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]، سید محمد موذني[۱*]

چکیده

مقدمه: دیابت وابسته به انسولین، 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 ($P < ۰/۰۲$).

نتيجه‌گيري: 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: دیابت خود ایمن، 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:٨٨٠٠٦٥٤٤؛ 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 كنندة 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 كنندة 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 ليپوپلي‌ساكارايد 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 نحوة 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 استريتومايسين(Gibco) و سديم پيروات (Sigma) استفاده شد. در توليد و تيمار سلول‌هاي دندريتيك سايتوكين‌هاي mrTNF-α (Bender ،mrIL-4(R&D) ،mrGM-CSF(R&D) 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 cc ۵ 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 كلراید (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 ۳۷ºC و CO2 ۵% 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.

اينترکولين ۱۰ در اين مطالعه بر اساس گزارش Haase و همکارانش [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

میلوییدي بیان مي‌گردد. بنابراین با مطالعه این شاخص‌ها مي‌توان زیر جمعیت القا شده از DC هاي تولید شده تحت تیمار با IL-10 و LPS را مورد مطالعه قرار داد. در هر مورد از ایزوتیپ کنترل مناسب آنتي‌بادي به عنوان کنترل منفي استفاده شد.

براي رنگ آمیزي و فلوسایتومتري در خصوص هر یک از شاخص‌هاي فوق با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده عمل شد. به طور خلاصه و صرف نظر از نوع شاخص بکار رفته، روند کار به این صورت بود که ابتدا یک سوسپانسیون سلولي با غلظت ۲×۱۰^{۶} تهیه شده و سپس ۵۰ میکرولیتر از آن با ۱۰ میکرولیتر از آنتي بادي مخلوط شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوبه شدن در حمام یخ و شستشوي سلول‌ها، نتایج با استفاده از دستگاه فلوسایتومتري Partec III سنجیده شده و با برنامه Partec Flomax آنالیز گردید.

براي بررسي عملکرد تکثیري سلول‌هاي T و سنجش ترشح سایتوکین‌ها، ابتدا سلول‌هاي DC تیمار شده با سیتوکین IL-10 که با آنتي‌ژن نیز بارگذاري شده بودند. با PBS مخلوط شده و سوسپانسیون سلولي($۲/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلي لیتر) تهیه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از این سوسپانسیون در هر کف دست موش تزریق شده و ۵ روز بعد، غدد لنفاوي براکیال جدا و سلول‌هاي تک هسته‌اي آنها جمع‌آوري شد.

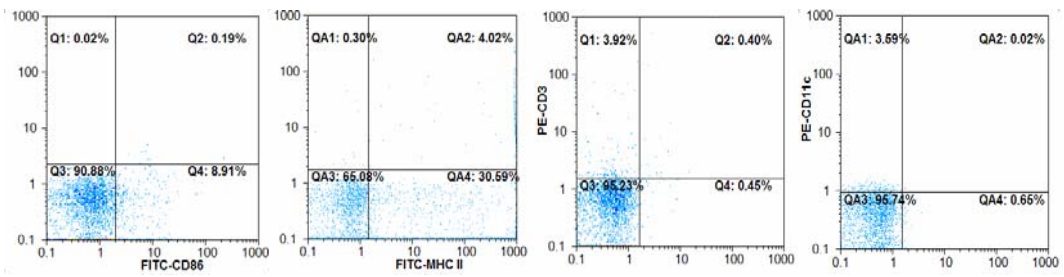
سلول‌ها در محیط کشت حاوي ۱% سرم موش در حفرات پلیت کشت ۹۶ خانه‌اي، به طور مجدد با پپتید انسولین تحریک شده و بعد از ۵۶ ساعت انکوباسیون با اضافه نمودن تیمیدین رادیواکتیو، میزان تکثیر سلول‌ها اندازه‌گیري شد. به حفرات کنترل، پپتید اضافه نگردید. براي سنجش سایتوکین‌هاي تولید شده، مایع رویي کشت سلول‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت جمع‌آوري شده و در ۷۰°C- تا زمان اندازه گیري سایتوکین نگهداري گردید. سایتوکین‌هاي مورد مطالعه شامل IL-10 و IFN-γ بوده و سنجش با روش الیزا صورت گرفت. گروه‌هاي کنترل شامل موارد ذیل بود: موش‌هایي که به آنها DC تیمار شده با IL-10 که با آنتي‌ژن بارگذاري نشده بود، تزریق شد. موش‌هایي که به آنها DC تیمار شده با LPS و بارگذاري شده با آنتي‌ژن تزریق شد و موش‌هایي که به آنها فقط PBS تزریق شد.

یافته‌ها

از ٤ استخوان فمور و تیبیاي هر موش C57BL/6، بعد از لیز کردن گلبول‌هاي قرمز، حدود $۳-۵\times۱۰^{۷}$ سلول هسته‌دار جدا شد. آنالیز فلوسایتومتري این سلول‌ها نشان داد که تنها ۴±۰/۵ درصد سلول‌ها $CD11c^{+}$ ، ۳۵±۵ درصد $MHC\text{-}^{+}$ Class II، ۸±۲ درصد $CD86^{+}$ و ۳±۰/۵ درصد $CD3^{+}$ بودند (نمودار ۱).

مطالعه سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوري نشان داد که سلول‌هاي تولید شده در روز ششم ضمن این که نسبت به سلول‌هاي اولیه تیره‌تر هستند، داراي زوایدي در اطراف سلول نیز مي‌باشند که معمولا کاهش دماي محیط و یا تعویض محیط باعث مي‌شود که این دندانه‌ها جمع شده و رویت آنها را مشکل مي‌کند.

آنالیز فنوتیپ سلول‌هاي دندریتیك تولید شده از



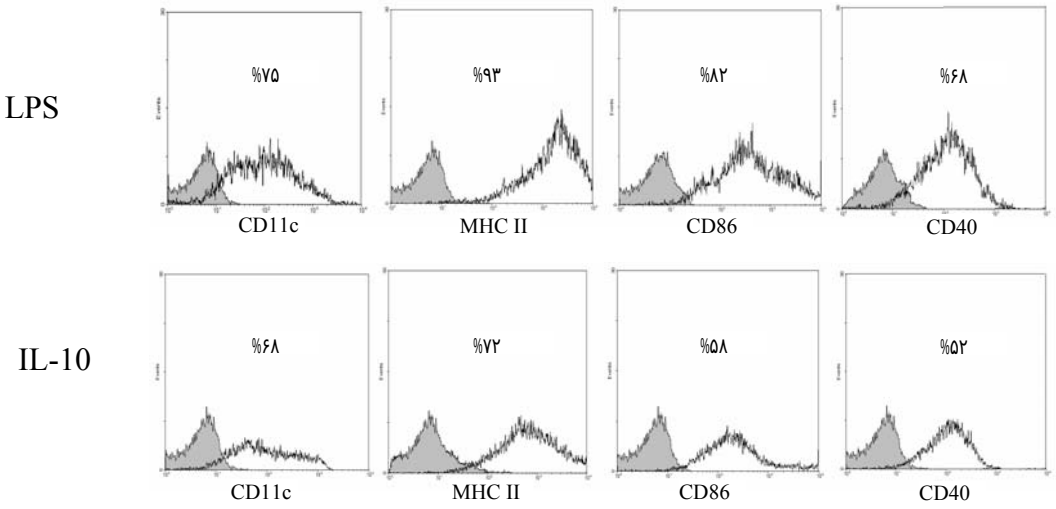
نمودار ۱- نمونه ای از نمودارهای حاصل از آنالیز فلوسیتومتری سلولهای بدست آمده از مغز استخوان

مغز استخوان موش با استفاده از فلوسایتومتري در روز ششم نشان داد که ۵±۶۰ درصد از سلول‌ها، $CD11c^+$ مي‌باشند. سایر شاخص‌هاي مورد مطالعه به صورت دو رنگي و بر روي سلول‌هاي $CD11c^+$ (سلول‌هاي دندریتیک) مورد بررسي قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که سلول‌هاي دندریتیک در روز ششم، ۷±۸۵% MHC $ClassII^+$، ۵±۶۷% $CD86^+$ و ٤±۳۰% $CD40^+$ بودند. سلول‌هاي دندریتیك تولید شده در این روش فاقد شاخص CD8α بودند و تقریباً تمام سلول‌هاي $C11c^+$ که تولید شده بودند، شاخص CD11b (DC2) را بر روي خود بروز مي‌دادند. بنابراین در این روش تنها سلول‌هاي دندریتیك از زیر گروه میلوییدي تولید مي‌گردند که در موش، این گروه مي‌تواند باعث ایجاد پاسخ‌هاي ایمونولوژیك از نوع Th2 گردد.

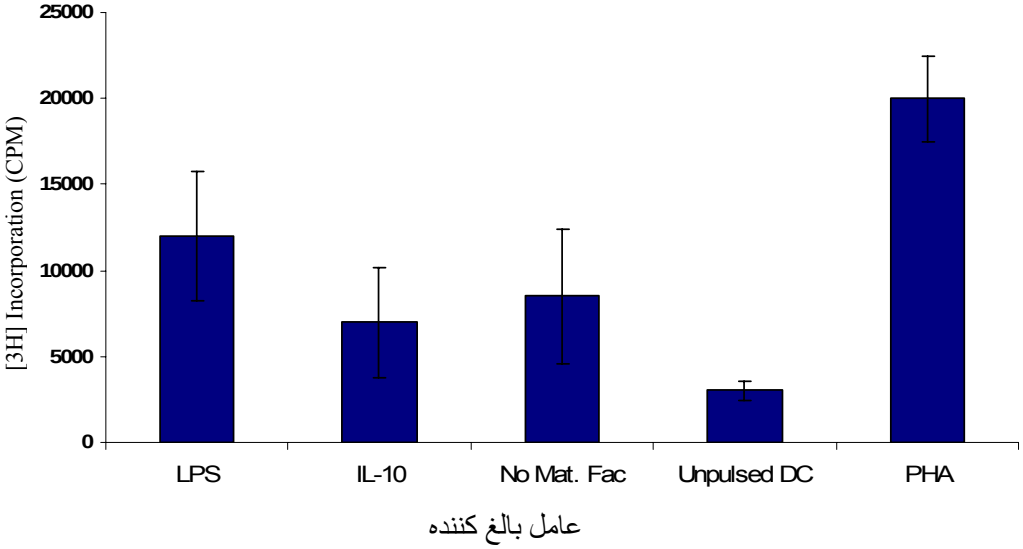
براي بلوغ سلول‌هاي دندریتیك از عوامل متعددي مي‌توان استفاده کرد. در این مطالعه از LPS و IL-10 به عنوان عامل بالغ کننده استفاده شد. عامل بلوغ LPS علاوه بر افزایش میزان خلوص سلول‌هاي دندریتیك، از ۵±۶۰% در روز ششم کشت به ٦±۷۵% در روز هشتم، شاخص‌هاي مربوط به بلوغ را نیز افزایش مي‌دهد به طوري که ٤۸ ساعت بعد از اضافه کردن LPS، ٦±۹۳% سلول‌ها MHC $ClassII^+$ ، ۱۰±۸۲% سلول‌ها $CD86^+$ و ۹±٦۸% سلول‌ها $CD40^+$ بودند. البته از آنجایي که MHC ClassII بر روي سلول‌هاي نابالغ نیز بیان مي‌شود، درصد آن تغیر چنداني را نشان نمي‌دهد ولي میزان MFI آن به طور محسوسي افزایش مي‌یابد (۲۰۵ در مقابل ۲۸۳، P=۰/۰۴۶) و این یافته نشان مي‌دهد که اضافه کردن عامل بلوغ، شدت بروز MHC ClassII را نیز بر روي این سلول‌ها افزایش مي‌دهد (نمودار ۲).

اضافه کردن IL-10 بعد از روز هشتم به مدت ۴۸ ساعت، میزان خلوص سلول‌هاي دندریتیك را به ۴±۶۸% در مقابل ۶±۷۵% بعد از اضافه نمودن LPS کاهش مي‌دهد. سایر شاخص‌ها عبارت بودند از $MHC\ ClassII^+$ ۹±۷۲%، $CD86^+$ ۵±۵۸% و $CD40^+$ ٦±۵۲%. مقایسه شاخص‌ها نشان مي‌دهد که IL-10 بروز MHC class II و CD86 را بر روي سلول‌هاي دندریتیك در مقایسه با LPS به طور محسوسي کاهش مي‌دهد (P=۰/۰۴) ولي در سایر موارد تفاوت معني داري مشاهده نشد (نمودار ۲). مطالعات بیشتر نشان داد که اضافه کردن IL-10 به محیط کشت از روز اول مي‌تواند از ایجاد سلول‌هاي دندریتیك جلوگیري کند و یك مهار کننده به شمار مي‌آید. همچنین در صورت بالغ کردن سلول‌ها با LPS، اضافه کردن IL-10 تاثیري بر بروز شاخص‌ها ندارد (اطلاعات نشان داده نشده است).

مطالعات اندکي به بررسي در خصوص اثرات *In vivo* سایتوکین IL-10 پرداخته‌اند. در این مطالعه براي بررسي این اثرات سلول‌هاي دندریتیك مشتق از مغز استخوان ابتدا با IL-10 تیمار شده و سپس با پپتید انسولین بارگذاري شدند. در مرحله بعدي این سلول‌ها به موش تزریق شده و پس از انجام عمل عرضه آنتي ژن در محیط In vivo لنفوسیت‌هاي غدد لنفاوي استخراج شده و با تحریك مجدد سلول‌هاي T با پپتید انسولین، میزان تأثیرات آن مورد بررسي قرار گرفت. میانگین میزان تکثیر سلولي در گروه‌هایي که به آنها سلول‌هاي دندریتیك تیمار شده با IL-10 تزریق شده بود، معادلCPM ۷۰۰۰ (SD=۹۲۰) بود در حالي که این میزان در سلول‌هاي دندریتیك تیمار شده با LPS حدود CPM (SD=۸۰۰) ۱۲۰۰۰ بود که از نظر آماري تفاوت محسوسي با گروه IL-10 داشت. بنابراین هر چند سلول‌هاي تیمار شده با IL-10 قادر به تحریک سلول‌هاي T بودند، ولي شدت این تحریک کمتر بوده است. اضافه کردن IL-10 باعث شده بود که میزان تکثیر سلول‌هاي T حتي از زیر گروهي که در آن سلول‌هاي دندریتیک هیچ عامل بالغ کننده‌اي دریافت نکرده بودند نیز کمتر باشد (نمودار ۳).



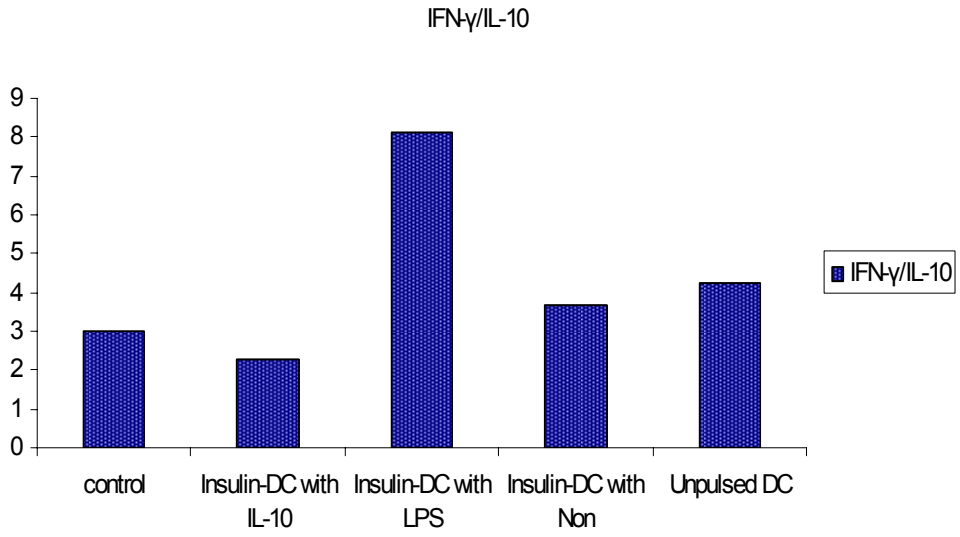
نمودار ۲- میزان بروز هر یک از شاخص‌های بلوغ بر روی سلول‌های دندریتیک بعد از اضافه نمودن عوامل بلوغ. نمودارهای خاکستری مربوط به ایزوتیپ کنترل هر یک از شاخص‌ها بر روی سلول‌های مورد مطالعه می‌باشد.



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 الیزا 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

پیکوگرم) (P <۰/۰۲). در مقایسه نسبت IFN-γ/IL-10، مشخص شد که این 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 سایتوکین‌های INFγ/IL10 تولید شده توسط لنفوسیت‌های T در گروه‌های مورد مطالعه تزریق شده توسط سلول‌های دندریتیکی که به صورت‌های متفاوتی تیمار 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 CD2, CD50, CD54 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]،

عملکردي که توسط آن پاتوژن‌هاي پاک شده و آنتي‌ژن‌ها با سهولت بيشتري در اختيار سلول‌هاي عرضه کننده آنتي ژن قرار مي‌گيرند تا ارتباط بين ايمني ذاتي و ايمني اختصاصي ايجاد شود [۳۰و۳۱]. اين سايتوکين عملکرد پيش التهابي سلول‌هاي عرضه کننده آنتي ژن را با واسطة کاهش دادن بيان مولکول‌هاي کمکي و با کاهش ترشح سايتوکين‌هاي پيش التهابي و کاهش بلوغ سلول‌هاي عرضه کننده آنتي‌ژن، مهار مي‌کند. علاوه بر مهار بلوغ سلول‌هاي عرضه کنندة 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 کاهش التهاب مي‌باشد. در موش و انسان، IL-10 مي‌تواند آنرژي اختصاصي طولاني مدتي را در سلول‌هاي $CD4^+T$ ايجاد نمايد [۳۲و۳۳].

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

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

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

مطالعات انجام شده بر روي مدل حيواني ديابت بر روي موش‌هاي NOD نشان مي‌دهد که خود واکنشگري مي‌تواند در نتيجه کاهش توليد سلول‌هاي T_{reg} ($CD25^+CD4^+$) در تيموس حيوان ايجاد شود [۴۵و۴۶]، بنابراين استفاده از سلول‌هاي دندريتيک تولوژنيک، مي‌تواند يک راهکار مناسب در پيشگيري و درمان بيماري ديابت خود واکنشگر باشد. به طور مثال مي‌توان به روش *Ex vivo*، سلول‌هاي T بيمار را در معرض سلول‌هاي دندريتيک تولوژنيک قرار داد و بعد از توليد و تکثير سلول‌هاي T_{reg} اختصاصي، آنها را به بيمار تزريق کرده و بدين ترتيب روند خود واکنشگري را در او مهار نمود. از مزاياي عمده اين روش کاهش عوارض ناشي از مصرف داروهاي مهار کننده سيستم ايمني مي‌باشد. مطالعة Papaccio و همکارانش نشان مي‌دهد که تزريق سلول‌هاي دندريتيک بارگذاري شده با HCG، ضمن تنظيم ترشح سايتوکين‌ها به طرف سايتوکين‌هاي Th2، مي‌توانند از بروز ديابت در موش NOD نيز پيشگيري کنند [۴۷].

مطالعه حاضر نيز نشان مي‌دهد که استفاده از IL-10 مي‌تواند منجر به توليد DC هايي گردد که پاسخ سلول‌هاي T را به طرف پاسخ‌هاي Th2 سوق مي دهد و بدين ترتيب مي‌تواند در درمان خود واکنش‌گري منجر به ديابت موثر باشد. بنابراين براي مطالعه بيشتر، مي‌توان با استفاده از مدل‌هاي حيواني در موش NOD يا رت BB، ابتدا ديابت خود واکنش‌گر را ايجاد کرد و سپس سلول‌هاي دندريتيک 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 يک را با استفاده از سايتوکين‌هاي مناسب به سلول‌هاي دندريتيک تبديل کرده

و سپس اثر IL-10 را بر روي عملكرد 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 captture 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.