مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره ۳، تیر ۱۳۹۲(شماره پی در پی۷۵)

اثر هیستامین بر سلول‌های دندریتیک پالس شده با پروتئین بازی میلین و پاسخ سلول‌های T اتولوگ در شرایط in vitro

هادی محب علیان[۱*]، نوروز دلیرژ[۲]، احمد مرشدی[۳]

[۱]گروه میکروب شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۲]گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۳] گروه ایمنی‌شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱

چکیده

زمینه و هدف: نقش سلول‌های دندریتیک در هدایت پاسخ‌های ایمنی باعث شده تا از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های خود ایمن مانند مولتیپل اسکلروزیس استفاده شود. هدف این مطالعه بررسی اثر هیستامین سلول‌های دندریتیک پالس شده با پروتئین بازی میلین و پاسخ سلول‌های T اتولوگ در شرایط in vitro بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از ۵ فرد داوطلب نمونه‌گیری انجام شد و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده ازفایکول جدا شدند. سلول‌های دندریتیک ازسلول‌های خون محیطی با استفاده از سایتوکاین‌های GM-CSF و IL-4 تولید شدند و بعد از تحریک شدن با پروتئین بازی میلین در حضور هیستامین در گروه تیمار و بدون هیستامین در گروه کنترل بالغ شدند. با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، شاخص CD14 و شاخص‌های سطحی در سلول‌های دندریتیک سنجیده شد. مقادیر سایتوکاین‌های IL-10 و IL-12 در کشت سلول‌های دندریتیک و IL-4، و IFN-γ در کشت توأمان سلول‌های دندریتیک و سلول T اتولوگ آن به دست آمد. میزان تکثیر لنفوسیت‌های T در گروه کنترل و تیمار مقایسه شدند. داده‌ها با آزمون‌های آماری تی دانشجویی و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در گروه تیمار بیانCD83 (از ۱۵/۳ به ۲۴/۵درصد) و HLA-DR (از ۲۶/۳ به ۳۸درصد) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد($p<۰/۰۵$). بیان CD14 کاهش را نشان نداد. ترشح IL-10 افزایش و IL-12 کاهش را نشان داد. نسبت IL-4/IFN-γ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: هیستامین با انحراف پاسخ‌های ایمنی از سمت TH1/TH17 به سمت TH2 در مدل آزمایشگاهی مولتیپل اسکلروزیس می‌تواند به عنوان یک روش نوین در ساخت واکسن‌های با پایه سلول‌های دندرتیک در درمان بیماری مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های دندریتیک، پروتئین بازی میلین، هیستامین، مولتیپل اسکلروزیس

***نویسنده مسئول**: **دکتر هادی محب علیان**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب‌شناسی

E-mail: Dr.mohebalian@yahoo.com

Archive of SID

D.ir

مقدمه

بیماری اسکلروز متعدد[1] یک التهاب مزمن سیستم اعصاب مرکزی است که به طور عمده نوجوانان بالغ را مبتلا می‌سازد(۱). شواهد محکمی‌دال بر خود ایمن بودن بیماری در بررسی مدل حیوانی آن که به صورت تجربی در موش ایجاد می‌شود، به دست آمده است. اجزای پروتئینی غشاء میلین مانند پروتئین بازی میلین[2] هدف مناسبی برای حمله سلول‌های خود واکنشگر T یاریگر می‌باشد(۲). در گذشته عقیده بر این بود که نقش اصلی در پاتوژنز این بیماری فقط بر عهده رده سلول‌های T کمکی نوع ۱ (TH1) می‌باشد که از توانایی بالایی در پیشبرد بیماری برخوردار می‌باشند، حال آن که پاتوژنز بیماری حاصل برآیند فعالیت رده‌های سلولی TH1 و TH17 از یک سو و فعالیت تنظیمی لنفوسیت‌های T تنظیمی (Treg) از سوی دیگر می‌باشد، به نحوی که در این بیماری فعالیت سلول‌های Treg کاهش می‌یابد(۴ و ۳).

با توجه به روند روبه رشد بیماری به خصوص در کشور ایران تلاش‌های زیادی در جهت درمان بیماری صورت گرفته است. یکی از راهکارهای درمانی پیشنهاد شده، ایمونوتراپی می‌باشد. با در نظر گرفتن توان بالای سلول‌های دندریتیک در شروع پاسخ‌های ایمنی اکتسابی و یا در القای تحمل ایمنی، می‌توان از آنها در این زمینه کمک گرفت. امروزه ساخت واکسن‌ها بر مبنای تولید سلول‌های دندریتیک کارآمد از سلول‌های پیش‌ساز آن از یک فرد در محیط کشت و تزریق مجدد آن به همان فرد و هدایت پاسخ‌های ایمنی به سمت مطلوب در موارد متعددی از جمله؛ ایدز، سرطان‌ها و بیماری‌های خود ایمن در کانون توجه مراکز تحقیقاتی می‌باشد(۵). در درمان بیماری اسکلروز متعدد انحراف پاسخ‌های ایمنی از سمت TH1 و هدایت آن به سمت TH2 از یک طرف و افزایش فعالیت سلول‌های T تنظیمی‌ازطرف دیگر مد نظر است. با سه روش می‌توان با مداخله در محیط کشت سلول‌های دندریتیک به تولید سلول‌های دندریتیک القاء کنندهٔ تحمل ایمنی[3] پرداخت که عبارت از؛ میانجی‌های فیزیولوژیک، مواد دارویی و مهندسی ژنتیک می‌باشند(۵).

هیستامین از جمله موادی است که به طور فعال در سلول‌های بازوفیل و ماست سل در بدن به وسیله آنزیم هیستدین دکربوکسیلاز ساخته و ذخیره می‌شود. از سلول‌های دیگری که هیستامین در آنها ساخته می‌شود می‌توان به نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T و سلول‌های دندریتیک اشاره کرد. اعمال زیستی گوناگونی را به هیستامین نسبت می‌دهند و آن هم به علت تنوع در گیرنده‌های این ماده در سطح سلول‌ها و راه‌های داخلی فعال‌سازی متفاوت می‌باشد(۷ و ۶). هدف این مطالعه بررسی اثر هیستامین سلول‌های دندریتیک پالس شده با پروتئین بازی میلین و پاسخ سلول‌های T اتولوگ در شرایط in vitro بود.

1-Multiple Sclerosis (MS)
2-Myelin Basic Protein (MBP)
3-Tolerogenic Denderitic Cells (TDC)

Archive of SID

www.SID.ir

روش بررسی

این مطالعه تجربی در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام شد. تمام مراحل انجام آزمایش زیر هود لامینارانجام گرفت. ابتدا سلول‌های تک هسته ای خون محیطی از نمونه خون افراد ۵ نفر داوطلب، استخراج شد. برای این منظور مقدار ۵۰ سی سی خون هپارینه با ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 رقیق گردید. سپس خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکولی که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت و مجموعه خون رقیق شده و فایکول با سرعت ۸۰۰ گرم به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده جمع شده بودند به آرامی‌جمع آوری گردید و سلول‌های به دست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط شده و با سرعت ۴۵۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط شده و این بار به منظور حذف پلاکت‌ها با سرعت ۲۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دست آمده با استفاده از تریپان بلو تعیین گردید(۸).

سلول‌های حاصل به تعداد ۴×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر خون و به مقدار ۵ میلی‌لیتر در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر استرمتومایسین و ۱۰ درصدFBS [1] به مدت ۲ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد،۵ درصد دی‌اکسید کربن و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند، با دو بار شستشوی آرام جدا شده و از فلاسک خارج گردیدند و به سلول‌های جدید که اکثریت آنها را مونوسیت‌ها تشکیل می‌دادند، محیط کشت جدید به همراه GM-CSF به میزان ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر به علاوه IL-4 به میزان ۵۰۰ واحد بر میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۷ روز کشت داده شدند. در روز سوم مجدداً مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به فلاسک‌های حاوی سلول اضافه شد. در روز چهارم به محیط کشت ۵۰۰ سی‌سی عامل بلوغ MCM [2] به گروه کنترل و MCM به عالوه هیستامین ۱۰ میکرومولار به گروه‌های تیمار اضافه گردید. در روز پنجم آزمایش پپتید MBP (AnaSpec co-USA) به میزان ۱۰ میکرومولار به محیط کشت اضافه شد. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک برداشت شدند و از نظر مر فولوژی، فنوتیپ و قدرت تحریک تکثیرلنفوسیت‌های T و میزان ترشح سایتوکاین‌های IL-10 و IL-12 به وسیله کیت الایزا (PerProtech co-USA) مورد سنجش قرار گرفتند. در حین مراحل انجام آزمایش فنوتیپ سلول‌های دندریتیک تولید شده از لحاظ بیان مولکول‌های CD83، HLA-DR، CD14 با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد نشان گرهای سطحی (DAKOCO,Denmark) دستگاه

1- Fetal Bovin Serum.(FBS)
2- Monocyte Condition Medium (MCM)

Archive of SID

www.SID.ir

فلوسایتومتری FACScalibor (Becton-Dickinson. USA) سنجش شده و نتایج حاصل با نرم‌افزار CellQuest آنالیز شد. توانایی فاگوسیتوز سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بید لاتکس فلورسانت کونژوکه با FITC (Sigma CO , USA) و دستگاه فلوسایتومتری در روز هفتم آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفت.

پس از برداشت سلول‌های دندریتیک، سوسپانسون سلولی ۱×۱۰^{۵} از سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و گروه تیمار تهیه شده و به نسبت ۱/۱۰ از آن با لنفوسیت‌های T در پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت مجاورسازی شدند. این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. هم‌چنین از محیط کشت RPMI 1640 به عنوان بلانک در سه چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شد. برای هر گروه کنترل و تیمار سه تکرار گذاشته شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوبه در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن به هر یک از چاهک‌ها ۲۵ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT (۳-۵، ۴ - دی میتیل تیازول ۲- ایل ۵، ۲ دی فنیل تترازولیوم بروماید) در بافر افزوده شد و به مدت ۴ ساعت دیگر در شرایط مشابه انکوبه شد تا در این مدت سلول‌های زنده و در حال تکثیر با ماده MTT تشکیل فورمازون دادند و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول در آمدند. سپس میزان شدت رنگ در طول موج ۴۹۰nm تعیین شده و شاخص تحریک بر اساس فرمول مربوطه محاسبه شد(۸).

توانایی فاگوسیتوز سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفاده از بید لاتکس فلورسنت کونژوکه با FITC (Sigma Co,USA) و دستگاه فلوسایتومتری در دو حالت نابالغ (روزپنجم) و حالت بالغ (روز هفتم) مورد ارزیابی قرار گرفت. این توانایی به صورت میزان درصد فاگسیتوز سلول‌های دندریتیک و با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه شد(۸).

میزان ترشح سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γ به وسیله لنفوسیت‌های T که با سلول‌های دندریتیک تحریک شده‌اند به کمک کیت الایزا سنجش شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS [۱] و آزمون‌های آماری تی دانشجویی[۲] و آنالیز واریانس یک طرفه[۳] تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصله، میزان بیان CD14 از مقدار۸/۳±۰/۱۷ در گروه کنترل به مقدار۷/۲±۰/۱۱ در گروه تیمار کاهش پیدا کرد و اختلاف معنی‌دار نبود. میزان بیان مولکول CD83 از۱۵/۳±۰/۶۴ در گروه کنترل به مقدار ۲۴/۳±۰/۵۷ در گروه تیمار افزایش معنی‌داری یافت(p=۰/۰۱). میزان بیان شاخص بلوغ HLA-DR در گروه تیمار(۲۶/۳±۳/۶۶ درصد) نیز به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل(۳۸±۳/۰۷ درصد) افزایش یافت(p=۰/۰۰۴). میزان ترشح IL-12

1-Statistical Package for Social Sciences
2- Student's T-Test
3-One Way ANOVA

Archive of SID

www.SID.ir

در گروه تیمار کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<0/05$). در ارتباط با ترشح IL-10 گروه تیمار افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<0/05$). میزان ترشح سایتوکاین IFN-γ و IL-4 از لنفوسیت‌های T، که به وسیله سلول‌های دندریتیک گروه کنترل و تیمار تحریک شده به ترتیب ۴/۱۵±۰/۳۶ ، ۱/۲±۰/۲۳ و ۱±۰/۴۹، ۲/۴۶±۰/۱۸ بود که تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($p>0/05$). میزان ترشح سایتوکاین IL-17 در تمامی گروه‌ها کمتر از ۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود، و بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت(جدول ۱).

نتایج فلوسایتومتری به دست آمده نشان داد که میانگین درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه خواری انجام داده‌اند در مورد گروه کنترل در حالت نابالغ (روز پنجم) ۱/۱±۳۲/۲ درصد بود و در حالت بالغ این مقدار به ۰/۰۸ ± ۲/۱۶ درصد کاهش یافت($p<0/05$). هم چنین در مورد گروه تیمار با هیستامین، درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه‌خواری انجام داده‌اند، در حالت نابالغ ۱/۱۵±۳۰/۲ درصد بوده است و این مقدار در حالت بالغ به ۰/۶۱±۵/۲ درصد کاهش یافته است($p<0/05$)، اما بین گروه کنترل و تیمار با هیستامین در هر دو حالت بالغ و نابالغ تفاوت معنی‌داری مشاهد نشد.

در کنار این تغییرات، نتایج تست MTT حاکی از عدم تغییر در میزان تکثیر لنفوسیت‌های کشت داده شده در مجاورت سلول‌های دندریتیک گروه تیمار با هیستامین در قیاس با گروه کنترل بود. شاخص تحریک لنفوسیت‌های T حاصل از تست MTT در گروه تیمار با هیستامین ۰/۱±۱/۳۷ بود که در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۵±۱/۴۱) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد($p=0/8$).

هم‌چنین مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده به وسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نماهای مختلف بررسی شد و مشاهده شد که اندازهٔ این سلول‌ها بزرگ‌تر از مونوسیت‌های اولیه بوده و زوائد سیتوپلاسمی پیدا کرده بودند. با گذشت زمان روند کنده شدن سلول‌های چسبنده و بزرگ شدن اندازه‌های آن‌ها و افزایش تعداد زوائد سیتوپلاسمی ادامه یافت.

جدول ۱: مقایسه میانگین و انحراف‌معیار شاخص‌های بررسی شده سلول‌های دندریتیک در گروه‌های کنترل و تیمار شده با هیستامین

متغیر / گروه	کنترل	تیمار با هیستامین	سطح معنی‌داری
CD14(درصد)	۸/۳ ±۰/۱۷	۷/۲ ±/۱۱	۰/۱۹
CD83(درصد)	۱۵/۳ ±۰/۶۴	۲۴/۳ ±۰/۵۷	۰/۰۱
HLA-DR(درصد)	۲۶/۳ ±۳/۶۶	۳۸ ±۳/۰۷	۰/۰۰۴
IL-12(نانوگرم بر میلی لیتر)	۳/۴ ±۰/۱۶	۰/۸ ±۰/۰۲۴	۰/۰۲۴
IL-10(نانوگرم بر میلی لیتر)	۴ ±۰/۱۴	۷/۲ ±۰/۲۴	۰/۰۰۳
IFN-γ(نانوگرم بر میلی لیتر)	۴/۱۵ ±۰/۳۶	۱/۲ ±۰/۲۳	۰/۰۰۱
IL-4(نانوگرم بر میلی لیتر)	۱ ±۰/۴۹	۲/۴۶ ±۰/۱۸	۰/۰۲
IL-17(نانوگرم بر میلی لیتر)	۱/۶±۰/۲	۱/۸±۰/۲	۰/۰۵

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

سلول‌های دندریتیک به دلیل مجموعه وسیعی از کاربردهای بالقوه در زمینه تقویت پاسخ‌های ایمنی و یا کنترل آن‌ها، نظر محققین مختلف را به خود جلب نموده است. شناخت روش‌های جداسازی، تولید و القای بلوغ در این سلول‌ها در in-vitro، نه تنها کاربردهای زیادی در زمینه ایمنی درمانی انواع مختلف بیماری‌ها از جمله بیماری‌های عفونی، سرطان‌ها و اختلالات سیستم ایمنی همچون بیماری‌های خود ایمن دارد، بلکه امکان درک بیشتر مکانیسم‌های حاکم بر سیستم ایمنی در in-vitvo را نیز فراهم می‌آورد. بنابراین شناسایی عوامل ناشناخته القاء کننده بلوغ نه تنها در گسترش فهم ما از بیولوژی این سلول‌ها درIn-vivo مفید می‌باشد، بلکه در روش‌های ایمونوتراپی به عنوان ابزاری برای القای بلوغ در سلول دندریتیک نابالغ تیمارشده با پپتید مهم است(۱۰ و۹). هدف این مطالعه بررسی اثر هیستامین سلول‌های دندریتیک پالس شده با پروتئین بازی میلین و پاسخ سلول‌های T اتولوگ در شرایط in vitro بود.

در بررسی فنوتیپ سطحی سلول‌های دندریتیک در میزان بیان شاخص CD14 در گروه تیمار شده، هیستامین نسبت به گروه کنترل تغییری مشاهده نشد. در حالی که بیان مولکول‌های CD83 و HLA-DR بر سطح سلول‌های تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. کاتو[1](۲۰۰۵)نشان داد که هیستامین باعث افزایش قابل ملاحظه مولکول‌های MHC کلاس ۲ (HLA-DR) در فنوتیپ سلول‌های دندریتیک در روز ششم کشت این سلول‌ها در محیط کشت می‌شود، از طرف دیگر این ماده باعث تولید سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیتی می‌شود که CD14 را بیان می‌کنند، اما در میزان بیان CD83 نسبت به گروه کنترل تغییری حاصل نمی‌شود(۱۱). در مطالعه دیگری مازونی و همکاران[2](۲۰۰۱) گزارش کردند که هیستامین اثری برفنوتیپ سلول‌های دندریتیک ندارند(۱۲). تفاوت‌های فنوتیپی سلول‌های دندریتیک تیمار شده با هیستامین در مطالعه حاضر و مطالعات فوق احتمالاً به دلیل؛ تنوع در تعداد و مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی گیرنده‌های هیستامین در سطح سلول‌های دندریتیک، پاسخ این سلول‌ها به تحریکات حاصل از هیستامین نیزمتنوع می‌باشد و تحریک سلول‌های دندریتیک به وسیله پروتئین بازی میلین می‌تواند، عملکرد و پاسخ این سلول‌ها به عوامل بلوغ را تا حد زیادی دچار اختلال کند(۱۳ و۱). از آنجای که این تحریک فقط درمطالعه حاضر صورت گرفته، می‌تواند این اختلاف را توجیه کند.

میزان ترشح سایتوکاین IL-12 در گروه تیمار کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد، در حالی که سایتوکاینIL-10 در گروه تیمار افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. میزان ترشح IL-4 در مایع رویی کشت توأمان

1-Katoh
2- Mazzoni et al

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌هایدندریتیک و T اتولوگ آن در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. میزان ترشح IFN-γ در آن مایع نیز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش را نشان می‌دهد. در مورد میزان توانایی فاگوسیتوز سلول‌های دندریتیک بین گروه کنترل و تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. دررابطه با شاخص تحریک سلول‌های T اتولوگ حاصل از تست MTT نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و کنترل مشاهده نشد. در این ارتباط در مطالعه‌های مختلفی نتایج مشابهی با یافته‌های این مطالعه گزارش شد(۱۵-۱۳ و۷).

نشان داده شده که هیستامین با اثر بر دو نوع گیرنده خود H1R و H4R در سطح سلول‌های دندریتیک باعث پلاریزاسیون پاسخ لنفوسیت‌های T به سمت Th2 در آزمون MLR [1] با این سلول‌ها می‌شود و همچنین اشاره داشتند که این اثر به همراه افزایش ترشح سایتوکاین IL-10 و کاهش IL-12 از سلول‌های دندریتیک، ناشی از افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی (آزاد شده از کلسیم ذخیره شده در داخل سلول) می‌باشد(۱۵).

نقش سایتوکاین IL-10 به عنوان یکی از مکانیسم‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی در واکنش‌های التهابی و خود ایمن از طریق مهار فسفوریلاسیون تیروزین CD28 و در نتیجه انسداد انتقال پیام از طریق این شاخص اعمال می‌شود. سایر مکانیسم‌های سرکوب کنندهٔ سیستم ایمنی عبارت از سایتوکاین TGF-β و مولکول‌های سطحی متنوعی از قبیل CTLA4 و PD-1 می‌باشند(۱۶).

IL-10 به طور عمده به وسیله ماکروفاژهای فعال شده و لنفوسیت‌های T تنظیمی تولید می‌شود، هم‌چنین این سایتوکاین به وسیله سلول‌های دندریتیک تنظیمی‌ترشح می‌شود که باعث القای لنفوسیت‌های T تحریک نشده به سمت لنفوسیت‌های T تنظیمی(Treg) می‌شود(۱۷).

به نظر می‌رسد که هیستامین به طور قابل توجهی سبب تغییر پروفایل سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های دندریتیک پالس شده با MBP (به عنوان مدل آزمایشگاهی بیماری MS) از IL-12 به سمت IL-10 شده و کشت آنها در مجاورت با سلول‌های T بکراتولوگ زمینه را جهت هدایت پاسخ این سلول‌ها به سمت TH2 فراهم آورده و باعث کاهش ترشح سایتوکاین پیش التهابی IFN-γ (منتج از TH1) وافزایش IL-4 می‌شود. به عبارت دیگر باعث افزایش نسبت IL-4/IFN-γ در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل شده است که این خود می‌تواند به کاهش آسیب های حاصل از حمله سلول‌های خود واکنشگر TH1به سیستم عصبی منجرشده و مانع از وخیم‌تر شدن بیماری شود. مقادیر ناچیز IL-17 یافت شده در این مطالعه ممکن است به علت فقدان عوامل لازم جهت القای TH17 و ترشح سایتوکاین منتج از آن در محیط کشت باشد.

1-Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

در رابطه با تیمار حاوی هیستامین آنچه بیش از همه مورد توجه قرار گرفت، تغییر در پروفایل سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های دندریتیک می‌باشد که باعث افزایش IL-10 و کاهش IL-12 شده است و تغییرات در فنوتیپ سلول‌های دندریتیک اگر چه نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ولی این تغییرات از شدت کمتری نسبت به تغییر در سایتوکاین‌های مترشحه برخوردار بود. به نظر می‌رسد هیستامین قادر به تغییر در سایر عملکردهای سلول دندریتیک پالس شده با MBP از قبیل قدرت تحریک سلول‌های T و قدرت فاگوسیتوزآن نمی‌باشد. تحقیقات در آینده می‌بایست بر تدوین یک روش آزمایشگاهی با استاندارد جهانی و کنترل دقیق کیفی بر تهیه سلول‌های دندریتیک به منظور تولید واکسن‌هایی با پایه سلول دندریتیک در جهت مقابله با انواع بیماری‌ها از جمله بیماری‌های خود ایمن متمرکز شود. بدیهی است بررسی عوارض احتمالی این واکسن‌ها با پایه سلول دندریتیک نیازمند آزمایش‌هایی در سطح in-vivo می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه منتج از پایان نامه دکتری تخصصی ایمنی شناسی مصوب دانشگاه ارومیه بود که با کمک پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

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

2.Goverman J. Autoimmune T cell responses in the centeral nervous System. Nat Rev Immunol 2009; 3: 292-407.

3.O'Connor RA, Taams LS, Anderton SM. 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): 137-47.

4.Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. Ann Rheum Dis 2007; 66(3): 87-90.

5.Kalantari T, Kamali-Sarvestani K, Ciric B, Karimi MH, Kalantari M. Faridar A, et al. Generation of immunologic and toleorogenic cilinical-grade denderitic cells. Immuno Res 2011; 51: 153-60.

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; 10: 1189/jlb.0910486 .

7.Caron G, Denlneste Y, Roelandts E, Duez C, Bonnefoy JY, Pestel A, at al. Histamine polarizes human denderitic cells. J Immunol 2001; 167: 3682-6.

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 MT, Angus W. TDenderitic cell , Biology and clinical Application. 2nd ed. Academic Press: USA; 2001; 575-95.

10.Granucci F, Ferrero E, Foti M. Eeary events in denderitic cell maturation induced by LPS. J Microbes Infect 1999; 1: 1079- 84.

11.Katoh N. Influence of histamine on monocyte-derived denderitic cells. Mod. Asp Immnuobiol 2005; 17: 16-24.

12.Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Vistin A, Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing denderitic cells, resulting in Altered T cell polarization. Cli Invest 2001; 108(12): 1865-73.

13.Mahony LO, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by Histamine and histamine receptors. J Allergy Cun Immunology 2011; 128: 1153-62.

14.Amaral MM, 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: 3425-33.

15.Geng S, Gao YD, sYang J, Zou JJ, Guo W. Potentional role of store-operated Ca^{2+} entery in Th2 response induced by histamine in human monocyte-derived denderitic cells. Int Immuopharmacol 2011; 12: 358-67.

16.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 . Immunology 2006; 117: 433-42.

17.Petka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interlukine -10 and related cytokines and receptors. Annu Rev Immunol 2004; 22: 929-79.

Archive of SID

www.SID.ir

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Histamine on Dendritic Cells Pulsed with Myelin Proteins and Autologous T Cell Response in Vitro

Mohebalian H[1]*, Dalirezh N[2], Morshedi A[3]

[1]Departmant of microbiology, Urmia University, Urmia,Iran, [2]Department of Pathobiology, Urmia University, Urmia,Iran, [3]Department of Immunology, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 12 Dec 2012 Accepted: 19 Feb 2013

Abstract

Background & aim: The role of dendritic cells in the immune responses has led to the application of these cells in autoimmune diseases such as multiple sclerosis. The aim of this study was to investigate the effect of histamine on dendritic cells pulsed with myelin proteins and autologous T cell response in vitro.

Methods: In this experimental study, blood samples were taken from 5 volunteers. Subsequently, peripheral blood mononuclear cells were isolated by using Phicole Hypaque. Using GM-CSF cytokine and IL-4, dendritic cells were produced from peripheral blood and then stimulated with MBP in the presence and without histamine in control and treated group to be matured. The $CD14^{+}$ and surface markers of resulted DC were evaluated by Flowcytometry. The levels of cytokines IL-10 and IL-12 in dendritic cells culture and IL-4, and IFN-γ in both cultured dendritic cells and antilogous T cells were obtained. And then the proliferation of T lymphocytes in the treatment and control groups were compared. The collected data was analyzed by Student's t-test and ANOVA.

Results: In the treatment group, the expression of CD83 (from 3/15 to 5/24%) and HLA-DR (from 3/26 to 38%) was significantly higher than the control group ($P< 0.05$). The expression of CD14 exhibited no change. The secretion of IL-10 increased and IL-12 showed a decrease. The secretion of IL-4/IFN- □ showed an increase in treated group than the control group (P □ 0/05).

Conclusion: Histamine deviation with immune responses from TH1/TH17 to the TH2 in an experimental model of MS can be used as a new method of DC-based vaccines which may be useful in treating this disease.

Key words: Denderitic Cells, Myelin Basic Protein (MBP), Histamine, Multiple sclerosis (MS)

*Corresponding Author: **Mohebalian H,** Departmant of microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia,Iran
Email: DR.mohebalian@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir