنتی‌بادی های ضد نشانگر سطحی یا کنترل ایزوتیپ اضافه شد، سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از اتمام انکوباسیون، سلول‌ها یک بار با بافر FACS شسته شده (g۳۰۰×، ۱۰ دقیقه) و تا زمان سنجش روی یخ خورده شده قرار داده شدند. بعد از آن شدت فلورسانت نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Partec- آلمان) سنجیده و نتایج با نرم افزار FloMAx مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری قدرت بیگانه خواری سلول‌های دندریتیک

بررسی بیگانه خواری به دو صورت درصد سلول‌های بیگانه‌خواری کننده و میزان بیگانه‌خواری هر سلول دندریتیک (MFI) در مرحله قبل و بعد از بلوغ صورت گرفت. براین اساس ۲۰µl از بید لاتکس فلورسانت (کونژوگه با FITC) با غلظت $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ در هر میلی‌لیتر در ۵µl سرم AB^{+} به مدت ۷ دقیقه و ۳۰ ثانیه اپسونیزه شد. سپس بید اپسونیزه شده با ۲۰µl از سلول‌های دندریتیک نابالغ (روز پنج، قبل از اضافه کردن فاکتورهای بلوغ) و بالغ با غلظت $۱/۲۵ \times ۱۰^{۷}$ در

هر میلی‌لیتر مخلوط شده و با اضافه کردن ۶۰µl بافر مخصوص بیگانه‌خواری (PBS، ۵mM گلوکز، ۰/۹mM CaCl2، ۰/۵mM MgSO4 و ۰/۵درصد FBS) به حجم کلی ۱۰۰µl رسید (در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد). میکروپیلت حاوی گروه‌های تیمار به همراه گروه‌های شاهد حاوی تمامی مواد به جز بید لاتکس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °c، ۵ درصد CO_2 و ۹۰ درصد رطوبت انکوبه شد. بعد از اتمام ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با پیپتاژ از کف چاهک ها برداشت شده و به منظور خاموش شدن فلورسانت سطح سلول با بافر خاموش کننده (NaCl ۰/۹ درصد، بافرسیترات ۱۳ µM و تریپان بلو ۰/۲۵ mg/ml) شسته شدند (۳۰۰×g، به مدت ۱۰ دقیقه). نمونه توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی و نتایج با نرم افزار Flo Max مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن

به منظور سنجش قدرت سلول‌های دندریتیک تولید شده از نظر تحریک تکثیر لنفوسیت‌ها واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) آلوژن به شرح زیر انجام گرفت. لنفوسیت‌های آلوژن از PBMC به روش MACS طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده (USA-Miltenyi Biotec) جدا شد. تعداد 10^5 لنفوست به نسبت (۱:۱۰،۱:۲۰،۱:۵) با سلول‌های دندریتیک مخلوط و به مدت پنج روز در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد در محیط کشت RPMI-1640 کامل، به همراه ۱۰ درصد سرم AB^+ انسانی در حجم ۲۰۰µl در دمای ۳۷ °c، پنج درصد CO_2 و ۹۰ درصد رطوبت کشت داده شد.

از PHA به عنوان گروه شاهد برای اندازه‌گیری حداکثر میزان تحریک لنفوسیت ها استفاده شد. تعداد لنفوسیت‌ها مجاور شده با PHA برابر با 10^5 می‌باشد. سپس از ماده MTT به مقدار ۱۰µl(۵mg/ml) به هر خانه اضافه و به مدت دو تا چهار ساعت انکوبه گردید. در طی این زمان توسط میکروسکوپ معکوس هر خانه از میکروپلیت به منظور مشاهده نقاط بنفش رنگ داخل سلولی بررسی شد. در مرحله بعد ۱۰۰µl DMSO به هر خانه اضافه و در تاریکی به مدت دو تا چهار ساعت قرار داده شد. سپس تغییر رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۵۰ خوانده شد.

سنجش ترشح سایتوکاین ها توسط سلول های دندریتیک

برای سنجش میزان تولید IL-10 و IL-12 در مایع رویی روز هفتم کشت سلول‌های دندریتیک، از کیت تجاری الیزا استفاده شد (Peprotech-USA) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده میزان تولید آن ها مورد سنجش قرار گرفت. آزمایش دو بار تکرار شد و نتایج به دست آمده برحسب pg/ml گزارش گردید. کم‌ترین میزان قابل تشخیص توسط کیت الیزا طبق استانداردها ۳۲ pg/ml بود.

تحلیل آماری

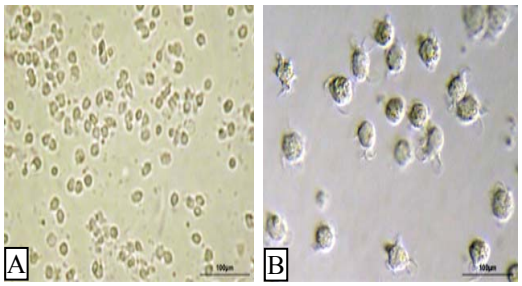
نتایج این تحقیق با برنامه SPSS۱۸ (Software Inc) بررسی و تفسیر شد. مقایسه بین گروه‌ها توسط Student's t-test در سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ صورت گرفت. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش گردید و ترسیم نمودار با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel-2007 انجام گرفت.

یافته ها

مورفولوژی سلول های دندریتیک

پس از کشت مونوسیت‌ها و اضافه کردن سایتوکاین‌های GM-CSF و IL-4 در روز اول و سوم، مونوسیت‌ها با از دست دادن خاصیت چسبندگی، بزرگ‌تر و به همراه زوائد سیتوپلاسمی دندریتیک شکل به صورت شناور در آمدند. با اضافه کردن آنتی‌ژن تومووری در روز چهارم و فاکتورهای بلوغ در روز پنجم، بیش از ۷۰ درصد از سلول‌ها شناور بودند و از

نظر مورفولوژی در روز هفتم نسبت به زمان قبل از اضافه شدن آنتی‌ژن و عوامل تکمیل کننده بلوغ، بزرگ‌تر و زوائد دندریتیک آن‌ها مشخص‌تر بود. (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: (A) مونوسیت های خون محیطی در روز اول، (B) سلول های دندریتیک با اندازه ای بزرگتر از مونوسیت ها و زوائد سیتوپلاسمی دندریتیت شکل در روز هفتم

فنوتیپ سلول های دندریتیک

در بررسی نشانگرهای سطحی سلول‌های دندریتیک که در روز هفت توسط فلوسایتومتری صورت گرفت، به طور میانگین میزان بیان CD14 ۸±۰/۵۶، CD83 ۴۲±۲/۱۳، HLA-DR (۸۳±۴/۳۷)، CD80 ۳۵±۰/۸۲، CD86 ۷۲±۴/۲۹ مشخص گردید. بیان پایین CD14 در کنار بیان CD83 و مولکول‌های کمک تحریکی (CD86،CD80) و هم‌چنین HLA-DR به عنوان شاخص MHCII، شاهدی بر تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک بالغ می‌باشد.

قدرت بیگانه خواری سلول های دندریتیک

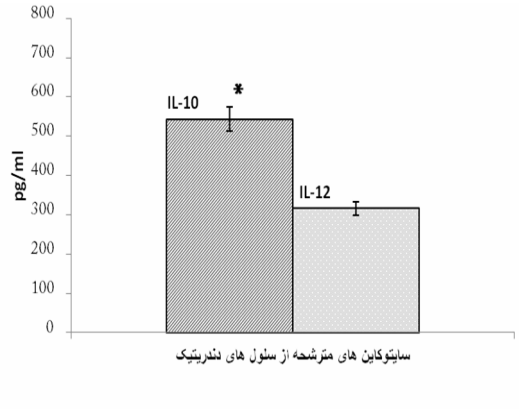
نتایج به دست آمده از فلوسایتومتری نشان داد که درصد سلول‌های بیگانه خواری کننده در قبل و بعد از بلوغ به ترتیب ۵۲±۲/۰۴ و ۷±۰/۶ بود، این اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نشان دهنده القاء فرآیند بلوغ در روز هفتم نسبت به روز پنجم می‌باشد. هم‌چنین این میزان برای MFI به ترتیب ۲۱±۰/۵۴ و ۲۳±۰/۳۸ بود که اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

واکنش مختلط لوکوسیتی (MLR) آلوژن

نتایج به دست آمده از سنجش توانایی سلول‌های دندریتیک در القاء واکنش مختلط لوکوسیتی و تکثیر لنفوسیت‌ها در نسبت‌های ۱:۲۰، ۱:۱۰ و ۱:۵ نشان داد که علی‌رغم تکثیر لنفوسیت‌ها در هر سه نسبت، بیش‌ترین میزان تحریک لنفوسیت‌ها در نسبت ۱:۱۰ می‌باشد(p<۰/۰۵).

سنجش توانایی ترشح سایتوکاین ها

اندازه‌گیری ترشح سایتوکاین‌های IL-12، IL-10 توسط سلول‌های دندریتیک در روز هفتم نشان داد که تولید هر دو سایتوکاین افزایش یافته است ولی در میزان ترشح IL-10 نسبت به IL-12 افزایش معنی‌داری مشاهده شد (نمودار شماره ۱).



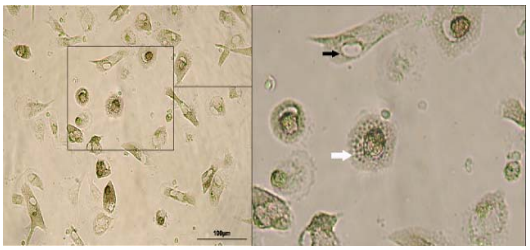
نمودار شماره ۱: میزان IL-10 و IL-12 ترشح شده توسط سلول های دندریتیک در روز هفتم.

* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح (p<۰/۰۵).

بررسی مورفولوژی سلول‌های دندریتیک پس از ۱۰ روز

بررسی میکروسکوپی سلول‌های دندریتیک بالغ کشت داده شده تا روز دهم نشان داد که این سلول ها برخلاف سلول های هفت روزه قابلیت شناوری خود را از دست داده و همانند مونوسیت‌های خون محیطی در ابتدای کشت به کف فلاسک چسبیده اند. هم‌چنین از دیگر خصوصیات مشاهده شده در این سلول‌ها از دست

دادن زوائد سیتوپلاسمی دندریتیت مانند، اندازه بزرگ‌تر، سیتوپلاسمی گسترده (نسبت سیتوپلاسم به هسته سلول) و گرانوله همراه با واکوئل هایی در آن، از اختلافات آن‌ها با سلول‌های دندریتیک می‌باشد. مجموع این خصوصیات نمایی شبه ماکروفاژی به این سلول ها داده است (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۲: سلول های چسبنده شبه ماکروفاژی در روز ۱۰ کشت، با واکوئل ها (فلش سیاه) و گرانول های سیتوپلاسمی (فلش سفید).

بحث

تا به امروز روش‌های زیادی برای تولید سلول‌های دندریتیک در شرایط آزمایشگاهی ارائه شده است، اما به‌طور کلی این سلول‌ها از پیش‌سازهای $CD34^+$ و مونوسیت‌های خون محیطی $CD14^+$ تولید می‌شوند(۲۰-۱۷). سلول‌های دندریتیک مشتق شده از مونوسیت‌های خون محیطی (میلوییدی) که در طی این تحقیق تولید شدند از نظر تعدادی از شاخصه‌های بین‌المللی مورد ارزیابی قرار گرفتند(۲۳-۲۱). براین اساس یکی از مهم‌ترین موارد، القاء فرایند بلوغ در سلول‌ها است که برای آن روش‌های متفاوتی وجود دارد و در مجموع شامل آگونیست‌های TLR، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها بوده که به تنهایی یا ترکیبی به منظور بلوغ که لازمه آن تغییر در مورفولوژی و فنوتیپ سلول‌ها است، استفاده می‌شوند(۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌ها پس از گذراندن یک دوره ۴۸ ساعته تحت تأثیر فاکتورهای بلوغ، در روز هفتم ظاهری دندریتیت شکل پیدا کرده و با کاهش بیان CD14 به عنوان شاخص مونوسیتی به همراه بیان شاخص MHC II و مولکول‌های کمک تحریکی CD86, CD80 و هم‌چنین بیان CD83 به عنوان نشانگر بلوغ سلول‌های دندریتیک میلوییدی(۲۴،۲۵) این مرحله را پشت سر گذاشتند. به دنبال تغییر وضعیت سلول‌های دندریتیک از حالت نابالغ به بالغ از قدرت بیگانه خواری آن‌ها کاسته می‌شود و سلول‌ها به منظور تحریک لنفوسیت‌های T آماده عرضه آنتی‌ژن و ترشح سایتوکاین‌های مؤثر در جهت‌گیری پاسخ ایمنی می‌شوند(۲۶). از این رو نتایج به دست آمده از سنجش قدرت بیگانه‌خواری سلول ها بیانگر یک سیر نزولی از وضعیت نابالغ به بالغ بوده، این تغییر همراه با بررسی میانگین شدت فلورسانس (MFI) ذرات بلعیده شده توسط هر سلول، نشان دهنده افزایش ظرفیت بیگانه خواری سلول ها در مرحله بلوغ می باشد. علت این پدیده استفاده از فاکتور poly (I:C) است که با افزایش پایداری بلوغ در سلول‌های دندریتیک فعالیت بیگانه خواری را افزایش می‌دهد(۲۷). بررسی نتایج MLR آلوژنیک سلول‌های دندریتیک نشان داد این سلول‌ها در هر سه نسبت (۱:۲۰،۱:۱۰،۱:۵) مجاور شده با لنفوسیت‌های T، آن‌ها را تحریک کرده و سبب تکثیر آن‌ها می‌شود ولی بیش‌ترین میزان قدرت تحریکی مربوط به نسبت ۱:۱۰ می‌باشد. این مسأله ممکن است به دلیل افزایش احتمال برخورد یک سلول دندریتیک با لنفوسیت‌ها در محیط باشد که با توجه به ظرفیت تحریکی یک سلول دندریتیک از آن به عنوان نسبت بهینه تحریکی یاد می‌کنند(۲۸، ۲۹). در نهایت بررسی ترشح سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های دندریتیک به عنوان یکی از عوامل تعیین کننده نوع پاسخ ایمنی بیانگر تولید هر دو نوع سایتوکاین IL-10 و IL-12 است ولی با تولید IL-10 بیش تر می باشد (نمودار شماره ۱). بنابراین طبق یافته‌های محققین افزایش نسبت IL-12 به IL-10 منجر به جهت‌گیری سلول دندریتیک به سمت DC1 (ایمنی‌زا) و برعکس کاهش این نسبت، باعث ایجاد DC2 (تحمل‌زا) و متعاقب آن T_H1 و T_H2 می‌شود(۳۰). همان‌گونه که می‌دانیم سلول‌ها اجزایی فعال در محیط اطرافشان هستند و به طور ثابت در پاسخ

به تغییر نیازها و فشارهای وارده از محیط خارج سلول، ساختمان و عملکرد خود را به منظور حفظ هموستاز تعدیل می‌کنند(۱۱). مونوسیت‌های خون محیطی هم در پاسخ به همین تغییر نیازها تبدیل به سلول های غیر تقسیم شونده ماکروفاژ و دندریتیک با عملکردی متفاوت و کاملاً تمایزیافته می شوند(۳۱). باید توجه داشت تغییر شرایط محیطی مثل عوامل پاتوژن و آسیب رسان و متابولیت‌های حاصل از فعالیت آن‌ها یکی از مهم‌ترین فاکتورهای القایی شکل پذیری در سلول‌ها است(۱۱) با توجه به مشاهدات صورت گرفته، ادامه کشت سلول‌های دندریتیک تا روز دهم در غیاب IL-4 به عنوان یک فاکتور مهارکننده تمایز مونوسیت‌ها به ماکروفاژها(۳۲) و GM-CSF که درتمایز و حفظ سلول‌های دندریتیک نقش اساسی برعهده دارد، دو محرک اصلی در تبدیل سلول‌های دندرتیک به سلول‌های شبه ماکروفاژی شناخته شدند که باعث تغییر حالت سلول‌های شناور دندریتیک به سلول‌هایی چسبنده همراه با سیتوپلاسمی گسترده می‌شود، نتایج بررسی Karolina و همکارانش تأییدکننده این یافته می‌باشد(۳۳).

طبق یافته‌های برخی دیگر از محقیقین IL-10 که به عنوان یکی از سایتوکاین‌های شاخص القاء تولرانس و ایمنی همورال باعث مهار تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک شده و آن‌ها را تبدیل به ماکروفاژ می‌کند(۳۴، ۳۵). عامل محرک دیگر نیز در این مطالعه نسبت IL-12:IL-10 در روز هفتم می‌باشد که می‌تواند مبین اثر مهاری IL-10 روی سلول‌های دندریتیک تا روز دهم باشد. البته Karolina و همکارانش معتقد بودند که سلول‌های دندریتیکی که کاملاً بالغ شده‌اند و CD83 را به نسبت زیاد بیان می‌کنند در طی کشت طولانی مدت در محیط فاقد سایتوکاین یا می‌میرند یا به همان صورت دندریتیک باقی می‌مانند. به نظر می‌رسد این تناقض می‌تواند به دو علت باشد: اول این‌که استفاده ترکیبی از فاکتورهای بلوغ TNF-α، MCM و Poly (I:C) که منجربه افزایش میزان ترشح IL-10 از سلول‌های دندریتیک در محیط شده است و دوم عدم تعویض محیط کشت تا روز دهم که به حفظ ترکیب سایتوکاینی محیط کمک می‌کند و سبب زنده ماندن سلول‌ها می‌شود. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داده است که عدم استفاده مجدد از IL-4 و GM-CSF، عدم تعویض محیط کشت و افزایش غلظت IL-10 سه محرک القاءکننده تبدیل سلول‌های دندریتیک به سلول‌های شبه ماکروفاژی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند به گونه‌ای که سلول‌های دندریتیک در مقابل تغییر شرایط مطلوب محیطی در طی ده روز به منظور سازگاری با محیط متحمل این تغییر می‌شوند. هرچند این واکنش همراه با تغییر عملکرد سلول‌های دندریتیک بوده، با این حال گزارشاتی مبنی برعکس این حالت درسلول‌های دندریتیک نابالغ در سطح آزمایشگاهی وجود دارد(۳۷،۳۶).

مجموع این یافته‌ها نشان دهنده قابلیت شکل پذیری سلول‌های رده میلوییدی به ویژه سلول‌های مشتق شده از مونوسیت‌ها (سلول‌های دندریتیک) است که حتی در حالت کاملاً تمایز یافته قادر به این واکنش می‌باشند. پیشنهاد می‌شود به منظور مشخص شدن هویت سلول‌های شبه ماکروفاژی، از نشانگرهای سطحی تفریق‌دهنده بین سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژی استفاده شود. هم‌چنین سنجش سایتوکاین‌های مایع رویی کشت سلول‌های دندرتیک در روز دهم جهت بررسی حضور و نقش IL-6، TNF-α و M-CSF در تمایز سلول‌های دندریتیک به ماکروفاژ، می‌تواند تکمیل کننده پژوهش‌های حاضر در زمینه تمایز سلول‌های دندریتیک باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی ازپایان نامه تحت عنوان "مقایسه فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک تولید شده از مونوسیت‌های تمایززدایی شده و مونوسیت‌های تازه جدا شده" در مقطع کارشناسی ارشد ایمنی شناسی در سال ۱۳۹۱ و کد (۵۰۳-۲-ک) در دانشگاه ارومیه

می‌باشد. در پایان نگارندگان از آقای دکتر رضا حبیبیان به دلیل مشاوره علمی و عملی (بخش فلوسایتومتری) و همکاری مسئولین پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه و هم‌چنین آقایان اصغر علیاری و یوسف حیدرثانی کارشناسان محترم آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده دام پزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med 1973; 137(5): 1142-1162.
2. Karine Breckpot AB, Aerts JL, Thielemans K. Dendritic Cells: Subtypes, Life Cycle, Activation, Biological Functions and their Exploitation in Cancer Immunotherapy. New York: Nova science publisher, Inc; 2010. p. 1-42.
3. Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. Proc Natl Acad Sci 1991; 88(7): 2788-2792.
4. Moore AJ, Anderson MK. Dendritic Cell Development: A Choose-Your-Own-Adventure Story. Advances in Hematology 2013; 2013: 1-16.
5. D'Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. J Exp Med 2003; 198(2): 293-303.
6. Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. J Exp Med 2003; 198(2): 305-313.
7. Naik SH, Sathe P, Park H-Y, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. Nature Immunology 2007; 8(11): 1217-1226.
8. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. Science 2006; 311(5757): 83-87.
9. Raes G, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Clinical and fundamental aspects of monocyte, macrophage and dendritic cell plasticity. Eur J Immunol 2012; 42(1): 6-13.
10. Jopling C, Boue S, Belmonte JCI. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. Nat Rev Mol Cell Biol 2011; 12(2): 79-89.
11. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010.
12. Shen CN, Burke ZD, Tosh D. Transdifferentiation, metaplasia and tissue regeneration. Organogenesis 2004; 1(2): 36-44..
13. Romani N, Gruner S, Brang D. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J Exp Med 1994; 180: 83-93.
14. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. Annual Review of Immunology 2012; 30: 1-22.
15. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annual Review of Immunology 2009; 27: 669-692.
16. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. Blood 2002; 99(9):

3089-3101.

17. Li Y-L, Wu Y-G, Wang Y-Q ,Li Z, Wang R-C, Wang L, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor lysates induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo. World Journal of Gastroenterology: WJG 2008; 14(46): 7127.
18. Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. Cancer Res 1995; 55(5): 1099-1104.
19. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A, Lombardi L, et al. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. Experimental hematology 1995; 23(14): 1463.
20. Berger TG, Feuerstein B, Strasser E, Hirsch U, Schreiner D, Schuler G, et al. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories™. J Immunol Methods 2002; 268(2): 131-140.
21. Felzmann T, Witt V, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, Paul P, et al. Monocyte enrichment from leukapharesis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection. Cytotherapy 2003; 5(5): 391-398.
22. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. Blood 2002; 100(13): 4512-4520.
23. Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, et al. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. The Journal of Immunology 2006; 177(11): 77-84.
24. 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. Cellular Immunology 2009; 257(1): 23-31.
25. Lechmann M, Berchtold S, Steinkasserer A, Hauber J. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. Trends in Immunology 2002; 23(6): 273-275.
26. Tuettenberg A, Fondel S, Steinbrink K, Enk AH, Jonuleit H. CD40 signalling induces IL-10-producing, tolerogenic dendritic cells. Experimental Dermatology 2010;19(1): 44-53.
27. Henry F, Boisteau O, Bretaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Grégoire M. Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. Cancer Research 1999; 59(14): 3329-3332.
28. Delirezh N, Asadi B. Comparison of the Effect of TNF-α, MCM and Poly I: C in Maturation of Dendritic Cells. J Mazand Univ Med Sci 2012; 21(1): 51-65 (Persian).
29. Popov A, Driesen J, Abdullah Z, Wickenhauser C, Beyer M, Debey-Pascher S, et al. Infection of myeloid dendritic cells with Listeria monocytogenes leads to the suppression of T cell function by multiple inhibitory mechanisms. J Immunol 2008; 181(7): 4976-4988.
30. Höpken UE, Lehmann I, Droese J, Lipp M, Schüler T, Rehm A. The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: proliferation

versus deletion. Eur J Immunol 2005; 35(10): 2851-2863.

31. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. Front Immunol 2013; 4: 82.
32. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. Nature Reviews Immunology 2012; 12(2): 101-113.
33. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. Eur J Immunol 1990; 20(11): 2375-2381.
34. Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. J Immunol 1998; 160(9): 4587-4595.
35. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, et al. IL10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. Eur J Immunol 1998; 28(1): 359-369.
36. Förtsch D, Röllinghoff M, Stenger S. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent Mycobacterium tuberculosis. J Immunol 2000; 165(2): 978-987.
37. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. Nature Immunology 2000; 1(6): 510-514.
38. Delneste Y, Charbonnier P, Herbault N, Magistrelli G, Caron G, Bonnefoy J-Y, et al. Interferon-γ switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. Blood 2003; 101(1): 143-150.