

چکیده:

زمینه وهدف: نقش سلولهای دندرتیک در هدایت پاسخ های ایمنی باعث شده تا از این سلول ها در درمان انواع بیماریها از جمله بیما ری های خود ایمن کمک گرفته شود.بیماری MS از جملۀ بیماری های خود ایمن بوده که به علت حملۀ سلول های TH1 و TH17خود واکنشگر به پروتین بازی میلین(MBP) ایجاد می شود . در مطالعه حاضر، تأثیر هیستامین بر سلول های دندرتیک پالس شده با MBP بر سلول های T اتولوگ در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته است.

.روش بررسی:بخشی از سلول های تک هسته ای خون محیطی که به پلاستیک می چسبنددر حضور GM-CSF و IL-4 به مدت پنج روز ؛چهارروزهمراه با پپتید MBPاوسه روز با هیستامین+عامل بلوغ MCM درگروه تیمار ودر گروه کنترل فقط MCM کشت گردید.در روز هفتم میزان بیان شاخص های CD14 ، CD83 ، HLA-DR در DC سنجیده شد و مقادیر سایتوکاین های IL-10 و IL-12 در کشت DC و سایتوکاین های IL-4 و IFN-ᵞ در کشت توامان DC و سلول T اتولوگ آن بدست آمد و میزان تکثیر لنفوسیت های T در مجاورت با سلول های دندرتیک گروه کنترل وتیماربا روش MTT مقایسه گردید..یافته ها: بیان CD83 و HLA-DR نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد،(.(P≤0/05 بیان CD14 کاهش را نشان می دهد .ترشح IL-10 افزایش و IL-12 کاهش را نشان داد.نسبت IL-4/IFN-ᵞ نسبت به گروه کنترل افزایش را نشان می دهد.نتیجه گیری: هیستامین با انحراف پاسخ های ایمنی از سمت TH1/TH17 به سمت TH2 در مدل آزمایشگاهی MS می تواند به عنوان یک روش نوین در ساخت واکسن های با پایه DC در درمان این بیماری در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی:اسکلروز متعدد، پروتئین بازی میلین، هیستامین.

Abstract:

Background: The key role of denderitic cells in skewing of immune responses causes that

 DC-based Vaccines have been used as a alternative treatment in diseases; including

autoimmune Ones. Multiple sclerosis (MS) is a autoimmune diseases which is triggered by

attacking of Auto reactive TH1/TH17 to Myelin Basic Protein( MBP).This study was carried out to evaluate the effects of Histamin on Polarization of autologous T cells in Co-culture with MBP-pulsed DCs.

Methodes: Plastic adherent monocytes were cultured with granulocyte-macrophage

colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) for five days , three days

withMBP as a antigen and two days with monocyte-conditioned medium (MCM) + Histamin in treatment group vs only MCM in control one.. Phenotypic and functional analyses were carried out using anti-CD14, anti-HLA-DR, anti-CD83monoclonal antibodies. Phagocytic activity, cytokine production were also evaluated. T cells were tested for proliferation by MTT test.

Results: The expression of CD83 andHLA-DR as Maturation markers of DC increased

Significantly(P> 0/05). The expression of CD14 was unchanged. The production of IL-10 increased significantly, Whereas IL-12 decreased. The amount of IL-17 was undetectable . The relative of IL-4/IFN-ᵞ as a index of polarization TH0 towared TH2 increased (p> 0/05). Histamin could skew TH1/TH17 toward TH2 in laboratory model of MS and could be considered as a novel approaches in making of DC-based Vaccine to tackle Of MS.

Key words:Multiple Scelerosis, Myelin Basic Protein, Denderitic cells.

مقدمه

اسکلروز متعدد (MS) یک التهاب مزمن سیستم اعصاب مرکزی درانسان بوده؛که به طور عمده نوجوانان بالغ را مبتلا می سازد.1

.باتوجه به بررسی مدل حیوانی این بیماری که به صورت تجربی در موش ایجاد می شود. به شواهد محکمی دال برخود ایمن بودن بیماری دست یافته اند.واجزاءپروتیینی غشاء میلین هدف مناسبی برای حمله سلولهای خود واکنشگر T یاریگر می باشد،که از جمله آن میتوان به پروتين بازی میلین اشاره کرد.2 .درگذشته عقیده بر این بود که نقش اصلی در پاتوژنز این بیماری فقط بر عهده رده سلولهای Tکمکی نوع 1 (TH1)می باشد حال انکه مشخص شده است که علاوه بر ان رده سلولی که از توانایی بالایی در پیشبرد بیماری برخوردار می باشند، پاتوژنز بیماری حاصل برایند فعالیت رده های سلولی TH1وTH17از یک سو وفعالیت تنظیمی Tregازسمت دیگر می باشد به نحویکه در بیماران مبتلا بهMSفعالیت سلولهایTregکاهش میابد.3و4

باتوجه به روند روبه رشد بیماری بخصوص درکشورمان تلاشهای زیادی در جهت درمان بیماری صورت گرفته است واز جمله راهکارهای درمانی پیشنهاد شده، ایمنوتراپی می باشد وبادر نظر گرفتن توان بالای سلولهای دندرتیک چه در شروع پاسخهای ایمنی اکتسابی ویا در القای تحمل ایمنی؛ از این سلولها در این زمینه کمک گرفته اند.به نحویکه امروزه ساخت واکسنها بر مبنای تولید سلولهای دندرتیک کارآمد از سلولهای پیش ساز آن از یک فرد در محیط کشت و تزریق مجدد ان به همان فرد وهدایت پاسخهای ایمنی به سمت مطلوب در موارد متعددی از جمله در ایدز؛سرطانها وبیماریهای خود ایمن در کانون توجه مراکز تحقیقاتی مبباشد5.در بیماری MS انحراف پاسخهای ایمنی از سمت TH1وهدایت آن به سمت TH2ازیک طرف وافزایش فعالیت سلولهای Tتنظیمی[[1]](#footnote-2) ازطرف دیگر مد نظر میباشد با سه روش می توان با مداخله در محیط کشت سلولهای دندرتیک به تولید سلولهای دندرتیک القاء کنندة تحمل ایمنی (TDC)[[2]](#footnote-3)پرداخت:1-از طریق میانجیهای فیزیولوژیک 2-مواد دارویی 3-مهندسی ژنتیک5.

هیستامین از جملة موادی است که به طور فعال در سلولهای بازوفیل وماست سل در بدن توسط انزیم هیستدین دکربوکسیلاز ساخته وذخیره میشود از سلولهای دیگری که هیستامین در انها ساخته میشود می توان به نوتروفیلها ؛ماکروفاژها ؛لنفوسیتهای Tوسلولهای دندرتیک اشاره کرد.اعمال زیستی گوناگونی را به هیستامین نسبت می دهند وآن هم به علت تنوع در گیرنده های این ماده در سطح سلولها وراههای داخلی فعال سازی متفاوت در این گیرنده ها می باشد6و7.

ما در این مطالعه به بررسی اثر هیستامین بر بلوغ و فعال سازی سلولهای دندرتیک تحریک شده با پروتین بازی میلین [[3]](#footnote-4)وهدایت پاسخهای ایمنی سلولهای TCD4+بکر که در مجاورت با این سلولهای دندرتیک کشت داده شده اند پر داخته ایم.

روش بررسی :

این مطالعه به صورت تجربی – آزمایشگاهی در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه از اردیبهشت تا آذر1390انجام شد.تمام مراحل انجام آزمایش زیر هود لامینارانجام گرفت. ابتدا سلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMC) از نمونه خون افراد داوطلب( 5 نفر)استخراج گردید؛ برای این منظور مقدارcc50 خون هپارینه(U/ml 200)با50میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640رقیق گردید.سپس خون رقیق شده به آرامی بروی فایکولی که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت ومجموعه خون رقیق شده وفایکول با سرعت g800 به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ گردید.سلولهای تک هسته ای خون محیطی که در حد فاصل فابکول وخون رقیق شده جمع شده بودند به آرامی جمع آوری گردید وPBMCبدست امده به منظور حذف فایکول همراه آن با محیط کشت RPMI-1640مخلوط وباسرعت g450به مدت 10دقیفه سانتریفوژ گردید.سلولهای حاصل مجدد بامحیط کشت با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط واین بار به منظور حذف پلاکتها PBMCباسرعت g200به مدت 10دقیقه سانتریفوژ گردید وتعداد ومیزان زنده بودن سلولهای تک هسته ای خون محیطی بدست آمده با استفاده از تریپان بلو تعیین گردید8.

سلولهای PBMCبه تعداد 106×4 در هر میلی لیتر خون وبه مقدار 5میلی لیتر در هر فلاسک کشت T25در محیط کشت

RPMI-1640حاوی پنی سیلینU/ml100؛استرمتومایسین g/ml100وFBS10%به مدت 2ساعت در شرایط دمای 37

درجه سانتیگراد؛ CO25 %ورطوبت 90%انکوبه گردید.بعد از اتمام زمان انکوباسیون؛ سلولهایی که به فلاسک نچسبیده

بودند؛ با دو بار شستشوی آرام جداشده واز فلاسک خارج گردیدند و به سلولهی جدید که اکثریت انها را مونوسیتها تشکیل میدادند؛ به محیط کشت جدید GM-CSFبه میزان U/ml1000بعلاوه IL-4به میزانU/ml500اضافه وبه مدت 7روز کشت داده شد و در روز سوم مجدد مقادیر مشابهی از GM-CSFوIL-4 به فلاسکهای حاوی سلول اضافه شد.در روز چهارم به محیط کشتcc 500 عامل بلوغMCM به گروه کنترل وMCMبعلاوه هیستامین (µM)10به گروهای تیمار اضافه گردید.در روز پنجم آزمایش پپتیدAnaSpec co-USA) MBP (به میزان Mµ10به محیط کشت اضافه شد. در روز هفتم سلولهای دندرتیک برداشت شدند واز نظر مر فولوژی؛ فنوتیپ و قدرت تحریک تکثیرلنفوسیتهایTومیزان ترشح سایتوکاینهای IL-10و IL-12به وسیله کیت الایزا(PerProtech co-USA)مورد سنجش قرار گرفتند؛ در حین مراحل انجام آزمایش فنوتیپ سلولهای دندرتیک تولید شده از لحاظ بیان مولکولهای CD83، HLA-DR، CD14با استفاده از انتی بادیهای ضد نشان گرهای سطحی(DAKOCO,Denmarkا) دستگاه فلوسایتومتری FACScalibor (Becton- Dickinson.USA )سنجش ونتایج حاصل با نرم افزار CellQuestآنالیز شد..توانایی فاگوسیتوز سلولهای دندرتیک تولید شده با استفاده از بید لاتکس فلورسانت کونژوکه با FITC)(Sigma CO .,USA)ودستگاه فلوسایتومتری در روز هفتم آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفت.

**بررسی میزان تکثیر لنفوسیت های T بوسیله دندریتیک با روش MTT**: پس از برداشت سلول های دندریتیک، سوسپانسون سلولی 105×1 از سلول های دندریتیک گروه کنترل و گروه تیمار تهیه و به نسبت10/1 از آن با لنفوسیت هایT در پلیت 96 خانه ای ته تخت مجاورسازی شد این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. همچنین از محیط کشتRPMI 1640 به عنوان بلانک در سه چاهک پلیت 96 خانه ای قرار داده شد. برای هر گروه کنترل و تیمار سه تکرار گذاشته شد. بعد از 72 ساعت انکوبه در اکوباتور حاوی 5% CO2 به هر یک از چاهک ها 25 میکرولیتر از محلول ${mg}/{ml}$5 MTT (3-4،5 –دی میتیل تیازول 2-ایل 2،5 دی فنیل تترازولیوم بروماید) در PBS افزوده شد ویه مدت 4 ساعت دیگر در شرایط مشابه انکوبه شد تا در این مدت سلول های زنده و در حال تکثیر با ماده MTT تشکیل فوزمازون دادند و با افزودن 100 میکرو لیتر DMSO به حالت محاول در آمدند. سپس میزان شدت رنگ در طول موج nm490 تعین وشاخص تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید.

*100×*$\frac{ODبلانک-OD تیمارگروه }{ODبلانک-OD کنترل گروه }$

توانایی فاگوسیتوز سلول های دندرتیک تولید شده بااستفاده از بید لاتکس فلورسنت کونژوکه با FITC (Sigma Co,USA) ودستگاه فلوسایتومتری در دو حالت نابالغ (روزپنجم) و حالت بالغ (روز هفتم) مورد ارزیابی قرار گرفت.

این توانایی به صورت میزان درصد فاگسیتوز سلول های دندرتیک وبا استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:



میزان ترشح IL-4 وIFNᵧ توسط لنفوسیت های Tکه با سلولهای دندرتیک تحریک شده اند به کمک کیت الایزا سنجش شد.

در این تحقیق؛در گروه کنترل تولید سلولهای دندریتیک بدون استفاده از هیستامین (به عنوان عامل بلوغ ) وفقط در حضور MCMانجام پذیرفت ودر گروههای تیمار تولید سلولهای دندرتیک در حضور هیستامین وMCMانجام گرفت ونتایج با برنامهspss ویراست 17بررسی شد. وتمامی داده ها به صورتSEM ±Mean بیان شدوبرای مقایسه نتایج فتوتیپ از آزمون Student’s t-test استفاده شدو.به منظور مقایسه تفاوتهای بین گروهی ؛ از آزمون One Way ANOVA سس کمک گرفته شد.در تمامی داده ها P<0/05 معنی دار در نظر گرفته شد.نتایج تست الایزا نیز با نرم افزارCUREPERT 0/7. آنالیزشد.

یا فته ها:

با بررسی پنج نشان گر در سطح سلولهای دندریتیک ؛ درصد بیان مولکول های CD14 ,CD83,,HLA-DRبا استفاده از دستگاه فلوسایتو متری مشخص گردید.که نتایج ان به صورت میانگین درصد بیان مولکول ها؛ در جدول 1 ارایه شده است. همان گونه که مشاهده می شود میزان بیان CD14 از مقدار 17/0 ±3/8 در گروه کنترل به مقدار 11/0 ±2/7 در گروه تیمار کاهش پیدا کرده ولی دارای اختلاق معنی داری نیست .ومیزان بیان مولکول CD83از64/0 ±3/15 در گروه کنترل به مقدار 57/0 ±3/24 در گروه تیمار افزایش یافته بود.میزان بیان شاخص بلوغ HLA-DR در گروه تیمار نیز به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود.(از میزان 66/3± 3 /26% در گروه کنترل به 07/3±38 در گروه تیمار با هیستامین افزایش یافته است ).میزان IL-10 وIL-12 ترشح شده از سلول های دندرتیک در روز هفتم کشت از طریق مایع رویی این سلول ها به وسیله الایزا مورد سنجش قرار گرفت که میانگین نتایج آن بر حسب ng/ml در نمودار 2 آورده شده است ومشاهده گردید که در مورد ترشح IL-12 ،در گروه تیمار کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد(p≤0/05).در ارتباط با ترشح IL-10 گروه تیمار افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد.میزان ترشح سایتوکاین IFN-ᵞ و IL-4 از لنفوسیت های T ، که توسط سلول های دندرتیک گروه کنترل وتیمار تحریک شده بودند،از طریق مایع رویی جمع آوری گردیده به وسیله کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت و میانگین نتایج آن ها بر حسب ng/ml در نمودار 1 نشان داده شده است. میزان ترشح سایتوکاین IL-17 در تمامی گروه ها کمتر ازng/ml 2 بود، وبین گروه ها تفاوت معنی داری وجود نداشت.(داده ها ارائه نشده است ).

قدرت بیگانه خواری سلول های دندرتیک نابالغ با استفاده ازروش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتری به دست آمده نشان داد که میانگین درصد سلول های دندرتیکی که بیگانه خواری انجام داده اند در مورد گروه کنترل در حالت نابالغ(روز پنجم)1/1 ±2/32% بوده است ودر حالت بالغ این مقداربه 08/0± 16/2% کاهش یافته است واین مقادیر باوجود P˂0/05 اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند. هم چنین در مورد گروه تیمار با هیستامین درصد سلول های دندرتیکی که بیگانه خواری انجام داده اند در حالت نابالغ 15/1± 2/30 % بوده است واین مقدار در حالت بالغ به 61/0±2/5% کاهش یافته است واین مقادیر باوجود P˂0/05 اختلاف معنی داری بایکدیگر دارند اما بین گروه کنترل وتیمار با هیستامین درهردوحالت بالغ ونابالغ از لحاظ آماری تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود.( نمودار3).

درکنار این تغییرات ، نتایج تست MTT حاکی از عدم تغییر در میزان تکثیر لنفوسیت های کشت داده شده درمجاورت سلول های دندرتیک گروه تیمار با هیستامین در قیاس با گروه کنترل می باشد( نمودار4). شاخص تحریک لنفوسیت هایT حاصل ازتست MTT در گروه تیمار با هیستامین1/0±37/1 بود که در مقایسه با گروه کنترل 05/0±41/1 تفاوت معنی داری مشاهده نشد.(8/0P=).

هم چنین مورفولوژی سلول های کشت داده شده به وسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگ نمای های مختلف بررسی شد

ومشاهده گردید که اندازۀ این سلول ها بزرگتر از مونوسیت های اولیه بوده وزوائد سیتوپلاسمی پیدا کرده بودند.

 با گذشت زمان روند کنده شدن سلول های چسبنده وبزرگ شدن اندازه های آن ها و افزایش تعداد زوائد

 سیتوپلاسمی ادامه یافت .

8- بحث

از زمانیکه Steinman وهمکارانش سلول های دندرتیک را برای اولین بار توصیف کردند تحقیقات گسترده ای در جهت شناخت ویژگیها وتوانمندیهای عملکردی این سلول ها صورت گرفته است ودر این رهگذر مشخص گردیده که سلول دندرتیک از سلول های ریشه ای CD34+ مغز استخوان منشأ گرفته وبه صورت سلول های نا بالغ به بافتهای مختلف مهاجرت ودر آنها مستقر می شوند. آنها بعد از دریافت آنتی ژن وعوامل پیش التهابی ضمن اینکه فرایند بلوغ را آغاز می کنند مهاجرت به گره لنفاوی را نیز شروع وتا رسیدن به این محل به سلول های دندرتیک بالغ با زوائد سیتوپلاسمی فراوان وبیان بالای مولکول MHCI,II ومولکول های هم تحریکی CD80،CD86 تبدیل وتوانایی تحریک لنفوسیت های T دست نخورده را پیدا می کنند 9. اخیرا سلول های دندرتیک بدلیل مجموعه ی وسیعی از کاربردهای بالقوه در زمینۀ تقویت پاسخ های ایمنی ویا کنترل آن ها ،نظر محققین مختلف را به خود جلب نموده است.شناخت روش های جدا سازی ،تولید والقای بلوغ در این سلول ها در in-vitro،نه تنها کاربردهای زیادی در زمینه ایمنی در مانی انواع مختلف بیماریها از جمله بیماریهای عفونی، سرطانها واختلالات سیستم ایمنی همچون بیماریهایخود ایمن دارد، بلکه امکان درک بیشتر مکانیسم های حاکم برسیستم ایمنی در in-vitvoرا نیز فراهم می آورد.بنابراین شناسایی عوامل ناشناخته ی القاء کننده ی بلوغ نه تنها در گسترش فهم ما از بیولوژی این سلول ها درIn-vivo مفید می باشد ، بلکه در روش های ایمونوتراپی به عنوان ابزاری یرای القای بلوغ در DC نا بالغ تیمارشده با پپتید مهم است10. بررسی مورفولوژی DC تولید شده نشان داد که 80 تا 90 درصد سلول های دندرتیک تولید شده در شرایط In-vitro در روز هفتم کشت وقبل از برداشت ، آزاد وبه صورت مجموعه های به هم چسبیده ی شناوردر آمده بودند که از این تعداد اکثریت آن ها سلول های همگون بزرگ با زوائد دندرتیک زیاد ومشخص وهسته ی بزرگ واقع در خارج مرکز بود.

بررسی فنوتیپ سطحی در روز هفتم وبعد از برداشت DC انجام گرفت، نشان داد که میزان بیان شاخص CD14 در گروه هیستامین نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است.آنتی ژن CD83 بر سطح سلول ها مشاهده شدCD83 به عنوان نشانه ی بلوغ سلول های دندرتیک شناخته می شود ( فقط در سلول های دندرتیک انسانی ظاهر می شود).

این شاخص درگروه تیمارشده با هیستامین (اگر چه به صورت جزئی ) به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود. شاخص بلوغ HLA-DR در سلول های دندرتیک تیمار شده با هیستامین افزایش معنی داری را نشان داد.

میزان ترشح IL-12 در گروه تیمار شده با هیستامین کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد، در عوض میزان سایتوکاین IL-10 در گروه تیمار با هیستامین افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد.

میزان ترشح IL-4در مایع روئی کشت توأمان سلول های DC وT اتولوگ آن در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل

افزایش معنی داری را نشان می دهد . میزان ترشح IFNᵞ در آن مایع نیز در گروه تیمارنسبت به گروه کنترل کاهش را نشان می دهد. در مورد میزان توانایی فاگوسیتوز سلول های ندرتیک بین گروه کنترل و تیمار تفاوت معنی داری مشاهده نشد.دررابطه با شاخص تحریک سلول های T اتولوگ حاصل از تست MTT نیز تفاوت معنی داری بین گروه های تیماروکنترل مشاهده نگردید.

Mazzoni وهمکاران در سال 2001 در مقاله ای به بررسی اثر هیستامین بر نحوه عملکرد وپلاریزاسیون سلول های دندرتیک پرداختند واشاره کردند که هیستامین از طریق تغییر در پروفایل سایتوکاین های مترشحه (افزایش IL-10 وکاهش IL-12 )از DC باعث تغییر در ظرفیت پلاریزان سلول های T بکر+ CD4توسط این سلول ها از Th1 به سمت Th2 می شود البته این کار را به کمک یک فاکتور بلوغ DC همانند LPSانجام می دهد.همچنین در این تحقیق مشخص شد که هیستامین اثری بر فنوتیپ وخصوصیات عملکردی )همانند تحریک تکثیر لنفوسیت های Tبکر) سلول های دندرتیک ندارد 11.

Caron وهمکاران در سال 2001 در تحقیقی دیگر مشخص کردند که هیستامین با اثر بر دو گیرنده هیستامین H1R و

H2R سلول دندرتیک باعث کاهش ترشح IL-12 حتی در حضور IFNᵞ (عامل قوی هدایت کنندۀ پاسخهای لنفوسیت های T بکر به سمت Th1) می شود ، واز این طریق باعث هدایت پاسخ ها به سمت Th2 می شود12.

Amaral و همکاران در سال 2007 نشان دادند که هیستامین باعث افزایش ترشح IL-10 وکاهش ترشح IL-12 ازسلول های دندرتیک در محیط کشت از طریق اثر بر گیرنده های H1R و H4R در سطح این سلول ها می شود.13

.Lapilla وهمکاران در سال 2011 در تحقیقی مشخص کردند که هیستامین با اثر برروی گیرنده های H1R وH2R سلول های T خود واکنشگر برعلیه میلین در محیط in vitro باعث مهار تکثیر ودر نتیجه ایجاد انرژی در این سلول ها می شود14.

Katoh وهمکاران نشان دادند که هیستامین باعث افزایش قابل ملاحظه مولکول های MHC کلاس 2 (HLA-DR)

در فنوتیپ سلول های DC در روز ششم کشت این سلول ها در محیط کشت می شود ، از طرف دیگر این ماده باعث تولید

سلول های دندرتیک مشتق از مونوسیتی می شود که CD14 رابیان می کنند، اما در میزان بیان CD83 نسبت به گروه کنترل تغییری حاصل نمی شود15.

Mahony وهمکاران در سال 2011 در مقاله ای به بررسی تعداد وتنوع گیرنده های هیستامین بر سطح سلول های

سیستم ایمنی پرداخته واشاره می کنند که به دلیل تنوع در تعداد و مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی این گیرنده ها

در سطح سلول های سیستم ایمنی از جمله سلول دندرتیک ، پاسخ این سلول ها به تحریکات حاصل از هیستامین نیز

متنوع می باشد16 .

Geng وهمکاران در سال 2011 نشان دادند که هیستامین با اثر بردو نوع گیرنده خود H1R وH4R در سطح سلول های

دندرتیک باعث پلاریزاسیون پاسخ لنفوسیت های T به سمت Th2 در آزمون MLR بااین سلول ها می شود وهمچنین

اشاره داشتند که این اثر به همراه افزایش ترشح سایتوکاین IL-10 وکاهش IL-12 از DCs ، ناشی از افزایش غلظت

کلسیم داخل سلولی ( آزاد شده از کلسیم ذخیره شده در داخل سلول) می باشد17 .

Taylor وهمکاران در سال 2005 در مقاله ای به نقش IL-10 به عنوان یکی از مکانیسم های سرکوب کننده سیستم ایمنی در واکنشهای التهابی و خود ایمن پرداخته ومی افزاید این اثر از طریق مهار فسفوریلاسیون تیروزین CD28 ودر نتیجه انسداد انتقال پیام از طریق این شاخص اعمال می شود. سایر مکانیسم های سرکوب کنندۀ سیستم ایمنی عبارتند از سایتوکاین TGF-β و مولکول های سطحی متنوعی از قبیل CTLA4 وPD-1 می باشد18.

به نظر می رسد که هیستامین به طور قابل توجهی سبب تغییر پروفایل سایتوکاین های مترشحه از سلول های دندرتیک پالس شده با MBP (به عنوان مدل آزمایشگاهی بیماری MS) از IL-12 به سمت IL-10 شده وکشت آنها در مجاورت با سلول های T بکراتولوگ زمینه را جهت هدایت پاسخ این سلول ها به سمت TH2 فراهم آورده وباعث کاهش ترشح سایتوکاین پیش التهابی IFNᵞ (منتج ازTH1)وافزایش IL-4 می شود.به عبارت بهتر باعث افزایش نسبت IL-4/IFN-ˠ در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل شده است، که این خود می تواندبه کاهش آسیب های حاصل از حمله سلول های خود واکنشگرTH1به سیستم عصبی منجرشده ومانع از وخیم تر شدن بیماری گردد.مقادیر ناچیز IL-17 یافت شده در این مطالعه ممکن است به علت فقدان عوامل لازم جهت القاء TH17 و ترشح سایتوکاین منتج از آن در محیط کشت فراهم شده باشد.

نتیجه گیری و پیشنهادات :

در رابطه با تیمار حاوی هیستامین آنچه بیش از همه مورد توجه قرار گرفت تغییر در پروفایل سایتوکاین های

مترشحه از سلول های دندرتیک می باشد که باعث افزایش IL-10 و کاهش IL-12 شده است وتغییرات در فنوتیپ

سلول های دندرتیک اگر چه نسبت به گروه کنترل معنی دار بود، ولی این تغییرات از شدت کمتری نسبت به تغییر درسایتوکاین های مترشحه برخوردار بود.به نظر می رسد هیستامین قادر به تغییر در سایر عملکردهای سلول دندرتیک پالس شده با MBP از قبیل قدرت تحریک سلول های T و قدرت فاگوسیتوزآن نمی باشد.تحقیقات در آینده می بایست بر تدوین یک روش آزمایشگاهی با استاندارد جهانی وکنترل دقیق کیفی بر تهیه سلول های دندرتیک به منظور تولید واکسن هایی با پایه سلول دندرتیک در جهت مقابله با انواع بیماریها از جمله بیماری های خود ایمن متمرکز گردد. بدیهی است بررسی عوارض احتمالی این واکسن ها با پایه سلول دندرتیک نیازمند آزمایشاتی در سطح In-vivo می باشد.

 جدول-1:میانگین درصد بیان مولکول های CD14 ،CD83 ،HLA-DR

 در سطح سلول های دندرتیک تولید شده در گروه کنترل و تیمار شده با هیستامین

|  |
| --- |
| CD14  CD83 HLA-DR |

|  |
| --- |
|  |

 گروه کنترل 15/1 ±3/8 64/0 ± 3 /15 66/3±3/26

 گروه تیمار با هیستامن 58/0±2/7 57/0 ± 5/24 07/3 ± 38

 P -Value 19/0 01./0\* 004/0\*

|  |
| --- |
| \* وجود اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل( 5./0>P )، آزمون آماری مورد استفاده در جدول Student’s t-test می باشد. |

نمودار2- میانگین میزان ترشح سایتوکین های IL-10 وIL-12 ازسلول های دندریتیک در حالت بالغ (\*نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح (p˂0.05) و \*\* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح(p˂0.005))

نمودار1- میانگین میزان ترشح سایتوکین های IL-4 و IFN-γ از لنفوسیت های T که توسط سلول های دندریتیک تحریک شده بودند(\*نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح (p˂0.05) و \*\* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح(p˂0.005))

نمودار3- میانگین درصد بیگانه خواری در سلول های دندریتیک گروه کنترل و تیمار در حالت نابالغ و بالغ (\* نشان دهنده اختلاف معنی داربین حالت بالغ ونابالغ در سطح (p˂0.05))

نمودار4- مقایسه تکثیر لنفوسیت های T در تحریک با سلول های دندریتیک در گروه کنترل و گروه تیمار با هیستامین807/ P=

تشکر وسپاسگذاری:

در پایان نگارندگان از آقای دکتر میثم ابطحی وخانم دکتر پروا پروین و کارشناسان محترم بخش ایمنولوژی و میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه آقایان حیدر ثانی،اصغر علیاری، علی کاظم نیا، سید عبدالمجید عزیزی کمال تقدیر و تشکر را دارند.این مطالعه قسمتی از پایان نامه دکتری تخصصی این جانب هادی محب علیان تحت عنوان پاسخ سلول­های T القاء شده با سلول­­­­های دندرتیک مجاور شده با پروتئین بازی میلین(MBP) و بالغ شده در حضور هیستامین، اینترفرون بتا(IFN-β) و 2و3 دی متوکسی 1و4 نفتوکینون (DMNQ) در شرایط آزمایشگاهی می باشد که با کمک پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام گرفته است.

شماره ثبت پروپوزال این پایان نامه2/8922374به مورخه 7/12/89 می باشد.

References:

1—Gredler V, Ebner S, Schanda K. , Forstner M,Berger T, Romani,et al.Impact of human myelin on the maturation and Function of human monocyte-derived denderitic cells. Clinical Imunology(2010);134:296-304.

2- Goverman J.Autoimmune T cell responses in the centeral nervous System. Nature Reviews Immunology (2009);3:292-407.

3- O’Connor R A,Taams L S,Anderton S M,Transitional mini-review Series on Th17 Cells:

CD4 T helper cells: functional plasticity and differential sensitivity to regulatory

T cell-mediated regulation. Clin Exp Immunol 2010;159(2):137-147.

4- Oukka M.Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. Ann Rheum Dis 2007;

66 Suppl 3:iii87-90.

5- Kalantari T,Kamali-Sarvestani K, Ciric B, K,arimi M.H,Kalantari M.; Faridar,A,et al. Generation of immunologic and toleorogenic cilinical-grade denderitic cells. Immuno Res(2011) ; 51: 153-160.

6- Lapilla M,Gallo B ,Martinello M, Procaccini C,Costanzan M, Musio,S,et al.

Histamine regulates auto reactive T cell activation and adhesiveness in inflamed brain microcirculation . Journal Leukocyte biology(2010);Doi:10.1189/jlb.0910486 .

7—Caron G,Denlneste Y, Roelandts E, Duez C, Bonnefoy J.Y, Pestel,at al.

Histamine polarizes human denderitic cells , The journal Of Immunology(2001); 167:3682-86.

8-Dalirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei P. Autologous

Denderitic cells loaded with apopetotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses

Against breast cancer in vitro.Cell Immunol 2009;257(1-2):23-31.

9- Lotz ,M.T.And Angus ,W.TDenderitic cell , Biology and clinical

Application(2001);2nd ed Academic Press,USA;2001;575-595.

10- GranucciF, Ferrero E, Foti M.Eeary events in denderitic cell maturation induced by LPS .J.Microbes Infect1999;1:1079- 84.

11- Mazzoni A, Young,H.A, Spitzer,J.H, Vistin A, SegalD.M.Histamine regulates cytokine production in maturing denderitic cells, resulting in Altered T cell polarization(2001).. J Cli Invest,108(12):1865-1873.

12- Caron G, Denlneste Y, Roelandts E, Duez C, Bonnefoy J.Y, Pestel,

J,et al. Histamine polarizes human denderitic cells , The journal of immunology2001; 167:3682-3686.

13- Amaral M.M,David C,Cebellos A,Salamone G,Canones C,Geffiner,J,et al..Histamin Improves Antigen uptake and cross-peresention by denderitic cells.J.Immunol 2007;179:3425-3433.

14- Lapilla M, Gallo,B, Martinello M, Procaccini C, Costanzan M, Musio S,et al.Histamine regulates auto reactive T cell activation and adhesiveness in inflamed brain microcirculation . Journal Leukocyte biology 2010) Doi:10.1189/jlb.0910486.

15- Katoh,N. Influence of histamine on monocyte-derived denderitic cells.

Mod.Asp.Immnuobiol2005;17:16-24.

16- Mahony L.O, Akdis M, Akdis C.A.Regulation of the immune response and inflammation by Histamine and histamine receptors. J Allergy Cun Immunology2011;128:1153-1162.

17- Geng S , Gao Y.D , sYang J, Zou J.J, Guo,W. Potentional role of store-operated Ca2+ entery in Th2 response induced by histamine in human monocyte-derived denderitic cells. International Immunpharmacology2011;12:358-367.

18- Taylor A, Verhagen J, Blaser K,Mubeccel A ,Akdis C.Mechanisms of immune suppression by Interlukin-10 and growth factor-B : The role of T regulatory cells . Immunology2006;117:433-442.

1. -1T regulatory [↑](#footnote-ref-2)
2. -2Tolerogenic Denderitic Cells [↑](#footnote-ref-3)
3. -3Myelin Basic Protein [↑](#footnote-ref-4)