مجله دیابت و لیپید ایران. تابستان ۱۳۸۵؛ دوره ۵ (شماره ۴):۳۰۸-۲۹۹

رویکردی جدید در درمان بیماری دیابت خودایمن وابسته به انسولین با استفاده از سلول‌های دندریتیک تیمار شده با اینترلوکین ۱۰ (IL-10)

ناصر اقدمي[۱]، سيد محمد موذني[۱*]

چکیده

مقدمه: ديابت وابسته به انسولين، يك بيماري خود ايمن به واسطه فعاليت سلول‌هاي T خود واكنشگر عليه سلول‌هاي بتاي جزاير لانگرهانس كبدي مي‌باشد. سلول‌هاي دندريتيك (DCs) مي‌توانند در صورت قرار گرفتن در محيط‌هاي سايتوكيني متفاوت، عملكرد تحريكي و يا تنظيمي سلول‌هاي T را القا نمايند.

روش‌ها: در مطالعه حاضر، ابتدا سلول‌هاي دندريتيك با استفاده از GM-CSF و IL-4 از سلول‌هاي بنيادي مغز استخوان موش توليد شده و بعد از تيمار شدن با IL-10 و يا LPS با پپتيد انسولين بارگذاري شده و از نظر شاخص‌هاي بلوغ و همچنين توليد سلول‌هاي T تنظيمي و القاي توليد سايتوكين‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند.

يافته‌ها: نتايج نشان مي‌دهند كه ميزان بروزMHC class II بر روي سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با IL-10 كمتر از سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با LPS (۷۲ درصد در مقابل ۹۳ درصد، ($P < ۰/۰۴$) مي باشد. هرچند سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با IL-10 قادر به القاي تكثير سلول‌هاي T بودند، ولي مقايسه سايتوكين‌هاي توليد شده در دو گروه نشان مي‌دهد كه در گروهي كه با IL-10 تيمار شده بودند، ميزان توليد IFN-γ كمتر بوده ($P < ۰/۰۲$).

نتيجه‌گيری: استفاده از سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با IL-10، مي‌تواند در درمان و پيشگيري از ديابت خود ايمن موثر باشد اما براي بررسي بيشتر اين كارايي لازم است سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با اين سايتوكين در مدل‌هاي حيواني ديابتي مورد استفاده و آزمون قرار گيرند.

واژگان کلیدی: ديابت خود ايمن، سلول‌هاي دندريتيک، IL-10

۱- گروه ايمونولوژي، دانشگاه تربيت مدرس

* نشانی: گروه ايمونولوژي، دانشكده علوم پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، صندوق پستي: ۱۱۱-۱٤۱۱۵؛ نمابر:۸۸۰۰٦۵٤٤؛
پست الكترونيك: moazzeni@dr.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۷/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۴/۲۰

مقدمه

عامل ايجاد ديابت نوع يك وابسته به انسولين، سلول‌هاي T خود واكنشگر مي‌باشند كه باعث تخريب سلول‌هاي β توليد كنندهٔ انسولين در جزاير لانگرهانس پانكراس مي‌گردند. راهبرد رايج در درمان ايمونولوژيك اين بيماري، غير فعال كردن سلول‌هاي T خود واكنشگر و يا ايجاد سلول‌هاي تنظيمي براي مهار بيماري مي‌باشد[۱]. مطالعات تجربي نشان مي‌دهند كه استفاده از آنتاگونيست‌هاي گيرنده‌هاي سلولهاي T، مي‌تواند در پيشگيري از اين بيماري مفيد باشد. مطالعات باليني نيز استفاده از آنتي‌بادي‌هاي مونوكلونال و يا داروهاي سركوب كننده ايمني همانند سيكلوسپورين A را اميدوار كننده نشان مي‌دهند،[۲]، ولي عوارض مصرف اين داروها مشكلي است كه بايد در استفاده از آنها مدنظر باشد به ويژه آن كه اين بيماران معمولاً عملكرد كليوي مناسبي ندارند.

نقش حياتي سلول‌هاي دندريتيك (DC) در ايجاد پاسخ‌هاي ايمني كاملاً شناخته شده و امروزه سلول دندريتيك به عنوان يك سلول عرضه كنندهٔ قوي آنتي‌ژن در تحريك سلول‌هاي T دست نخورده مطرح است[۳و۴]. سلول‌هاي دندريتيك، حداقل داراي دو مرحله تكاملي شامل سلول‌هاي دندريتيك نابالغ و سلول‌هاي دندريتيك بالغ مي‌باشند. سلول‌هاي نابالغ توانايي زيادي براي فاگوسيتوز و پينوسيتوز آنتي‌ژن دارند در حالي كه سلول‌هاي بالغ، قدرت بالايي در تحريك سلول‌هاي T دارند. عوامل بلوغ متفاوتي همچون ليپوپلي‌ساكاريد باكتريايي (LPS)، عامل نكروز توموري TNF-α، DNA حاوي CpG غير متيله، اينترفرون گاما IFN-γ و يا اتصال ليگاند CD40 به مولكول CD40 مي‌تواند سلول‌هاي دندريتيك نابالغ را به سلول‌هاي دندريتيك بالغ تبديل نمايد [۵].

از آنجايي كه مراحل بلوغ و نحوهٔ بلوغ سلول‌هاي دندريتيك مي‌تواند بر پاسخ‌هاي ايمني ايجاد شده توسط سلول‌هاي T موثر باشد، بنابراين به نظر مي‌رسد سايتوكين‌هاي بالغ كننده، ميزان آنتي‌ژن و ميزان سيتوكين IL-12 محيط از جمله عواملي باشند كه ايجاد پاسخ Th1 و يا Th2 توسط سلول‌هاي دندريتيك را هدايت مي‌كنند [۹-۶].

اينترلوكين۱۰ (IL-10)، يك سايتوكين تنظيم كننده ايمني است كه مي‌تواند بر روند بلوغ سلول‌هاي دندريتيك در انسان و موش تأثيرگذار باشد. مشاهده شده كه سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با IL-10 ميزان IL-12 كمتري ترشح مي‌كنند [۱۳-۱۰]. درحالي كه سلول‌هاي دندريتيك طحالي تيمار شده با IL-10، باعث ايجاد پاسخ‌هاي Th2 مي‌شوند، سلول‌هاي دندريتيك مشتق از مغز استخوان كه با IL-10 تيمار شده‌اند، در عرضه آنتي‌ژن به سلول‌هاي T دچار نقص مي باشند [۱۴]. سلول‌هاي دندريتيك انساني تيمار شده با IL-10 ضمن كاهش قدرت تحريكي سلول‌هاي T [۱۵]، باعث ايجاد سلول‌هاي T مقاوم به تحريك نيز مي‌شوند [۱۸-۱۶]. همچنين تيمار پيش‌سازهاي سلول‌هاي دندريتيك انساني با IL-10 مي‌تواند تبديل آنها به ماكروفاژ را تسهيل نمايد [۱۹]. بنابراين IL-10 داراي اثرات شناخته شده و ناشناخته متفاوتي بر روي سلول‌هاي دندريتيك مي‌باشد. در اين مطالعه اثرات IL-10 در مهار بلوغ سلول‌هاي دندريتيك مشتق از مغز استخوان موش مورد بررسي قرار گرفته و اين اثر در مهار پاسخ‌هاي ايمني ايجاد شده عليه پپتيد انسولين كه در ايجاد IDDM تجربي موثر مي‌باشد نيز به صورت اختصاصي مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش‌ها

در اين مطالعه از موش‌هاي C57BL/6 ماده ۶ تا ۸ هفته‌اي تهيه شده از انيستيتو پاستور استفاده شد.

براي كشت سلول‌ها از محيط RPMI (Gibco) حاوي ۱۰% FBS (Gibco)، ۱۰۰U/ml پني‌سيلين(Gibco)، ۱۰۰ μg/ml استرپتومايسين(Gibco) و سديم پيروات (Sigma) استفاده شد. در توليد و تيمار سلول‌هاي دندريتيك سايتوكين‌هاي mrGM-CSF(R&D)، mrIL-4(R&D)، mrTNF-α (Bender Med) و mrIL-10 (Bender Med) مورد استفاده قرار گرفتند. آنتي‌بادي‌هاي مورد استفاده عبارت بودند از antiCD11c(PE-conjugated) براي بررسي ميزان خلوص سلول‌هاي دندريتيك، anti CD11b(FITC-conjugated) و anti CD8α(PE-conjugated) براي بررسي زير گروه‌هاي سلول‌هاي دندريتيك توليد شده و آنتي‌بادي‌هاي -anti

anti CD40(PE-،MHC class II I-A^{E}(FITC-conjugated) conjugated) و anti CD86(PE-conjugated) براي مطالعة ميزان بلوغ سلول‌ها. از آنتي بادي anti-CD3(PE-conjugated) نيز براي بررسي ميزان خلوص سلول‌هاي T استفاده گرديد. كليه آنتي‌بادي‌ها از شركت BD Biosciences تهيه گرديدند.

براي جدا كردن سلول‌هاي مغز استخوان موش، ابتدا حيوان با استفاده از بيهوشي و قطع نخاع كشته شده و بعد از ثابت نمودن حيوان در ظرف تشريح پوست ناحيه شكم و ران‌ها باز شد. بعد از بريدن عضلات اين ناحيه، استخوان‌هاي فمور و تيبيا آزاد شده و استخوان جدا گرديد. سپس بافت ماهيچه‌اي اطراف استخوان‌ها كاملاً جدا گرديد و استخوان‌ها به مدت ۲ دقيقه در ۵ cc الكل ۷۰% قرار گرفتند تا ميكروب زدايي گردند. در اين مرحله، استخوان‌ها بعد از ۲ بار شستشو با PBS استريل، در پتري‌ديش ۶۰mm حاوي ۱۰cc از محيط كشت قرار داده شدند. سپس يك طرف از استخوان‌ها با استفاده از قيچي بريده شد و با استفاده از يك سرنگ ۲cc با سرسوزن ۰/۲۵ ميلي‌متري و با تزريق محيط كشت سلول‌هاي مغز استخوان با استفاده از فشار مايع (Flush out) از استخوان خارج شده و سلول‌ها بعد از پيپتاژ به مدت ۱۰ دقيقه در ۲۸۰g سانتريفوژ گرديدند. گلبول‌هاي قرمز با استفاده از آمونيوم كلرايد (۲ دقيقه در دماي اتاق) ليز شده و يك سوسپانسيون سلولي ۱×۱۰^{۶} در محيط RPMI كامل تهيه گرديد.

براي كشت سلول‌هاي مغز استخوان، ۵ ميلي‌ليتر از سوسپانسيون سلولي تهيه شده در مرحله قبلي به داخل فلاسك كشت ۲۵cm^{2} منتقل گرديد، سپس ۱۰۰۰U/ml از سايتوكين rmGM-CSF و ۵۰۰u/ml از سايتوكين rmIL-4 اضافه شد. فلاسك‌ها در شرايط ۳۷°C و ۵% CO2 انكوبه شده و هرسه روز يك بار بدون آن كه تكان شديدي به فلاسك‌ها وارد شود، ۷۵% از مايع رويي سلول‌ها برداشته و با محيط تازه حاوي سايتوكين‌هاي قيد شده جايگزين گرديد. ادامه اين كار تا روز ششم، سلول‌هاي مغز استخوان را به سلول‌هاي DC نابالغ تبديل مي‌نمايد. در ادامه مطالعه از اين سلول‌ها براي ايجاد DC هاي بالغ استفاده گرديد.

اينتركولين ۱۰ در اين مطالعه بر اساس گزارش Haase و همكارانش [۲۰]، در روز ششم و به ميزان ۵۰۰U/ml به محيط كشت سلولها اضافه گرديد. به اين صورت كه روز ششم۹۰% از محيط كشت جمع‌آوري شد و سلول‌هاي آن بعد از سانتريفوژ كردن، در محيط حاوي سايتوكين IL-10 به صورت سوسپانسيون در آمدند و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه و ۵% CO_2 انكوبه شدند. براي گروه كنترل، از LPS (۱ ميكروگرم در هر ميلي‌ليتر) استفاده شد. بعد از اثر دادن سايتوكين‌ها، براي جداسازي DC هاي توليد شده، سلول‌ها روي ستوني از محلول متروزآميد ۱۳/۷% قرار گرفتند و بعد از سانتريفوژ در ۶۰۰g و در دماي اتاق، سلول‌هاي با دانسيته كم از سطح متروزاميد جمع‌آوري شدند.

پپتيد انسولين، يكي از پپتيدهايي است كه در صورت استفاده از آن به همراه Polyinosinic-Polycytidylic acid (poly I/C)، مي‌تواند ايجاد ديابت خودايمن نمايد. بنابراين براي بارگذاري آنتي‌ژن از پپتيد انسولين Insulin 2B chain peptide B: 9-23(SHLVEALYLVCGERG) تهيه شده توسط شركت آرياژن استفاده شد؛ به اين ترتيب كه روز هشتم سلول‌ها به مدت ۶-۴ ساعت با ۱۰۰μg/ml از پپتيد انسولين انكوبه شدند.

بررسي فلوسايتومتري با هدف بررسي ميزان خلوص DCs و يا ساير سلول‌هاي جدا شده همانند سلول‌هاي T، بررسي فنوتيپي DCها از نظر بلوغ و بررسي فنوتيپي DCها از نظر نوع عملكرد (DC1 يا DC2) انجام گرديد. از آنجايي كه اين مطالعه بر روي موش انجام گرفته، براي بررسي خلوص DCs از دو شاخص CD11c و MHC-II استفاده گرديد. براي بررسي ميزان بلوغ نيز از شاخص‌هاي CD86 و CD40 استفاده شد. بعد از اثر دادن سايتوكين‌هاي IL-10 و LPS، براي بررسي زير گروه‌هاي بوجود آمده، از شاخص‌هاي CD8α و CD11b استفاده شد. قابل اعتمادترين شاخص شناخته شده براي افتراق سلول‌هاي دندريتيک لنفوييدي و ميلوييدي در موش CD8α مي‌باشد كه به صورت همودايمر بر روي سلول‌هاي DC لنفوييدي بيان مي‌گردد و سلول‌هاي DC ميلوييدي آن را بيان نمي‌كنند. مولكول CD11b، بيشتر بر روي سلول‌هاي DC

ميلوييدي بيان مي‌گردد. بنابراين با مطالعه اين شاخص‌ها مي‌توان زير جمعيت القا شده از DC هاي توليد شده تحت تيمار با IL-10 و LPS را مورد مطالعه قرار داد. در هر مورد از ايزوتيپ كنترل مناسب آنتي‌بادي به عنوان كنترل منفي استفاده شد.

براي رنگ آميزي و فلوسايتومتري در خصوص هر يک از شاخص‌هاي فوق با توجه به دستورالعمل كارخانه سازنده عمل شد. به طور خلاصه و صرف نظر از نوع شاخص بكار رفته، روند كار به اين صورت بود كه ابتدا يک سوسپانسيون سلولي با غلظت $۲×۱۰^۶$ تهيه شده و سپس ۵۰ ميكروليتر از آن با ۱۰ ميكروليتر از آنتي بادي مخلوط شد و پس از ۲۰ دقيقه انكوبه شدن در حمام يخ و شستشوي سلول‌ها، نتايج با استفاده از دستگاه فلوسايتومتري Partec III سنجيده شده و با برنامه Partec Flomax آناليز گرديد.

براي بررسي عملكرد تكثيري سلول‌هاي T و سنجش ترشح سايتوكين‌ها، ابتدا سلول‌هاي DC تيمار شده با سيتوكين IL-10 كه با آنتي‌ژن نيز بارگذاري شده بودند. با PBS مخلوط شده و سوسپانسيون سلولي($۲/۵ ×۱۰^۶$ سلول در هر ميلي ليتر) تهيه گرديد. مقدار ۱۰۰ ميكرو ليتر از اين سوسپانسيون در هر كف دست موش تزريق شده و ۵ روز بعد، غدد لنفاوي براكيال جدا و سلول‌هاي تک هسته‌اي آنها جمع‌آوري شد.

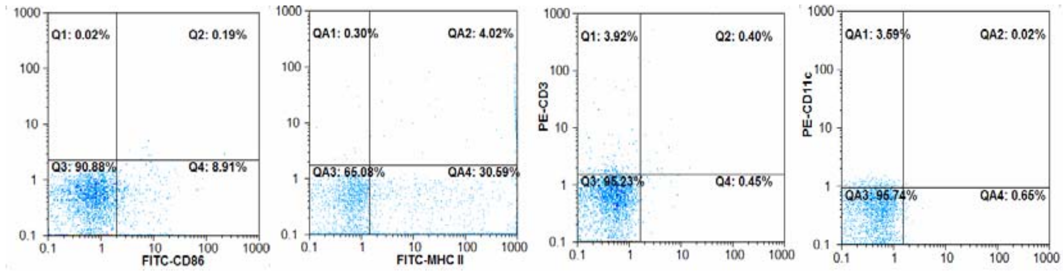
سلول‌ها در محيط كشت حاوي ۱% سرم موش در حفرات پليت كشت ۹۶ خانه‌اي، به طور مجدد با پپتيد انسولين تحريک شده و بعد از ۵۶ ساعت انكوباسيون با اضافه نمودن تيميدين راديواكتيو، ميزان تكثير سلول‌ها اندازه‌گيري شد. به حفرات كنترل، پپتيد اضافه نگرديد. براي سنجش سايتوكين‌هاي توليد شده، مايع رويي كشت سلول‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت جمع‌آوري شده و در ‎-۷۰°C‎ تا زمان اندازه گيري سايتوكين نگهداري گرديد. سايتوكين‌هاي مورد مطالعه شامل IL-10 و IFN-γ بوده و سنجش با روش اليزا صورت گرفت. گروه‌هاي كنترل شامل موارد ذيل بود: موش‌هايي كه به آنها DC تيمار شده با IL-10 كه با آنتي‌ژن بارگذاري نشده بود، تزريق شد. موش‌هايي كه به آنها DC تيمار شده با LPS و بارگذاري شده با آنتي‌ژن تزريق شد و موش‌هايي كه به آنها فقط PBS تزريق شد.

يافته‌ها

از ٤ استخوان فمور و تيبياي هر موش C57BL/6، بعد از ليز كردن گلبول‌هاي قرمز، حدود $۳-۵×۱۰^۷$ سلول هسته‌دار جدا شد. آناليز فلوسايتومتري اين سلول‌ها نشان داد كه تنها ۴±۰/۵ درصد سلول‌ها $CD11c^+$ ، ۳۵±۵ درصد $MHC-^+$ Class II، ۸±۲ درصد $CD86^+$ و ۳±۰/۵ درصد $CD3^+$ بودند (نمودار ۱).

مطالعه سلول‌ها با استفاده از ميكروسكوپ نوري نشان داد كه سلول‌هاي توليد شده در روز ششم ضمن اين كه نسبت به سلول‌هاي اوليه تيره‌تر هستند، داراي زوايدي در اطراف سلول نيز مي‌باشند كه معمولا كاهش دماي محيط و يا تعويض محيط باعث مي‌شود كه اين دندانه‌ها جمع شده و رويت آنها را مشكل مي‌كند.

آناليز فنوتيپ سلول‌هاي دندريتيك توليد شده از



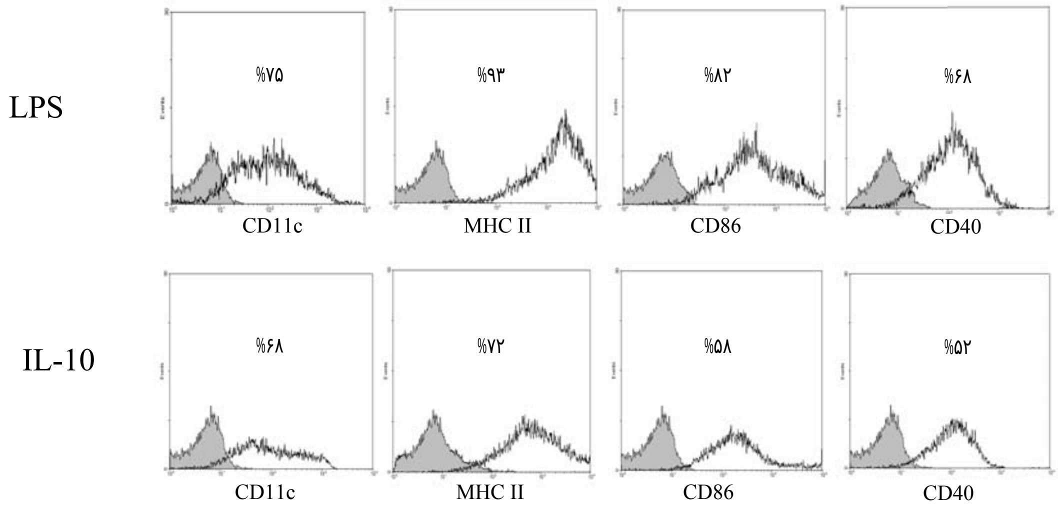
نمودار ۱- نمونه ای از نمودارهای حاصل از آنالیز فلوسیتومتری سلولهای بدست آمده از مغز استخوان

مغز استخوان موش با استفاده از فلوسايتومتري در روز ششم نشان داد كه ۵±۶۰ درصد از سلول‌ها، $CD11c^+$ مي‌باشند. ساير شاخص‌هاي مورد مطالعه به صورت دو رنگي و بر روي سلول‌هاي $CD11c^+$ (سلول‌هاي دندريتيک) مورد بررسي قرار گرفتند. نتايج حاصل نشان داد كه سلول‌هاي دندريتيک در روز ششم، ۷±۸۵% MHC $ClassII^+$، ۵±۶۷% $CD86^+$ و ٤±۳۰% $CD40^+$ بودند. سلول‌هاي دندريتيك توليد شده در اين روش فاقد شاخص CD8α بودند و تقريباً تمام سلول‌هاي $C11c^+$ كه توليد شده بودند، شاخص CD11b (DC2) را بر روي خود بروز مي‌دادند. بنابراين در اين روش تنها سلول‌هاي دندريتيك از زير گروه ميلوييدي توليد مي‌گردند كه در موش، اين گروه مي‌تواند باعث ايجاد پاسخ‌هاي ايمونولوژيك از نوع Th2 گردد.

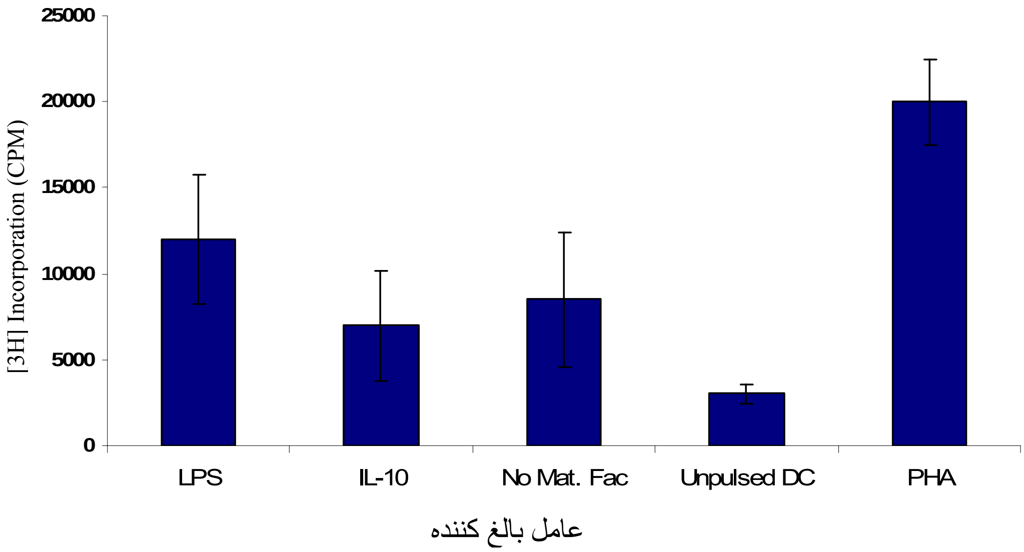
براي بلوغ سلول‌هاي دندريتيك از عوامل متعددي مي‌توان استفاده كرد. در اين مطالعه از LPS و IL-10 به عنوان عامل بالغ كننده استفاده شد. عامل بلوغ LPS علاوه بر افزايش ميزان خلوص سلول‌هاي دندريتيك، از ۵±٦۰% در روز ششم كشت به ٦±۷۵% در روز هشتم، شاخص‌هاي مربوط به بلوغ را نيز افزايش مي‌دهد به طوري كه ٤۸ ساعت بعد از اضافه كردن LPS، ٦±۹۳% سلول‌ها MHC $ClassII^+$ ، ۱۰±۸۲% سلول‌ها $CD86^+$ و ۹±٦۸% سلول‌ها $CD40^+$ بودند. البته از آنجايي كه MHC ClassII بر روي سلول‌هاي نابالغ نيز بيان مي‌شود، درصد آن تغير چنداني را نشان نمي‌دهد ولي ميزان MFI آن به طور محسوسي افزايش مي‌يابد (۲۰۵ در مقابل ۲۸۳، P=۰/۰۴۶) و اين يافته نشان مي‌دهد كه اضافه كردن عامل بلوغ، شدت بروز MHC ClassII را نيز بر روي اين سلول‌ها افزايش مي‌دهد (نمودار ۲).

اضافه كردن IL-10 بعد از روز هشتم به مدت ۴۸ ساعت، ميزان خلوص سلول‌هاي دندريتيك را به ۴±۶۸% در مقابل ۶±۷۵% بعد از اضافه نمودن LPS كاهش مي‌دهد. ساير شاخص‌ها عبارت بودند از MHC $ClassII^+$ ۹±۷۲%، $CD86^+$ ۵±۵۸% و $CD40^+$ ٦±۵۲%. مقايسه شاخص‌ها نشان مي‌دهد كه IL-10 بروز MHC class II و CD86 را بر روي سلول‌هاي دندريتيك در مقايسه با LPS به طور محسوسي كاهش مي‌دهد (P=۰/۰۴) ولي در ساير موارد تفاوت معني داري مشاهده نشد (نمودار ۲). مطالعات بيشتر نشان داد كه اضافه كردن IL-10 به محيط كشت از روز اول مي‌تواند از ايجاد سلول‌هاي دندريتيك جلوگيري كند و يك مهار كننده به شمار مي‌آيد. همچنين در صورت بالغ كردن سلول‌ها با LPS، اضافه كردن IL-10 تاثيري بر بروز شاخص‌ها ندارد (اطلاعات نشان داده نشده است).

مطالعات اندكي به بررسي در خصوص اثرات *In vivo* سايتوكين IL-10 پرداخته‌اند. در اين مطالعه براي بررسي اين اثرات سلول‌هاي دندريتيك مشتق از مغز استخوان ابتدا با IL-10 تيمار شده و سپس با پپتيد انسولين بارگذاري شدند. در مرحله بعدي اين سلول‌ها به موش تزريق شده و پس از انجام عمل عرضه آنتي ژن در محيط In vivo لنفوسيت‌هاي غدد لنفاوي استخراج شده و با تحريك مجدد سلول‌هاي T با پپتيد انسولين، ميزان تأثيرات آن مورد بررسي قرار گرفت. ميانگين ميزان تكثير سلولي در گروه‌هايي كه به آنها سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با IL-10 تزريق شده بود، معادلCPM ۷۰۰۰ (SD=۹۲۰) بود در حالي كه اين ميزان در سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با LPS حدود CPM ۱۲۰۰۰ (SD=۸۰۰) بود كه از نظر آماري تفاوت محسوسي با گروه IL-10 داشت. بنابراين هر چند سلول‌هاي تيمار شده با IL-10 قادر به تحريک سلول‌هاي T بودند، ولي شدت اين تحريک كمتر بوده است. اضافه كردن IL-10 باعث شده بود كه ميزان تكثير سلول‌هاي T حتي از زير گروهي كه در آن سلول‌هاي دندريتيک هيچ عامل بالغ كننده‌اي دريافت نكرده بودند نيز كمتر باشد (نمودار ۳).



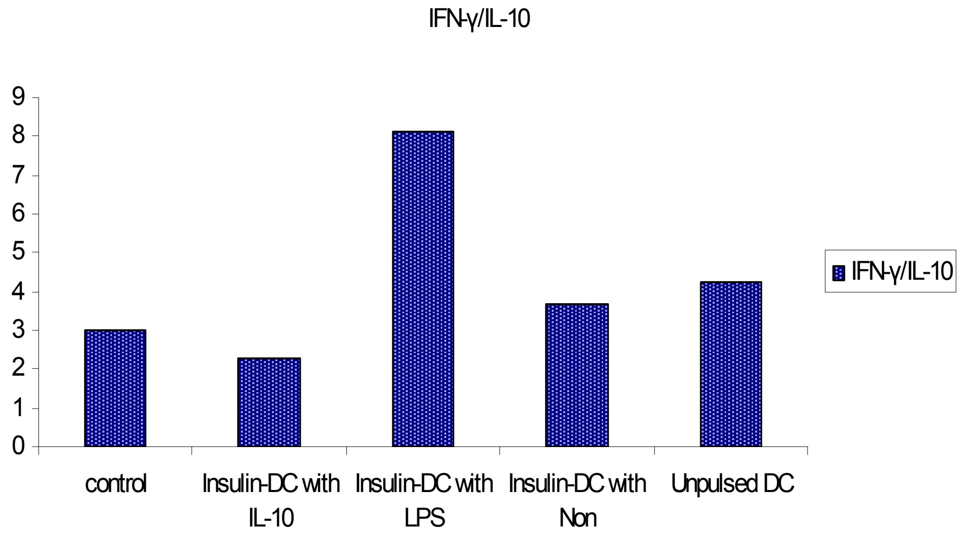
نمودار ۲- میزان بروز هر یک از شاخص‌های بلوغ بر روی سلول‌های دندریتیک بعد از اضافه نمودن عوامل بلوغ. نمودارهای خاکستری مربوط به ایزوتیپ کنترل هر یک از شاخص‌ها بر روی سلول‌های مورد مطالعه می‌باشد.



نمودار ۳- میزان تکثیر سلول‌های T در مواجهه با آنتی‌ژن در آزمون سنجش تکثیر سلول‌های T در گروه‌های مختلف سلول‌های دندریتیک تیمار شده با IL-10 و LPS گروه No Mat . Fac مربوط به سلول‌های دندریتیکی است که هیچ عامل بالغ کننده‌ای دریافت نکرده‌اند و unpulsed DC مربوط به گروهی است که با پپتید انسولین بارگذاری نشده‌اند.

براي بررسي ميزان سايتوكين‌هاي توليد شده توسط لنفوسيت‌هاي T، مايع رويي كشت سلول‌هاي T طي ۴۸ ساعت جمع‌آوري شد و با استفاده از روش اليزا مقدار اينترفرون گاما و IL-10 در آن اندازه‌گيري گرديد. سطح بسيار پايين IL-10 در هر دو گروه سلول‌هاي دندريتيك تفاوت معني‌داري را نشان نداد. اين ميزان در مورد سلول‌هاي تيمار شده با IL-10، ۱۱۰۰ پيكوگرم در ميلي ليتر و در مورد سلول‌هاي تيمار شده با LPS حدود ۸۰۰ پيكوگرم در ميلي‌ليتر بود. مقايسه مقدار اينترفرون گاما نشان مي‌دهد كه سلول‌هاي تيمار شده با LPS در مقايسه با سلول‌هاي تيمار شده با IL-10 مقدار بالاتري از اينترفرون گاما را ترشح مي‌كنند (۶۵۰۰ پيكوگرم در مقابل ۲۵۰۰

پيكوگرم) (P <۰/۰۲). در مقايسه نسبت IFN-γ/IL-10، مشخص شد كه اين نسبت بصورت معني‌داري در گروه سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با LPS بزرگتر مي‌باشد (P< ۰/۰۱). بنابراين سلول‌هاي دندريتيك تيمار شده با IL-10 پاسخ‌هاي ايمني را به طرف Th2 سوق مي‌دهند (نمودار۴).



نمودار ۴- نسبت سايتوكين‌هاي INFγ/IL10 توليد شده توسط لنفوسيت‌هاي T در گروه‌هاي مورد مطالعه تزريق شده توسط سلول‌هاي دندريتيكي كه به صورت‌هاي متفاوتي تيمار شده اند.

بحث

تماس فيزيكي بين سلول‌هاي T و DC ها براي فعال كردن سلول‌هاي T ضروري است. اتصال DC به سلول‌هاي T به واسطه چندين مولكول چسبان از دسته اينتگرين‌هاي β_2 و β_1 تحت عنوان CD50, CD54, CD2, و CD58 صورت مي گيرد [۲۱و۲۲]. حداكثر فعاليت سلول‌هاي T علاوه بر اين به سيگنال‌هاي متعدد ديگري كه از طريق سايتوكين‌هايي همچون IL-1, IL-6 و IL-12 تامين مي‌شوند نيز نياز دارد [۲۳]. وجود اين عوامل مايع از آن جهت اهميت بسزايي دارد كه تغيير ريزمحيط سايتوكيني، خود مي‌تواند در ايجاد پاسخ‌هايي از نوع Th1 و يا Th2 دخيل باشد. به عنوان مثال كشت DC هاي انساني در محيط حاوي GM-CSF + IL-3 + IFN-γ توليد مقادير بالايي از IL-12 را موجب مي‌شود، كه اين DC ها به نوبه خود با القاي توليد مقادير بالايي از IFN-γ باعث سوق دادن سلول‌هاي T به طرف پاسخ Th1 مي‌شوند در حالي كه كشت DC ها در محيط حاوي GM-CSF + IL-3 + IL-4 سلول‌هاي T را به طرف پاسخ Th2 سوق مي‌دهد [۲۴]. چنانچه مطالعه ما نشان مي‌دهد، كشت DC هاي مشتق از مغز استخوان در محيط حاوي IL-10، سلول‌هاي T را به سمت پاسخ‌هاي Th2 سوق مي‌دهد. اين اثر مي‌تواند از طريق كاهش ترشح IL-12P70 بدليل كاهش بيان CD40L اعمال گردد [۲۵].Kalinski و همكارانش در مطالعه خود بر روي ترشح و عدم ترشح IL-12 در سوق پاسخ‌هاي ايمونولوژيک به طرف Th1 و يا Th2 تأكيد دارند [۲۶]. به عنوان مثال وجـود IFN-γ, PGE_2 و IL-10 از جمله عوامل تغيير دهنده اين روند مي‌باشند.

هرچند سايتوكين‌ها به طور معمول به سايتوكين‌هاي التهابي و غيرالتهابي تقسيم‌بندي مي‌شوند، ولي به نظر مي‌رسد كه IL-10 يک سايتوكين با چندين اثر باشد كه در اين تقسيم‌بندي نمي‌توان آن را جاي داد [۲۷]. IL-10 يک محرک ثابت شده سلول‌هاي NK مي‌باشد [۲۸و۲۹]،

عملكردي كه توسط آن پاتوژن‌هاي پاک شده و آنتي‌ژن‌ها با سهولت بيشتري در اختيار سلول‌هاي عرضه كننده آنتي ژن قرار مي‌گيرند تا ارتباط بين ايمني ذاتي و ايمني اختصاصي ايجاد شود [۳۰و۳۱]. اين سايتوكين عملكرد پيش التهابي سلول‌هاي عرضه كننده آنتي ژن را با واسطة كاهش دادن بيان مولكول‌هاي كمكي و با كاهش ترشح سايتوكين‌هاي پيش التهابي و كاهش بلوغ سلول‌هاي عرضه كننده آنتي‌ژن، مهار مي‌كند. علاوه بر مهار بلوغ سلول‌هاي عرضه كنندة آنتي‌ژن، IL-10 قابليت آنها را براي برداشتن آنتي‌ژن با به تاخير انداختن مهاجرت آنها به غدد لنفاوي ثانويه، افزايش مي‌دهد [۲۷]. با اين حال عمده‌ترين اثر IL-10 كاهش التهاب مي‌باشد. در موش و انسان، IL-10 مي‌تواند آنرژي اختصاصي طولاني مدتي را در سلول‌هاي $CD4^+T$ ايجاد نمايد [۳۲و۳۳].

Steinbrink و همكارانش [۳۴]، DC بدست آمده از كشت سلول‌هاي تک هسته‌اي با IL-4 و GM-CSF را در روز هفتم كشت به مدت ۳ الي ۴ روز در محيط IL-10 كشت دادند و عملكرد سلول‌هاي DC را بررسي نمودند. نتايج نشان مي‌دهد كه سلول‌هاي $CD8^+T$ كه با DCهاي تيمار شده با IL-10 كشت داده شده بودند، دچار آنرژي اختصاصي آلوآنتي‌ژنيک شده و اين سلول‌ها ديگر قادر به ليزكردن سلول‌هاي ملانوما نبودند. به نظر مي‌رسد كه اثر مهاري IL-10 در سلول‌هاي سرطاني ناشي از كاهش بيان مولكولهاي MHCII و مولكول‌هاي كمكي فرعي B7-1/-2 و همچنين مولكول‌هاي چسبان بين سلولي (ICAM-1) مي‌باشد [۳۷-۳۵]. علاوه بر آن، IL-10 قادر است ترشح بسياري از سايتوكين‌هاي التهابي ترشح شده توسط مونوسيت‌ها و ماكروفاژها مانند IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α و GM-CSF را كاهش دهد [۳۸و۳۹].

به طور كلي مطالعات انجام شده، نشان مي‌دهند كه عمده‌ترين اتفاق روي داده در سلول‌هاي DC طحالي موش در صورت كشت در محيط حاوي IL-10، ايجاد پاسخ از نوع Th2 مي‌باشد [۴۰]، در حالي كه اضافه كردن IL-10 به محيط كشت DCهاي مغز استخواني موش باعث كاهش عرضه آنتي‌ژن در اين سلول‌ها مي‌گردد [۴۱].

مطالعه Dhodapkar و همكارانش [۴۲] نشان مي‌دهد كه سلول‌هاي DC نابالغ توليد كننده IL-10، قادرند در شرايط *In vivo* سلول‌هاي T_{reg} ايجاد نمايند. در عين حال مطالعات ديگر نشان مي‌دهند كه عمده‌ترين منبع توليد IL-10، سلول‌هاي T_{reg} مي‌باشند و بدين ترتيب سلول‌هاي T_{reg} مي‌توانند با اثرات پاراكرين سلول‌هاي DC و خود، سلول‌هاي T_{reg} را كنترل نمايند [۴۳و۴۴].

مطالعات انجام شده بر روي مدل حيواني ديابت بر روي موش‌هاي NOD نشان مي‌دهد كه خود واكنشگري مي‌تواند در نتيجه كاهش توليد سلول‌هاي T_{reg} ($CD25^+CD4^+$) در تيموس حيوان ايجاد شود [۴۵و۴۶]، بنابراين استفاده از سلول‌هاي دندريتيك تولوژنيك، مي‌تواند يك راهكار مناسب در پيشگيري و درمان بيماري ديابت خود واكنشگر باشد. به طور مثال مي‌توان به روش *Ex vivo*، سلول‌هاي T بيمار را در معرض سلول‌هاي دندريتيك تولوژنيك قرار داد و بعد از توليد و تكثير سلول‌هاي T_{reg} اختصاصي، آنها را به بيمار تزريق كرده و بدين ترتيب روند خود واكنشگري را در او مهار نمود. از مزاياي عمده اين روش كاهش عوارض ناشي از مصرف داروهاي مهار كننده سيستم ايمني مي‌باشد. مطالعة Papaccio و همكارانش نشان مي‌دهد كه تزريق سلول‌هاي دندريتيك بارگذاري شده با HCG، ضمن تنظيم ترشح سايتوكين‌ها به طرف سايتوكين‌هاي Th2، مي‌توانند از بروز ديابت در موش NOD نيز پيشگيري كنند [۴۷].

مطالعه حاضر نيز نشان مي‌دهد كه استفاده از IL-10 مي‌تواند منجر به توليد DC هايي گردد كه پاسخ سلول‌هاي T را به طرف پاسخ‌هاي Th2 سوق مي دهد و بدين ترتيب مي‌تواند در درمان خود واكنش‌گري منجر به ديابت موثر باشد. بنابراين براي مطالعه بيشتر، مي‌توان با استفاده از مدل‌هاي حيواني در موش NOD يا رت BB، ابتدا ديابت خود واكنش‌گر را ايجاد كرد و سپس سلول‌هاي دندريتيك اختصاصي تيمار شده با Il-10 را براي درمان اين مدل‌ها مورد استفاده قرار داد.

همچنين در محيط *In vitro*، مي‌توان سلول‌هاي خون محيطي افراد مبتلا به ديابت نوع يك را با استفاده از سايتوكين‌هاي مناسب به سلول‌هاي دندريتيك تبديل كرده

و سپس اثر IL-10 را بر روي عملکرد آنها مورد مطالعه قرار داد.

مآخذ

1. Masteller EL, Bluestone JA. Immunotherapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:652–659.
2. Parving H-H, Tarnow L, Nielsen F, Rossing P, Mandrup-Poulsen T, Osterby R, et al. Cyclosporine nephrotoxicity in type 1 diabetic patients. A 7-year follow-up study. *Diabetes Care* 1999; 22: 478-483.
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
4. Stein man RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
6. Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo. J Exp Med* 1999; 189:587-92.
7. Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differenttiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 1995; 182:1591-6.
8. Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra A. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 1995; 182: 1579-84.
9. Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995; 2: 523-32.
10. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1213-22.
11. Koch F, Stanzl V, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kaempgen E, et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996; 184: 741-6.
12. Huang LY, Sousa CR, Itoh Y, InmanJ, Scott DE. IL-12 induction by a Th1 inducing adjuvant *in vivo:* dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *J Immunol* 2001; 167: 1423-30.
13. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Vrbain J, Leo 0, Moser M. Effect of interleukin -10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1229-35.
14. Faulkner L, Buchan G, Baird M. Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunology* 2000; 99: 523-31.
15. Buelens C, Willems F, Delvaux A, Pierard G, Delville JP, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2668-72.
16. Stein brink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10 treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159: 4772-80.
17. Morel AS, Quaratino S, Douek DC, Londei M. Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step. *Eur J Immunol*1997; 27: 26-34.
18. Rieser C, Ramoner R, Bock G, Deo YM, Holtl L, Bartsch G, Thurnher M. Human monocyte-derived dendritic cells produce macrophage colony-stimulating factor: enhancement of c-fms expression by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2283-8.
19. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 1998; 28: 359-69.
20. Haase C, Jqrgensen TN, Michelsen BK: Both exogenous and endogenous interlukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells in vitro and strongly influence T-cell priming in vivo. *Immunology*. 2002; 107: 489-99.
21. Hart, D.N: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-87.
22. Bell, D., Young, J.W., Banchereau, J: Dendritic cells. *Adv Immunol* 1999; 72: 255-324.
23. Ni, K., O'Neill, H.CThe role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 1997; 75: 223–230.
24. Sato, M., Iwakabe, K., Kimura, S., Nishimura, T: Functional skewing of bone marrow-derived dendritic cells by Th1- or Th2- inducing cytokines. *Immunol Lett* 1999; 67: 63-8.
25. Liu, L., Rich, B.E., Inobe, J., Chen,W.,Weiner, H.L. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime ¨ naive CD41 T cells to secrete IL-4. *Int Immunol* 1998; 10: 1017-26.

26. Kalinski, P.K., Hilkens, C.M.U., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999; 20: 561-7.
27. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 2003; 24: 36-43.
28. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activeeeting interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 327-33.
29. Janjic BM, Lu G, Pimenov A, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL. Innate direct anticancer effector functions of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J Immunol* 2002; 168: 1823-30.
30. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-9.
31. Ignatius R, Marovich M, Mehlhop E, Villamide L, Mahnke K, Cox WI, *et al*. Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor a secretion. *J Virol* 2000; 74: 11329-38.
32. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.
33. Cavaillon, J.M. Pro-versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001; 47: 695-702.
34. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999; 93: 1634-42.
35. de Waal Malefyt RW, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Fries JE. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 314-20.
36. Hsu DH, Oore KW, Spits H. Differential effects of interleukin-4 and -10 on interleukin-2-induced interferon-g synthesis and lymphockine- activated killer activity. *Int Immunol* 1992; 4: 563-9.
37. de Waal Malefyt RW, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE: Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by dimishing the antigen-capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915-24.
38. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-51.
39. Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 685: 713-39.
40. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic-cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1229-35.
41. Huang L Y, Sousa CR, Itoh Y, Inman J, Scott DE. IL-12 induction by a Th 1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-l0. *J Immunol* 2001; 167: 1423-30.
42. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001; 193: 233-8.
43. Groux H, O`Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antoneko S, De Vries JE, Roncarolo NG. A $CD4^+$ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responces and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-42.
44. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Pwrie F. An essential role for interleukin-10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190: 995-1004.
45. McHugh, R.S., and E.M. Shevach. Cutting edge: depletion of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J Immunol* 2002; 168 :5979-5983.
46. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. $CD25^+$ $CD4^+$T Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med*. 2004 199:1467-1477.
47. Papaccio G, Nicoletti F, Aurelio F, Bendtzen K, Galdieri M. Prevention of Spontaneous Autoimmune Diabetes in NOD Mice by Transferring In Vitro Antigen-Pulsed Syngeneic Dendritic Cells. *Endocrinology* 2000; 141: 1500-1505.