

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.^{1,4}, 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 Molecular Biology Research Center, Iran Medical Science University

✉ *Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Immunology Department, Faculty 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 hematopoietic 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.^۱، زهیر محمدحسن، Ph.D.^{۱*}، سیدمحمد موذنی، Ph.D.^۱، جمشید حاجتی، Ph.D.^۲، سعید کاظمی آشتیانی، Ph.D.^۲، پریسا حیات، B.Sc.^۲

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، گروه ایمنولوژی
۳. پژوهشکده علوم سلولی و تاباروری 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 ایمنولوژی

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 ساینوکاینی IL-4، GM-CSF، SCF، Flt3L و استفاده شد. با این تفاوت که در گروه (+) TNF، به ترکیبات ساینوکاینی فوق میزان ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر TNF- α در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ اضافه شد، و در گروه (-) TNF، هیچ ترکیب دیگری به ساینوکاین‌های 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 و ۱۴، 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:** هم‌کشی 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- α سبب 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 آلوزن 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 هسته‌ای منجر به تولید سلول‌های دندریتیک هموزن 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 میلوئیدی 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 آرتрит روماتوئید افزایش می‌یابد، ارائه می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای، خون بندناف، سلول‌های دندریتیک، فاکتور آلفا نکروز دهنده تومور

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۱۴-۱۳۹

مقدمه

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:

سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cell: DC) سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن (Antigen Presenting Cell: APC) به منظور تحریک لنفوسیت‌های T باکره و تولید پاسخ‌های ایمنی

اثر افزایش TNF- α بر عملکرد سلول دندریتیک

سزارین به دست آمد. به طور خلاصه پس از زایمان و خروج جفت، مکان خون گیری توسط محلول بتادین/الکل تمیز و خون سیاهرگی توسط سر سوزن G118 و با استفاده از سرنگ های ۲۰ سی سی آغشته به ۳/۵ سی سی سیترات فسفات دکستروز آدنین (Citrate Phosphate Dextrose Adenine: CPDA)، بحث، ایران) به منظور ممانعت از لخته شدن خون جمع آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. سپس به منظور کاهش سلول های قرمز، هر نمونه به میزان ۱ به ۵ با اتیل استارچ (HAES 10%, Free Flex SM 711202) مخلوط گردید (۱ میلی لیتر از HAES ۱۰ درصد با ۵ میلی لیتر از خون). پلاسما غنی از لکوسیت پس از ۱ ساعت، جمع آوری و به روی لئودکس با گرادیان ۱۷۰۸-۱۷۰۷ گرم بر سانتی متر مربع (InnoTrain, H9L6114, Germany) منتقل شد (۱۷، ۱۸). سلول های 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 میلی مولار EDTA و درصد سرم جنین گاو (FCS, Gibco, Germany 16141-09) به میزان ۱۰ سلول در میلی لیتر محیط RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو رسانده شد. سلول های T از مخلوط سلولی به روش روزت (۱۹) جدا شدند. در انتها تعداد سلول ها با استفاده از لام نوبار و درصد سلول های زنده توسط تریان بلو (۴ درصد در PBS) محاسبه شد.

کشت سلول های تک هسته ای خون بندناف

میزان 1×10^6 سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه ای (TPP, Germany) و در ۲ میلی لیتر RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FCS، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استریو مایسین (15070-063, Gibco, Germany) ۲ میلی متر ال گلو تامین (250c-024, Gibco, Germany) به مدت ۱۴ روز کشت شدند. ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر از سیتوکاین های (308-FK) Fit3L و لیگاند C-Kit یا (255-SC, R&D, USA)، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر GM-CSF (215-GM, R&D, GM-CSF USA) و ۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر 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 سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند (۲۰). محیط کشت هر هفته توسط تخلیه نیمی از محیط کشت تعویض شد. در روز ۱۴ محیط سلول ها به طور کامل تعویض و محیط کشت کامل به همراه سیتوکاین های Fit3L (۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر) GM-CSF (۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر)، IL-4 (۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر) و ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر 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 سلول ها اضافه شدند و کشت به مدت ۴ روز دیگر ادامه یافت (شکل ۱).

افزایش TNF- α

سلول ها بر اساس زمان افزایش فاکتور آلفا نکروز دهنده توموری به

۱. تمایز از منوسیت های 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 سلول های پیش ساز خون ساز $CD34^+$ توسط کشت در محیط GM-CSF و TNF- α و تولید سلول های دندریتیک (۴-۶).

از میان همه سیتوکاین هایی که در تولید سلول های دندریتیک از منابع مختلف سلولی نقش دارند، TNF- α و GM-CSF نقش حیاتی و مهمی در تکوین DC از پیش سازهای خونی (۷)، سلول دندریتیک فولیکولی (FDC) (۸) و تمایز نهایی سلول های دندریتیک مشتق از منوسیت ها (۷) به عهده دارند. TNF- α به عنوان محرک پاسخ ایمنی شناخته شده است و در پاسخ به التهاب، ورود پاتوژن ها، تحریکات فیزیولوژیک، شیمیایی و بیولوژیک از سلول های منوسیت/ماکروفاژ آزاد می شود (۹). در مطالعاتی که بر روی سلول های $CD34^+$ با هدف تمایز به سلول های دندریتیک صورت گرفته است، TNF- α در ابتدای کشت اضافه و در نهایت جمعیت هتروژنی از سلول های دندریتیک حاصل می شود (۹-۱۱). در مطالعه ای که زنگ بر روی سلول های منوسیت مشتق از خون بندناف انجام داد به مقایسه افزایش اولیه و تاخیری TNF- α هنگام تمایز این سلول ها به DC پرداخت و نشان داد DC های تولید شده در حضور TNF- α توانایی بیشتری برای تکثیر سلول های T آلرژن 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 سلول های $CD34^+$ می شود (۱۳، ۱۴). با این وجود مطالعه ای در زمینه اثر زمان افزایش TNF- α به کشت هم زمان سلول های منوسیتی و سلول های بنیادی خون ساز وجود ندارد. این مطالعه در جهت بررسی اثر افزایش اولیه TNF- α به سلول های تک هسته ای خون بندناف به منظور تولید DC صورت گرفت. از آنجا که شاخص های CD80، CD83 و CD86 برای فعال سازی لئوسیت های T توسط سلول های دندریتیک ضروری هستند (۱۵، ۱۶)، این شاخص ها به همراه c11CD و a1CD برای بررسی و ارزیابی سطح بلوغ DC مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم چنین میزان بیان شاخص های میلویدی (CD34 و CD14) به منظور ارزیابی سلول های تمایز نیافته و یا نیمه تمایز یافته مورد مطالعه قرار گرفت. در نهایت از آنجا که در این مطالعه از سلول های خالص شده که نیازمند مراحل خالص سازی پرهزینه و زمان بر است استفاده نشده، اثر هم کشتی سلول های منوسیتی و سلول های بنیادی/پیش سازهای خونی در تولید و بلوغ DC نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

جمع آوری خون بندناف و جداسازی سلول های 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

چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل اضافه شد. سپس به آنها 1×10^6 سلول دندریتیک غیرفعال (سلول محرک) در سه تکرار اضافه شد. به این ترتیب نسبت محرک به پاسخ دهنده $1:10$ است. پس از ۵ روز کشت، به مجموعه سلولی فوق میزان 50 میکروکوری از تیمیدین رادیواکتیو (Amersham, Sweden) به هر چاهک اضافه و ۱۸ ساعت بعد سلول‌ها توسط هاروست کننده سلولی (A31CN Flow co, USA) به روی فیلترهای مخصوص منتقل و میزان برداشت تیمیدین رادیواکتیو توسط دستگاه شمارش گر β (Wallach pharmacia, Sweden) اندازه گیری شد.

سنجش سینتوکاین‌های 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 (eBioscience, USA) (7929-88) و IL-10 (eBioscience, USA) (88-7106) مطابق با دستور کارخانه استفاده شد. سوپ کشت سلولی در انتهای MLR و یا در انتهای کشت DC جمع آوری و در دمای 70°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (حداقل یک ماه).

آنالیز آماری

اکثر آزمایش‌ها حداقل در ۳ تکرار انجام شد. از تست کلوامپلر و 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 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تست توکی برای مقایسه دو گروه مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد و اختلاف $p < 0.05$ معنی‌دار گزارش شد.

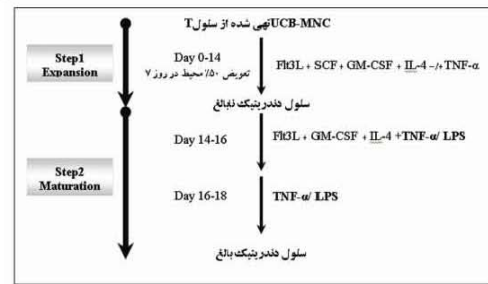
یافته‌ها

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 $48/25 \pm 7/67$ میلی‌لیتر خون بندناف، میزان $10^6 \times (172/9 \pm 80/88)$ سلول تک هسته حاصل شد و میزان $10^6 \times (79/52 \pm 34/89)$ 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، ۱۴ و ۱۸ نشان داد که افزایش اولیه ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر (TNF α) سبب افزایش تکثیر سلول‌های اولیه خون‌ساز و حفظ بقای سلول‌های پیش‌سازی در کشت‌های کوتاه مدت (هفته اول) می‌شود ($p=0/03$)، به طوری که تعداد سلول‌ها در گروه TNF(+) طی ۷ روز ابتدایی $1/3 \pm 6/1$ برابر و در گروه TNF(-) تعداد سلول‌ها $4/1 \pm 3/1$ برابر نسبت به روز آغازین کشت افزایش یافت (جدول ۱).

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 کوئزوجه با فلوروسین ایزوتیوسیانات (FITC) و فیکواریترین (PE) ضد شاخص‌های (FITC-NA1/34, PE-TUK4, CD14, (FITC-KB90)CD11c, F7141)CD1a (Ro864) شرکت R&D (USA)، (FITC, MCA 1582F) شرکت Serotec (HLADR(FITC-EDVL, AHVO 188)، (USA) Biosource (FITC, 130-081-001) CD34 و شرکت MACS (Germany) استفاده شد. از آنتی‌بادی‌های (IgG1-FITC(X0927) و IgG1-PE(X0928) 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 رنگ آمیزی 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 $10^4/10^5$ 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 میلی‌لیتر میتوماکسین C- (MA287, Sigma, USA) غیرفعال شدند. لئوسیت‌های 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

اثر افزایش TNF- α بر عملکرد سلول دندریتیکی

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 ۱۲ روز در حضور ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر از TNF- α کشت شدند و سپس در روز ۱۴ به مدت ۲ روز دیگر توسط دو دوز از ۱۰
نانوگرم بر میلی‌لیتر از TNF- α بالغ شدند. در گروه TNF(-) سلول‌ها به مدت ۱۲ 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 \pm SD نشان داده شده‌اند.

Isolation Step	Expansion Step									
	روز ۰		روز ۷		روز ۱۰		روز ۱۲		روز ۱۸	
UCB Volume (ml)	۲۸/۱ \pm ۷/۶		TNF- TNF+		TNF- TNF+		TNF- TNF+		TNF- TNF+	
MNC Count (10 ⁶)	۱۷۷/۹ \pm ۸۰/۸		۰/۶ \pm ۰/۱		۱/۹ \pm ۰/۶		۳/۸ \pm ۰/۶		۵/۸ \pm ۲/۲	
MNC Viability (%)	۹۳/۹۱ \pm ۸/۶		۳/۱ \pm ۱/۲		۶/۱ \pm ۱/۳		۲/۹ \pm ۰/۷		۲/۸ \pm ۰/۲	

بررسی فنوتیپی توسط فلوسیتومتری در هر دو گروه نشان داد که در این زمان شاخص‌های CD80, CD83, CD86 نسبت به روز آغازین کشت از بیان پایینی در هر دو گروه برخوردار بودند و اختلاف معنی‌داری نیز بین گروه‌ها مشاهده نشد ($p > 0.08$). مقایسه میزان سلول‌های CD14⁺ و CD34⁺ در گروه TNF(+)
نسبت به TNF(-) افزایش معنی‌داری نداشت، (۱۴/۱۵ \pm ۵/۱۴ درصد سلول CD14⁺ و ۱۶/۱/۱۱ \pm ۵۵/۴ درصد سلول CD34⁺ در مقایسه با ۳/۶ \pm ۸/۹ درصد و ۶/۶ \pm ۱۵/۶ درصد در روز ۱۴، (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(+)
پیش از گروه TNF(-) بود. سلول‌های مشابه منوسیت‌های خون محیطی و نیز شبه DC در گروه TNF(+)
نیز از تعداد بیشتری برخوردار بود (شکل ۳b, ۳c). در این زمان میزان سلول‌های CD11c⁺ و CD1a⁺ در هر دو گروه افزایش و سلول‌های CD34⁺ کاهش یافت ($p < 0.01$ و $p < 0.02$). کاهش سلول‌های CD34⁺ در گروه TNF(+)
پیش از گروه TNF(-) بود (۳/۳ \pm ۵/۰۳ درصد در مقایسه با ۲۳/۱۳ \pm ۸/۲۶ درصد) ($p = 0.04$). از سوی دیگر میزان سلول‌های CD14⁺ نیز در این زمان در گروه TNF(+)
نسبت به گروه TNF(-) افزایش قابل توجهی یافت (۱۶/۱/۱۱ \pm ۴۷/۳ درصد در مقایسه با ۱۳/۹۷ \pm ۸/۶۴ درصد) ($p < 0.03$ ، شکل ۳a و ۳b). 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 \pm ۱۹/۶ درصد در مقایسه با ۶/۲ \pm ۴/۲ درصد) ($p < 0.04$ ، شکل ۳b و ۳c). بیان کم شاخص‌های بلوغ CD (CD80, CD86, CD38) در روز ۱۴ بیانگر عدم تکوین بلوغ DC در هر دو گروه بود، هر چند که افزایش بیان CD1a⁺ و CD11c⁺ شاهدی بر تکوین DC نابالغ بود (شکل ۳b و ۳c). 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

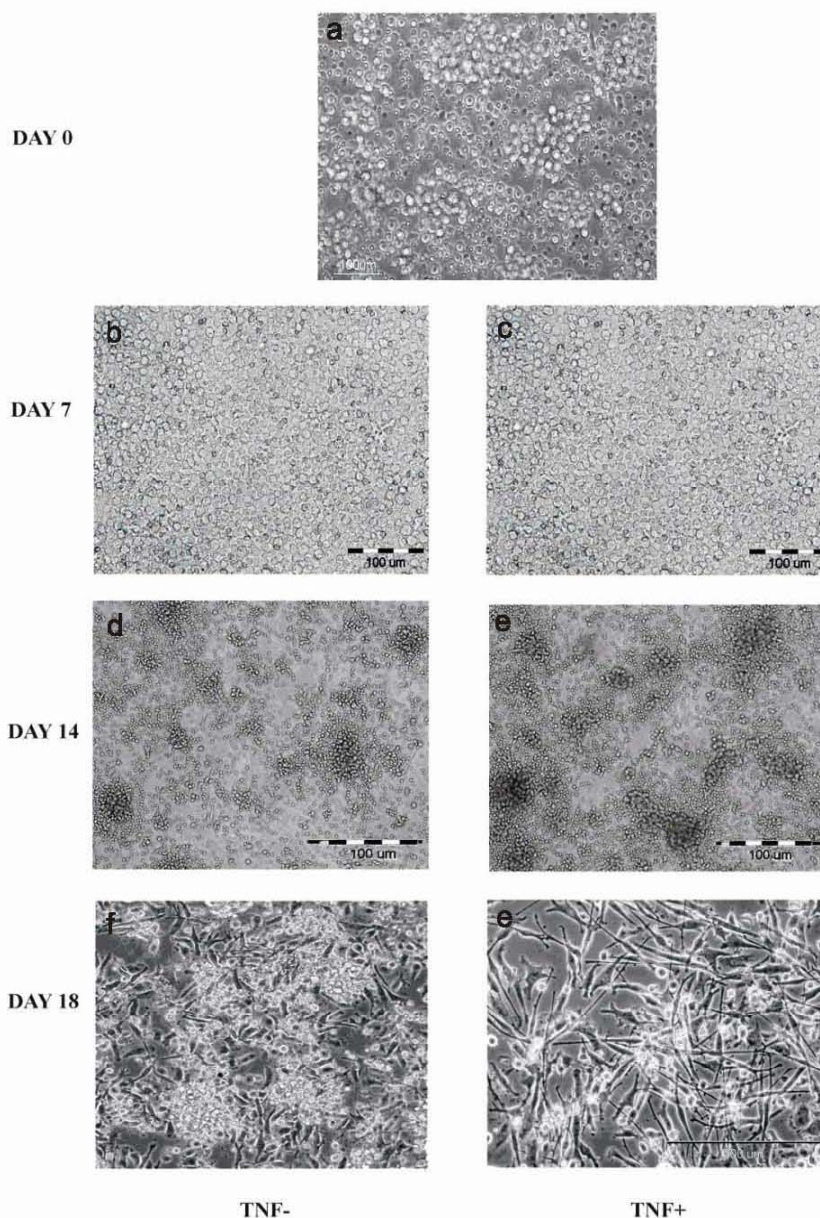
افزایش زمان کشت به ۱۴ روز سبب کاهش تعداد سلول‌ها در گروه TNF(+)
شد. به این ترتیب طی ۱۴ روز کشت در حضور TNF تعداد سلول‌ها ۳۰/۷ \pm ۲۴/۵۹ درصد کاهش و در غیاب TNF، ۱۷/۴۵ درصد افزایش یافت. ماکزیمم افزایش تعداد سلول‌ها در گروه TNF(+)
در روز ۷ و در گروه TNF(-) در روز ۱۴ مشاهده گردید (جدول ۱). القای بلوغ در هر دو گروه توسط TNF- α در روز ۱۸ کشت سبب تولید ۱۰^۶ ۱۲/۲۵ \pm ۶/۱۲ سلول بالغ در گروه TNF(+)
و ۱۰^۶ ۸/۵۹ \pm ۸/۶۳ سلول بالغ در گروه TNF(-) از ۱۰^۶ شد (جدول ۱).

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

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 فلوسیتومتری و آنتی‌بادی‌های کوئزوگه با فلوکروم‌ها انجام گرفت. نتایج نشان داد که ۱/۳۹ \pm ۵۹/۱ درصد از سلول‌ها CD34⁺، ۱۲/۲ \pm ۲۷/۶ درصد CD14⁺، ۱۳/۸ \pm ۲۸/۷ درصد CD1a⁺، ۱/۱ \pm ۲۵/۸ درصد CD11c⁺، ۱۸/۶ \pm ۲۹/۶ درصد CD80⁺، ۳/۳ \pm ۱۷/۵ درصد CD83⁺، ۲/۲ \pm ۳۰/۹ درصد CD86⁺ و ۱/۱ \pm ۳۴/۱ درصد از سلول‌ها HLA-DR⁺ را بیان می‌کردند (شکل ۳a). 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 ($p < 0.05$). 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 ۳b, ۳c).

MNC در حضور SCF, Flt3L, GM-CSF و IL-4 به مدت ۱۴ روز و القای بلوغ توسط TNF- α سبب تولید ۴۴/۶ درصد سلول CD80، ۲۷/۲ درصد سلول CD83+ و ۴۹/۰ درصد 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).

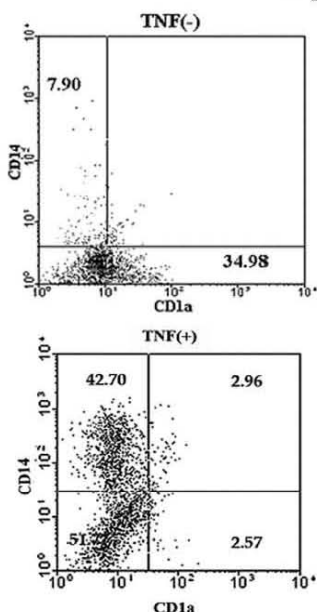
شناور و یا چسبیده با مقادیر زیادی بیرون زدگی سیتوپلاسمی در اطراف سلول‌ها مشاهده شد. در گروه TNF(+) سلول‌ها دندریتیکی حاصل در زیر میکروسکوپ هموزن تر بوده و در ظاهر از خلوص بیشتری برخوردار بودند (شکل ۳f، g). افزایش بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک بالغ همچون CD80، CD83 و CD86 پس از افزایش فاکتور بلوغ خصوصا در گروه TNF(+) نشان دهنده ایجاد سلول بالغ در این گروه است (شکل ۳c). به این ترتیب کشت سلول‌های UCB-



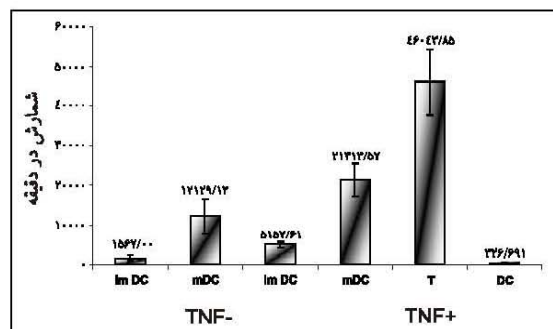
شکل ۳: تصویر سلول‌های منوسیت خون مبتدیان تهیه از سلول T (a)، سلول‌های کشت شده در روز ۷ (b، c)، روز ۱۴ (d، e)، روز ۱۸ و ۲۴ ساعت پس از افزایش فاکتور بلوغ TNF (f، g). سلول‌های ردیف سمت راست، TNF را از ابتدای کشت دریافت داشته‌اند و سلول‌های ردیف چپ TNF را تنها در زمان بلوغ دریافت داشته‌اند. بزرگنمایی تصاویر ۲۰× (۱۰۰ میکرو متر: Scale Bar)

اثر افزایش TNF- α بر عملکرد سلول دندریتیک

افزایش اولیه TNF بالغ شده‌اند (روز ۱۸) میزان برداشت تیمیدین رادیواکتیو بیشتری نسبت به گروهی که TNF را در انتهای کشت و به عنوان فاکتور بلوغ دریافت کرده‌اند، دارا هستند ($p=0/01$) ($21313/57 \pm 4180/54$ در برابر $12129/13 \pm 4554/02$). علاوه بر این که DCهای نابالغ (روز ۱۴) تولید شده در حضور TNF، سطح بالایی از برداشت تیمیدین رادیواکتیو را نسبت به سلول‌های نابالغ گروه TNF(-) نشان دادند ($5157/61 \pm 389/32$ در برابر $1567/00 \pm 684/48$ در برابر $p=0/01$ ، شکل ۵).

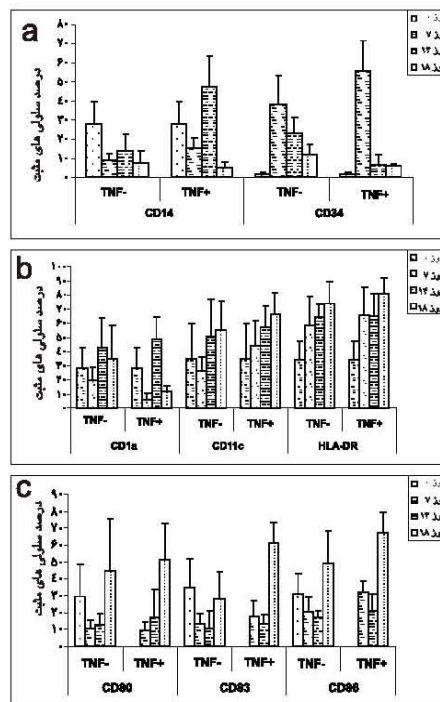


شکل ۴: بررسی بیان همزمان سلول‌های CD14+ و CD1a+ در دو گروه TNF(-) و TNF(+)



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

سنجش سایتوکاین‌های IL-10 و IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک حاصل از سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف در این مطالعه تولید هترودایمر IL-12P70 و IL-10 در



شکل ۳: بررسی بیان شاخص‌های CD14 و CD34 (a) CD11c، CD1a (b) و شاخص‌های بلوغ CD80، CD83، CD86 (c) بر سطح سلول‌های منوسیتی خون بندناف در حضور و یا عدم حضور TNF در روزهای ۱۲، ۱۸ و ۲۰

بیان HLA-DR در سلول‌های تک هسته‌ای 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 ($p>0/05$)، در مجموع زمانی که TNF در روزهای آغازین به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد، بیان شاخص‌های CD11c، CD80، CD83، CD86 و HLA-DR بر سطح سلول‌های دندریتیک افزایش و بیان CD14، CD34، CD1a و کاهش یافت ($p<0/04$ ، $p=0/01$). بالاتر بودن تعداد سلول‌های بیان‌کننده 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 (شکل ۳).

واکنش مختلط لکوسیتی

در روز ۱۸ کشت سلول‌های دندریتیک بالغ به منظور تحریک تکثیر آلوژن در سلول‌های T توسط میتوماکسین 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

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، ۴/۰۷±۰/۰۴ و ۶/۴۵±۰/۰۵، ۱/۵۶±۰/۰۴ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) ($p < 0.01$).

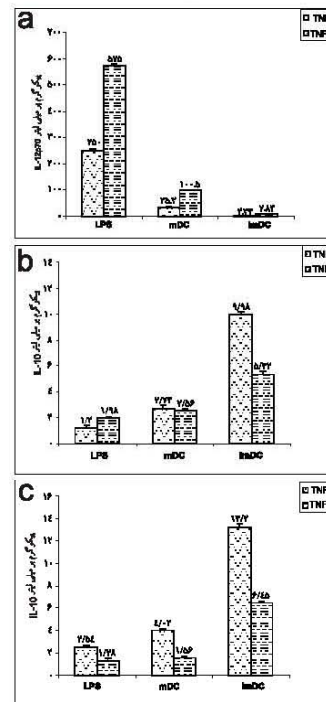
بحث

استینمن و کوهن برای اولین بار سلول‌های دندریتیک را به عنوان دسته جدیدی از سلول‌هایی که در اعضای لثنی محیطی موش‌ها مستقر هستند معرفی کردند (۲۴). پس از آن استینمن و ویتر 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 دندریتیک از منابع منوسیتی و یا سلول‌های CD34+ توسط ترکیبات سیتوکاینی متفاوت (۲۷) و یا تحریک توسط برخی پاتوژن‌ها و یا ترکیبات التهابی پرداخته‌اند (۲۸).

TNF α مدیاتور اولیه پاسخ‌های ایمنی در پاسخ به شرایط التهابی و پاتولوژیک، عفونت‌ها، شوک، بیماری‌های اتوایمنی و دفع پیوند بافتی است. طی مسیر خون‌سازی TNF α 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، TNF α را در ابتدای کشت سلول و در ترکیب با سایر سیتوکاین‌ها به کار می‌برند (۵، ۲۹) و یا از TNF α به عنوان فاکتور بلوغ برای تحریک و بلوغ DC مشتق از منوسیت‌ها استفاده می‌کنند (۳۰). در حقیقت TNF α 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 معمولاً 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 سیتوکاین‌های rhGM-CSF، rhFlt3L، rhSCF و rhIL-4 در حضور یا بدون حضور TNF در DC تولید

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 ($p > 0.05$) (شکل ۵a). همچنین سلول‌های دندریتیک بالغ در گروه TNF(+) تولید بیشتر IL-12 را در مقایسه با گروه TNF(-) دارا هستند ($100/5 \pm 0/7$ در برابر $35/2 \pm 1/5$) ($p = 0/0$) (شکل ۶a). LPS به عنوان کنترل مثبت سبب افزایش ترشح IL-12 در هر دو گروه به میزان $250 \pm 8/7$ و $575 \pm 5/4$ شد (شکل ۶a).



شکل ۶: سنجش (a) IL-12 و IL-10 در محیط کشت سلول‌های DC بالغ و نابالغ، سنجش IL-10 در محیط کشت واکنش MLR (b) و سنجش IL-10 در محیط کشت واکنش MLR (c)

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 ($9/98 \pm 0/17$ در برابر $5/32 \pm 0/24$) پیکوگرم در میلی‌لیتر ($p = 0/0$) (شکل ۶b). سلول‌های بالغ در هر دو گروه و نیز سلول‌های بالغ توسط LPS نیز مقادیر کمی ($p < 0.05$)، ترشح می‌کردند. این نتایج توسط سه آزمایش مجزا تایید شد (شکل ۶b).

سنجش سیتوکاین IL-10 در کشت MLR

تولید سیتوکاین‌ها توسط سلول‌های T و با عرضه شاخص‌های آلورژیک 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 IFN γ و در گروه دیگر

اثر افزایش TNF- α بر عملکرد سلول دندریتیک

دادن CD14، افزایش بیان گیرنده MHCII، CD83، CD80، 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 CD80، CD38 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 (جدول ۱ و شکل ۳) و احتمالاً نیازمند زمان بیشتری برای تکوین هستند که در این مطالعه صورت نگرفت. برخی مطالعات نشان داده‌اند که TNF α 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 TNF α همچنان نامشخص است. اما همان طور که پیشتر اشاره شد، TNF α 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 تھی 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-CSF استفاده شده است که تکثیر سلولی را خصوصاً در سلول‌های میلوئید افزایش می‌دهد و نیز از IL-4 که سبب بقای پیش‌سازهای میلوئیدی 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 ۳۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و برای بلوغ سلول‌های دندریتیک 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 متغیری 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 مکانیسم اثر TNF بر سلول‌های CD14، CD34 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

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

از آنجا که در این مطالعه از سلول‌های تک هسته‌ای بدون فرایندهای خالص سازی استفاده شده است، لذا تمام شاخص‌های مربوط به سلول‌های دندریتیک (CD80، CD83، CD86) در ابتدای 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 خصوصاً در گروه دریافت کننده 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 آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (۳۳). در عوض میانکنش با TNFR2 مانع القای آپوپتوز 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 تزیاید 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 (جدول ۱ و شکل ۳). 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 دندریتیک 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 CD86، CD80 نیز از جمله فاکتورهای کمک‌حرکی مهم در تکثیر سلول‌های T به واسطه DC هستند که در سطح سلول‌های بالغ دندریتیک افزایش می‌یابند (۱۰، ۱۵، ۳۵). براساس مطالعات استینمن و همکارانش، فنوتیپ اکثر DC‌های بالغ با از دست

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 از آپوپتوز 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 خصوصاً 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. Guemnonprez 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 tnfr

12-IL استفاده و مشخص شد که DC تولید شده در حضور افزایش اولیه 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 (شکل ۵). 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 میلویدی 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 سلول‌های CD34+ و فاکتور التهابی چون TNF قادر است نتیجه نهایی تولید DC را تحت تاثیر قرار دهد. به علاوه پیشنهاد می‌شود برای

- 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, Raffil S, Moore M. Tumor necrosis factor alpha stimulated endothelium: An inducer of dendritic cell development from hematopoietic progenitors and myeloid 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: Cd8 α 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, Miglilacclot G, Migliacclot 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, Bellilos 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. Borrás 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, Bememan ZN, Van Tendeloo VF, Nijs G, Lenjou M, Henckaerts E, Boeckxstaens CJ, Vandenaabeele 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. Rosenzweig 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- κ b activation results in maturation and t cell priming activity of dendritic cells overexpressing a mutated i κ b α . J Immunol 2007; 178(3): 1301-1311
38. Reid CD, Stackpoole A, Tlkerpae 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
-