فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۸۳

مقایسهٔ توانایی مشتق پروتئینی خالص شده (PPD) و TNF-α در القاء بلوغ در سلولهای دندریتیک

کامبیز باقری[۲،۱]، سید محمد مؤذنی[۱]، نوروز دلیرژ[۳]

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی شناسی
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، گروه بیولوژی
۳- دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی

چکیده

سلول های دندریتیک (Dendritic Cells (DCs قوی ترین سلولهای عرضه کننده آنتی ژن می باشند. این سلولها استفاده‌های کلینیکی متعددی داشته و در حال حاضر روش های مختلفی به منظور تولید و القاء بلوغ در این سلول ها مورد مطالعه هستند. هدف از این تحقیق شناخت کارایی عصاره PPD در القاء بلوغ سلول های دندریتیک مشتق از مونوسیت و مقایسه آن با TNF-α می باشد.

سلول‌های دندریتیک نابالغ از مونوسیتهای خون محیطی داوطلبان سالم و بوسیله کشت در محیط حاوی GM-CSF و IL-4 تهیه شده و سپس با TNF-α یا عصارهٔ PPD، به منظور القاء بلوغ، تحریک شدند. برای مقایسه آثار این دو ماده از اختلافات مورفولوژیکی سلولهای بدست آمده و بررسی شاخص های فنوتیپی آنها با استفاده از روش فلوسیتومتری استفاده شد. شاخص های آنتی ژنی مورد استفاده شامل CD11c ، CD14 ، CD1a ، HLA-DR و CD83 می باشند، که تغییرات هر کدام به طور جداگانه بررسی و تفسیر شده است.

نتایج بدست آمده نشان می دهند که طی دوره کشت میزان و شدت بیان CD14 افت می کند. در حالی که CD83 و HLA-DR یک افزایش نسبی را نشان می دهند، اما تغییرات CD11c از نظر آماری چندان معنی دار نبود. CD1a نیز طی بلوغ یک کاهش نسبی را نشان می دهد. از نظر مورفولوژیکی نیز با گذشت زمان اندازه سلول افزایش یافته و استطاله های سیتوپلاسمی طویل تر به وضوح در سطح سلول مشاهده می‌شود.

براساس نتایج حاصله، سلولهای دندریتیک تحریک شده با PPD، فنوتیپ DC بالغ را به صورت سلول های حاوی میزان بالای CD83 و HLA-DR و میزان کم CD1a نشان دادند. بنابراین PPD نیز همانند TNF-α قادر به القاء بلوغ در سلول‌های دندریتیک بوده و بهترین دوز آن جهت تحریک ۱۵۰μg/ml می باشد. معرفی و استفاده از این عصارهٔ باکتریایی بی‌خطر، بعنوان القاء کننده بلوغ در سلول های دندریتیک می تواند امکان تکامل هر چه بیشتر استراتژی های جدید در ایمونوتراپی بیماریها با استفاده از سلول های دندریتیک تولید شده در ex-vivo را فراهم کند.

واژه‌های کلیدی : سلولهای دندریتیک، PPD، TNF-α، ایمونوتراپی.

مقدمه

سلول‌های دندریتیک مهمترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) در سیستم ایمنی هستند [۱]. این سلولها مکانیسم‌های بسیار کارآمدی را جهت اندوسیتوز آنتی‌ژن‌های محلول و ذره‌ای بکار می‌گیرند. DCها به واسطهٔ عوامل پیش التهابی نظیر برخی محصولات باکتریایی یا ویروسی که در مجموع یک سری تغییرات عملکردی و فنوتیپی منسوب به بلوغ را القاء می‌کنند، دگرگون می‌شوند [۲].

DC ها در بافت‌های غیرلنفاوی محیطی به صورت سلول‌های نابالغ مستقر می‌باشند و در آنجا آنتی‌ژن‌ها را فاگوسیته نموده و از طریق شناسایی اجزائی از پاتوژن‌ها مثل لیپوپلی ساکارید (LPS)، RNA دو رشته‌ای یا سیتوکین‌های التهابی همچون فاکتور نکروز دهنده تومور - α (α-TNF) و اینترلوکین - ۱ (IL-1) فعال می‌شوند. این سلول‌ها به دنبال فعال شدن از بافت‌ها مهاجرت کرده و به اندام‌های لنفاوی ثانویه یعنی جایی که سلول‌های T مبتدی را فعال می‌کنند، می‌رسند. در اعضاء لنفاوی ثانویه، DCها بوسیلهٔ لیگاند CD_{40} ($CD_{40}L$) بارز شده بر روی سلول‌های T کمکی (Th)، مجددا تحریک شده و فعالیت بیشتری را از خود نشان می‌دهند. DC بالغ به علت بیان زیاد مولکول‌های اصلی سازگار سنجی (MHC) و مولکول‌های کمک محرک و تولید برخی سیتوکین‌ها قادر به تحریک سلول‌های T مبتدی و القاء تمایز آنها به سلول‌های مجری می‌باشد [۳، ۴، ۵ و ۶].

استفاده از DC به علت توان منحصر به فرد آن در آغاز پاسخ‌های اختصاصی به آنتی‌ژن در سلول T به صورت in-vitro و in-vivo، به منظور تقویت پاسخ های ایمنی سلولی میزبان جهت معالجه بیماری‌های ویروسی و ایمونوتراپی سرطان، مورد توجه شدید قرار گرفته است [۷و۸]. امکان تولید DCهای منتج شده از سلول های پیش‌ساز به صورت ex-vivo و به میزان مورد نیاز، هم در مدل‌های آزمایشگاهی و هم در معالجات انسانی، به طراحی و آزمایش روش های جدید مبتنی بر DC کمک کرده است [۹و۱۰]. در ایمونوتراپی بیماری های یاد شده هنگامی که از DC بالغ استفاده شود احتمال کسب موفقیت افزایش می‌یابد. در سال‌های اخیر روش‌هایی به منظور تمایز مونوسیت‌های خونی به سلول‌های دندریتیک از طریق کشت در in-vitro و در حضور IL-4 و GM-CSF توصیف شده‌اند [۱۱]. در این روش ها DCهای حاصله ویژگی‌های فنوتیپی و عملکردی معمول مرحلهٔ نابالغ تمایز نیافته را دارا بوده و می‌توانند بوسیلهٔ α-TNF، LPS یا IL-1 به DC بالغ تمایز یابند [۳ و ۱۲].

Thurnher M. و همکارانش در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که باسیل های کالمت - گرین (BCG) قادر است که سلول های دندریتیک موجود در خون محیطی انسان را تحریک نماید [۱۳]. PPD مادهٔ رایج مورد استفاده در تست پوستی توبرکولین بوده [۱۴و۱۵و۱۶] و هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر عصارهٔ PPD بر تمایز و بلوغ سلول های دندریتیک مشتق شده از مونوسیت‌های انسان می باشد.

مواد و روش‌ها

الف - تهیهٔ PBMC و غنی‌سازی مونوسیت‌ها

سلول‌های تک هسته‌ای به وسیلهٔ سانتریفوژ و با استفاده از فایکول - هیپک از خون محیطی یا بافی کوت داوطلبان سالم طبیعی مراجعه کننده به مرکز انتقال خون تهران جدا سازی شدند. جهت به حداقل رساندن آلودگی پلاکتی، سلول‌های تک هسته‌ای بدست آمده، با دور پائین سانتریفوژ شسته شده و سوسپانسیونی حاوی $۱-۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪

سرم جنین گاو (FCS) (Gibco) تهیه و به مدت ۲ ساعت در ۳۷°C و ۵٪ CO_2 انکوبه گردید. بعد از اتمام انکوباسیون، فلاسک‌های کشت سلولی به آرامی تکان داده شد و سلول‌های شناور شده با RPMI-1640 شسته و خالی گردید. بدین ترتیب سلول‌های غیرچسبنده حذف شدند. اغلب سلول‌هایی که در این مرحله باقی می مانند مونوسیت بوده که جهت اطمینان از خلوص آنها با anti-CD14 کونژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات رنگ آمیزی شد و در صد سلول‌های مثبت توسط فلوسیتومتری تعیین گردید.

ب - تولید سلول های دندریتیک نابالغ

مونوسیت‌های غنی شده بدست آمده از مرحله قبل در محیط RPMI-1640 (Gibco) حاوی ۱۰٪ FCS (Gibco)، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین (Sigma)، ۱۰۰ $\mu g/ml$ استرپتومایسین (Sigma)، 5×10^{-5} مول 2-ME (Merck)، ۲۵ میلی‌مول HEPES (Merck)، ۴۰ ng/ml از IL-4 نوترکیب انسانی (Peprotech) و ۱۰۰ ng/ml از GM-CSF نوترکیب انسانی (Peprotech) در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. بعد از گذشت ۳ روز، مجددا IL-4 و GM-CSF به محیط های کشت اضافه شد. در روز پنجم از آغاز کشت، تجمعات DCهای نابالغ چسپنده قابل مشاهده بودند که یا به منظور القاء بلوغ مورد استفاده قرار گرفتند و یا اینکه جهت بررسی مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ و یا تعیین شاخص های سطحی به وسیله روش فلوسیتومتری از آنها استفاده شد.

ج - القاء بلوغ در سلول های دندریتیک

سلول های دندریتیک نابالغ در روز پنجم با ۲۰ ng/ml از TNF-α نوترکیب انسانی (Peprotech) به مدت ۴۸ ساعت به منظور القاء بلوغ تحریک شدند. گروه دیگری از سلول ها مربوط به همان دهنده خون، از روز ۵ تا روز ۷ با غلظت‌های متفاوتی از عصارهٔ PPD (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) کشت داده شدند.

د - ایمونوفنوتیپینگ سلول ها بوسیله فلوسیتومتری

به منظور بررسی شاخص های سطحی سلول ها از آنتی بادی های منوکلونال کونژوگه با FITC و RPE (جدول-۱) استفاده شد.

به منظور رنگ‌آمیزی سلول‌ها، محیط کشت با ۵ میلی‌لیتر محلول نمک بافر - فسفات (PBS) حاوی ۰/۵ میلی‌مول EDTA جایگزین شده و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 سلول ها با استفاده از پیپت نمودن، کنده و برداشت شدند. سلول‌های برداشت شده سانتریفوژ (۴۰۰g) شده و سپس در بافر FACS سرد (PBS حاوی ۰/۱٪ NaN_3، ۵ میلی‌مول EDTA و ۲٪ FCS) به عنوان محلول شستشو Washing Solution (WS) به صورت سوسپانسیون در آمد.

سلول‌ها بعد از شستشو، به صورت 10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر WS به ازاء هر لوله FACS (Becton Dickinson, NJ, USA, Falcon 2054) تقسیم شدند. به هر لوله ۱ میکرولیتر از سرم نرمال موش اضافه شده به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون مجددا سلول ها با WS شستشو شدند. آنگاه از هر آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه ۱۰ میکرولیتر به یکی از لوله ها اضافه شده و به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و بر روی یخ انکوبه شدند. بعد از شستشوی سلول ها و تعلیق مجدد در ۳۰۰-۵۰۰ میکرولیتر از WS با افزودن پارافرمالدئید با غلظت نهایی ۱/۵٪ تثبیت شدند و با دستگاه فلوسیتومتر FACSCalibur (Becton - Dickinson، CA، USA) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار Cell Queste مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین

شدت فلورسانس (MFI) یا درصد سلول‌های مثبت در مقایسه با سلول‌های رنگ نشده یا رنگ شده با کنترل‌های ایزوتیپی تجزیه و تحلیل شد.

ه - بهینه سازی تکنیک‌های کشت سلولی و روش تولید DC :

به منظور یافتن بهینه ترین روش تولید سلول‌های دندریتیک نرمال، تکنیک های مختلف کشت و تولید سلول‌های دندریتیک طراحی و متغیر های مختلفی مورد بررسی قرار گرفت.

ت - کنترل تولید و بلوغ DC :

جهت کنترل تولید و بلوغ DC از ویژگی‌های مورفولوژیک سلول‌ها و شاخص‌های فنوتیپی آنها استفاده شد. بدین منظور سلول‌های چسبندهٔ اولیه به عنوان مونوسیت‌های غنی شده، سلول‌های روز ۵ به عنوان DCهای نابالغ و سلول‌های حاصله بعد از مجاورت با یک عامل رایج القاء بلوغ سلول های دندریتیک یعنی TNF-α، به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. یک سیستم تولید DC نیز بدون افزودن عامل بلوغ به عنوان کنترل منفی طراحی و همهٔ انواع سلول های مذکور از نظر خصوصیات مورفولوژیک و بروز شاخص های سطحی توسط فلوسیتومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج بدست آمده با خصوصیات سلول هایی که در حضور PPD بالغ شده بودند مقایسه گردید.

ی - محاسبه و تحلیل آماری

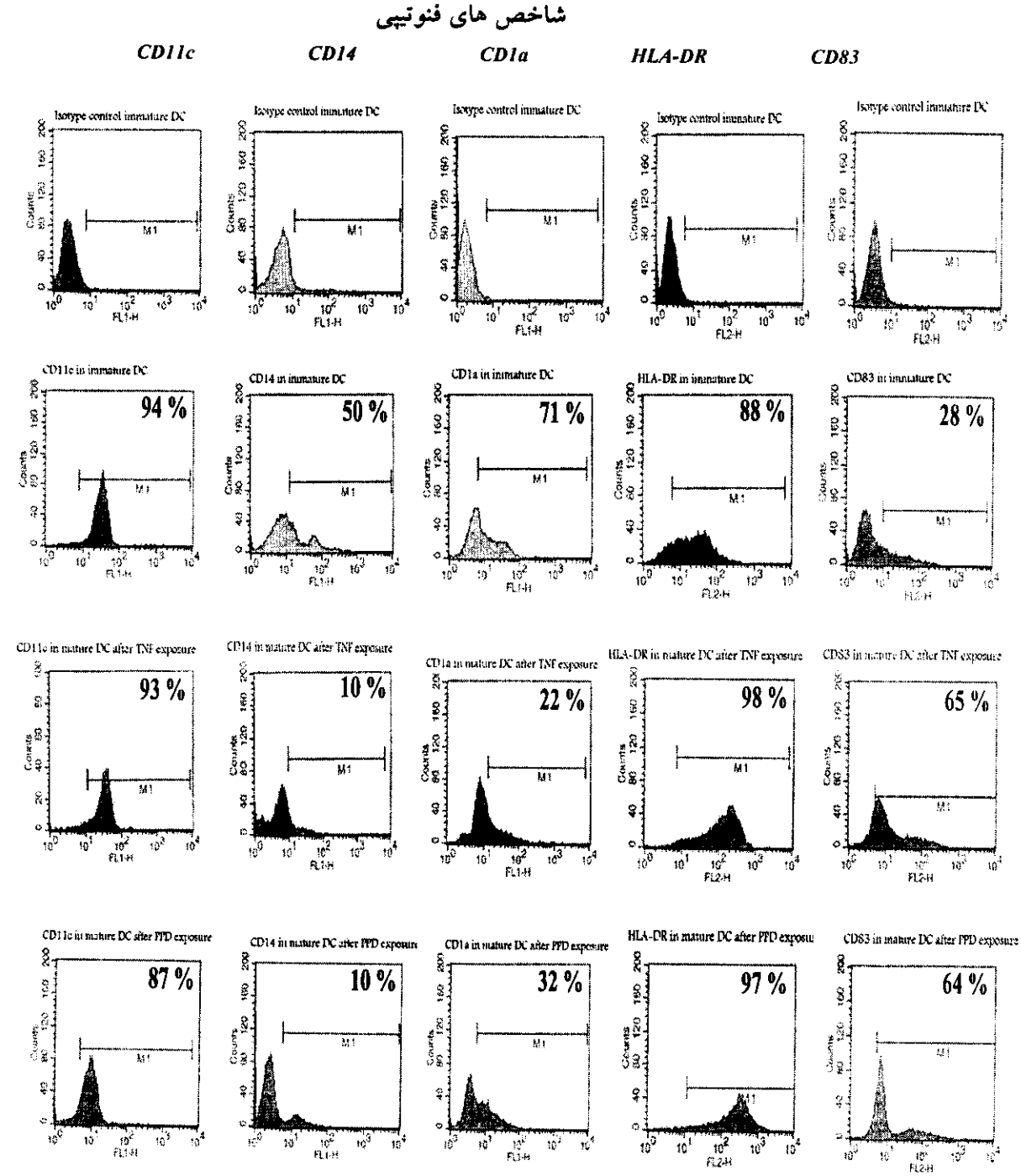
کلیهٔ آزمایشات بر روی ۵ نمونهٔ خونی مختلف تکرار شدند و اختلاف میانگین ها توسط آزمون ANOVA Oneway مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید. داده‌های پرت احتمالی از طریق نمودار جعبه‌ای حذف گردید.

نتایج

الف - بررسی خصوصیات فنوتیپی سلول ها

در این مطالعه تاثیر عصارهٔ PPD در القاء بلوغ DC های نابالغ بدست آمده از مونوسیت های خون محیطی به صورت in-vitro مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایشات DCهای نابالغ از طریق کشت مونوسیت‌ها به مدت ۵ روز در حضور GM-CSF و IL-4 ایجاد شدند. آنگاه DCهای نابالغ به مدت ۲ روز با ۲۰ ng/ml از TNF-α یا غلظت های مختلف PPD تحریک شدند. بعد از این تحریک دو روزه، سلولهای بدست آمده برداشت گردیده و برای تجزیه و تحلیل فنوتیپی مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور بررسی میزان بلوغ سلول های دندریتیک، بیان شاخص های مرتبط با بلوغ یعنی CD83 و HLA-DR مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت توصیف دقیق‌تر، تغییرات فنوتیپی القاء شده توسط PPD بیان دیگر شاخص‌های سطحی سلول‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفتند. مونوسیت‌های انسانی طی ۳ تا ۵ روز کشت در حضور GM-CSF و IL-4 به DCهای نابالغ متمایز شدند. در طول این دوره، سلول‌ها میزان بیان مولکول CD14 را که شاخص مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می باشد کاهش دادند. در مقابل بیان CD1a که یک شاخص DC نابالغ است افزایش پیدا کرد. DCهای کنترل که در محیط حاوی GM-CSF و IL-4 بدون هیچ گونه تحریک اضافه کشت شده بودند، از نظر چگونگی بیان شاخص های سطحی عمدتا ویژگی‌های DCهای نابالغ را آشکار کردند. در مقابل DCهای تحریک شده با PPD یا TNF-α شاخص های فنوتیپی مربوط به DCهای بالغ را نشان دادند (تصویر-۱).

از نظر خصوصیات مورفولوژیکی نیز سلول‌های کشت شده در حضور ۱۵۰ $\mu g/ml$ از



تصـویر ۱- القـاء بلـوغ فنوتیپـی در DCهـا بـه وسـیلهٔ PPD. DCهای نابالغ از طریق کشت مونوسیت های خون محیطی انسانی به مدت ۵ روز در محیط حـاوی GM-CSF و IL-4 تولـید شدند. سپس DCهای نابالغ به ترتیب با ng/ml ۲۰ از TNF-α و یا $\mu g/ml$ ۱۵۰ از PPD به مدت ۲ روز تحریک شـدند. شاخص‌های فنوتیپی سلول‌های روز ۵ به عنوان DCهای نابالغ تیمار نشده، جهت مقایسه با DCهای تیمار شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. DCهای حاصله با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه ضد CD11c، CD14، CD1a، HLA-DR، CD83 و با کنترل‌های ایزوتیپی مناسب، نشان دار شده و بوسیلهٔ FACS مورد بررسی قرار گرفتند. اعداد نشان دهندهٔ درصد سلول های مثبت (حاوی شاخص مربوطه) می باشند.

جدول ۱- مشخصات آنتی بادی های به کار رفته برای تعیین فنوتیپ سلولی

شرکت	ایزوتیپ	نوع کنژوگه	کلون	ویژگی
Serotec	IgG2b	RPE	HB15e	CD83
Serotec	IgG1	FITC	BU15	CD11c
Serotec	IgG2a	FITC	MA1/34	CD1a
Serotec	IgG3	RPE	HL-39	HLA-DR
Serotec	IgG2a	FITC	UCHM1	CD14

PPD مورفولوژی سلول های دندریتیک بالغ (ظاهر منشعب؛ تصویر ۲) را ایجاد کردند و از نظر آماری بین میزان تنظیم کاهشی CD14 Down regulation و تنظیم افزایشی CD83 Up regulation در این سلول‌ها و DCهای کنترل (کشت شده در حضور GM-CSF و IL-4 به تنهایی) تفاوت معنی‌داری وجود داشت. مقادیر P برای اختلاف بین تاثیر $\mu g/ml$ ۱۵۰ از PPD و ng/ml ۲۰ از TNF-α به عنوان عامل بلوغ سلول‌های دندریتیک عبارتند از: CD11c، ۰/۳۳۹، CD14، ۰/۹۹۰؛ CD1a، ۰/۳۸۴؛ HLA-DR، ۰/۵۸۰ و CD83، ۰/۹۵۷ که این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبودند. در حالی که به جز CD11c، از نظر سایر شاخص‌ها بین DCهای کنترل (کشت شده در حضور GM-CSF و IL-4 به تنهایی) و DCهای تحریک شده با PPD یا TNF-α اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

میزان بیان شاخص های سطحی علاوه بر درصد سلول‌های مثبت، از نظر میانگین شدت فلورسانس (MFI) Mean Fluorescence Intensity نیز بررسی و تحلیل شد. شدت فلورسانس مربوط به یک مولکول بعد از رنگ‌آمیزی آن، منعکس کننده شدت بیان آن مولکول می‌باشد. با روی هم قرار دادن هیستوگرام‌های مربوطه مشخص گردید که فنوتیپ DCهای بالغ شده توسط PPD با غلظت $\mu g/ml$ ۱۵۰ با DC های بالغ شده با ng/ml ۲۰ از TNF-α قابل مقایسه بوده و بیش از ۹۵٪ همپوشانی دارد (تصویر ۳). اطلاعات بدست آمده از بررسی شاخص های فنوتیپی سلول ها نشان می دهد که PPD همانند TNF-α می تواند باعث القاء بلوغ سلول های دندریتیک گردد.

ب - بررسی خصوصیات مورفولوژیکی سلول ها

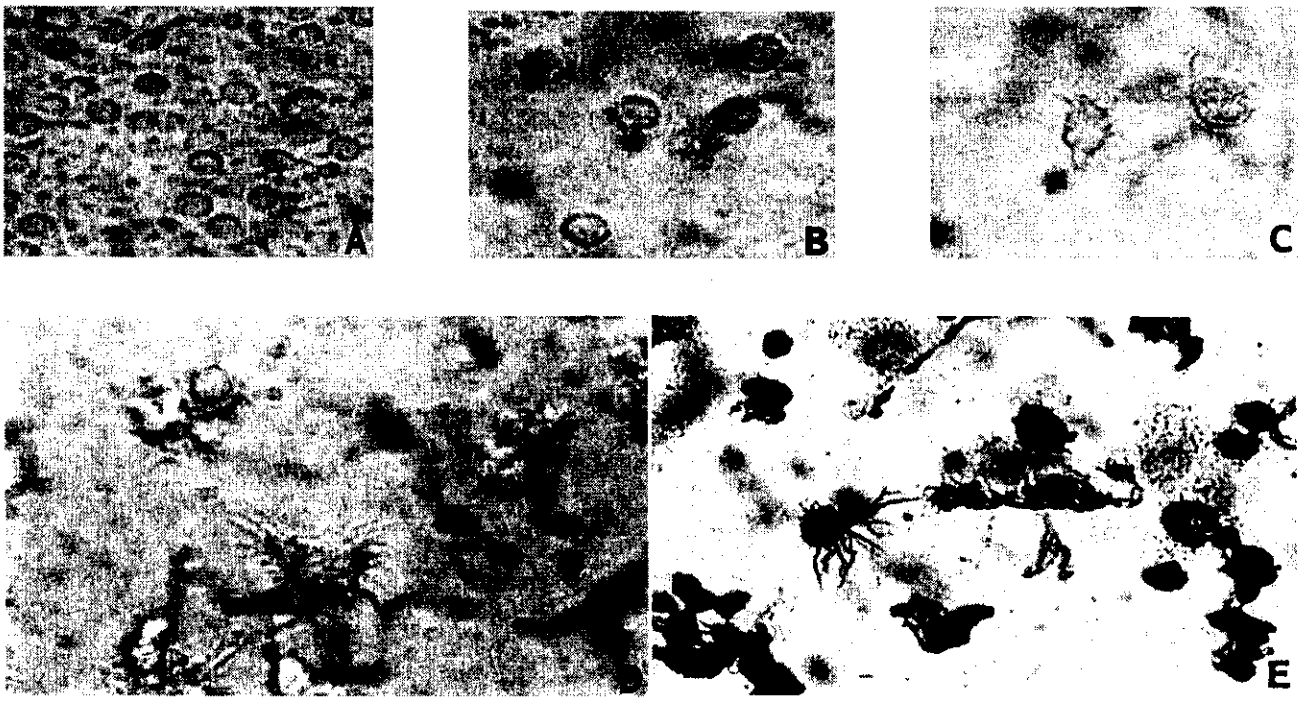
سلول‌های کشیده با زوائد طویل‌تر را می‌توان به وضوح در حضور PPD به عنوان عامل القاء کننده بلوغ مشاهده نمود اما بعد از مجاورت با PBS حاوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار سلولها تا حدودی گرد شده و شناور می‌گردند (تصویر ۴).

ج - تاثیر دوز PPD بر بلوغ سلول های دندریتیک

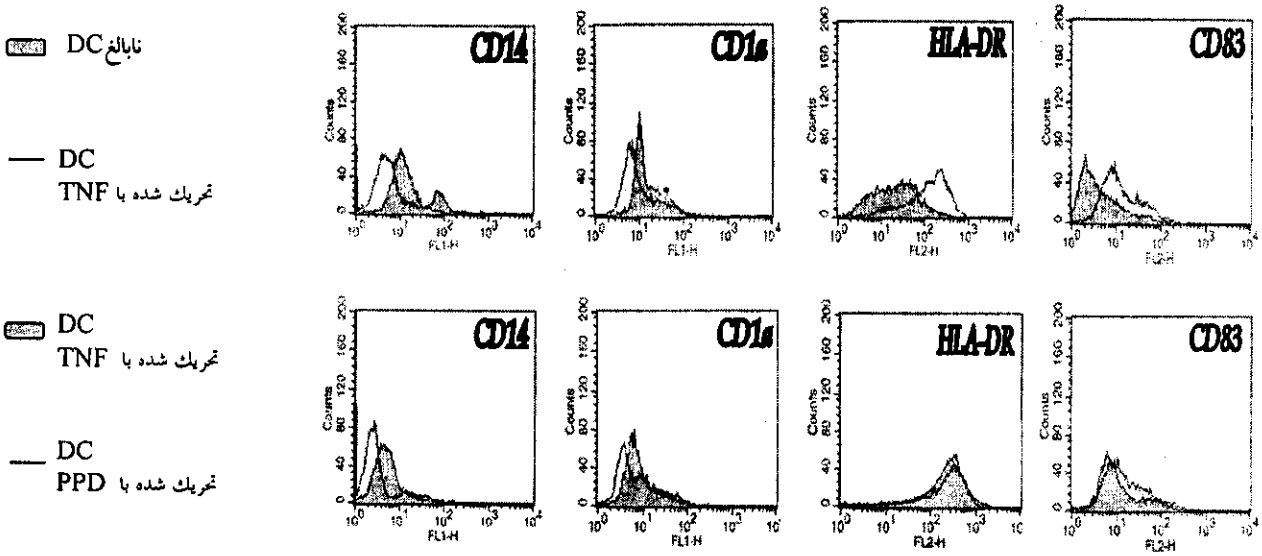
مونوسیت‌های غنی شدهٔ خون محیطی با خلوص تقریبی ۸۰-۸۵٪ (اطلاعات نشان داده نشده‌اند) به همراه GM-CSF و IL-4 کشت شده و سپس MDDCهای نابالغ روز ۵ با غلظت‌های متفاوت PPD و به مدت ۴۸ ساعت مجاور شدند. اطلاعات بدست آمده نشان دهندهٔ تأثیر وابسته به دوز PPD بود بطوریکه غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر PPD باعث بیان به ترتیب ۵۶، ۶۹ و ۵۷ درصدی CD83 و ۱۳، ۶ و ۱۲ درصدی CD14 گردید. در بررسی میزان بیان HLA-DR هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری که مرتبط با دوز باشد مشاهده نشد (تصویر ۵). بر اساس اطلاعات بدست آمده، دوز ۱۵۰ میکروگرم بر

کتابخانه مرکزی دانشگاه علوم و فنون شیراز

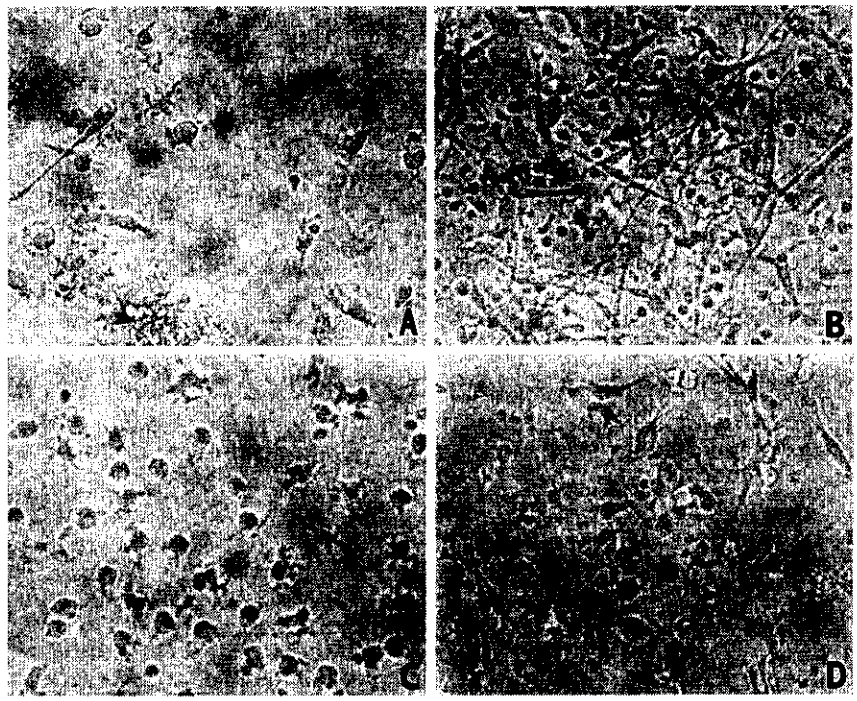
میلی‌لیتر PPD مناسب ترین دوز در القاء بلوغ در سلول های دندریتیک می باشد.



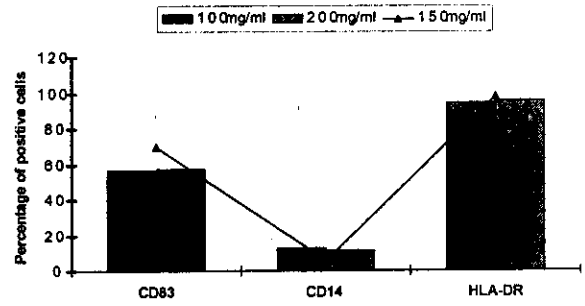
تصویر ۲- خصوصیات مورفولوژیکی DCها در جریان تمایز و بلوغ. DCها بوسیلهٔ کشت مونوسیت‌ها به مدت ۵ روز همراه با GM-CSF (ng/ml ۱۰۰) و IL-4 (ng/ml ۴۰) و ۲ روز در حضور PPD به عنوان عامل بلوغ ایجاد شدند. از سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری در روزهای ۱، ۳ و ۵ و ۷ عکس‌برداری به عمل آمد. PBMCهای حاوی سلول‌های چسبنده قبل از انکوباسیون ۲ ساعته (A)؛ در روز ۳، (B) سلول‌ها در حال تمایز هستند و در روز ۵ (C) به DC نابالغ تبدیل می‌شوند. در انتهای دورهٔ کشت (D) DCهای کاملا بالغ همراه با مقادیر زیادی سیتوپلاسم و استطاله‌های دندریتی فراوان قابل مشاهده می‌باشند. سلول های دندریتیک بالغ رنگ آمیزی شده با گیمسا و رایت (E).



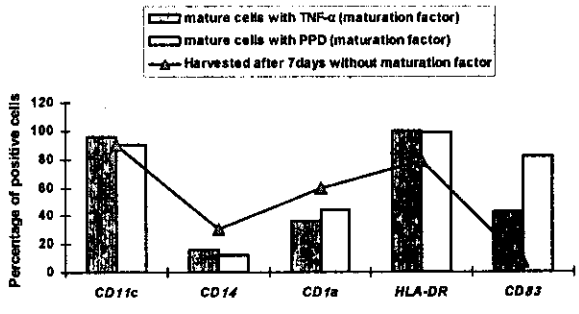
تصویر ۳- هیستوگرام‌های مربوط به DC تحریک شده با TNF-α، DC نابالغ و DC تحریک شده با PPD که بر روی هم قرار داده شده‌اند. انتقال هیستوگرام‌ها به چپ یا راست به ترتیب بر کاهش یا افزایش بیان مولکول‌ها [Mean Fluorescence Intensity (MFI)] دلالت دارند.



تصویر ۴- خصوصیات مورفولوژیک DCهای تحریک شده با TNF-α (A) و PPD (B) قبل از مجاورت با PBS حاوی ۰/۵ میلی‌مول EDTA تا حدودی متفاوت است در حالی که بعد از مجاورت با بافر مذکور و کنده شدن از کف فلاسک کشت، قابل مقایسه و مشابه می‌شوند (D,C).



تصویر ۵- تاثیر دوز های مختلف PPD در القاء بلوغ در سلول های دندریتیک منتج شده از مونوسیت های خون محیطی.



تصویر ۶- DCهای نابالغ روز پنجم به مدت دو روز در غیاب یا در حضور عوامل القاء بلوغ (PPD یا TNF-α) کشت داده شدند. تجزیه و تحلیل فنوتیپی سلول‌ها در روز هفتم احتمال اینکه DC کاملا از طریق یک مکانیسم خود به خودی بالغ شود را رد نمود.

د - بررسی احتمال بلوغ خود به خودی سلول های دندریتیک

به منظور حصول اطمینان از عدم بلوغ خود به خودی سلول‌های دندریتیک در گروهی از سلول ها بعد از کشت پنج روزه در حضور IL-4 و GM-CSF هیچ کدام از عوامل القاء بلوغ اضافه نشد و در روز ۷ این سلول ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانطور که در تصویر ۱ نشان داده شده، کشت DC در حضور یک عامل بلوغ همچون PPD یا TNF-α منجر به افزایش معنی‌دار CD83 و HLA-DR و کاهش CD14 و CD1a می‌شود که این موضوع نشان می‌دهد که DCها تحت تأثیر مواد اضافه شده در روز ۵ متحمل درجه‌ای از تمایز و بلوغ شده‌اند. اما تجزیه و تحلیل شاخص های فنوتیپی سلول‌های روز ۷ بدون دریافت عامل بلوغ، عمدتا ویژگی‌های DCهای نابالغ را نشان داد (تصویر۶).

بحث

اخیرا سلولهای دندریتیک بدلیل مجموعهٔ وسیعی از کاربردهای بالقوه در زمینه تقویت پاسخ‌های ایمنی و یا کنترل آنها، نظر محققین مختلف را به خود جلب نموده است . شناخت روشهای جدا سازی، تولید و القاء بلوغ در این سلولها در in-vitro نه تنها کاربردهای زیادی در زمینه ایمنی درمانی سرطانها و اختلالات سیستم ایمنی همچون بیماریهای خود ایمنی دارد، بلکه امکان درک بیشتر مکانیسم‌های حاکم بر سیستم ایمنی در in-vivo را نیز فراهم می آورد. بنابراین شناسائی عوامل ناشناخته القاء کننده بلوغ نه تنها در گسترش فهم ما از بیولوژی این سلول ها در in-vivo مفید می‌باشد، بلکه در روش‌های ایمونوتراپی به عنوان ابزاری برای القاء بلوغ در DC نابالغ تیمار شده با پپتید مهم است [۲و۱۷و۱۸و۱۹]. مطالعات گذشته توانایی پاتوژن‌ها، میکروارگانیسم ها یا مشتقات آنها را در القاء بلوغ در سلول های دندریتیک نشان می دهند. به عنوان مثال BCG سبب بالغ شدن سلول های دندریتیک می گردد [۱۳]. بنابراین، یافته جدیدی مبتنی بر اینکه PPD، به عنوان یک عصارهٔ استریل و بی‌خطر که سالهاست در تشخیص وجود مصونیت و یا سابقه برخورد قبلی با میکوباکتریوم مولد بیماری سل بکار می‌رود و بی خطر بودن آن برای انسان ثابت شده است، قادر به القاء چنین بلوغی است، می تواند مورد توجه واقع گردد. در آزمایش توبرکولین PPD اثرش را از طریق ایجاد یک واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری در بیمارانی که قبلا با میکوباکتریوم توبرکلوزیس برخورد داشته‌اند، اعمال می کند [۱۴و۱۵]. با توجه به بیولوژی تست پوستی توبرکولین و نیز ماهیت PPD به عنوان یک عصارهٔ مشتق شده از مایکوباکتریوم و یافته‌های قبلی مربوط به برهم‌کنش عوامل پاتوژن و سلولهای دندریتیک [۱۳و۲۰و ۲۱]، این چنین تصور شد که بلوغ سلول های دندریتیک مشتق شده از مونوسیت های خون محیطی می‌تواند به وسیلهٔ عصاره های باکتریایی نظیر PPD نیز القاء گردد. میزان بلوغ DCهای بدست آمده در حضور GM-CSF و IL-4 طی آزمایشات متعدد در in-vitro، با DCهایی که با TNF-α یا عصارهٔ PPD نیز تحریک شده بودند مقایسه گشته و با در نظر گرفتن میزان بروز مولکول‌های MHC II و CD83 مشخص گردید که تغییرات فنوتیپی سلول ها با تغییرات مورفولوژیکی آنها در in-vitro قرین می‌باشد. اطلاعات بدست آمده نشان دادند که PPD یک عامل القاء کننده بلوغ برای DCهای انسانی است که دارای توانی معادل TNF-α به عنوان یک محرک مشهور DC می‌باشد.

قبل از ورود عامل بلوغ، جمعیت‌های سلولی مورد بررسی بسیاری از ویژگیهای DC نابالغ منتج شده از مونوسیت‌ها را از جمله بیان نسبتا بالای CD1a و HLA-DR و بروز پائین CD14 را نشان دادند، در حالی که از روز پنجم تا انتهای دورهٔ کشت عمدتا میزان بروز CD83 افزایش

یافت. کاهش یافتن میزان بروز CD14 نشانه تغییر کردن جمعیت مونوسیتی و بروز CD1a نشانه شکل گیری سلولهای دندریتیک می باشد. درحالیکه بروز CD83 بعنوان قابل قبولترین شاخص سلولهای دندریتیک بالغ، نشانه القای بلوغ در سلولهای بدست آمده می باشد. اطلاعات بدست آمده در این بررسی با اطلاعات منتشر شده توسط سایر محققین کاملا همخوانی دارد [۳و۶و۲۱].

تجزیه و تحلیل شاخص های فنوتیپی و مورفولوژیکی سلول‌های گروه کنترل منفی که TNF-α و یا PPD دریافت نکرده بودند، در روز هفتم نشان داد که بلوغ مشاهده شده در سلولهای گروه های آزمایش، واقعا به وسیلهٔ TNF-α یا دیگر مواد اضافه شده در روز پنجم وساطت می‌شود و موضوع بلوغ خود به خودی DCها را منتفی می کند.

اضافه نمودن PPD به محیط کشت، سلولهایی با مورفولوژی کشیده و طویل‌تر به صورت مختلط با سلولهایی با مورفولوژی معمول DC (سلول‌های نقاب‌دار غیرچسبنده) ایجاد کرد. اما این سلولها نیز بعد از تیمار با PBS حاوی ۰/۵ میلی‌مول EDTA به شکل سلولهای نسبتا گرد با دنباله‌های سیتوپلاسمی ظریف در آمدند. DCهای بالغ شده توسط PPD نیز به ترتیب باعث تنظیم کاهشی یا افزایشی CD14 و CD83 گردیدند و در این مورد در مقایسه با DC بالغ شده با TNF-α از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین به نظر می‌رسد که آثار PPD بر روی DC نابالغ تمایز یافته در حضور GM-CSF و IL-4 با آثار TNF-α مشابه می‌باشد.

کشت سلولهای دندریتیک نابالغ در حضور غلظت‌های مختلف PPD (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان داد که سلول‌های کشت شده در حضور ۱۵۰μg/ml از PPD به ترتیب سطوح بالاتری و پائین تری از CD83 و CD14 را بارز نمودند، اگرچه هیچ تفاوت معنی‌داری در بروز HLA-DR مشاهده نگردید. بنابراین کشت DCهای نابالغ در حضور PPD بلوغ را در یک حالت تقریبا وابسته به دوز پیش می‌برد. چنین یافته ای با نتایج مبنی بر آثار وابسته به غلظت BCG در تحریک سلول های دندریتیک همخوانی دارد [۱۳]. بنابراین ۱۵۰μg/ml از PPD از نظر القاء تغییرات مورفولوژیکی و فنوتیپی در سلولهای دندریتیک، دارای توانی معادل با ۲۰ng/ml از TNF-α است. اما حتی غلظت ۵۰μg/ml از PPD نیز آثار القاء بلوغ در DCها را نشان داد (اطلاعات نشان داده نشده‌اند).

اگرچه مکانیسم‌های مولکولی که بدان وسیله PPD بلوغ DC را القاء می کند هنوز روشن نشده است و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد اما به نظر می‌رسد که این امر از طریق ترشح TNF-α [۱۳] یا یک مسیر وابسته به گیرنده شبه تول Toll like receptor [۲۲ و ۲۳] وساطت می‌شود. اطلاعات بدست آمده از این تحقیق پیشنهاد می کند که PPD، هم تمایز DCها از مونوسیتها و هم بلوغ آنها را القاء می کند. از آنجا که PPD ماده‌ای است که از استانداردهای GMP برخوردار بوده و کاربرد بالینی آن مجاز می باشد و از طرفی بی‌خطر بودن آن طی سالها استفاده in-vivo به اثبات رسیده است، این عصارهٔ باکتریایی می‌تواند یک کاندیدای مناسب و درخور توجه برای القاء بلوغ سلول های دندریتیک در آزمایه‌های بالینی سرطان باشد به گونه‌ای که معرفی و استفاده از این ماده می‌تواند روش‌های جدید را در ایمونوتراپی بیماریها به وسیلهٔ سلول‌های دندریتیک تهیه شده در ex-vivo بهبود بخشد.

منابع

[1] Satthaporn, S. and Eremin, O. Dendritic cells. Biological functions. ***J. R. Coll. Surg. Edinb.,*** 46 (2001) 9-20.

[2] Lanzavecchina, A., Cella, M. and Sallusto, F. Origin, maturation and antigen presentation function of dendritic cell. ***Curr. Opin. Immunol.,*** 9 (1997) 10-16.

[3] Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Hartmann, G. and Endres, S. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or Cytidine-phosphate-Guanosine DNA derives T cell activation in-vitro therapeutic anti-tumor immune response in-vivo. ***J. Immunol.,*** 165 (2000) 6278-6286.

[4] Brocker, T., Karjalainen, K. Targeted expression of MHC class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but positive selection of thymocytes in vivo. ***J. Exp. Med.,*** 185 (1997) 541.

[5] Finkelman, F., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W. and Morris, S. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. ***J. Immunol.,*** 157 (1996) 1406.

[6] Wutzen, P.A., Nissen, M.H. and Claesson, M.H. Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogenous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. ***Scand J. Immunol.,*** 53 (2001) 579-587.

[7] Schuler, G., Thurner, B. and Romani, N. Dendritic cells: from ignored cells to major players in T-cell-mediated immunity. ***Int. Arch. Allergy Immunol.,*** 112 (1997) 317–322.

[8] Shortman, K., Wu, L., Suss, G., Kronin, V., Winkel, K., Saunders, D. and Vremec, D. Dendritic cells and T lymphocytes: developmental and functional interactions. ***Ciba Found Symp.,*** 204 (1997) 130–138.

[8] Chapuis, F., Rosenzwajg, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., and Gluckman, J.C. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. ***Eur. J. Immunol.,*** 27 (1997) 431-441.

[10] Timmerman, J.M. and Levy, R. Linkage of forign carrier protein to a self tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. ***J. Immunol.,*** 164 (2000) 4797-4803.

[11] Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α. ***J. Exp. Med.,*** 179 (1994) 1109.

[12] Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. ***J. Exp. Med.,*** 182 (1995) 389.

[13] Thurnher, M., Ramoner, R., Gastl, G., Radmayr, C., Herold, M., Klocker, H. and Bartsch, G. Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. ***Int. J. Cancer,*** 70 (1997) 128-134.

[14] Huebner, R.E. and Schein, M.F. The tuberculin skin test. ***Clin. Infect. Dis.,*** 17 (1993) 968-975.

[15] Villarino, M.E., Brennan, M.J., Nolan, C.M., Catanzaro, A. and Burman, W.J. Comparison testing of current (PPD-S1) and proposed (PPD-S2) reference tuberculin standards. *Am.* ***J. Respir. Crit. Care Med.,*** 161 (2000) 1167-1171.

[16] Seibert, F.B. and Glenn, J.T. Tuberculin purified protein derivative: preparation and analyses of a large quantity for standard. ***Amer. Rev. Tuberc.,*** 41 (1941) 9-25.

[17] Guyre, C.A., Fisher, J.L., Waugh, M.G.,

Wallace, P.K. and Tretter, C.G. Advantages of hydrophobic culture bags over flasks for the generation of monocyte-derived dendritic cells for clinical applications. ***J. Immunol. Meth.***, 262 (2002) 85–94.

[18] Feuerer, M., Beckhove, P., Umansky, V., Bai, L. and Schirrmacher, V. Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: Advantages for clinical applications in comparison to peripheral blood monocyte derived cells. ***Int. J. Oncol.***, 20 (2002) 247-253.

[19] Gluck, S. and Syme, R. Generation of dendritic cells: role of cytokines and potential clinical applications. ***Transfusion and Apheresis Sci.***, 24 (2001) 117-124.

[20] Henderson, R.A., Watkins, S.C. and Flynn, J.L. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. ***J. Immunol.***, 159 (1997) 635–643.

[21] Thurnher, M., Ramoner, R., Zelle-Rieser, C. and Bartsch, G. A clinically approved oral vaccine against pneumotropic bacteria induces the terminal maturation of CD^{+}_{83} immunostimulatory dendritic cells. ***Immunol. Letters***, 76 (2001) 63-67.

[22] Norgard, V.M., Roth, M.D., Modlin, R.L., Godowski, P.J., Kiertscher, S.M. and Hertz, C.J. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via toll-like receptor 2. ***J. Immunol.***, 166 (2001) 2444-2450.

[23] Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A. and Golenbock, D.T. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. ***J. Immunol.***, 163 (1999) 3920–3927.