Original Article

Effects of Immediate TNF-α Exposure on Phenotype and Function of Dendritic Cells derived from Cord Blood Mono Nuclear Cells

M. Ebrahimi M.Sc.[1], ZM. Hassan Ph.D.[1]*, S.M. Moazzeni Ph.D.[1]
J. Hadjati Ph.D.[2], S. Kazemi Ashtiani Ph.D.[3], P. Haiat B.Sc.[4]

1. Immunology Department, Faculty of Medicine, Tarbiat Modarres University
2. Immunology Department, Tehran Medical University
3. Stem Cells Department, Royan Institute
4. Cellular and Mollecular Biology Research Center, Iran Medical Science University

*Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Immunology Department, Faulty of Medicine, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
Email: Hasan_ZM@Modares.ac.ir

Abstract

Received: 10/May/2007, Accepted: 6/Aug/2007

Objective: Effects of immediate TNF-α exposure on phenotype and function of dendritic cells (DCs) derived from cord blood mono nuclear cells

Materials and Methods: Umbilical cord blood MNCs were isolated from healthy mothers and were divided into TNF(+(and TNF (-) groups. Both were cultured using SCF, Flt3L, GM-CSF and IL-4. But, three ng/ml of TNF-α was first added in the culture of TNF(+) group. All cells were cultured for 14 days and matured with TNF-α or LPS for additional four days. Light microscopic and flowcytometric analyses were performed on days 0, 7, and 14 of both cultures. MLR and cytokines assays were used to characterize the function of immature and mature DCs.

Results: Co-culture of cord blood monocytes and hematopoietic stem cells led to the production of DCs with a characteristic veiled appearance and were consistent with a DC panel of surface markers. However, immediate exposure to TNF-α enhanced the survival of culturing cells in the first week of culture and produced mature DCs with higher maturation markers and IL-12 production. Addition of TNF-α as a maturation marker led to the production of matured DCs and also certain immature and hematopoietic stem cells with higher level of IL-10 production.

Conclusion: This study developed a simple, easy and cost effective way to generate DCs from non fractionating mononuclear cells. It seems that primitive DCs and monocytes in the MNCs are contented in the presence of TNF. This will lead different hematopoitic stem cells to myeloid pathway and results in DCs .

Keywords: Mononuclear cells, Cord Blood, Dendritic Cells, TNF-α

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages:129-140

بررسی اثر افزایش اولیه TNF-α بر فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک مشتق از سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف

مرضیه ابراهیمی M.Sc.[1]، زهیر محمدحسن Ph.D.[1*]، سیدمحمد موذنی Ph.D.[1]، جمشید حاجتی Ph.D.[2]، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D.[3]، پریسا حیات B.Sc.[4]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، گروه ایمونولوژی
۳. پژوهشکده علوم سلولی و ناباروری رویان، گروه سلول‌های بنیادی
۴. دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: Hasan_ZM@Modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۲/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۱۵

* **هدف:** بررسی اثر افزایش اولیه فاکتور آلفا نکروز دهنده تومور (TNF-α) در فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک مشتق از سلول‌های منوسیت خون بندناف

* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های تک هسته‌ای از خون بندناف افراد سالم جدا و به دو گروه تقسیم شدند، در هر دو گروه از محیط کشت حاوی ترکیبات سایتوکاینی GM-CSF, SCF, Flt3L و IL-4 استفاده شد. با این تفاوت که در گروه (+)TNF، به ترکیبات سایتوکاینی فوق میزان ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر TNF-α در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ اضافه شد، و در گروه (-)TNF، هیچ ترکیب دیگری به سایتوکاین‌های فوق اضافه نشد. سلول‌ها در هر دو گروه به مدت ۱۴ روز کشت شدند و سپس در روز ۱۴ به منظور القای بلوغ ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر TNF-α و یا ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر LPS به محیط کشت اضافه شد و کشت به مدت ۴ روز دیگر ادامه یافت. در روزهای ۰، ۷ و۱۴، مورفولوژی و فنوتیپ سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت و عملکرد سلول‌های دندریتیک بالغ و نابالغ نیز توسط واکنش مختلط لکوسیتی و سنجش سیتوکاین‌های IL-۱۲ و IL-۱۰ ارزیابی شد.

* **یافته‌ها:** هم‌کشتی سلول‌های بنیادی خون‌ساز و منوسیت‌های خون بندناف، سبب تولید سلول‌های دندریتیک با ظاهر ویلی‌دار شد که شاخص‌های سلول‌های دندریتیک را بیان می‌کردند. افزایش اولیه TNF-αسبب افزایش بقای سلول‌ها در هفته اول کشت و تولید DC های بالغ با شاخص‌های بلوغ بیشتر شد که توانایی ترشح مقادیر زیادی IL-۱۲ را دارا بودند. در عوض، افزایش TNF-α تنها به عنوان فاکتور بلوغ و در انتهای کشت، سبب تولید مجموعه هتروژنی از سلول‌های DC بالغ، نابالغ و سلول‌های بنیادی شد که توانایی ترشح IL-۱۲ کمتر و IL-۱۰ بیشتری داشتند. در هر دو گروه DC بالغ سبب افزایش تکثیر T آلوژن شد.

* **نتیجه‌گیری:** در این مطالعه روشی ساده و کم هزینه برای تولید سلول‌های دندریتیک از سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف بدون انجام مراحل دشوار تخلیص سلولی ارائه شده است و مشخص شد حضور TNF در روزهای اولیه کشت و نیز حضور سایر سلول‌های تک هسته ای منجر به تولید سلول‌های دندریتیک هموژن تر با توانایی تولید IL-۱۲ از مسیر CD14 می‌شود. به نظر می‌رسد TNF با اثر بر سلول‌های دندریتیک و منوسیتی که در مخلوط سلولی وجود دارند، سبب ورود سلول‌های بنیادی خون‌ساز به مسیر میلوییدی می‌شوند و منجر به تولید سلول‌های دندریتیک از نوع DC1 می‌شوند. این روش مدلی ساده برای پیگیری پیامد تمایز سلول‌ها دندریتیک در حضور TNF-α که در شرایط التهابی و برخی بیماری‌ها همچون آرتریت روماتویید افزایش می‌یابد، ارائه می‌دهد.

کلیدواژگان: سلول‌های تک هسته، خون بندناف، سلول‌های دندریتیک، فاکتور آلفا نکروز دهنده تومور

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۱۴۰-۱۲۹

مقدمه

سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cell: DC) سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن (Antigen Presenting Cell: APC) به منظور تحریک لنفوسیت‌های T باکره و تولید پاسخ‌های ایمنی هستند. آنها در سطوح کم در بافت‌ها و جریان خون وجود دارند و بسیاری از اعمال لنفوسیت‌ها را تنظیم می‌کنند (۱، ۲). برای تولید DC به منظور اهداف درمانی دو مسیر متفاوت وجود دارد:

۱. تمایز از منوسیت‌های خون بندناف، مغز استخوان و یا خون محیطی در پاسخ به ترکیبات سیتوکاینی متفاوت مثل فاکتور تحریک کننده کلونی ماکروفاژ/ گرانولوسیت (GM-CSF)، اینترلوکین ۴ (IL-۴) و فاکتور آلفا نکروز دهنده تومور (TNF-α) (۳) یا اینترلوکین ۱۳ (IL-۱۳) و ۲. تمایز سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز $CD34^+$ توسط کشت در محیط GM-CSF و TNF-α و تولید سلول‌های دندریتیک (۶-۴).

از میان همه سیتوکاین‌هایی که در تولید سلول‌های دندریتیک از منابع مختلف سلولی نقش دارند، TNF-α و GM-CSF نقش حیاتی و مهمی در تکوین DC از پیش‌سازهای خونی (۷)، سلول دندریتیک فولیکولی (FDC) (۸) و تمایز نهایی سلول‌های دندریتیک مشتق از منوسیت‌ها (۷) به عهده دارند. TNF-α به عنوان محرک پاسخ ایمنی شناخته شده است و در پاسخ به التهاب، ورود پاتوژن‌ها، تحریکات فیزیولوژیک، شیمیایی و بیولوژیک از سلول‌های منوسیت/ ماکروفاژ آزاد می‌شود (۹). در مطالعاتی که بر روی سلول‌های $CD34^+$ با هدف تمایز به سلول‌های دندریتیک صورت گرفته است، TNF-α در ابتدای کشت اضافه و در نهایت جمعیت هتروژنی از سلول‌های دندریتیک حاصل می‌شود (۱۱-۹). در مطالعه‌ای که زنگ بر روی سلول‌های منوسیت مشتق از خون بندناف انجام داد به مقایسه افزایش اولیه و تاخیری TNF-α هنگام تمایز این سلول‌ها به DC پرداخت و نشان داد DCهای تولید شده در حضور TNF-α توانایی بیشتری برای تکثیر سلول‌های T آلوژن داشتند (۱۲). در مطالعه مولدنهور و همکارانش و نیز ون گوین و همکارانش مشخص شد که آندوتلیوم تحریک شده با TNF-α سبب تولید DC بالغ از سلول‌های $CD34^+$ می‌شود (۱۳، ۱۴). با این وجود مطالعه‌ای در زمینه اثر زمان افزایش TNF-α به کشت هم‌زمان سلول‌های منوسیتی و سلول‌های بنیادی خون‌ساز وجود ندارد. این مطالعه در جهت بررسی اثر افزایش اولیه TNF-α به سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف به منظور تولید DC صورت گرفت. از آنجا که شاخص‌های CD80، CD83 و CD86 برای فعال‌سازی لنفوسیت‌های T توسط سلول‌های دندریتیک ضروری هستند (۱۵، ۱۶)، این شاخص‌ها به همراه c11CD و a1CD برای بررسی و ارزیابی سطح بلوغ DC مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم چنین میزان بیان شاخص‌های میلوییدی (CD34 و CD14) به منظور ارزیابی سلول‌های تمایز نیافته و یا نیمه تمایز یافته مورد مطالعه قرار گرفت. در نهایت از آنجا که در این مطالعه از سلول‌های خالص شده که نیازمند مراحل خالص‌سازی پرهزینه و زمان بر است استفاده نشده، اثر هم‌کشتی سلول‌های منوسیتی و سلول‌های بنیادی/پیش‌سازهای خونی در تولید و بلوغ DC نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری خون بندناف و جداسازی سلول‌های تک هسته

۱۰ نمونه خون بندناف از نوزادان سالم (HIV-, HBS-, HCV-) با دوره حاملگی ۹ ماه کامل و از مادران سالم غیردیابتی در هنگام سزارین به دست آمد. به طور خلاصه پس از زایمان و خروج جفت، مکان خون‌گیری توسط محلول بتادین/ الکل تمیز و خون سیاهرگی توسط سر سوزن G118 و با استفاده از سرنگ‌های ۲۰ سی‌سی آغشته به ۳/۵ سی‌سی سیترات فسفات دکستروز آدنین (Citrate Phosphate Dextrose Adenine: CPDA، بعثت، ایران) به منظور ممانعت از لخته شدن خون جمع‌آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. سپس به منظور کاهش سلول‌های قرمز، هر نمونه به میزان ۱ به ۵ با اتیل استارچ (HAES 10%, Free Flex SM 711202) مخلوط گردید (۱ میلی‌لیتر از HAES ۱۰درصد با ۵ میلی‌لیتر از خون). پلاسمای غنی از لکوسیت پس از ۱ ساعت، جمع‌آوری و به روی لنفودکس با گرادیان ۱/۰۸-۱/۰۷۷ گرم بر سانتی‌متر مربع (InnoTrain,H9L6114, Germany) منتقل شد (۱۷، ۱۸). سلول‌های تک هسته پس از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۶۰۰g جدا و پس از شستشو توسط بافر فسفات نمکی (PBS) حاوی ۰/۰۲ میلی‌مولار EDTA و ۵درصد سرم جنین گاو (FCS, 16141-09, Gibco, Germany) به میزان 10^7 سلول در میلی‌لیتر محیط RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو رسانده شد. سلول‌های T از مخلوط سلولی به روش روزت (۱۹) جدا شدند. در انتها تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار و درصد سلول‌های زنده توسط تریپان‌بلو (۴درصد در PBS) محاسبه شد.

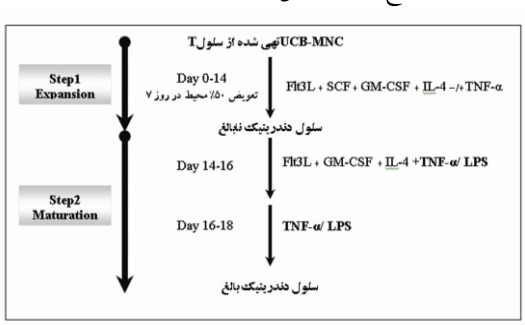
کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف

میزان 1×10^6 سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای (TPP, Germany) و در ۲ میلی‌لیتر RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FCS، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (15070-063, Gibco, Germany)، ۲ میلی‌متر ال گلوتامین (250c-024, Gibco, Germany) به مدت ۱۴ روز کشت شدند. ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از سیتوکاین‌های (308-FK) Flt3L و لیگاند C-Kit یا (255-SC, R&D, USA)، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF (215-GM, R&D, GM-CSF USA) و ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر از IL-4 (204-IL-10, R&D, Germany) در روز های ۰ و ۷ به محیط کشت اضافه شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵درصد CO_2 انکوبه شدند (۲۰). محیط کشت هر هفته توسط تخلیه نیمی از محیط کشت تعویض شد. در روز ۱۴ محیط سلول‌ها به طور کامل تعویض و محیط کشت کامل به همراه سیتوکاین‌های Flt3L (۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) GM-CSF (۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، IL-4 (۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور آلفا نکروز دهنده تومور (TNF-α, 210-TA, R&D, Germany) به عنوان عامل بلوغ در دو دوز طی فواصل دو روز به سلول‌ها اضافه شدند و کشت به مدت ۴ روز دیگر ادامه یافت (شکل ۱).

افزایش TNF-α

سلول‌ها بر اساس زمان افزایش فاکتور آلفا نکروز دهنده توموری به

دو گروه سه‌تایی تقسیم شدند. در گروه اول یا (+)TNF میزان ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر از TNF-α در روزاول و هفتم (دوز نگهدارنده) به محیط کشت اضافه شد و کشت به مدت ۱۴ روز در این شرایط ادامه یافت. در روز ۱۴ پس از تعویض کامل محیط، محیط القای بلوغ به سلول‌ها اضافه شد. در گروه دوم یا (-)TNF طی ۱۴ روز اول TNF-α به محیط کشت اضافه نشد و سلول‌ها در انتها توسط محیط القای بلوغ حاوی TNF-α، بالغ شدند (شکل ۱) (۲۱).



شکل ۱: نمایش شماتیک شرایط کشت UCB-MNC

آنالیز فلوسایتومتری

سلول‌ها به منظور بیان شاخص‌های سلول دندریتیک در روز ۰، ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۸ مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی شاخص‌های سلولی از آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و فیکواریترین (PE) ضدشاخص‌های (FITC-NA1/34, F7141)CdIa، (FITC-KB90)CDIIc، CD14، (PE-TUK4 Ro864) شرکت R&D (USA)، (FITc, MCA 1582F) شرکت Serotec، HLADR(FITC-EDVL, AHVO 188) شرکت Biosource (USA) و CD34 (FITC, 130-081-001) شرکت MACS (Germany) استفاده شد. از آنتی‌بادی‌های IgG1-PE(X0928.)، IgG1-FITC(X0927) و IgG2a-FITC(X0933) شرکت Dako به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر از هر آنتی‌بادی به صورت دورنگ و یا تک رنگ انکوبه شدند. مدت زمان رنگ‌آمیزی بر مبنای سفارش شرکت سازنده انتخاب شد. برای هر نمونه از کنترل ایزوتیپ مناسب استفاده شد. برای جداسازی DCهای چسبیده به کف پلیت از محلول PBS سرد حاوی ۰/۵ درصد EDTA به مدت ۳-۱ دقیقه استفاده شد (۲۲). فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه FACScan (Becton Dickinson, USA) با حداقل ۱۰/۰۰۰ سلول صورت گرفت و نتایج با استفاده از نرم افزار FACScan و یا WinMDI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

واکنش مختلط لکوسیتی (MLR)

سلول‌های دندریتیک حاصل توسط ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر میتومایسین C- (MA287, Sigma, USA) غیرفعال شدند. لنفوسیت‌های T خون محیطی (سلول پاسخ دهنده) به روش روزت جدا و به تعداد 1×10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل اضافه شد. سپس به آنها 1×10^4 سلول دندریتیک غیرفعال (سلول محرک) در سه تکرار اضافه شد. به این ترتیب نسبت محرک به پاسخ دهنده ۱:۱۰ است. پس از ۵ روز کشت، به مجموعه سلولی فوق میزان ۵۰ میکروکوری از تیمیدین رادیواکتیو (Amershams, Sweden) به هر چاهک اضافه و ۱۸ ساعت بعد سلول‌ها توسط هاروست کننده سلولی (A3ICN Flow co, USA) به روی فیلترهای مخصوص منتقل و میزان برداشت تیمی‌دین رادیواکتیو توسط دستگاه شمارش‌گر β (Wallach pharmacia, Sweden) اندازه‌گیری شد.

سنجش سیتوکاین‌های IL-۱۲ و IL-۱۰

برای سنجش IL- ۱۲ و IL- ۱۰ در محیط کشت سلول‌های دندریتیک و MLR از کیت الیزای IL-۱۲ انسانی (7929-88 eBioscience, USA) و IL-10 (88-7106, eBioscience, USA) مطابق با دستور کارخانه استفاده شد. سوپ کشت سلولی در انتهای MLR و یا در انتهای کشت DC جمع‌آوری و در دمای ۷۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (حداقل یک ماه).

آنالیز آماری

اکثر آزمایش‌ها حداقل در ۳ تکرار انجام شد. از تست کلوموگروف اسمیرونوف برای بررسی نرمال بودن گروه‌ها استفاده شده است و داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون غیرپارامتریک (Mann-Whitney) و بر نامه آماری SPSS10 موردتجزیه و تحلیل قرار گرفت. تست توکی برای مقایسه دو گروه مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شد و اختلاف $p<0.05$ معنی‌دار گزارش شد.

یافته‌ها

اثر افزایش TNF-α در ابتدای کشت بر تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای

سلول‌های تک هسته به طور تازه از خون بندناف نوزادان سالم جدا و سلول‌های T آنها به روش روزت جدا شد. به این ترتیب از ۴۸/۲۵±۷/۶۷ میلی‌لیتر خون بندناف، میزان $10^6\times$(۱۷۲/۹±۸۰/۸۸) سلول تک هسته حاصل شد و میزان $10^6\times$(۷۹/۵۲±۴۴/۸۹) سلول T طی روش روزت جدا شد (جدول ۱).

نتایج شمارش سلولی و محاسبه سلول‌های زنده در دو گروه (+)TNF و (-)TNF طی روزهای ۰، ۷، ۱۰ ، ۱۴و ۱۸ نشان داد که افزایش اولیه ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر (TNFα) سبب افزایش تکثیر سلول‌های اولیه خون‌ساز و حفظ بقای سلول‌های پیش‌سازی در کشت‌های کوتاه مدت (هفته اول) می‌شود (p=۰/۰۳)، به طوری که تعداد سلول‌ها در گروه (+)TNF طی ۷ روز ابتدایی ۶/۱±۱/۳ برابر و در گروه (-)TNF تعداد سلول‌ها ۳/۱±/۴ برابر نسبت به روز آغازین کشت افزایش یافت (جدول۱).

جدول ۱: مشخصات نمونه‌های خون بندناف، تعداد سلول‌ها و میزان تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از خون بندناف. در گروه (+)TNF سلول‌ها به مدت ۱۴ روز در حضور ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر از TNF-α کشت شدند و سپس در روز ۱۴ به مدت ۴ روز دیگر توسط دو دوز از ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از TNF-α بالغ شدند. در گروه (-)TNF سلول‌ها به مدت ۱۴ روز در محیط عاری از TNF-α کشت شده و توسط دو دوز از ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر TNF-α بالغ شدند. اعداد در جدول به صورت میانگین ±SD نشان داده شده‌اند.

Isolation Step												Expaansion Step
			روز ۰		روز ۷		روز ۱۰			روز ۱۴		روز ۱۸
UCB Volume (ml)	۴۸/۲±۷/۶		TNF-	TNF+	TNF-	TNF+	TNF-	TNF+	TNF-	TNF+	TNF-	TNF+
MNC Count (10^6)	۱۷۷/۹±۸۰/۸	Count ($x10^6$)	۰/۶±۰/۱		۱/۹±۰/۶	۳/۸±۰/۶	۵/۸±۲/۴	۱۱/۰±۲/۷	۱۹/۴±۵/۳	۱۷/۴±۶/۰	۲۱/۶±۸/۵	۱۲/۲±۶/۱
MNC Viability (%)	۹۳/۹۱±۸/۶	Fold			۳/۱±۱/۴	۶/۱±۱/۳	۲/۹±۰/۷	۲/۸±۰/۴	۳/۳±۱/۶	۱/۵±۰/۶	۱/۱±۰/۳	۰/۶±۰/۱

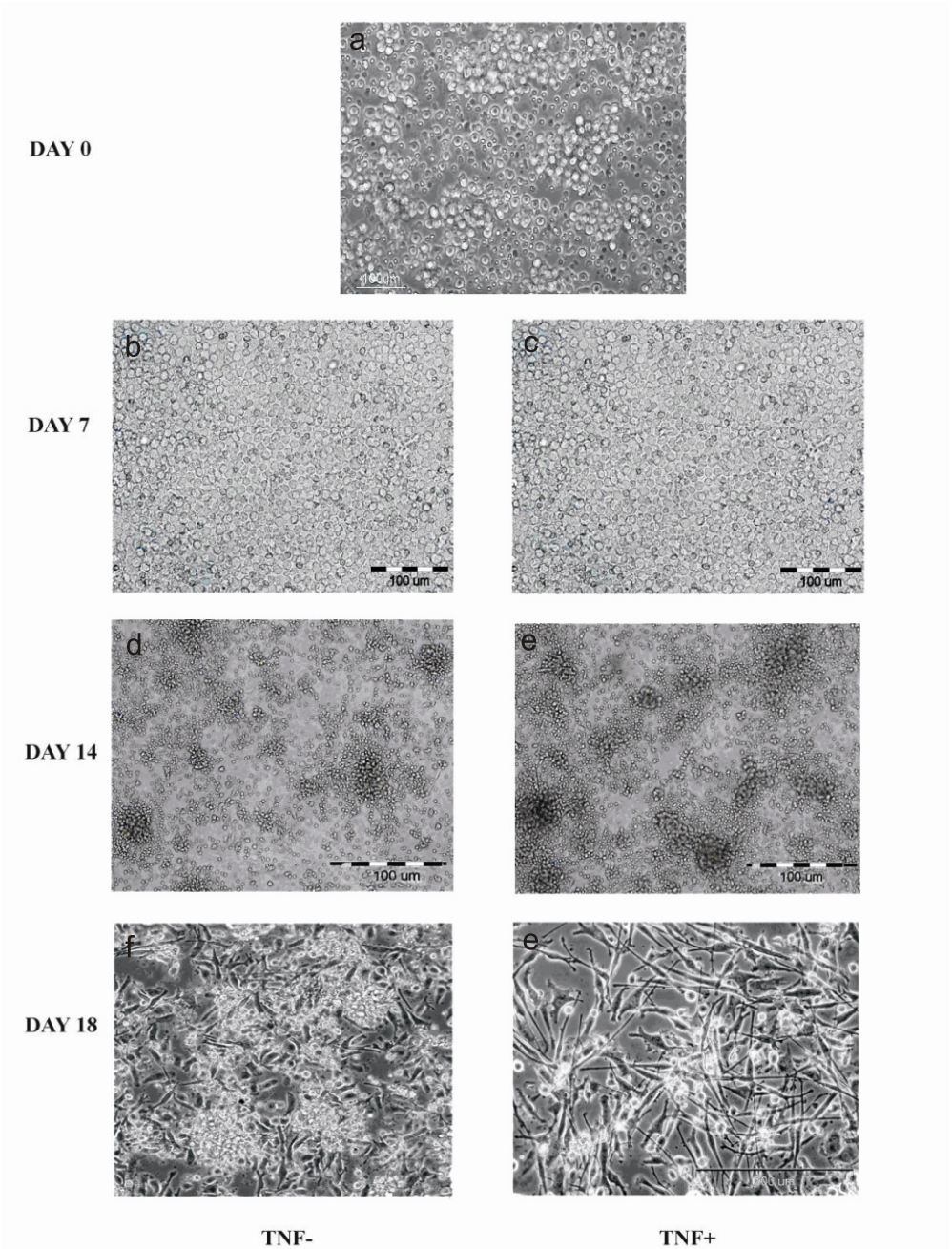
افزایش زمان کشت به ۱۴ روز سبب کاهش تعداد سلول‌ها در گروه (+)TNF شد. به این ترتیب طی ۱۴ روز کشت در حضور TNF تعداد سلول‌ها ۲۴/۵۹±۷/۳۰ درصد کاهش و در غیاب TNF، ۴۵/۱۷ درصد افزایش یافت. ماکزیمم افزایش تعداد سلول‌ها در گروه (+)TNF در روز ۷ و در گروه (–)TNF در روز ۱۴ مشاهده گردید (جدول ۱). القای بلوغ در هر دو گروه توسط TNF-α در روز ۱۸ کشت سبب تولید $۱۲/۲۵\pm۶/۱۲\times۱۰^۶$ سلول بالغ در گروه (+)TNF و $۲۱/۶۳\pm۸/۵۹\times۱۰^۶$ در گروه (–)TNF از ۱×۱۰^۶ شد (جدول ۱).

اثر افزایش اولیه TNF-α بر مورفولوژی و فنوتیپ سلول‌های دندریتیک

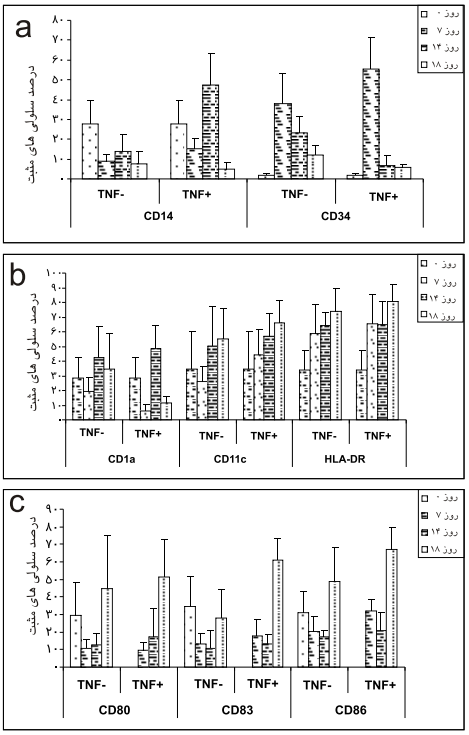
مشاهده میکروسکوپی سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف که به روش روزت، سلول‌های T آنها جدا شده بود، سلول‌هایی با اندازه‌های متفاوت و شناور را نشان داد. در بین سلول‌های جدا شده، تعداد زیادی سلول منوسیتی نیز دیده می‌شد (شکل ۲a). بررسی شاخص‌های سلولی در همین زمان با استفاده از فلوسایتومتری و آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فلوکروم ها انجام گرفت. نتایج نشان داد که ۱/۵۹±۱/۳۹ درصد از سلول‌ها $CD34^+$، ۲۷/۶±۱۲/۲درصد $CD14^+$، ۲۸/۷±۱۳/۸درصد CDIa، ۳۴/۱±۲۵/۱درصد $CD11C11c^+$، ۲۹/۶±۱۸/۶درصد $CD80^+$، ۳۴/۵±۱۷/۳درصد $CD83^+$، ۳۰/۹±۱۲/۲درصد $CD86^+$ و ۳۴/۱±۳۱/۱درصد از سلول‌ها $HLA\text{-}DR^+$ را بیان می‌کردند (شکل a۳). سلول‌ها در دو محیط حاوی سیتوکاین‌ها و TNF [گروه (+)TNF] و فاقد TNF [گروه (–)TNF] به مدت ۱۴ روز کشت شد. شمارش سلولی نشان داد که طی ۳ روز ابتدایی کشت، میزان مرگ سلولی افزایش یافته است. کاهش تعداد سلول‌ها در گروه (+)TNF بیشتر از (–)TNF بود ($p<۰/۰۵$). سپس سلول‌ها شروع به تکثیر کردند که در این حالت از نظر اندازه بزرگ‌تر و نسبت هسته به سیتوپلاسم آنها افزایش یافت. به این ترتیب در روز هفتم حدود ۷۰–۶۰ درصد از سلول‌ها در هر دو گروه ظاهری نامشخص و سلول‌های گرد و شناور، مشابه با سلول‌های خون‌ساز (HSCs) و باقی‌مانده سلول‌ها ظاهری شبیه DC داشتند (شکل ۲b, c).

بررسی فنوتیپی توسط فلوسیتومتری در هر دو گروه نشان داد که در این زمان شاخص‌های CD80،CD83 و CD86 نسبت به روز آغازین کشت از بیان پایینی در هر دو گروه برخوردار بودند و اختلاف معنی‌داری نیز بین گروه‌ها مشاهده نشد ($p>۰/۰۸$). مقایسه میزان سلول‌های $CD14^+$ و $CD34^+$ در گروه (+)TNF نسبت به (–)TNF افزایش معنی‌داری نداشت، (۵/۱۴±۱۵درصد سلول $CD14^+$ و ۱۶/۱±۵۵/۴درصد سلول $CD34^+$ در مقایسه با ۳/۶±۸/۹درصد و ۱۵/۶±۳۷/۸درصد) (شکل ۳a). با افزایش زمان کشت به ۱۴ روز، سلول‌هایی که در روز صفر آزمایش TNF دریافت داشته بودند، سلول‌های شبه HSC کمتری داشتند (۳۵–۲۵ درصد در مقابل ۶۰–۴۵ درصد در گروه دوم). تعداد کلونی‌های چسبان که سلول‌های دندریتیکی در حاشیه آنها دیده می‌شد و از روز ۱۰ شروع به تشکیل شدن کرده بودند، در روز ۱۴ کشت در گروه (+)TNF بیش از گروه (–)TNF بود. سلول‌های مشابه منوسیت‌های خون محیطی و نیز شبه DC در گروه (+)TNF نیز از تعداد بیشتری برخوردار بود (شکل d۲، e). در این زمان میزان سلول‌های $CD1a^+$ و $CD11c^+$ در هر دو گروه افزایش و سلول‌های $CD34^+$ کاهش یافت $p<۰/۰۲$ و $p<۰/۰۱$). کاهش سلول‌های $CD34^+$ در گروه (+)TNF بیش از گروه (–)TNF بود (۵/۰۳±۶/۶۷درصد در مقایسه با ۸/۲۶±۲۳/۱۳درصد) ($p=۰/۰۴$). از سوی دیگر میزان سلول‌های $CD14^+$ نیز در این زمان در گروه (+)TNF نسبت به گروه (–)TNF افزایش قابل توجهی یافت (۱۶/۱±۴۷/۳درصد در مقایسه با ۸/۶۴±۱۳/۹۷درصد) ($p<۰/۰۳$)، شکل a۳، و شکل a۴). این در حالی بود که میزان سلول‌های +CD1a نیز ۷ روز پس از کشت در گروه (–)TNF نسبت به گروه (+)TNF افزایش نشان داد (۹/۴±۱۹/۶درصد در مقایسه با ۴/۲±۶/۲درصد) ($p<۰/۰۴$)، شکل b۳ و شکل b۴). بیان کم شاخص‌های بلوغ CD (CD80، CD38، CD86) در روز ۱۴ بیانگر عدم تکوین بلوغ DC در هر دو گروه بود، هر چند که افزایش بیان CD1a و c11CD شاهدی بر تکوین DC نابالغ بود (شکل b و c۳). القای بلوغ با افزایش ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از TNF-α در دو مرحله و به فواصل دو روز سبب ایجاد سلول‌هایی با مورفولوژی تیپیک DC در هر دو گروه شد. سلول‌هایی

شناور و یا چسبیده با مقادیر زیادی بیرون زدگی سیتوپلاسمی در اطراف سلول‌ها مشاهده شد. در گروه (+)TNF سلول‌ها دندریتیکی حاصل در زیر میکروسکوپ هموژن‌تر بوده و در ظاهر از خلوص بیشتری برخوردار بودند (شکل f، ۲g). افزایش بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های دندرتیک بالغ همچون CD80، CD83 و CD86 پس از افزایش فاکتور بلوغ خصوصا در گروه (+)TNF نشان دهنده ایجاد سلول بالغ در این گروه است (شکل ۳c). به این ترتیب کشت سلول‌های UCB-MNC در حضور SCF, Flt3L, GM-CSF و IL-4 به مدت ۱۴ روز و القای بلوغ توسط TNF-α سبب تولید ۴۴/۶درصد سلول CD80، ۲۷/۲درصد سلول +CD83 و ۰/۴۹درصد سلول +CD86 شد. افزایش درصد سلول‌های +CD1a و +CD34 در گروه (-)TNF نسبت به گروه (+)TNF ($p<0/05$) نشان دهنده حضور سلول‌های نابالغ در این گروه است که منطبق بر مشاهدات میکروسکوپی بود (شکل ۳b).



شکل ۲: تصویر سلول‌های منوسیت خون بندناف تهی از سلول T (a)، سلول‌های کشت شده در روز ۷ (b, c)، روز ۱۴ (d, e)، روز ۱۸ و ۲۴ ساعت پس از افزایش فاکتور بلوغ TNF (f, g). سلول‌های ردیف سمت راست، TNF را از ابتدای کشت دریافت داشته‌اند و سلول‌های ردیف چپ TNF را تنها در زمان بلوغ دریافت داشته‌اند. بزرگنمایی تصاویر ۲۰× (۱۰۰ میکرو متر :Scale Bar)

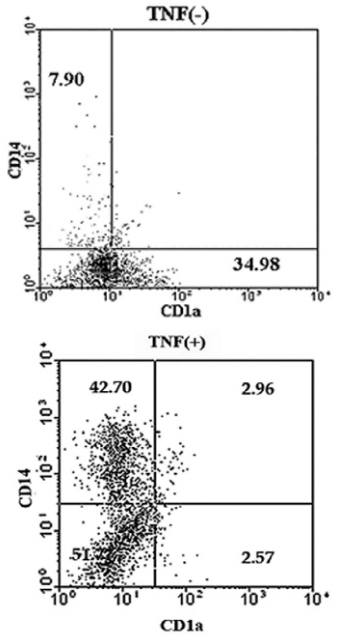


شکل ۳: بررسی بیان شاخص‌های CD34 و CD14 (a) CD1a، CD11c، HLA-DR، (b) و شاخص‌های بلوغ CD80، CD83، CD86 (c) بر سطح سلول‌های منوسیتی خون بندناف در حضور و یا عدم حضور TNF و در روزهای ۰، ۱۴ و ۱۸

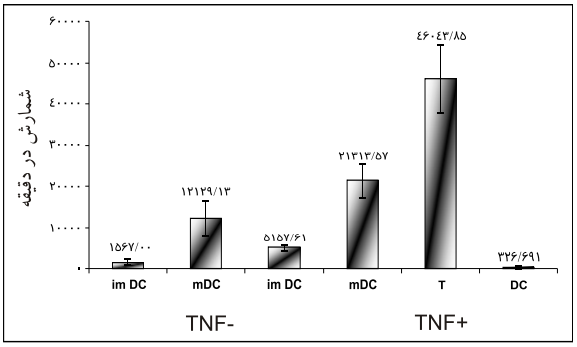
بیان HLA-DR در سلول‌های تک هسته تهی شده از سلول‌های T در سطح بالایی بیان شد و با افزایش زمان کشت افزایش یافت و دو گروه از نظر بیان این شاخص تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (p>۰/۰۵، ۳c). در مجموع زمانی که TNF در روزهای آغازین به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد، بیان شاخص‌های CD11c،CD80 ، CD83، CD86و HLA-DR بر سطح سلول‌های دندریتیک افزایش و بیان CD14، CD34 و CD1a کاهش یافت (p<۰/۰۴، p=۰/۰۱). بالاتر بودن تعداد سلول‌های بیان کننده CD1a، CD14 و CD34 در غیاب TNF طی زمان‌های اولیه کشت و اضافه کردن آن به محیط به عنوان عامل بلوغ، نشان دهنده باقی ماندن سلول‌ها در نیمه مسیر تکوین DC است (شکل۳).

واکنش مختلط لکوسیتی

در روز ۱۸ کشت سلول‌های دندریتیک بالغ به منظور تحریک تکثیر آلوژن در سلول‌های T توسط میتومایسین C غیرفعال شدند و سپس به نسبت ۱:۱۰ با سلول‌های T کشت شدند. میزان برداشت تیمیدین رادیواکتیو توسط سلول‌ها در هر گروه پس از ۱۸ ساعت تیمار با این ماده مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۵ نشان داده شده است سلول‌های دندریتیک تولید شده در هر دو گروه سبب القای تکثیر آلوژن در سلول‌های T می‌شوند، و سلول‌هایی که در حضور افزایش اولیه TNF بالغ شده‌اند (روز۱۸) میزان برداشت تیمیدین رادیواکتیو بیشتری نسبت به گروهی که TNF را در انتهای کشت و به عنوان فاکتور بلوغ دریافت کرده‌اند، دارا هستند (p=۰/۰۱) (۲۱۳۱۳/۵۷±۴۱۸۰/۵۴ در برابر ۱۲۱۲۹/۱۳±۴۵۵۴/۰۲). علاوه بر این که DCهای نابالغ (روز۱۴) تولید شده در حضور TNF، سطح بالایی از برداشت تیمیدین رادیواکتیو را نسبت به سلول‌های نابالغ گروه (–)TNF نشان دادند (۵۱۵۷/۶۱±۳۸۹/۳۲ در برابر ۱۵۶۷/۰۰±۶۸۴/۴۸) (p=۰/۰۰۱، شکل ۵).



شکل ۴: بررسی بیان همزمان سلول‌های +CD14 و +CD1a در دو گروه (+)TNF و (-)TNF

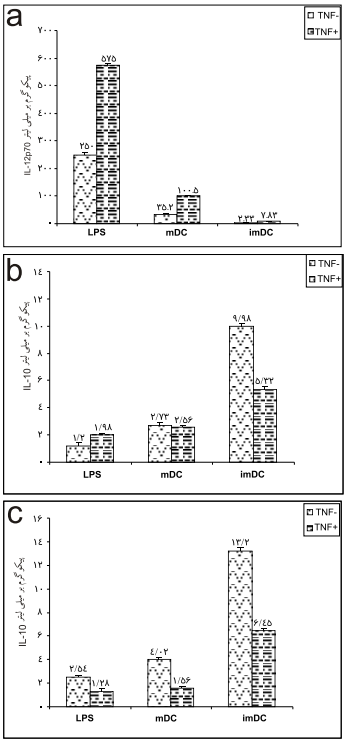


شکل ۵: تکثیر سلول‌های T آلوژن توسط سلول‌های دندریتیک نابالغ و بالغ در دو گروه (+)TNF و (-)TNF. نتایج به صورت میانگین اعداد ±SD نشان داده شده است

سنجش سایتوکاین‌های IL-۱۲ و IL-۱۰ توسط سلول‌های دندرتیک حاصل از سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف

در این مطالعه تولید هترودایمر IL-12P70 و IL-10 در

کشت‌های DC بالغ و نابالغ در هر دو گروه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد IL-12P70 توسط هر دو گروه ترشح می‌شود، اگرچه DC نابالغ در سطح پایین‌تری به ترشح این سیتوکاین می‌پردازد (p>۰/۰۵، شکل ۵a). همچنین سلول‌های دندریتیکی بالغ در گروه TNF(+) تولید بیشتر IL-12 را در مقایسه با گروه TNF(–) دارا هستند (۱۰۰/۵±۰/۷ در برابر ۳۵/۲±۱/۵) (p=۰/۰، شکل ۶a). LPS به عنوان کنترل مثبت سبب افزایش ترشح IL-12 در هر دو گروه به میزان ۵/۴ ±۵۷۵ و ۸/۲ ±۲۵۰ شد (شکل ۶a).



شکل۶: سنجش a) IL–۱۲ و b) IL–۱۰ در محیط کشت سلول‌های DC بالغ و نابالغ، سنجش IL–۱۰ در محیط کشت واکنش c) MLR

ترشح IL-10 نیز در سوپ کشت سلول‌های دندریتیک ارزیابی شد و مشخص شد و میزان ترشح این سیتوکاین در سلول‌های نابالغ گروه TNF(–) بیش از گروه TNF(+) بود (۹/۹۸±۰/۱۷ در برابر ۵/۳۲±۰/۲۴) پیکوگرم در میلی‌لیتر (p=۰/۰، شکل ۶b). سلول‌های بالغ در هر دو گروه و نیز سلول‌های بالغ توسط LPS نیز مقادیر کمی (<۵pg) IL-۱۰، ترشح می‌کردند. این نتایج توسط سه آزمایش مجزا تایید شد (شکل ۶b).

سنجش سایتوکاین IL-10 در کشت MLR

تولید سیتوکاین‌ها توسط سلول‌های T و با عرضه شاخص‌های آلوژنیک بر سطح DC و بیان مولکول‌های کمک تحریکی در MLR تنظیم می‌شود. بر اساس جمعیت‌های مختلف APC مشتق از منوسیت‌ها دو دسته سلول T ایجاد می‌شود. در گروهی IFNγ و در گروه دیگر IL-4 و IL-10 ترشح می‌شود (۲۳). به منظور بررسی ترشح IL-10 توسط سلول‌های T تحریک شده با سلول‌های دندریتیک، DCهای تولید شده به منظور حذف سیتوکاین‌های مورد استفاده در کشت و قبل از ورود به MLR شستشو و سپس به سلول‌های T آلوژن به مدت ۵ روز اضافه شدند. سنجش IL-10 ۴۸ ساعت پس از تحریک انجام گرفت و نتیجه سه آزمایش مجزا نشان داد که هر دو گروه قادر به القای سلول‌های T تولید کننده IL-10 هستند (شکل ۶c). در این آزمایش‌ها DC در گروه TNF- سلول‌های تولیدکننده IL-10 بیشتری نسبت به گروه TNF+ ایجاد می‌کند (به ترتیب ۱۳/۲±۰/۰۶، ۴/۰۲±۰/۰۴ و ۶/۴۵±۰/۰۵، ۱/۵۶±۰/۰۴ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) (p<۰/۰۱).

بحث

استینمن و کوهن برای اولین بار سلول‌های دندریتیک را به عنوان دسته جدیدی از سلول‌هایی که در اعضای لنفی محیطی موش‌ها مستقر هستند معرفی کردند (۲۴). پس ازآن استینمن و ویتمر اثر تحریکی این سلول‌ها را در واکنش مختلف لنفوسیتی گزارش کردند (۲۵) و به این ترتیب وظیفه این سلول‌های در عرضه آنتی‌ژن‌ها و فعالیت‌سازی T مشخص شد (۲۶) . تا به امروز مطالعات زیاد به تولید و تمایز سلول‌های دندرتیک از منابع منوسیتی و یا سلول‌های CD34+ توسط ترکیبات سیتوکاینی متفاوت (۲۷) و یا تحریک توسط برخی پاتوژن‌ها و یا ترکیبات التهابی پرداخته‌اند (۲۸).

TNFα مدیاتور اولیه پاسخ‌های ایمنی در پاسخ به شرایط التهابی و پاتولوژیک، عفونت‌ها، شوک، بیماری‌های اتوایمیون و دفع پیوند بافتی است. طی مسیر خون‌سازی TNFα به عنوان تنظیم‌کننده مثبت و منفی تکثیر و تمایز سلولی عمل می‌کند. بیشتر روش‌هایی که سلول‌های دندریتیک را از منابع سلول‌های پیش‌ساز خونی CD34+ تولید می‌کنند، TNFα را در ابتدای کشت سلول و در ترکیب با سایر سیتوکاین‌ها به کار می‌برند (۵، ۲۹) و یا از TNFα به عنوان فاکتور بلوغ برای تحریک و بلوغ DC مشتق از منوسیت‌ها استفاده می‌کنند (۳۰). در حقیقت TNFα با افزایش بیان گیرنده‌های GM-CSF بر سطح سلول‌های در حال تکوین و القای وقایع آپوپتوزی در کمپارتمان گرانولوسیتی (۳۱)، سبب تسهیل تکوین فنوتیپ و مورفولوژی سلول‌های دندریتیک می‌شود (۳۲).

برای انجام ایمنوتراپی معمولا DCها از سلول‌هایی که توسط بیدهای مغناطیسی خالص شده‌اند، حاصل می‌شوند که این فرایند علاوه بر پرهزینه بودن، سبب ازدست رفتن سلول‌ها و نیز صرف زمان بسیار است. به علاوه مطالعات کمی در مورد تولید سلول‌های دندریتیک بدون انجام پروسه خالص‌سازی وجود دارد. لذا در این مطالعه، با استفاده از یک روش ساده، ارزان قیمت و سریع تولید DC از سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف بدون هیچ فرایند تخلیصی صورت گرفت. و با استفاده از سایتوکاین‌های rhSCF، rhFlt3L، rhGM-CSF و rh IL-4 تولید DC در حضور یا بدون حضور rh TNF انجام شد. همچنین در

این مطالعه مقایسه اثر فوری و تاخیری TNFα بر خصوصیات فنوتیپی و ایمونولوژیک DC تولید شده صورت پذیرفت.

از آنجا که در این مطالعه از سلول‌های تک هسته‌ای بدون فرایندهای خالص‌سازی استفاده شده است، لذا تمام شاخص‌های مربوط به سلول‌های دندریتیک (CD80، CD83 و CD86) درابتدای کشت اندازه‌گیری شدند. کاهش این شاخص‌ها پس از ۷ روز کشت می‌تواند به دلیل افزایش پیش‌سازهای خونی از جمله سلول‌های +CD34 و یا از بین رفتن سلول‌های واجد این شاخص‌ها در مراحل اولیه کشت باشد. این مطالعه نشان داد که مرگ سلولی طی ۳ روز ابتدایی کشت خصوصا در گروه دریافت‌کننده TNF افزایش می‌یابد. یکی از وظایف TNF القای آپوپتوز است. گیرنده‌های TNF بر سطح منوسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های T و B بیان شده و میانکنش TNF با گیرنده TNFR1 سبب القای آپوپتوزیز در این سلول‌ها می‌شود (۳۳). در عوض میانکنش با TNFR2 مانع القای آپوپتوزیز می‌شود (۳۴). نتایج کشت کوتاه مدت در حضور TNF نیز حاکی از مرگ اولیه سلول‌های تمایز یافته موجود در سلول‌های تک هسته خون بندناف و به دنبال آن افزایش تکثیر و تزاید سلولی و افزایش تعداد سلول‌های +CD34 بود که در راستای وظایف TNF است. هم‌چنین TNF قادر به برانگیختن طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیک شامل، تکثیر، تمایز، التهاب و مرگ سلولی است (۳۴). کاهش تعداد سلول‌ها در گروه (+)TNF که پس از ۱۴ روز مشاهده شد نیز می‌تواند نشانه‌ای از ورود به مسیر تمایزی سلول‌های تکثیر باشد که در راستای افزایش سلول‌های +CD14 است (جدول۱ و شکل۳). کاهش بیان CD80, CD83, CD86 و افزایش بیان CD14, CD1a پس از ۱۴ روز در گروهی که TNF را طی روزهای اولیه دریافت داشته‌اند نیز دلیلی بر افزایش تمایز سلول‌های نابالغ دندریتیکی است. CD1a شاخص مولکولی DCهایی است که از منوسیت مشتق شده‌اند و در ارتباط با فرایند عرضه آنتی‌ژن به DCها است و بیان آن بر سطح سلول‌های دندریتیک نابالغ مشتق از منوسیت‌ها افزایش می‌یابد. CD14 که از شاخص سلول‌های منوسیتی است طی تمایز به سمت DC کاهش می‌یابد (۳۵). در این مطالعه افزایش سلول‌های CD14 در گروه (+)TNF و کاهش آن طی تمایز نهایی و به دنبال افزایش TNF در دو مرحله و به فواصل دو روز نشان دهنده تمایز سلول‌های با شاخص CD34 به سمت CD14 و سپس تولید DC است. افزایش CD1a در این مرحله در این گروه ناشی از تمایز پیش‌سازهای منوسیتی و یا منوسیت‌های موجود در محیط کشت است. به این ترتیب به نظر می‌رسد که تکوین DC از دو مسیر تمایزی غیروابسته به هم رخ می‌دهد که شامل مسیر +CD1a و +CD14 است (۳۶) و سلول‌ها در حضور اولیه TNF بیشتر وارد مسیر +CD14 و در غیاب آن وارد مسیر +CD1a می‌شوند CD83 از شاخص‌های بلوغ سلول‌های DC انسانی و CD80, CD86 نیز از جمله فاکتورهای کمک تحریکی مهم در تکثیر سلول‌های T به واسطه DC هستند که در سطح سلول‌های بالغ دندریتیکی افزایش می‌یابند (۱۰، ۱۵ و ۳۵). براساس مطالعات استینمن و همکارانش، فنوتیپ اکثر DCهای بالغ با از دست دادن CD14، افزایش بیان گیرنده MHCII، CD83, CD80, CD86 همراه است (۱). نتایج این مطالعه نیز نشان داد سلول‌هایی که TNF را با تاخیر و در روز ۱۴ و ۱۶ به میزان ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و تنها به عنوان عامل بلوغ دریافت کرده‌اند پس از بلوغ واجد مقادیر زیادی از CD14، CD1a و مقادیر کمتری از CD38، CD80 و CD86 در مقایسه با گروه (+)TNF هستند. حضور مقادیر قابل توجهی از سلول‌های +CD34 پس از اتمام تمایز و نیز افزایش تعداد سلول‌ها در تمام مدت کشت نیز حاکی از ناقص ماندن مسیر تمایزی در این گروه است (جدول۱ و شکل۳) و احتمالا نیازمند زمان بیشتری برای تکوین هستند که در این مطالعه صورت نگرفت. برخی مطالعات نشان داده‌اند که TNFα می‌تواند در تمایز سلول‌ها به منظور تولید DC اثرات تحریک کننده و یا باز دارنده اعمال کند (۳۷، ۳۸). مکانیسم اثر افزایش تکثیر با مواجهه فوری با TNFα همچنان نامشخص است. اما همان طور که پیشتر اشاره شد، TNFα سبب افزایش گیرنده‌های GM-CSF شده و بنابراین بقای سلول‌های بنیادی پیش‌ساز خونی را افزایش می‌دهد، همچنین سبب تکثیر پیش‌سازها میلوییدی می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط چنگ و همکارانش انجام گرفته است مشخص شد که افزایش تاخیری و نه اولیه TNF سبب افزایش تولید DC از پیش‌سازهای +CD34 می‌شود (۳۹). همچنین موریسون و همکارانش نشان داده‌اند افزایش تاخیری TNF، اگر چه سبب تولید DC بیشتری می‌شود اما سبب ممانعت بلوغ و بیان کمتر CD80 بر DCهای تولید شده از سلول‌های CD34 می‌گردد (۹). این دو مطالعه از جهاتی با روشی که ما به کار گرفتیم متفاوت است، اول آنکه منبع سلولی در این مطالعه، سلول‌های خون بندناف تهی از سلول‌های T بوده است و از سلول‌های خالص استفاده نشد؛ در حالی که در دو مطالعه فوق از سلول‌های +CD34 استفاده شده است. حضور سلول‌های منوسیتی و پیش‌سازهای خونی در کنار هم در این مطالعه می‌تواند پاسخگوی برخی تفاوت‌ها از جمله افزایش سلول‌های CD80 باشد. دوم آنکه ترکیب سیتوکاینی این مطالعه نیز متفاوت است، به عبارت دیگر از ترکیب SCF، Flt3L، GM-CSFاستفاده شده است که تکثیر سلولی را خصوصا در سلول‌های میلوییدی افزایش می‌دهد و نیز از IL-4 که سبب بقای پیش‌سازهای میلوییدی می‌شود. در حالی که در مطالعات فوق از ترکیب SCF و GM-CSF استفاده شده است. سوم آنکه در این مطالعه TNF در ابتدای کشت و نیز طی کشت با غلظت ۳نانوگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و برای بلوغ سلول‌های دندرتیک نیز در هر دو گروه از ۲ دوز TNF استفاده شد در حالی که در دو مطالعه فوق زمان اثردهی TNF به صورت کوتاه مدت در ابتدا ، اواسط و یا اواخر کشت با محدوده متغییری از غلظت همراه بوده است. لذا دلایل فوق تفاوت‌های موجود بین این مطالعات و مطالعه ما را توجیه می‌کند. هر چند برای رسیدن به یک نتیجه قطعی نیاز مطالعات بیشتری در زمینه مکانیزم اثر TNF بر سلول‌های CD34، CD14 و ترکیب این دو با هم هستیم.

در این مطالعه به منظور بررسی عملکرد DC در هر دو گروه، از واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) و نیز سنجش سیتوکاین‌های IL-10 و

IL-12 استفاده و مشخص شد که DC تولید شده در حضور افزایش اولیه TNF قدرت بیشتری در تحریک تکثیر سلول‌های T آلوژن پس از بلوغ را دارا است (شکل ۴). علاوه بر اینکه سبب تولید مقادیر بیشتری از IL-12 (سیتوکاین تیپ I) می‌شوند (شکل۵). IL-10 (تیپ II سیتوکاینی) از سلول‌های نابالغ در هر دو گروه ترشح می‌شود و ترشح بسیار پایینی نسبت به IL-12 دارد، همچنین ترشح IL-10 در گروه TNF(-) و نیز در سلول‌های T فعال شده با این نوع DCها افزایش نشان داد. تدر و زو در مطالعه‌ای نسخه‌هایی از IL-10 را در سلول‌های CD83 جدا شده از خون محیطی توسط آنالیز RT-PCR مشاهده کردند (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر نیز مشاهده کردند که DCهای میلوییدی با منشا CD14+ نیز قادر به سنتز IL-10 هستند (۴۰).

نتیجه‌گیری

داده‌های این مطالعه پاسخی به اثر اختصاصی ریز محیط سیتوکاینی بر بلوغ و فعالیت DC بود و نشان داد کشت هم‌زمان منوسیت‌ها و سلول‌ها ی CD34+ و فاکتور التهابی چون TNF قادر است نتیجه نهایی تولید DC را تحت تاثیر قرار دهد. به علاوه پیشنهاد می‌شود برای حصول یک نتیجه بهتر برای تولید DC از منابع سلول CD34+ و یا تک هسته‌ای خون بندناف، TNF در هفته اول به کشت اضافه شود که سبب تکثیر پیش‌سازها و ممانعت ازآپوپتوز در مراحل اولیه شود و طی کشت نیز به منظور ممانعت از مرگ سلول‌های در حال تکوین از غلظتی پایین‌تر از ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر استفاده شود. از سوی دیگر شواهد موجود در این مطالعه بیان می‌دارد که حضور TNF از ابتدای کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف سبب ورود به مسیر تمایزی CD1a و در غیاب TNF وارد مسیر CD14 می‌شوند.

تقدیر و تشکر

از دکتر حسین بهاروند مدیر گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان به خاطر حمایت و مساعدت ایشان در اجرای پروژه، آقای احسان تقی‌آبادی کارشناس بخش پیوند گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان و خانم الهام عزآبادی مسئول پذیرش بانک خون بندناف رویان و نیز پرسنل اتاق عمل بیمارستان آتیه و خصوصا سرکار خانم سجاد تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392(6673): 245-252

2. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and t cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 2002; 20: 621-667

3. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J Exp Med 1994; 180(1): 83-93

4. 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

5. Caux C. Pathways of development of human dendritic cells. Eur J Dermatol 1998; 8(6): 375-384

6. Robinson SP, Saraya K, Reid CD. Developmental aspects of dendritic cells in vitro and in vivo. Leuk Lymphoma 1998; 29(5-6): 477-490

7. Zhang Y, Mukaida N, Wang J, Harada A, Akiyama M, Matsushima K. Induction of dendritic cell differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, stem cell factor, and tumor necrosis factor alpha in vitro from lineage phenotypes-negative c-kit+ murine hematopoietic progenitor cells. Blood 1997; 90(12): 4842-4853

8. Park S-M, park H-Y, Lee TH. Functional effects of tnf on a human follicular dendritic cell line: Persistent nf-kb activation and sensitization for fas-mediated apoptosis. The Journal of Immunology 2003; 171: 3955-3962

9. Morrison RS, 3rd, Cruse JM, Wang H, Lewis RE. Dendritic cell differentiation and proliferation: Enhancement by tumor necrosis factor-alpha. Exp Mol Pathol 2003; 75(3): 228-237

10. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Costimulatory function of umbilical cord blood cd14+ and cd34+ derived dendritic cells. Exp Mol Pathol 2003; 75(1): 18-33

11. Sato K, Nagayama H, Takahashi TA. Generation of dendritic cells from fresh and frozen cord blood cd34+ cells. Cryobiology 1998; 37(4): 362-371

12. Zheng R, Klang K, Gorin NC, Small D. Lack of kit or fms internal tandem duplications but co-expression with ligands in aml. Leuk Res 2004; 28(2): 121-126

13. Moldenhaur A, Nociari M, Lam G, Salama A, Rafii S, Moore M. Tumor necrosis factor alpha stimulated endothelium: An inducer of dendritic cell development from hematopietic progenitors and meyloid leukemic cells. Stem cells 2004; 22(2): 144-157

14. Van Neuyen A, Kirchmair M, Furhapter C, Romani N, Sepp N. Adhesive interactions between cd34(+)-derived dendritic cell precursors and dermal microvascular endothelial cells studied by scanning microscopy. Cell Tissue Res 2004; 315(1): 139-143

15. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Function of cd80 and cd86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. Exp Mol Pathol 2003; 75(3): 217-227
16. Hong L, Webb TJ, Wilkes DS. Dendritic cell-t cell interactions: Cd8alphaalpha expressed on dendritic cells regulates t cell proliferation. Immunol Lett 2007; 108(2): 174-178
17. Broxmeyer H, Douglas G, Hangoc G. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3828-3832
18. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migllacclot G, Migliacciot AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution Proc Nati Acad Sci USA 1995; 92: 10119-10122
19. Varas A, Jimenez E, Sacedon R, Rodriguez–Mahou M, Maroto E, Zapata A, Vicente A. Analysis of the human neonatal thymus: Evidence for a transient thymic involution. J Immunol 2000; 164: 6260-6267
20. Curti A, Fogli M, Ratta M, Tura S, Lemoli RM. Stem cell factor and flt3-ligand are strictly required to sustain the long-term expansion of primitive cd34+ dr- dendritic cell precursors. J Immunol 2001; 166(2): 848-854
21. Santiago-Schwarz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE. Tnf in combination with gm-csf enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. J Leukoc Biol 1992; 52(3): 274-281
22. Teresa SH, Robert GH. Flow cytometry protocole. Methods in molecular biology Second Edition; 263: 67-94
23. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of t helper cell and dendritic cell differentiation. Science 1999; 283(5405): 1183-1186
24. Steinman R, Inaba K. Myeloid dendritic cells. J Leukoc Biol 1999; 66(2): 205-208
25. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: Translating innate to adaptive immunity. Curr Top Microbiol Immunol 2006; 311: 17-58
26. Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class ii products of dendritic cells. J Exp Med 1998; 188(11): 2163-2173
27. Borras FE, Matthews NC, Patel R, Navarrete C. Dendritic cells can be successfully generated from cd34+ cord blood cells in the presence of autologous cord blood plasma. Bone Marrow Transplant 2000; 26(4): 371-376
28. Zhou LJ, Tedder TF. Cd14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature cd83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(6): 2588-2592
29. Lardon F, Snoeck HW, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Nijs G, Lenjou M, Henckaerts E, Boeckxtaens CJ, Vandenabeele P, Kestens LL, Van Bockstate DR. Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using gm-csf, tnf-alpha, and additional cytokines: Antagonistic effects of il-4 and ifn-gamma and selective involvement of tnf-alpha receptor-1. Immunology 1997; 91(4): 553-559
30. Curti A, Isidori A, Ferri E, Terragna C, Neyroz P, Cellini C, Ratta M, Baccarani M, Lemoli RM. Generation of dendritic cells from positively selected cd14+ monocytes for anti-tumor immunotherapy. Leuk Lymphoma 2004; 45(7): 1419-1428
31. Santiago-Schwarz F, Divaris N, Kay C, Carsons SE. Mechanisms of tumor necrosis factor-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced dendritic cell development. Blood 1993; 82(10): 3019-3028
32. Rosenzwajg M, Canque B, Gluckman JC. Human dendritic cell differentiation pathway from cd34+ hematopoietic precursor cells. Blood 1996; 87(2): 535-544
33. Baud L, Oudinet J, Bens M, Noel L, Peraldi M, Rondeau E, Etienne J, Ardaillou R. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. Kidney Int 1989; 35: 1111-1118
34. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ 2003; 10: 45-65
35. Bender A, Sapp M, Feldman M, Reddy A, Seder R, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Dendritic cells as immunogens for human ctl responses. Adv Exp Med Biol 1997; 417: 383-387
36. Fukaya H, Xiao W, Inaba K, Suzuki Y, Hirokawa M, Kawabata Y, Komatsuda A, Endo T, Kishimoto H, Takada G. Codevelopment of dendritic cells along with erythroid differentiation from human cd34(+) cells by tumor necrosis factor-alpha. Exp Hematol 2004; 32(5): 450-460

37. Moore F, Buonocore S, Aksoy E, Ouled-Haddou N, Goriely S, Lazarova E, Paulart F, Heirman C, Vaeremans E, Thielemans K, Goldman M. An alternative pathway of nf-{kappa}b activation results in maturation and t cell priming activity of dendritic cells overexpressing a mutated i{kappa} b{alpha}. J Immunol 2007; 178(3): 1301-1311

38. Reid CD, Stackpoole A, Tikerpae J. Tnf and gm-csf dependent growth of an early progenitor of dendritic langerhans cells in human bone marrow. Adv Exp Med Biol 1993; 329: 257-262

39. Xu RL, Tang Y, Ogburn PL, Malinowski K, Madajewicz S, Santiago-Schwarz F, Fan Q. Implication of delayed tnf-alpha exposure on dendritic cell maturation and expansion from cryopreserved cord blood cd34+ hematopoietic progenitors. J Immunol Methods 2004; 293(1-2): 169-182

40. De Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. J Immunol 1998; 160(4): 1666-1676