مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۰، شماره ۶، صفحات ۴۸۳ تا ۴۹۲، (۱۳۸۱)

www.SID.ir

بررسی خصوصیات چسبندگی و فعالیت کشندگی ماکروفاژهای پریتونئال به کمک Phorbol Myristate Acetate و ارزیابی توان اکسیداتیو توسط Nitroblue Tetrazolium

نزهت‌الملوک مصفا*، دکتر نریمان مصفا (دانشیار)**، بهاره میرزاحسین یزدی (کارشناس)***
عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی دانشگاه شهید بهشتی تهران *
گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران**
کارشناس زیست شناسی جانوری ***

چکیده

مقدمه: ماکروفاژهای پریتونئال، اصلی ترین جمعیت سلولهای موثر در این محوطه حیاتی و بعنوان سد دفاعی بر علیه تهاجم ارگانیسم هایی است که احتمال نفوذ آنها از دستگاه گوارش مطرح می‌باشد. این سلولها از منوسیتهای اولیه در گردش خون مشتق گردیده و بدنبال تکامل تغذیه‌ای در پستانداران شکل می‌گیرند. در این بررسی، سعی گردیده که بطور تجربی و با روشهای رایج کشت سلول خصوصیات التهابی و فعالیتهای کشندگی این ردهٔ سلولی به کمک محرک مناسب و لازم را ارزیابی و سنجش نماییم. توان چسبندگی این سلولها و تکوین مورفولوژیک و فعالیت اکسیداتیو آنها، از مهمترین جنبه‌های آزمایشگاهی این پژوهش بوده است.

مواد و روشها: این تحقیق بصورت تجربی در سال ۱۳۷۹ در گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی طراحی و انجام گرفت .سلولهای فاگوسیتیک منوسیتی به طریق لاواژ پریتونئال از موشهای ۲ هفته‌ای شیرخوار با تکنیک رایج، اخذ گردید. پس از قرار دادن در محیط کامل کشت سلول، سلولها به دو گروه مورد و کنترل تقسیم گردیدند که دریافت کنندهٔ فوربول میریستات استات (PMA+) و بدون محرک (PMA-) بودند. هر دو سیستم کشت سلولی در مقاطع مختلف زمانی از ۱ الی ۲۴ ساعت تحت انکوباسیون در شرایط رایج کشت گردیدند. در هر یک از زمانهای مختلف فوق، سلولهای محیط کشت از حیث تعداد چسبنده و نیز تکامل مورفولوژیک و قدرت حیاتی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ایده آل‌ترین زمان چسبندگی از حیث تعداد سلول و مناسب ترین مرحلهٔ تکوینی که مربوط به کسب خصوصیات ماکروفاژی آنها بود، آزمایش احیاء ماده NBT به عنوان اندیکاتورسیستم کشندگی و انفجار تنفسی سلول در هر دو گروه سلول انجام شد.

یافته ها: سلولهای رده منوسیتی موجود در مایع لاواژ در گروه +PMA از اولین ساعت آغاز کشت شروع به چسبیدن به سطح پلاستیکی فلاسک کشت نمودند و تعداد سلولهای چسبنده در ساعت ۱۸ به حداکثر میزان خود رسید.در گروه کنترل، از ساعت دوم الی ۲۴ پس از شروع انکوباسیون، چسبندگی سلولها ادامه یافت. ایده آل ترین مورفوژنز ماکروفاژی در سلولهایی که PMA دریافت داشتند در ساعت چهارم اتفاق افتاد در حالیکه سلولهای فاقد محرک در ساعت ۱۲به اوج تکامل مورفولوژیک و ماکروفاژی رسیدند. در مناسب ترین زمان انکوباسیون، از حیث فراوانی سلولهای چسبنده و تکوین ایده آل ماکروفاژی، در هر دو گروه آزمایش احیاء NBT به منظور تعیین درصد سلولهای واکنش دهنده انجام گردید. گروه +PMA از حیث تولید رادیکالهای اکسیداتیو و احیاء NBT و تشکیل بلورهای فورمازان با میزان نسبی (۹۲ درصد) ارزیابی گردیدند در حالیکه با رعایت اصول فوق، سلولهای -PMA (۶۷ درصد) را نشان دادند.

نتیجه گیری و توصیه ها: یافته‌های ما نشان داد که توانایی اکسیداتیو و عملکردی فاگوسیتهای پریتونئال که مشتق از منوسیتهای در گردش بوده و در حیوان شیرخوار به مناسب ترین صورت ممکن قابل اخذ می‌باشد، بسیار بالا بوده و این بیانگر نقش استراتژیک و بحرانی این سلولها در دفاع ذاتی می‌باشد. از طرفی دست یابی به این سلولها، امکان اجرای تحقیقات و پژوهشهای دقیق تری را در رابطه با اعمال فاگوسیتیک در دفاع طبیعی را فراهم می‌آورد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

یکی از مهمترین جنبه‌های عملکردی دفاع غیر اختصاصی در بدن مهره داران عالی، تکامل مورفولوژیک سلولهای ردهٔ منوسیتی ماکروفاژی است که به دودمان فاگوسیتهای تک هسته‌ای معروف است. سلولهای این رده، پس از مهاجرت از گردش خون و استقرار در بافت ها، فاز تکاملی مهمی را آغاز نموده و تبدیل به ماکروفاژهای ثابت بافتی میشوند. در فضاهای توخالی بدن، مانند فضای پلورال و بخصوص محوطهٔ پریتونئال، این تکامل بسیار با اهمیت است ویکی از عوامل مهم دفاعی غیر آداپتیو در مقابل ارگانیسم‌های نفوذ یافته از طریق سطوح در تماس با محید خارجی یا همان سطوح مخاطی است(١،١٣).

ماکروفاژهای پریتونئال، از این اصول تبعیت نموده و پس از نقل و انتقال از گردش خون، در فضای صفاقی و امنتوم، مستقر میشوند. از هنگام شروع تغذیه محیطی حیوان، این تکامل تسریع یافته و پس از مدتی، صفاق با ماکروفاژهای آماده برای دفاع و فوق العاده آگرسیو انباشته میشود(٦،٨).

در شرایط آزمایشگاهی، و محیط‌های ایده آل کشت و نگهداری سلولها، میتوان سلولهای این سیستم را با الگویی مشابه در بدن، وادار به فعالیت و تکامل نمود. در این صورت با وجود فقدان قدرت تزاید و در صورت در دسترس بودن سطوح ایده آل مانند سطوح پلاستیکی غیر توکسیک، به آن اتصال یافته و مورفولوژی هیستیوسیستیک می‌یابند و به همین دلیل عنوان سلولهای چسبنده به سطوح پلاستیکی یا Plastic Adherent I Cells را به خود اختصاص داده‌اند (١٢).

از جمله محرکهای مناسب برای تثبیت روند فوق، میتوان اندوتوکسین‌ها و یا پالیدهٔ بسیاری از ارگانیسم‌ها مانند: Ecoli، کاندیدیا، کورینه باکتریوم پارورم و غیره را ذکر نمود. منوسیتهای اولیه (Naive) در چنین شرایطی تکامل مورفولوژیک و ماکروفاژیک خویش را سپری می‌نمایند. تجربیات نشان داده است که در صورت فقدان عامل محرک، این تکامل بصورت تاخیری‌تر، انجام‌پذیر بوده و میتوان نمادی از تکامل این سلولها را ملاحظه نمود (١٤).

از جمله مواد محرک سیستم فاگوسیتیک که غالبا" برای ارزیابی اعمال فاگوسیتیک نوتروفیلی بکار برده میشود، فوربول میریستات استات است که مشتقی از گیاه کرچک هندی بوده و ساختاری کاملا" مشابه با اندوتوکسین باکتریال دارد(٨و١٤). از آنجائیکه اکثر مطالعات محدود به قدرت تحریکی PMA بر نوتروفیل‌ها بوده است و اخیرا" کوششهایی در جهت استفاده از PMA به منظور تحریک سلولهای فاگوسیتیک تک هسته‌ای به انجام رسیده، بر آن شدیم تا با مطالعه خصوصیات چسبندگی و تکامل سلولهای ماکروفاژی در مجاورت PMA یکی از اصلیٰ ترین فاگوسیتهای تک هسته‌ای دفاع ذاتی ایمنی ماکروفاژهای پریتونئال را، در زمانهای مختلف کشت، ارزیابی نموده و علاوه بر آن قدرت مادهٔ نیترو بلوتترازولیوم (NBT) را مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم. از آنجائیکه به تازگی تحقیقات مرتبط با دفاع ذاتی بر حول دو محور فاگوسیتیک تک هسته‌ای و چند هسته‌ای بصورت مجزا از هم استوار گردیده، انجام این پژوهش بمنظور ارزیابی مکانیسم‌های سیستم منوسیتی- ماکروفاژی میتواند مفید و موثر باشد.

مواد و روشها

سلولهای تک هسته‌ای فاگوسیتیک همانند سایر اجزاء سیستم دفاعی غیر آداپتیو، در مقابل محرک مناسب، قادر به پاسخ بوده و توان کشندگی و مکانیسم‌های وابسته به اکسیژن در آنها افزایش می‌یابد. این روند که بطور موثری وابسته به زمان بوده، متعاقب تکامل مورفولوژیک آنها رخ میدهد.هدف از انجام این تحقیق، مطالعهٔ عملکرد سلولهای فاگوسیتیک تک هسته‌ای یا همان سیستم منوسیتی ماکروفاژی بوده است. این فعالیت شامل خصوصیت چسبندگی آنها به سطوح پلاستیکی، کشت این سلولها در نظر گرفته شد که در هر یک از آنهابا استفاده از تک هسته ایهای منوسیتی استخراج شده از صفاق موش نوزاد شیرخوار و تحریک آنها به کمک PMA و بدون محرک مبادرت به بررسی نکات فوق نمودیم. این انتخاب به دلیل دست نخورده بودن سیستم منوسیتی ماکروفاژی حیوان آنهم در زمان ایده آل از حیث نوع تغذیه بوده است تا بصورت کامل بتواند مراحل تکاملی و انتقال سلول به وضعیت ماکروفاژی را نمودار سازد. از دید این تحقیق، نه تنها رویدادهای فوق در نیل به اهداف از اهمیت بسیاری برخوردار بوده است بلکه زمان ایده آل برای حداکثر میزان چسبندگی سلولها از حیث تعداد و درصد و نیز تکامل مورفولوژیک سلولها که بدنبال

Archive of SID

Archive of SID

آن انفجار تنفسی و آبشار اکسیداتیو در آنها راه اندازی میشود مورد تاکید بسیار بوده است. امکانات ومواد مورد نیاز در این تحقیق عبارت بودند از:

۱- مواد:

الف- حیوان آزمایشگاهی: نوزاد ۳-۲ هفته‌ای موش سفید از نژاد خالص Balb/c به تعداد مورد نیاز برای اخذ سلولهای تک هسته‌ای پریتونئال به تعداد مورد نیاز.

ب- محیط کامل کشت سلول حاوی (RPMI)(1640)، سرم جنین گاو (FBS) Fetal Bovine Serum، پنی سیلین استرپترمایسین همگی از شرکت Gibco) به علاوه آمفوتریسین B از شرکت wellcom به نسبت حجمی:

RPMI+15%+50 IU/ml penicilin 50 mg/ml streptomycin+250 mg/ml

(RPMI=Royal Park Memorial Institute)

همگی در حجم ۱۰۰ میلی لیتر = RPMI سرد بمنظور لاواژ پریتوئن.

ج- فوربول میریستات استات PMA: متعلق به شرکت زیگما- حل شده در DMSO (دی متیل سولفاکساید) به میزان ng/ml ۴۵۰ در محیط کشت.

د- مادهٔ NBT (نیتروبلوتترازولیوم) متعلق به شرکت زیگما- محلول در mg/ml CINa ۵/۱۰۰ .

ه- رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد در بافر مخصوص متعلق به شرکت زیگما.

و- ظروف و وسایل مخصوص کشت سلول: شامل انواع پیپت، فلاسک در پیج درا فالکون و یا دیش ۳۵ میلی لیتری مخصوص کشت و نگهداری سلو ل متعلق به شرکت Falcon - لولهٔ کونیکال پلاستیکی .

ی- وسایل و اداوات جراحی در قطع میکروسرجری شامل، قیچی، پنس، ادسون و آنژیوکت نوزادی .

دستگاههای مورد نیاز: انکوباتور Co2، هود لامینار، میکروسکوپ فازکونتراست.

۲- روشها:

الف - آماده نمودن حیوان: منبع تهیه سلولهای تک هسته‌ای منوسیتی ماکروفاژی، محوطهٔصفاق موش نوزاد شیرخوارBalb/c بود- حیوان را پس از انجام عملDislocation Cervical با حفظ ضربان قلب، کشته و بدین ترتیب قطع نخاع نمودیم. استفاده از روشهای بیهوشی، بمنظور اخذ سلولهای ایمنی، منع کامل دارد. حیوان را در زیر دستگاه هود لامینار خوابانده و در شرایط کاملاً استریل و با استفاده از شستشوی کامل بدن حیوان به کمک بتادین و الکل درصد۷۰، اقدام به لاواژ پریتونئال نمودیم.

ب - لاواژ پریتونئال: توسط آنژیوکت نوزادی (سوزن شماره ۸ نیز قابل استفاده است) از طریق پوست و یا عضله رکتوس (برش عرضی پوست به کمک فشار انگشت) به داخل محوطه صفاقی وارد شده و با تزریق ۲ الی ٤ میلی لیتر از RPMI سرد و قرار گرفتن کامل محلول بمدت چند دقیقه در داخل صفاق، اقدام به خروج ماده از محوطه صفاقی نمودیم. میتوان این عمل را بیش از یکبار نیز انجام داد. که در آنصورت امکان خروج مقداری خون نیز در داخل سرنگ به وجود خواهد آمد.

ج -آماده نموده سلولهای پریتونئال برای آغاز پروسهٔ کشت: پس از خروج مایع لاواژ، حجم آن را در لوله مخصوص به ۱۵ میلی لیتر رسانده (با RPMI) و پس از سه بار شستشو و با دور xg ٤۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سلولها را شمارش می‌نمائیم. قدرت حیاتی سلولها در این مرحله به کمک تریپان بلو مشخص گردیده و حداقل شمارش سلولها باید عدد ml/ $۱۰^{۶}$ * ۵ را نشان داده باشد.مراحل فوق، حتی الامکان باید در سرما انجام گیرد. تا سلولهای پریتونئال به دلیل خصوصیات چسبندگی به ته لوله اتصال نیابند.

د- کشت سلول: سلولهای هاروست شده را در این مرحله به دو گروه آزمایش و کنترل تفکیک نمودیم. گروه کنترل بدون افزودن محرک PMA مورد کشت قرار گرفتند. درحالیکه گروه آزمایش، مقدار ng ٤۵۰ در میلی لیتر محیط کشت، ماده PMA دریافت نمودند. مقدار لازم از محیط کشت کامل به هر یک از دو گروه اضافه گردید، و در ظروف مخصوص کشت قرار داده شدند. سپس در انکوباتور Co2 با دمای $^{\Sigma}$c ۳۷ قرار گرفتند- ظروف کشت در این تحقیق از درجه بندی مخصوص برای محاسبه تعداد سلول برخوردار بودند. برای هر دو گروه، زمان انکوباسیون از ۱ الی ۲٤ ساعت در نظر گرفته شد.

ه- شمارش و مطالعه وضعیت چسبندگی سلولهای ماکروفاژی:پس از اتمام هر یک از نمونه‌های دو گروه آزمایش و مورد، فلاسک کشت مربوطه را از انکوباتو خارج نموده و سوسپانسیون سلولهای رویی را به همراه سوپرناتنت خارج می‌نمائیم. سلولهای چسبیده شده به سطح ظرف کشت باتوجه به درجه بندی آن و شمارش تعداد لازم از هرشان میکروسکوپی hpf در هر خانه مربع را به منظور برآورد تعداد سلولهای ماکروفاژی

www.SID.ir

www.SID.ir

تکامل یافته انجام دادیم. بدین ترتیب عددی را که تقریباً نشان دهندهٔ کل سلولهای چسبنده است را بدست آورده و با در دست داشتن شمارش سلولهای اولیه و با فرمول تناسب درصد، نسبت کل سلولهای چسبنده را بدست آوردیم.

همچنین از حیث تکامل مورفولوژیک، کرایتریاهای زیر مورد استفاده قرار گرفت:

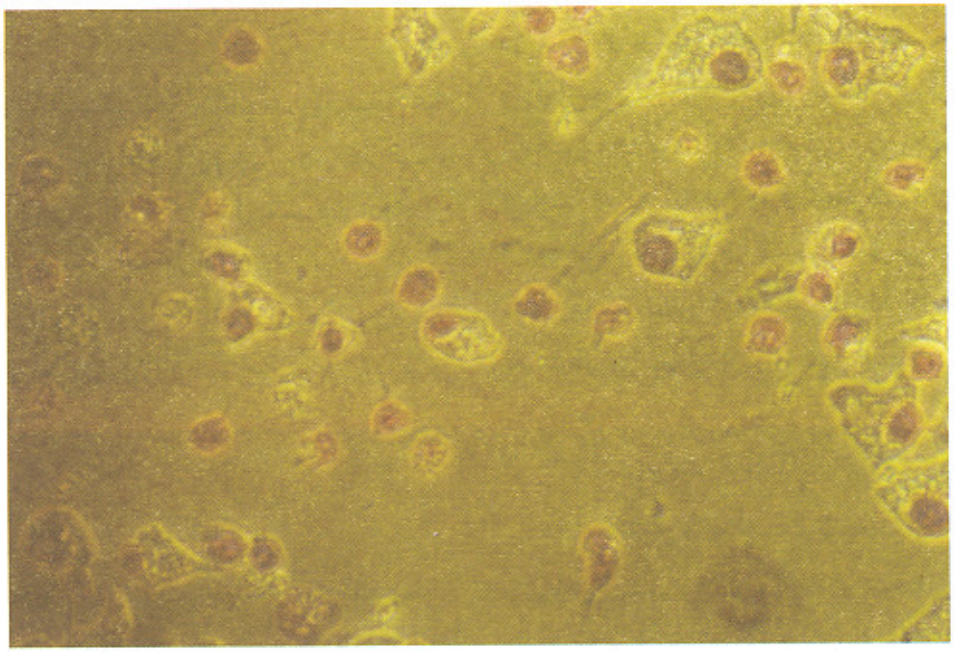
۱-سطح اشغال توسط سلول در مقایسه با سلولهای غیر چسبنده.

۲-تعداد پاهای کاذب تشکیل شده توسط سلول.

۳-وضعیت گرانولیتی سلولها و چگونگی نسبت هسته و سیتوپلاسم و واکوئلیزاسیون سیتوپلاسم.

تصاویر شماره ۱ و ۲ مراحل چسبندگی و تکامل مورفولوژیک ماکروفاژهای پریتونئال را نشان میدهد که براساس آن کرایتریاهای تحقیق شکل گرفته است.ارزیابی فوق صرفا" کیفی بوده و بین درجات + تا ++++، محقق را با وضعیت چسبندگی و میزان فعالیت سلولها آگاه می‌سازد. در این مرحله سلولها از حیث وضعیت حیاتی (درصد وایا بیلیتی) به کمک رنگ تریپان بلو، مورد بررسی قرار گرفتند. سعی گردید برای هر واحد زمانی از آغاز پروسهٔ کشت یک فلاسک بطور جداگانه بررسی و ارزیابی گردد.

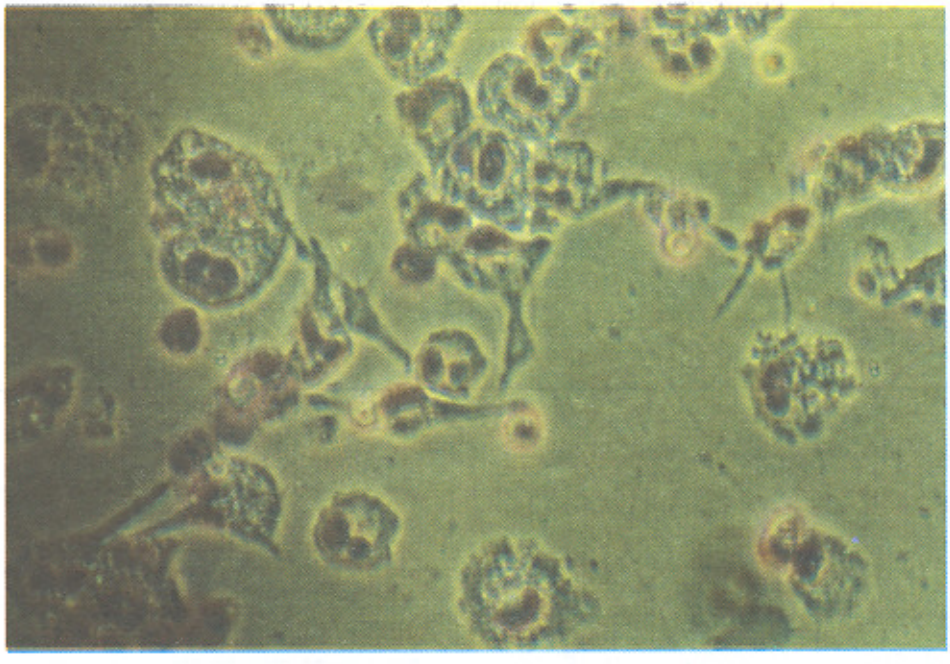
و- تعیین فعالیت اکسیداتیو سلولهای ماکروفاژی: به کمک آزمون NBT، بر طبق روش استاندارد، توان کشندگی و میزان تولید رادیکالهای فعال اکسیژن در سلولهایی که بالاترین درصد چسبندگی، تکامل مورفولوژیک و وایابیلیتی را نشان داده بودند. مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش روش استفاده از ماده NBT محلول در سالین نرمال بکار گرفته شد که در مقایسه با روش NBT محلول در سوکروز نتایج بسیار دقیق‌تری را نشان میداد.



تصویر شماره ۱- ملاحظه می‌شود که تعداد کمی از سلولهای منوسیتی به کف ظروف کشت چسبیده‌اند و از حیث تکامل مورفولوژیک نیز هنوز نابالغ می‌باشند (۴۰×phase contrast)

Archive of SID

Archive of SID



تصویر شماره ۲- فراوانی سلولهایی که در ساعت دوم پس از آغاز کشت خصوصیت چسبندگی یافته‌اند (۴۰×phase contrast)

یافته‌ها

نتایج حاصله از انجام این بررسی، بر اساس اعمال حیاتی سلول شامل توان افزایش یافته چسبندگی و تکامل مورفولوژی و قدرت کشندگی آنها بر پایه تولید عوامل اکسیداتیو ثبت گردید سعی گردید دستاوردهای فوق، براساس روشهای آزمایشگاهی مربوطه، در یک سیستم کشت و گروههای مورد و آزمایش، مورد مقایسه قرار گیرند.

بدین منظور در فواصل زمانی ۱،۲،۴،۶،۱۲،۱۸ و ۲۴ ساعت خصوصیات فوق مشاهده و نتایج حاصله ثبت گردید. احیاء مادهٔ که نشاندهندهٔ توان کشندگی و انفجار تنفسی سلولهاست در مرحله‌ای از کشت انجام شد که حداکثر سلولهای چسبنده در حال تکامل این وضعیت هیستوسیتیک قرار گرفته بودند.جدول شماره ۱ نشان میدهد که با توجه به طول مدت انکوباسیون و کشت سلولها، تعداد و درصد سلولهای چسبنده، محاسبه گردیده و نیز تکامل مورفولوژیک تا حد تشکیل وایجاد ماکروفاژها در شرایط بدون دخالت PMA در زمان آغاز انکوباسیون (صفر)، هیچگونه چسبندگی نداشته و این امر در مورد کشت سلولهای PMA نیز صادق است.

در طول مدت ۱ ساعت سلولهای فاقد PMA، هیچگونه اتصالی را به سطح پلاستیکی بروز نداده‌اند در حالیکه محرک PMA سبب آغاز پروسه چسبندگی در سلولهای منوسیتی / ماکروفاژی پریتونئال گردید و بطوریکه ۲/۰۵ درصد از سلولها با تکامل مورفولوژیک +++ و وایابیلیتی ۹۵ درصد، فعالیت فاگوسیتیک خویش را آغاز نمودند.

www.SID.ir

Archive of SID

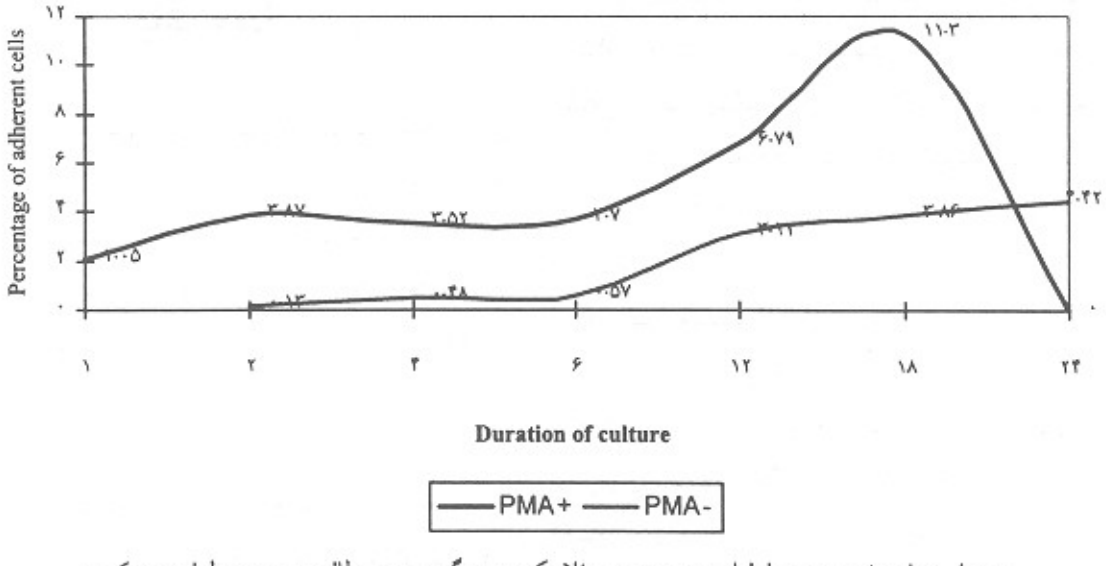
جدول شماره ١- خصوصیات ماکروفاژی سلولهای چسبنده به فلاسک براساس زمانهای مختلف کشت

زمانهای کشت	همراه با PMA			بدون PMA		
	درصد سلولهای چسبنده	مورفوژنز	Viability	درصد سلولهای چسبنده	مورفوژنز	viability
-	-	-	٪٩٦	٠	-	٪٩٦
١	٪٢/٠٥	+++	٪٩٥	٠	-	٪٩٣
٢	٪٣/٨٧	++++	٪٨٥	٪٠/١٣	+	٪٩٠
٤	٪٣/٥٢	++++	٪٧٥	٪٠/٤٨	+	٪٨٧
٦	٪٣/٧	++++	٪٥٠	٪٠/٥٧	++	٪٨٥
١٢	٪٦/٧٩	++++	٪١٠	٪٣/١٢	++++	٪٨٣
١٨	١١/٣	-	٠	٪٣/٨٦	++++	٪٨٢
٢٤	غیرقابل شمارش	-	٠	٪٤/٤٢	++++	٪٥٠

جدول شماره ٢- نتایج انجام تست NBT در سلولهای چسبنده و فعال ماکروفاژهای با توجه به زمان انکوباسیون

گروههای سلولی	طول مدت کشت	مورفوژنز	توان احیا ماده NBT
PMA^+(آزمایش)	٢ ساعت	++++	٪٩٢
PMA^-(کنترل)	١٢ ساعت	++++	٪٦٧

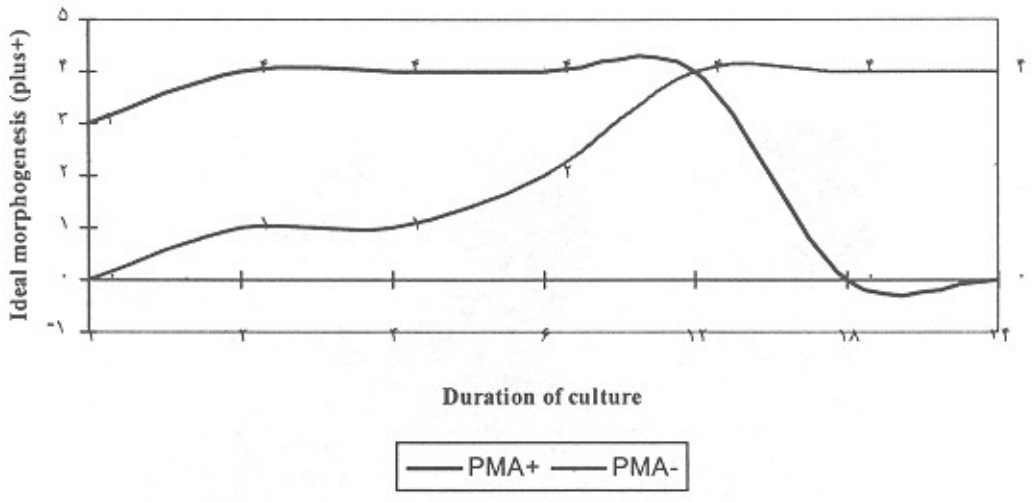
در ساعت دوم کشت نه تنها بر تعداد سلولهای چسبنده افزوده شد بلکه شرایط فاقد PMA نیز نشانه‌های دال بر اتصال سلولها را بروز داد البته تا ساعت ١٢ پس از شروع انکوباسیون افزایش سلولهای چسبنده در سیستم فاقد PMA جزئی به نظر میرسد و روند تکامل آنها بسیار کند میباشد، در حالیکه در سیستم PMA^+ یعنی گروه مورد آزمایش تا ساعت ١٨ حداکثر تعداد سلولهای چسبنده را داریم و تکامل مورفولوژیک تا ساعت ١٢ بسیار چشمگیر است (++++) ولیکن تنها نکته مورد اختلاف بین دو سیستم که بسیار چشمگیر ملاحظه میشود، افت و ایابیلیتی در سیستم همراه PMA و ابقاء وایابیلیتی در سیستم بدون PMA میباشد. نمودارهای ١ و ٢ و ٣ بخوبی تفاوت این نکات را در سلولهای تحت بررسی و کنترل نشان می‌دهند.



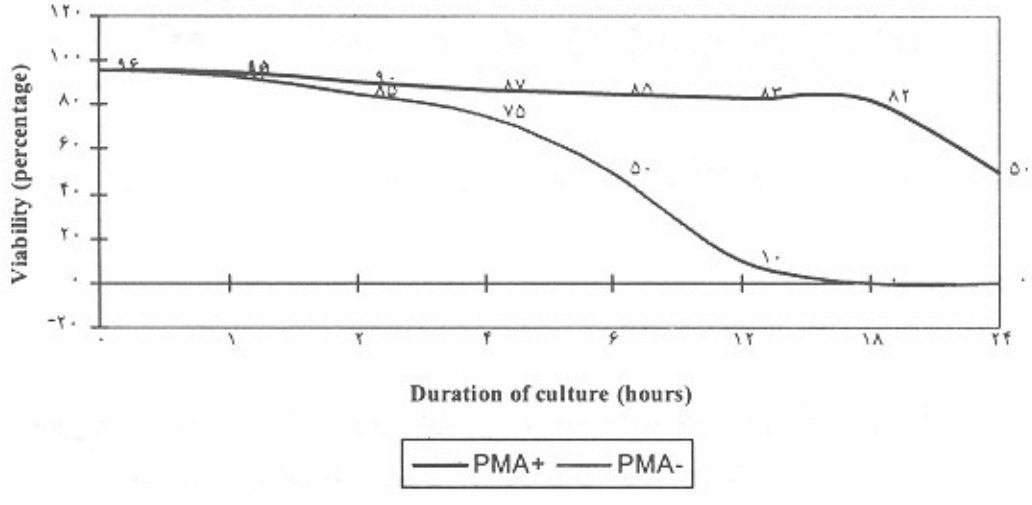
نمودار شماره ١- درصد سلولهای چسبنده به ته فلاسک در دو گروه مورد مطالعه بر حسب طول مدت کشت

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره ۲- درجه‌بندی مورفوژنز سلولهای چسبنده به ته فلاسک در دو گروه مورد مطالعه بر حسب طول مدت کشت



نمودار شماره ۳- ثبوت حیاتی سلولهای چسبنده در دو گروه مورد مطالعه بر حسب طول مدت کشت

همانگونه که دربخش موادوروشها ذکر گردید، در مناسبترین وضعیت کشت از حیث درصد فراوان سلولهای چسبنده و نیز تکوین ایده‌آل ماکروفاژهای سلولها،درهر دو گروه تحت بررسی،آزمون احیاءNBT به‌انجام رسید.

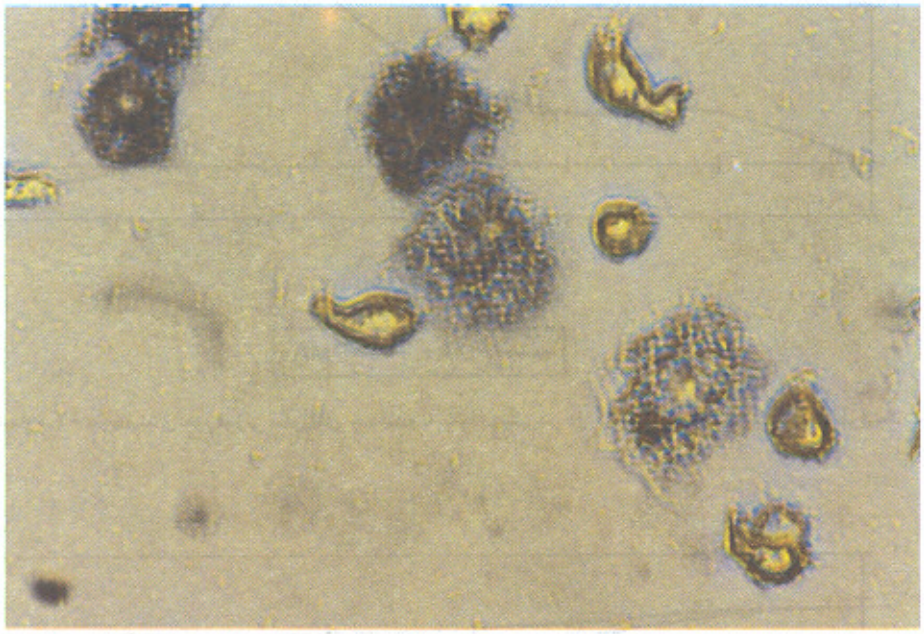
مبنای سنجش این روش، تشکیل بلورهای فورمازان به رنگ آبی سرمه‌ای در سیتوپلاسم سلولها بود که با شمارش تعداد سلولهایی که حداقل ۳ لکه فورمازان در سیتوپلاسم خود داشتند، پی به درصد احیاء نیترو بلو تترازولیوم نمودیم. در گروه PMA^+ از حیث تولید رادیکالهای اکسیداتیو و وقوع انفجار تنفسی، حدود ۹۲ درصد از سلولها مثبت گزارش گردیدند. در حالیکه با رعایت اصول فوق سلولهای PMA^- رقمی را معادل (۶۷ درصد) کل سلولها نشان دادند که در مورد این اختلاف، میتوان نظرات گوناگونی را ارائه داد (تصویر شماره ۳).

بحث

جمعیت ماکروفاژهای پریتونئال، شامل فاگوسیتهای تک هسته‌ای توانمندی هستند که به دلیل تماس مداوم با ارگانیسم‌های روده‌ای و فرآورده‌های آن سد دفاعی مهمی را در پاسخهای ایمنی تشکیل میدهند. این سلولها درحیوانات دست نخورده یا Naïve، هنوز وارد فاز تکاملی مورفولوژیک و عملکردی نگردیده و منابع خوبی برای مطالعات آزمایشگاهی و تحقیقاتی می‌باشند. بطوریکه

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۳ : سلولهای ماکروفاژی پریتونئال با ذخائر فورمازان که حاصل احیاء ماده NBT و فعالیت اکسیداتیو سلولهاست.

در منابع و در پروتکل های مختلف کشت این سلولها، میتوان آنها را به منظور مطالعه وبررسی سیستم های دفاعی غیر آداپتیو پیدا نمود. همچنین مطالعه بر روی سایتوکاینها و واسطه‌های التهابی مترشحه از این سلولها در مایع رویی کشت، موضوع بسیاری از تحقیقات ایمونولوژیکی بوده و امروزه از این سلولها در بررسی توان سیتوتوکسیتی ایمنی غیر اختصاصی نیز استفاده وسیعی میگردد (۱۳،۹).

همانگونه که از نتایج این تحقیق برمی‌آید، ماکروفاژهای پریتونئال در شرایط عاری از PMA، به زمان طولانی‌تری برای اتصال به سطوح پلاستیک و تکامل مورفولوژیک نیاز دارند. بطوریکه در ساعات اولیه دچار کاهش تعداد از نظر تمایل به اتصال میباشند. یکی دیگر اینکه در تمام سیستم‌های Harvesting وYeild سلولی، به دلیل طی مراحل شستشو و نقل و انتقال آنها از محیط بدن به لوله‌ها و سپس فلاسک مخصوص کشت، افت تعداد سلولها رخ میدهد و این امر غیر قابل اجتناب می‌باشد و شوک حاصل از مراحل فوق میتواند منجر به مرگ پاره‌ای از سلولها گردد (۱۵).

دوم اینکه به دلیل ورود مقداری خون در تجمعات صفاقی وسپس خروج آنها در مراحل لاواژ، بدلیل پارگی عروق تعداد بسیار زیادی از لکوسیتهای در گردش نیز بهمراه منوسیتها وارد مجموعه کشت گردیده‌اند و لذا بدلیل فقدان خاصیت چسبندگی، در جمعیت ماکروفاژی قرار نمیگیرند و بطور کلی امکان حضور سلولهای غیر از منوسیتها، شامل لنفوسیتها و غیره در مایع لاواژ بسیار زیاد است و بخصوص با افزایش سن حیوان، گستردگی و شیوع سلولهای پریتونئال افزایش می‌یابد. که ما سعی کردیم حیوان نوزاد شیرخوار را مورد لاواژ پریتوئین قرار دهیم (۱۵).

لیکن باید متذکر گردیم که چون در تمام مراحل کار، درصد سلولهای چسبنده از کل شمارش اولیه آنهم در شرایط مساوی ویکسان و زمانهای منظم محاسبه گردیده است،نهایتاً در اخذ نتایج آزمایش تغییر حاصل ننموده و همچنان ارزیابی ما معتبر و آماری

www.SID.ir

www.SID.ir

میباشد و نمی‌تواند موجبات اختلال در تفسیر نتایج و نسبت دادن سلولهای چسبنده به جمعیت ماکروفاژی را فراهم آورد.

در مورد سنجش توان حیاتی سلولها (نمودار شماره ۳) ملاحظه میشود که در سیستم فاقد PMA، حیات سلولها در شرایط بسیار چشمگیری، بالاتر از سلولهای تحریک شده،با PMA را نشان میدهند.این نکته با مقالات و نتایج پژوهشهایی که در زمینه عملکرد PMA بر فعالیت و حیات سلولهای ماکروفاژی انتشار یافته کاملاً تطابق دارد چرا که فوربول میریستات استات با وجود فعال نمودن سیستم‌های بیگانه خواری در سلول،بشدت مسیرهای آپپتوز را بخصوص در ساعات انتهایی کشت فعال می‌سازد و این امر، ادامه حیات و تثبیت موروفولوژیک سلولهای فاقد PMA را در این پژوهش تایید می‌نماید (۱۱).

در منابع و مقالات انتشار یافته در زمینه فعالیت اکسیداتیو ماکروفاژهای در گردش، ارقام ارائه شده اکثراً در محدودهٔ درصد ۷۰ –۶۰ را در زمینه احیاء ماده NBT و سلولهای مثبت از این حیث گزارش داده‌اند، در حالیکه در این تحقیق، نتایج چشمگیری از حیث توان فوق العاده زیاد سلولهای ماکروفاژی پریتونئال آنهم بمیزان درصد۹۲ ملاحظه میگردد و این خود بیانگر فعالیت قوی و بالا بودن مقادیر رادیکالهای اکسیداتیو در پروسه‌های تحریکی است که مسلما قابل تائید می‌باشد. زیرا که سلولهای فاگوسیتیک پریتونئال، توان چند گانه‌ای از حیث برخورد با عوامل میکروبیولوژیکال مختلف دارا میباشند و حتی در پارهٔای مقالات ذکر گردیده که منشاء اجدادی و خصوصیات مهاجرتی منوسیتهایی که به محوطه پریتوئن وارد میشوند. ممکن است متفاوت با سایر سلولهای رده منوسیتی – ماکروفاژی حاضر در گردش خون باشند. مسلما افت میزان احیاء NBT در شرایط عاری از PMA و آنهم در سلولهای که مراحل تکاملی را سپری نموده و ساعاتی را در شرایط اتصال به سطوح پلاستیکی طی نموده‌اند نشان دهنده عملکرد PMA در تسریع راه اندازی وقایع کشندگی است (۷،۹،۱۰،۱۲،۵).

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مدیریت محترم گروه ایمونولوژی، استاد گرانقدر و ممتاز، جناب آقای دکتر پرویز پاکزاد، سپاسگزاری می‌نمایم که به سیاق همیشگی خود پای‌بند بوده و همواره مشوق پژوهشگران و دانشجویان این مرز و بوم هستند .سلامت و موفقیت ایشان را از خداوند متعال خواستاریم.

Archive of SID

Archive of SID

منابع

1. Abul K Abbas et al. Cellular and molecular Immunology 1997, 3th edition W.B saunders 12-23.

2. Annette Fox, Maria Koulmanda et al. Evidence that peritoneal macrophages are required for T cell infiltration and rejection of fetal pig pancreas. Transplantation 1998 vol: 66 No:11 1407-16.

3. Duan X.et al. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes /macrophage, Archives of virology, 1997,142 (12): 2483-97.

4. Fernandez M.L. et al., Role of distinct subpopulation of peritoneal macrophages in the regulation of reactive oxygen species release, free Radical. Biol, Med, 1999,27(7-8): 797-809.

5. Harrison G. et al., Progressive loss of the macr ophage respiratory burst in oxygen toxicity, J Free Radic Biol Med, 1986,2(2): 129-34.

6. Imrich H.et al., On the role of peripheral macrophages during experimental allergic encephalomyelitis (EAE), Journal of Neural trans mission, 2001,108(4): 379-395.

7. Muller F. et al., Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes & monocyte- derived macrophages, APMIS, 1989, 97 :490-496.(Abstract)

8. John I Gallin ; Anthony Fauci .phagocytic cells 1982 (vol 1) 1th edition reven press Ny. Page: 13-31.

9. Ohkawa Y.et al., A rapid, simple screening method for skin-tumor promoters using mouse peritoneal macrophages in vitro, Cancer Lett 1984, 21(3):253-60 .

10. Rook GA.W, et al. A simple method for the solbuilized of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophage by γ-IFN, Journal of immunological method, 1985,82:161-7.

11 .Smit Marion E. et al., Effects of PMA on function of macrophages and microglya, Neurochemical Research, 1998,23(3): 427-434.

12. Roitt Ivan, Brostoff, Immunology, 1998, 5th diition Mosby Page: 229-40.

13. Goldsby R.A. Kindt T.J. Osborne B.A., Kuby Immunology, Fourth edition, Freeman, 41-60.

14. Stites D.P- terr A.I Basic and clinical immunology, Seventh Edition, prentice- Hall International Inc. 1991,149-151.

15. Leslie Hudson, Frank C-Hay practical Immunology 1997 3th edition Black well scientific publications 187-90,449.

www.SID.ir