

بررسی تاثیر سلول‌های اپی‌تلیالی پرده آمنیونی انسانی بر روند تولید و تکامل سلول‌های دندریتیک از منشاء مونوسیت‌های خون محیطی

بهاره کشاورزی^۱، امیر حسن زرنانی^{۲،۳}، محمود بزرگمهر^۲، معراج طباطبایی^۱، ابراهیم میرزادگان^۲، فهیمه
رضضانی تهرانی^۴، سهیلا عارفی^۵، فرزانه احمدی^۶، نریمان مصفا^{۴،۱*}

^۱ گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

^۳ مرکز نانو بیوتکنولوژی، پژوهشگاه ابن سینا

^۴ مرکز تحقیقات اندوکرینولوژی تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۵ مرکز تحقیقات باروری، پژوهشگاه ابن سینا

^۶ گروه آمارزیستی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: در مورد برهم‌کنش سلول‌های اپیتلیالی پرده آمنیونی انسانی (hAEC) با سلول‌های دندریتیک (DC) در سیستم هم‌کشتی ترانس‌ول و بررسی فاکتورهای محلول این سلول‌ها بر تمایز سلول‌های دندریتیک هیچ مطالعه مستدلی صورت نپذیرفته است. هدف از انجام این بررسی، ارزیابی اثر مهاری سلول‌های hAEC بر تکامل سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت‌های خون محیطی انسان در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ابتدا، سلول‌های اپی‌تلیالی از پرده آمنیونی جفت انسانی جداسازی شده و تایید خلوص این سلول‌ها از طریق تعیین برخی مارکرهای اختصاصی بکمک دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت. به منظور بررسی سلول‌های مشتق از مونوسیت در مرحله تولید سلول‌های دندریتیک نابالغ، در روز ۵ سلول‌ها جمع‌آوری شدند و به منظور تولید دندریتیک سل‌های بالغ در روز ۵ به محیط کشت لیپوپلی ساکارید اضافه شد و به مدت ۲ روز دیگر کشت داده شده و در روز ۷ جمع‌آوری شدند. سلول‌های مشتق از مونوسیت در روز ۵ و ۷ از نظر بیان مارکرهای سطحی توسط فلوسایتومتری و ترشح سایتوکین‌های IL10 و IL12 توسط الیزا مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیان مارکرهای سطحی CD14, CD1a, CD83, CD80, CD86 و HLA-DR و ترشح سایتوکین‌های IL12 و IL10 در سلول‌های مشتق از مونوسیت در مرحله تولید دندریتیک سل‌های نابالغ و بالغ بین دو گروه تست و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: هیچ‌گونه اثر تولوژن‌سیسته‌ای توسط سلول‌های AEC بر بلوغ و تمایز DC‌های مشتق از مونوسیت‌ها در کشت همزمان سلول‌های AEC-Monocyte مشاهده نشد. گسترش مطالعات بعدی در زمینه تغییرات در سیستم کشت می‌تواند یکی از پیشنهادات ما در این زمینه باشد.

واژگان کلیدی: سلول‌های اپی‌تلیالی آمنیون، سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت، مونوسیت، مارکرهای سطحی، سایتوکین، سیستم ترانس‌ول

مقدمه

است که در تماس با جنین بوده و نقش مهمی در روند بارداری برعهده دارد (۱). کاربردهای بالینی از این پرده به دلیل ویژگی‌هایی، از جمله نقش در ترمیم و بهبود زخم (۲)، خواص ضد التهابی (۳)، تعدیل سیستم ایمنی (۴)، توان ضد میکروبی، از دیر باز به عنوان التیام زخم در افراد دچار سوختگی (۵)، بازسازی حفره دهانی، مثانه و واژن و نیز در چشم پزشکی کاربردی با قدمت طولانی داشته است. سلول‌های مشتق از پرده آمنیون

جنین انسان در طول دوران بارداری توسط دو لایه به نام غشای آمنیون و کوریون احاطه شده است. پرده آمنیون یکی از بافت‌هایی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه ایمونولوژی، دکتر نریمان مصفا

(e-mail: mosaffan@sbmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱/۱۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۴/۲۴

این مایع موجب القای آپوپتوز در لمفوسیت B و T می‌شوند و همچنین تکثیر هر دو لمفوسیت B و T را بعد از تحریک با میتوزن مهار می‌کنند. ولی ماکروفاژ و نوتروفیل به القای آپوپتوز توسط این سلول‌ها مقاوم بودند (۸). حال با توجه به خاصیت مهاری سلول‌های مشتق از پرده آمنیونی بر روی اجزای سیستم ایمنی، و از آنجایی که سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیونی (AEC) برای استمرار و برقراری تولرانس و فعالیت سرکوب سیستم ایمنی مادر اهمیت بسیار دارند، این امکان وجود دارد که بخشی از تولروژنیسیته مادری مربوط به اثر القایی AECs روی سلول‌های DC مادری باشد که تاکنون گزارشی انتشار نگردیده است. البته اثر مهاری سلول‌های مزانشیمال مشتق از پرده آمنیونی بر روی تمایز منوسیت‌ها طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ گزارش شده است. اکنون این ایده به ذهن می‌رسد که شاید بتوان از سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیونی که منابع سهل، فراوان و قابل دسترسی هستند به عنوان منبع جدید و بی‌خطری برای تولید دندریتیکی سل‌های تولروژنیک (tolerogenic dendritic cells) یا DCs استفاده کرد.

سلول‌های دندریتیکی، قوی‌ترین و کارآمدترین سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن میباشند که در بافت‌های مختلف بدن مستقر هستند. آنها جمعیت هتروژنی از سلول‌ها هستند که از نظر عملکرد، مکان‌های استقرار و فنوتیپ متفاوت می‌باشند. این سلول‌ها پذیرنده‌های متفاوتی برای شناسایی آنتی ژن دارند و به عنوان اولین سد سلولی برخوردکننده با پاتوژن‌ها، آنها را بلعیده و پس از کشتن و تجزیه نمودن، قطعات آنتی‌ژنیک آنها را با مهاجرت به بافتهای لنفاوی به لنفوسیت‌های T عرضه می‌کنند و بسته به نوع آنتی ژن پاسخ‌های مناسب سلول T را راه اندازی می‌کنند. به همین جهت است که این سلول‌ها را به عنوان عرضه کنندگان حرفه‌ای آنتی‌ژن و پل ارتباطی بین ایمنی ذاتی و اکتسابی معرفی می‌کنند. امروزه تحقیقات نشان داده اند عملکرد تنظیمی DC ها بستگی به عوامل محیطی منجمله فاکتورهای محلول دارد و بلوغ آنها در شرایط محیطی مختلف باعث القای پاسخ‌های متفاوت تحریکی و مهاری بر سلول‌های T و سیستم ایمنی می‌شود (۱۴). اینکه سلول‌های DC در چه مکانی باشند، اهمیت بسیار دارد. آیا میتوان مشابه این گسترش، شرایطی را در Invitro فراهم آورد که منجر به تولید DC تولروژنیک گردد. آیا می‌توان با توجه به متعدد بودن تحت جمعیت‌های میلوئیدی منجر به تولید DC در بدن و آزمایشگاه، یک جمعیت یک دست با حفظ خصوصیت تحمل‌زایی را بکمک هم کشتی در جوار سلول‌های مشتق از پلاستای تولروژنیک بوجود آورد؟ از آنجایی که سلول‌های دندریتیکی تولروژنیک در بدن و متعاقب فرآیندهای

دارای ایمونوژنیسیته پایین و ویژگی‌های تنظیم سیستم ایمنی (Immunomodulatory) هستند (۶). تحقیقات نشان دادند که در محل پیوند پرده آمنیونی بر زخم یا در پیوند قرنیه یک مهار وسیع بر اجزای سیستم ایمنی در آن ناحیه به صورت موضعی اعمال می‌شود (۷). تاکنون چندین رده سلولی دارای توان چندتمایزی (Pluripotent)، از جمله سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های مزانشیمی و سلول‌های بنیادی مشتق از آمنیونی از این پرده جدا شده است که هر یک فواید درمانی وسیعی دارد. سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیونی (hAECs: Human amnion epithelial cell) از جمله مهم‌ترین آنهاست. اثر تعدیل‌کنندگی و مهاری hAEC بر فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی از جمله لمفوسیت B، T و سلول‌های ماکروفاژ و نوتروفیل به اثبات رسیده است (۴، ۸). از دیگر خصوصیات منحصر به فرد این رده سلولی این است که:

۱- به واسطه عدم بیان تلومراز، که از مارکرهای سلول‌های بنیادی است، این سلول‌ها قادر به ایجاد تومور نبوده و قدرت تکثیری محدودی در شرایط *in vitro* دارند، ۲- آنها نیازی به افزودن لایه سلولی غذادهنده ندارند (۹)، ۳- این سلول‌ها به آسانی در دسترس هستند، جفت و پرده آمنیونی هنگام زایمان به طور معمول بدون کاربرد بوده و استفاده از آنها به عنوان منبعی برای سلول‌های بنیادی بسیار مقرون به صرفه بوده و بر خلاف سلول‌های بنیادی جنینی هیچ مشکل اخلاقی ندارد (۱۰)، ۴- سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیونی هنگامی که به موجود زنده تزریق می‌شوند، به دلیل عدم بیان یا بیان پایین HLA-A, B, C و HLA-DR و نیز ترشح فاکتورهای ایمونوساپرسیو برای مهار سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی، ایمونوژنیسیته پایین دارد که در بقای پیوند حائز اهمیت است (۱۱). سلول‌های اپی‌تلیالی آمنیونی کاربرد فراوانی در مهندسی بافت دارند. استفاده از آنها به همراه قطعات پیوندی موجب بقای پیوندهای آلوگراف می‌گردند (۱۲). مکانیسم مهاری آنها با واسطه توقف عملکرد لنفوسیت‌های T آلورکتیو است، و همچنین می‌تواند باعث مهار واکنش MLR یا همان Mixed Lymphocyte Reaction گردد (۴). همچنین در مطالعه‌ای تأثیر سلول‌های مزانشیمال مشتق از پرده آمنیونی بر روند تمایزی منوسیت‌های خون محیطی و مستقر در ناحیه آمنیونی نشان داده شد، به طوری که مجاورت سلول‌های مزانشیمال مشتق از پرده آمنیونی با منوسیت‌ها باعث مهار تمایز این سلول‌ها به دندریتیکی سل‌ها می‌شود و همچنین از بالغ شدن دندریتیکی سل‌های نابالغ نیز جلوگیری می‌کند (۱۳). همچنین در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای که انجام شد، مایع رویی حاصله از کشت سلول‌های hAECs باعث مهار فعالیت کموتاکتیک نوتروفیل و ماکروفاژ شده و اینکه

مواد و روشها

تهیه واحد جفتی، جدا سازی و کشت سلول های اپیتلیال پرده آمنیون

تمام واحدهای پلاستای استفاده شده در این پایان نامه تحت نظارت کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با هماهنگی قبلی با جراح متخصص زنان و مامایی و با رضایت کامل مادر و پدر تهیه شد. جداسازی سلول های AEC طبق روش ذکر شده در مقالات انجام شد (۲۸، ۲۹). مرحله اول جداسازی پرده آمنیون از کوریون بود. بعد از جدا کردن بخش آمنیون از پرده کوریون، آن را در ظرف استیل حاوی RPMI سرد (۴ درجه سانتی گراد) قرار گرفته و چند بار شستشو داده شد و لخته های خون و قسمت هایی از پرده که تغییر مورفولوژی و قوام وجود داشت جدا گردید. این کار تا زمانی که پرده آمنیون کاملاً شفاف، یکدست و عاری از هرگونه لخته خون شود، ادامه دادیم. سپس پرده به ۴ قسمت تقسیم شد و در فلاسک های کشت سلول ۷۵ سانتی متر مربع که درب بدون فیلتر دارند قرار داده شد و به هر فلاسک حدود ۱۵-۲۰ میلی لیتر آنزیم تریپسین همراه با EDTA با غلظت ۰/۰۵٪ اضافه شد و فلاسک ها داخل یک پلاستیک اتوکلاو شده، در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شیکر دار قرار داده شدند. زمان هضم آنزیمی به شرح زیر بود: ۱) مرحله اول هضم به مدت ۱۰ دقیقه، ۲) مرحله دوم هضم به مدت ۲۰ دقیقه، ۳) مرحله سوم هضم به مدت ۲۰ دقیقه و ۴) مرحله چهارم هضم به مدت ۲۰ دقیقه. مایع حاصل از هضم اول که حاوی گلبول های قرمز و ضایعات بافتی است از مش فلزی (توری) فلزی استیل عبور داده شد و آنزیم تریپسین توسط FBS/۱۰ خنثی شد تا از آسیب بیشتر به سلول ها جلوگیری شود. سلول های به دست آمده از مرحله اول هضم آنزیمی با استفاده از سانتریفوژ (۳۰۰ g) ته نشین شده و بعد از ۲ بار شستشو با محیط کشت کامل (FBS+10% RPMI) از توری مخصوص کشت سلول با سایز ۱۰۰ میکرومتر (BD, USA) عبور داده شد و در فلاسک کشت سلول کشت گردید و در انکوباتور کشت سلول ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه CO₂ انکوبه شد. تکه پرده های باقی مانده مطابق روش توضیح داده شده، برای بار دوم و سوم متحمل هضم آنزیمی شدند. پس از تبدیل پلت سلولی بدست آمده توسط محیط RPMI به سوسپانسیون، شمارش با استفاده از لام نئوبار صورت گرفت. همچنین تست حیات با استفاده از تریپان بلو بر روی سلول ها انجام شد. اگر توان حیاتی سلول ها کمتر از ۸۵٪ بود، مورد استفاده قرار نمی گرفتند.

تنظیم ایمنی قادرند موجب تولید و تکامل لنفوسیت های تنظیمی یا همان Regulatory T Cells گردند و موجب کاهش خطرات ناشی از ازدیاد حساسیت در بسیاری از بیماری های عفونی مزمن و نیز بروز خودایمنی گردند کاربردهای وسیعی یافته اند (۱۶، ۱۵). این جمعیت لنفوسیتی قادر به تولید سیتوکاین های ضد التهابی مانند TGF- β می باشند. همچنین در مجاورت با سیتوکاین های ضد التهابی مانند TGF β و IL10 (۱۷، ۱۸) در شرایط آزمایشگاهی تولید می شوند. مطالعات بسیاری نشان داده است که برخی پاتوژن ها (۱۹، ۲۰) و پاره های از انواع سلول های توموری (۲۱، ۲۲) نیز در داخل بدن می توانند القاء کننده سلول دندریتیک تولروژنیک باشند، تا بدین وسیله مانع پاسخ های دفاعی حفاظتی بر علیه آنها گردند. بررسی های آزمایشگاهی تاثیر درمانی و سودمند این سلول ها را در مطالعات تجربی و مدل های حیوانی به اثبات رسانده اند. برای این گروه از سلول های القا شده به سمت تعدیل و تنظیم ایمنی اثرات درمانی بسیاری را بررسی نموده اند و در مواردی همچون درمان اختلالات خود ایمنی و سرکوب آلرژی ها کاربرد فراوان یافته اند. اثر درمانی این سلول ها بر مدل های تجربی بیماری های اتوایمنیون از جمله Collagen-Induced Arthritis (۲۳-۲۵)، Encephalomyelitis (۲۶) و Experimental Autoimmune Uveoretinitis (۲۷) به اثبات رسیده است.

تولید DC های مشتق از مونوسیت های در گردش خون به طور وسیعی به منزله منابعی با ارزش در ایمونوتراپی انسانی، به کمک فاکتور های رشد شناخته شده، سوژه بسیار پر طرفداری را در بین دست اندر کاران، تشکیل داده است. به طوری که در سال های اخیر به عنوان یک دستاورد بسیار مهم کاربردی در پژوهش و نیز کار آزماهی های بالینی مورد بهره گیری قرار گرفته است. در شرایط درون لوله ای به واسطه تمهیدات کشت سلولی می توان مسیر فعالیتی این سلول ها را بر اساس اهداف کاربردی به سمت کاهش و یا تعدیل سیستم ایمنی به کمک هم کشتی با سایر اجزای ایمنی هدایت نمود؛ به عنوان مثال، ارتقای پاسخ ایمنی بر علیه تومور و یا تغییر مسیر وقایع خود ایمنی در جهت تعدیل و القای تحمل در مقابل آنتی ژن های خودی.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی روند تکاملی منوسیت های انسانی در مجاورت سلول های اپیتلیال آمنیونی در کشت هم زمان آزمایشگاهی بود (In Vitro Co-Culture). یک مدل آزمایشگاهی تولید DC تولروژنیک می تواند در شرایط کشت هم زمان AEC با MDDCs (Monocyte-Derived Dendritic Cells) انسانی طراحی گردد که امکان استفاده از آن در تجربیات بسیار فراهم است.

تولید سلول‌های دندربیتییک از سلول‌های مونوسیت خون محیطی

سلول‌های دندربیتییک مشتق از مونوسیت‌های خون محیطی طبق روش استاندارد که در مقالات مرجع توضیح داده شدند (۱۳، ۳۰)، تولیدگردیدند. منبع اصلی جداسازی مونوسیت‌ها مجموعه بافی کوت کیسه‌های سانتریفیوژ شده سازمان انتقال خون بود که روزانه به صورت تازه در اختیار متقاضیان قرار می‌گیرد. اهداکنندگان از بین افراد سالم، که سابقه مصرف سیگار، الکل و بیماری‌های عفونی مزمن نداشتند و در ضمن فاقد سابقه اعتیاد به مواد مخدر و نیز مصرف انواع کورتیکواستروئید بودند، انتخاب گردیدند. ابتدا تک هسته‌ای-های خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cell) از نمونه بافی کوت (Buffy Coat) با استفاده از روش گرادیان فایکول جداسازی شد و سپس مونوسیت‌ها از تک هسته‌ای‌های خون محیطی (PBMCs) با استفاده از تکنیک MACS (Magnetic Antibody Cell Sorter) به روش انتخاب مثبت (Positive selection) به کمک آنتی بادی‌های ضد CD14 متصل به ذرات مگنت بکمک کیت مخصوص مونوسیت (Miltenyi Biotech, Germany) جداسازی شدند. اطمینان از خلوص مونوسیت‌های جدا شده، موجب ارتقاء آگاهی از فرآیند تکامل و عملکرد آنها می‌باشد؛ بنابراین پس از جداسازی، خلوص مونوسیت‌ها با دستگاه فلوسایتومتری (Partec, Munster, Germany) تایید شد. قبل از شروع مرحله هم‌کشتی سلول‌های مونوسیت جداسازی شده از PBMC با سلول‌های AEC، لزوم انجام چندین بار تکرار از مراحل تولید iDC و mDC به تنهایی به منظور بهینه کردن روش‌های به کار گرفته شده، موجب افزایش دقت وصحت عملیات گردید. بدین منظور پس از جداسازی سلول‌های مونوسیت، روش تولید iDC و mDC با ۳ بار تکرار بهینه سازی شد. به منظور تولید سلول‌های iDC، سلول‌های مونوسیت تخلیص شده از PBMCs خون محیطی به تعداد 1×10^6 سلول در هر میلی لیتر در پلیت کشت سلول ۶ حفره (SPL, Korea) با محیط کشت RPMI (Gibco, Germany) حاوی FBS ۱۰٪ (Gibco, Germany)، ال-گلوتامین ۲ میلی مولار (L-Glutamine) (Non Essential Amino acid)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بین المللی)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم) و سدیم پیرووات (Sodium Pyrovalate) (۱٪) [Sigma USA] و در حضور سایتوکین‌های IL4 و GM-CSF (R&D, USA) به ترتیب با غلظت‌های ۵۰ نانوگرم و ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی لیتر کشت داده شدند. روز سوم، نیمی از محیط رویی به

ایمونوفونوتایپینگ سلول‌های جدا شده از پرده آمینون ایمونوفونوتایپینگ سلول‌های hAECs جدا شده برای تایید خلوص سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال برای مارکرهای اصلی زیر انجام شد. در این مطالعه، آنتی‌بادی‌های منوکلونال کونژوگه شده با FITC ضد مارکرهای سایتوکراتین، HLA-G, MHC-II, CD9, CD34, CD38, CD29, CD45, CD44, PE ضد مارکرهای کونژوگه شده با CD133, CD73, CD10 (SSEA-4 و MHC-I) و CD105 ضد مارکر PE ضد مارکر STRO-1 (R&D-USA) آنتی بادی گوسفندی ضد موش کونژوگه با FITC (پژوهشگاه ابن سینا-ایران)، آنتی بادی پلی کلونال ضد OCT-4 و آنتی بادی لایه دوم بزی ضد خرگوشی کونژوگه با FITC (Abcam-USA) مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ از (BD-USA) خریداری شد. بلافاصله پس از جداسازی، سلول‌های حاصل با استفاده از بافر رنگ آمیزی (PBS + FBS10%) شستشو داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بافر رنگ آمیزی به همراه آنتی بادی کونژوگه شده با FITC یا PE انکوبه گردید. تمامی مراحل رنگ آمیزی در ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت (به جز رنگ آمیزی مارکر سایتوکراتین که در دمای اتاق انجام گرفت). در تمامی تست‌ها از آنتی بادی ایزوتایپ به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. بیان OCT-4 استفاده از رنگ آمیزی داخل سلولی انجام گرفت، بدین منظور سلول بعد از شستشو با بافر رنگ آمیزی با استفاده از فرمالین ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس گردید و با استفاده از ساپونین ۵ درصد نفوذ پذیری سلول افزایش داده شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون سلول‌ها ۲ بار با ساپونین شستشو داده شدند و آنتی بادی لایه دوم بزی ضد خرگوشی (Goat Anti Rabbit) کونژوگه با FITC با رقت ۱:۱۵۰ در ساپونین افزوده شد و برای ۳۰ دقیقه دیگر انکوبه گردید. بعد از اتمام مدت انکوباسیون آنتی بادی‌های متصل نشده با استفاده از شستشو خارج گردیدند و تا زمان قرائت توسط دستگاه فلوسایتومتری در یخ قرار داده شدند. برای رنگ آمیزی مارکر سطحی STRO-1، سلول‌ها با آنتی بادی موشی ضد STRO-1 انسانی غیرکونژوگه و آنتی بادی گوسفندی ضد موش کونژوگه با FITC هر کدام به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و بعد از شستشو با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Partec, Munster, Germany) قرائت گردید.

غلظت‌های مناسب IL4 و GM-CSF به ترتیب ۵۰ نانوگرم و ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت به نسبت ۱/۵ در قسمت پایینی پلیت در حجم ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI کامل کشت داده شدند. این هم‌کشتی در نسبت‌های ۱/۱ و ۱۰/۱ (hAECs / منوسیت) نیز انجام شد. پس از گذشت ۵ روز سلول‌های مشتق از منوسیت با شستشوی آرام جمع‌آوری شدند و ایمونوفلوروسانسینگ آنها به کمک آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان گروه کنترل، سلول‌های منوسیت در عدم حضور سلول‌های AEC شرایط ذکر شده در بالا کشت داده شدند.

هم‌کشتی سلول‌های منوسیت با hAECs تا مرحله تولید DC بالغ

مطابق با بند فوق، با این تفاوت که در روز پنجم پس از خروج مایع رویی، این بار محیط کشت حاوی LPS با غلظت ۵۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد. محیط رویی سلول‌های hAECs نیز به آرامی جمع‌آوری شده و با محیط تازه جایگزین شد. کشت سلول‌ها تا ۲ روز دیگر ادامه یافت. پس از ۷ روز سلول‌های مشتق از منوسیت با شستشوی آرام جمع‌آوری شدند و ایمونوفلوروسانسینگ آن‌ها با کمک آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان گروه کنترل، سلول‌های منوسیت در عدم حضور سلول‌های AEC در شرایط ذکر شده در بالا کشت داده شدند.

آزمایش‌های فلوسایتومتری

به منظور بررسی ایمونوفلوروسانسینگ سلول‌های DC تولید شده در مرحله قبل و بعد از هم‌کشتی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال متصل به FITC (Fluorescein Isothiocyanate) ضد مارکرهای CD80 و HLA-DR و آنتی‌بادی مونوکلونال متصل به PE (Phycoerythrin) ضد مارکرهای CD86, CD83, CD14 و CD1a و آنتی‌بادی مونوکلونال متصل به PE-CY5 ضد مارکر CD40 و آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ کنترل مناسب (همه از شرکت BD, USA) خریداری شده و رنگ آمیزی‌ها به صورت تک رنگی انجام شد. به طور خلاصه، سلول‌های مشتق از منوسیت برای مارکرهای ذکر شده در بالا به طور جداگانه در ۷ میکرو تیوپ به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در محلول رنگ آمیزی (PBS حاوی FBS ۲ درصد) با آنتی‌بادی متصل به رنگ‌های فلوروسانت مجاور شدند. سپس آنتی‌بادی‌های متصل نشده شسته شده و فنوتیپ سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتر (Partec, Germany) تجزیه و تحلیل شد. مشابه همین مراحل برای لوله‌های مربوط به آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل نیز انجام شد. به منظور مقایسه میزان بیان مولکول‌های کمک محرک (CD86, CD80, CD40, CD83) و مولکول‌های

آرامی جمع‌آوری و دور ریخته شد و با محیط تازه حاوی سایتوکاین با همان غلظت مذکور جایگزین گردید. پس از ۵ روز، سلول‌های iDC تولید شده با شستشوی ملایم توسط محیط کشت پایه جمع‌آوری شده و فنوتیپ آنها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تولید mDC، سلول‌های DC نابالغ در عرض ۵ روز مطابق آنچه در بخش قبل توضیح داده شد تهیه شدند. روز پنجم به محیط کشت سلول‌ها LPS (Sigma, USA) که فاکتور بلوغ دندربیتیک سل‌هاست با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اضافه شده و سلول‌ها به مدت دو روز دیگر کشت داده شدند. روز هفتم سلول‌های DC بالغ به دست آمده با شستشوی آرام جمع‌آوری شده و فنوتیپ آنها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

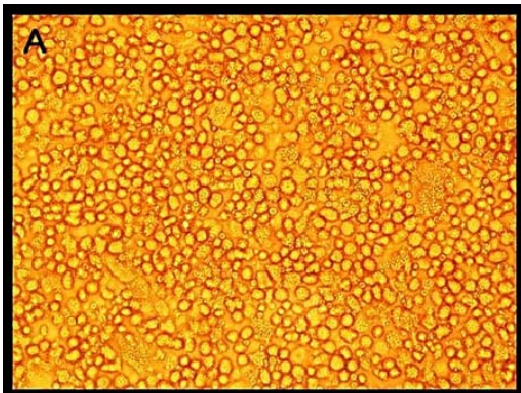
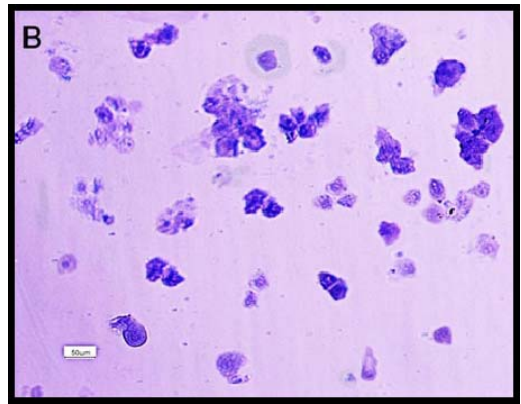
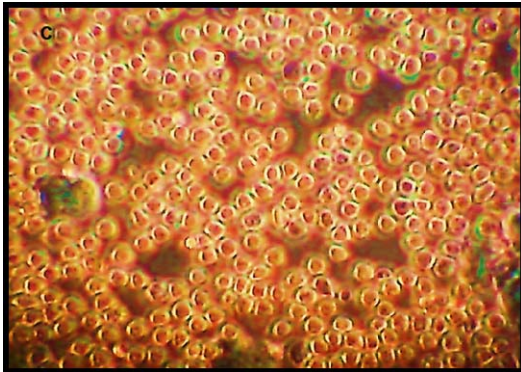
مدل‌های طراحی شده برای هم‌کشتی hAECs با سلول‌های منوسیت

در این بخش ۲ مدل برای هم‌کشتی منوسیت با AEC طراحی گردید که شامل هم‌کشتی سلول‌های منوسیت با hAECs تا مرحله تولید iDC و هم‌کشتی سلول‌های منوسیت با hAECs تا مرحله تولید mDC که عملیات هم‌کشتی فوق به طور کامل در سیستم ترانس ول انجام شد. پلیت‌های ترانس ول دارای بخشی به نام Insert chamber هستند که این قسمت امکان جدا نگهداشتن دو جمعیت سلولی را در طی هم‌کشتی فراهم می‌کند. Insert chamber ها دارای سایزهای مختلف در منافذ شان هستند که بر اساس نوع مطالعه سایز منفذ مناسب انتخاب می‌شود. در این مطالعه هدف هم‌کشتی تبادل فاکتورهای محلول بود.

هم‌کشتی منوسیت با سلول‌های AEC تا مرحله تولید DC نابالغ

به منظور تولید سلول DC در شرایط ترانس ول از روش مشابه روش ذکر شده در مقالات استفاده شد (۳۰). بدین منظور، از پلیت‌های کشت ۶ خانه ترانس ول (SPL, Korea) با قطر منفذ ۰/۴ میکرومتر استفاده شد. سلول‌های hAECs به تعداد ۶×۱۰^۵ در قسمت بالایی (Insert) در حجم ۱ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI کامل حاوی FBS ۱۰٪ (Gibco, Germany)، ال-گلوتامین ۲ میلی‌مولار (L-Glutamine) (Non Essential Amino acid)، پنی سیلین (۱۰۰ واحد بین‌المللی)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم) و سدیم پیرووات (Pyroate) (۱٪) (Sigma USA) کشت داده شدند. سلول‌های منوسیت تازه جدا شده (با میانگین خلوص ۹۴٪) در حضور

استفاده از درصد بیان سایتوکراتین (اصلی ترین مارکر سلول-های اپی تلیالی) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده خلوص ۹۰ درصدی سلول‌های جدا شده بود. بررسی میکروسکوپی سلول‌های AEC نشان داد که AECs سلول‌های مکعبی و مسطح می‌باشند. نتایج مربوط به مارکرهای سطحی سلول‌های جنینی خلوص بالایی را در اکثر موارد جداسازی شده در مراحل تکرار بررسی نشان داد.



شکل ۱. مورفولوژی میکروسکوپی سلول‌های اخذ شده از آمنیون. مورفولوژی سلول‌ها، حاکی از نشانه‌های اپیتلیالی در آنها است. بعضی به صورت مدور و تعداد بسیاری اشکال مربع و مستطیل می‌باشند. A: سلول‌ها بر روی لام، B: سلول‌ها با رنگ آمیزی گیمسا. C: سلول‌ها در محیط کشت سلول. میکروسکوپ نوری معکوس

HLA-DR در گروه‌های مختلف، از فاکتوری به نام نسبت میانگین شدت نور (MFI: Mean Ratio Fluorescence Intensity) استفاده شد. این فاکتور حاصل تقسیم میانگین شدت نور (MFI: Mean Fluorescence Intensity) سلول‌های رنگ شده با آنتی بادی مورد نظر بر MFI سلول‌های رنگ شده با آنتی بادی ایزوتیپ کنترل است. در مورد مارکرهای CD1a (اختصاصی سلول‌های DC) و CD14 (اختصاصی سلول‌های مونسیت خون محیطی) درصد سلول‌های مثبت مقایسه شد.

آزمایش سنجش غلظت سایتوکین

به منظور بررسی میزان تولید سایتوکین‌های IL10 و IL12 مایع رویی واکنش هم‌کشتی سلول‌های مونسیت با سلول‌های AEC و همچنین گروه کنترل (سلول‌های مونسیت و سلول‌های AEC کشت داده شده به تنهایی) در روز ۵ و روز ۷ جمع‌آوری شد. میزان تولید سایتوکین‌های IL10 و IL12 تکنیک الیزای ساندویچ (Sandwich ELISA) طبق روش بیان شده در کیت (R&D, USA) انجام گرفت. غلظت سایتوکین‌های IL10 و IL12 در مقایسه با غلظت استانداردهای همراه کیت محاسبه شد. غلظت استانداردها شامل: ۰.۳۱/۲۵، ۰.۶۲/۵، ۱.۲۵، ۲.۵۰، ۵.۰۰، ۱۰.۰۰، ۲۰.۰۰ در مورد هر دو سایتوکین بود. تمامی نمونه‌ها به صورت دوتایی اندازه‌گیری شدند.

تحلیل آماری

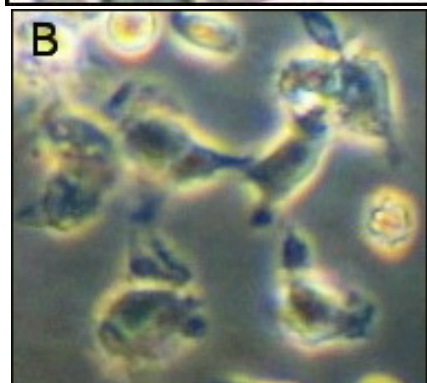
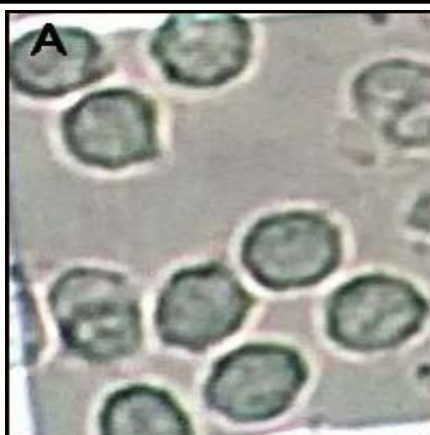
تحلیل نتایج و رسم نمودارها به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism ویرایش ۶ انجام شد. به منظور مقایسه بین میانگین‌ها در این مطالعه، در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال بود از آزمون آنالیز واریانس (One-way ANOVA) و t مستقل (Independent-Sample T test) و در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال نبود از معادل ناپارامتری آنها، به ترتیب، کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis) یا من-ویتنی (Mann-Whitney) استفاده شد و در صورت معنی‌داری مقایسه بیش از دو میانگین نیز آزمون تعقیبی دانت (Dunnett) به کار برده شد. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (Mean \pm SEM) گزارش شدند. در تمام آزمایشات حدود اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد و p-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

جداسازی پرده آمنیون و تخلیص و کشت سلول‌های

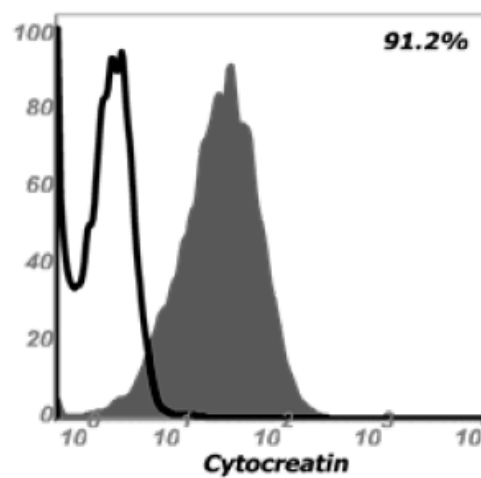
hAEC از پرده آمنیون

از هر واحد پرده آمنیون در هر بار جداسازی ۶۰-۷۰ میلیون سلول AEC به دست آمد. خلوص سلول‌های جدا شده با



شکل ۲. مورفولوژی میکروسکوپی سلول‌های مونوسیت جدا شده از سلول‌های PBMC (A)، سلول‌های iDC (B) و mDC (C). سلول‌های مونوسیت، به صورت کاملاً مدور با غشای یکنواخت در سطح لام نئوبار مشاهده شدند (A). به منظور تولید سلول iDC، سلول‌های مونوسیت به مدت ۵ روز در حضور سایتوکین‌های IL4 و GM-CSF کشت داده شدند. سلول‌های مونوسیتی که برای تولید iDC در محیط کشت آماده گردیده بودند، پس از ۵ روز در محیط کشت به صورت سلول‌های کشیده و دارای پاهای کاذب مشاهده شدند. ملاحظه می‌شود که وضعیت سلول‌های دندریتیک در مورد دستجات اتصال یافته به هم در محیط کشت، کاملاً ایده آل است و این تغییرات ظاهری حتی در سلول‌های غیر شناور نیز ملاحظه گردیدند (B). به منظور تولید سلول mDC، سلول‌های مونوسیت به مدت ۵ روز در حضور سایتوکین‌های IL4 و GM-CSF کشت داده شدند و سپس ۲ روز دیگر در حضور LPS کشت داده شدند. سلول‌های مونوسیتی که برای تولید Mdc در محیط کشت آماده گردیده بودند، پس از ۷ روز در محیط کشت به صورت سلول‌هایی با ایجاد زواید میله‌ای شکل (Rod-Shaped appandages) که کاملاً متمایز از پاهای کاذبی بود که در iDC ها مشاهده شدند (C). میکروسکوپ نوری معکوس

پس از ۷۲ ساعت کشت سلول‌ها، hAEC ها سه لایه مجزرا را در فلاسک کشت تشکیل دادند: چسبنده، نیمه چسبنده و سلول‌های شناور که با خروج محتویات رویی کشت حذف گردیده و سلول‌های نیمه شناور با شستشوی بستر فلاسک توسط RPMI گرم به راحتی از مجموعه چسبنده تفکیک و از محیط سلولی جداسازی گردیدند و در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. تصاویر مربوط به نمای میکروسکوپی سلول‌ها در شکل ۱ آمده است. نمودار ۱ نیز خلوص سلول‌های اپی تلیالی را به لحاظ بیان بالای مارکر سیتوکراتین نشان می‌دهد.



نمودار ۱. هیستوگرام مربوط به فلوسایتومتری مارکر سیتوکراتین در سلول‌های اپی تلیال اخذ شده از پرده آمیون

نتایج تولید و ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مونوسیت جدا شده از PBMC و سلول‌های iDC و mDC تولید شده از مونوسیت قبل از مرحله هم‌کشتی به روش فلوسایتومتری

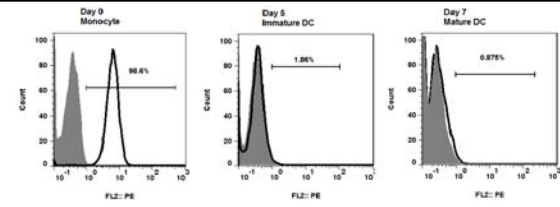
بررسی بیان مارکر CD14 که مارکر اصلی مونوسیت است، نشان داد که مونوسیت‌های جدا شده دارای خلوص 98 ± 0.9 درصد هستند. لازم به تاکید است که مورفولوژی منوسیت‌های به دست آمده و نیز سلول‌های دندریتیک تکامل یافته بالغ و نابالغ با مشاهدات میکروسکوپی به همان گونه که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد و مطابقت با منابع تصویری این رده‌ها داشته و در زمره نتایج بارز این مطالعه می‌باشد.

مونوسیت‌ها به لحاظ مارکرهای CD1a, CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40 نیز بررسی شدند که مارکر CD86 و HLA-DR مثبت و بقیه منفی بودند. در مورد دو مارکر CD1a و CD14 نتایج به صورت میانگین درصد سلول‌های مثبت گزارش شد و نتایج بیان مارکرهای CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40 به صورت میانگین MRFI گزارش شد.

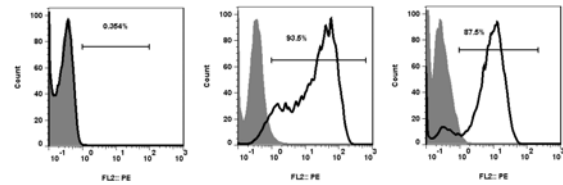
در روند تولید DC های نابالغ در روز ۵، شاهد کاهش مارکر CD14 که اصلی‌ترین مارکر مونوسیتی است، بودیم که در صورت عدم بلوغ پایدار می‌ماند. سلول‌های DC نابالغ در این بررسی در اکثریت موارد با کاهش شدید مارکر CD14 همراه بودند، به طوری که در انتهای کشت تنها ۲٪ از آنها واجد مارکر CD14 بودند. همچنین مارکر CD1a که اختصاصی سلول‌های DC تولید شده از مونوسیت است، تا ۸۰ درصد افزایش نشان داد. افزایش چشمگیر مارکر CD1a نشان دهنده موفقیت آمیز تولید iDC از مونوسیت است. سلول‌های iDC مارکرهای CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40 را نیز بیان می‌کردند. CD80 و CD40 در سطح بسیار پایینی بود. CD83 که مارکر بلوغ سلول DC است بیان بسیار کمی داشت. در مورد مارکرهای CD14 و CD1a درصد سلول‌های مثبت و در مورد سایر مارکرها، میانگین MRFI بیان شده است. در روند تولید mDC در روز ۷، همان طور که انتظار می‌رفت، مارکر CD14 به صورت کامل (در حد فقدان بیان) در سلول‌های تحت کشت برای تولید mDC، حذف و فاقد بیان گزارش گردید. این سلول‌ها نیز مانند گروه قبل یعنی iDC، مارکر CD1a را به میزان بالایی بیان کردند. سلول‌های mDC مارکرهای CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40 را نیز بیان می‌کردند. بیان CD83 که مارکر بلوغ سلول DC است، نسبت به iDC افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد که نشان دهنده موفقیت آمیز تولید mDC از iDC است. بیان CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40 نیز افزایش معنی‌داری نسبت به iDC نشان داد. در مورد مارکرهای CD14 و CD1a درصد سلول‌های مثبت و در مورد سایر مارکرها، میانگین MRFI بیان شده است (نمودار ۲).

نتایج تاثیر سلول‌های AEC بر تولید سلول‌های DC از منشا مونوسیت‌های خون محیطی

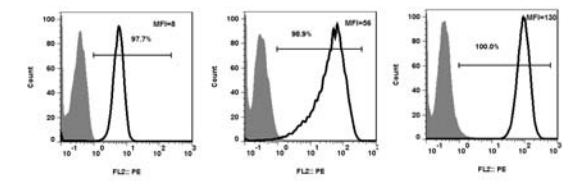
از آنجایی که یکی از اهداف بسیار با ارزش این پژوهش مطالعه، تاثیر AEC‌ها بر روند تکامل یافته انواع DC و بررسی این وقایع به صورت ایمونوفنوتایپینگ DC‌های حاصله و بررسی سایتوکین‌های مترشحه بود، لذا نتایج این هم‌کشتی پس از افزودن اصلی‌ترین فاکتورهای رشد DC شامل IL4 و GM-CSF می‌توانست تاثیر به‌سزایی در مسیر تغییر این سلول‌ها به سمت بلوغ و تکامل داشته باشد. عملیات هم‌کشتی فوق به طور کامل در سیستم ترانس ول امکان مداخله مستقیم با سایتوکین‌های فوق را فراهم و به خصوص در مراحل ایمونوفنوتایپینگ، DC های تفکیک شده در طی کشت را برای اخذ نتایج هموار می‌ساخت. با توجه به سائز منافذ



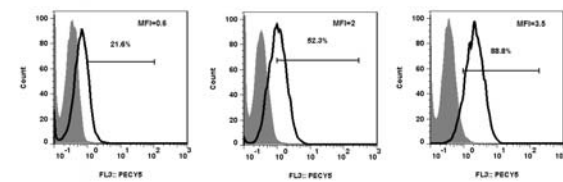
CD14



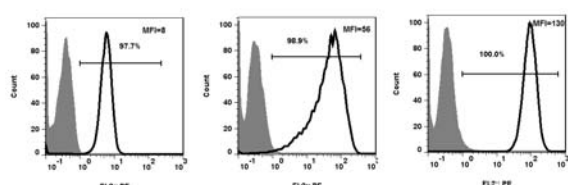
CD1a



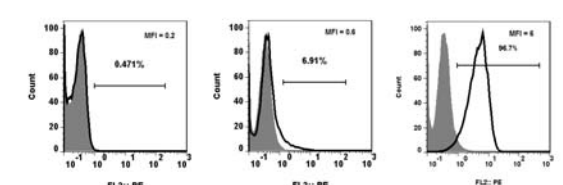
HLA-DR



CD40

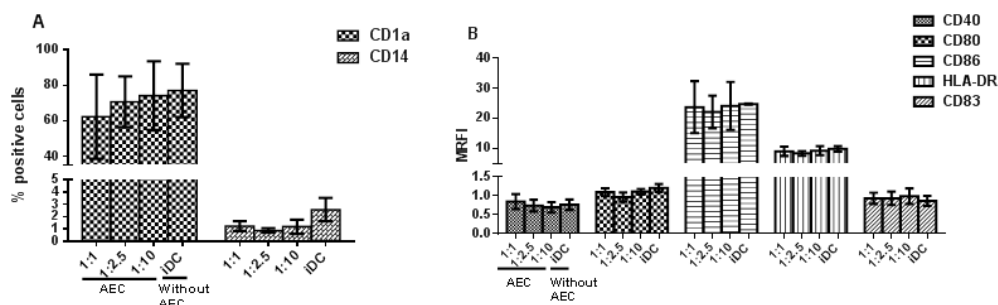


CD86

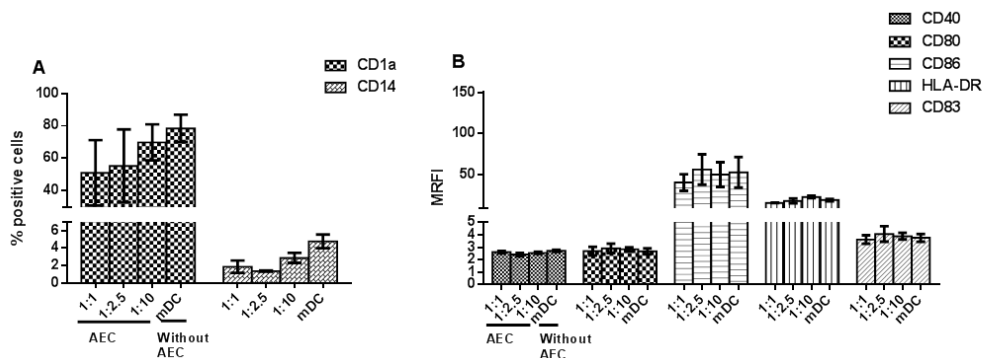


CD836

نمودار ۲. هیستوگرام مربوط به نتایج حاصل از ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مونوسیت (Day 0) و سلول‌های مشتق از مونوسیت در مرحله قبل از هم‌کشتی به منظور تولید iDC (Day 5) و mDC (Day 7). قبل از انجام هم‌کشتی سلول‌های مونوسیت با سلول‌های AEC لازم بود تا ابتدا مونوسیت‌های تخلیص شده از نظر درصد خلوص بررسی شوند و نیز روش تولید سلول iDC و mDC قبل از هم‌کشتی بهینه سازی شود. بدین منظور مارکرهای سطحی سلول‌های مونوسیت بدست آمده از PBMC در مرحله قبل از کشت در روز صفر مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تولید iDC، مونوسیت به مدت ۵ روز در کنار فاکتورهای رشد IL4 و GM-CSF کشت داده شدند. این سلول‌ها نیز از نظر بیان مارکرها بررسی شدند



نمودار ۳. نتایج بررسی ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مشتق از مونوسیت در هم کشتی با سلول‌های AEC در مرحله تولید iDC. سلول‌های مونوسیت در شرایط بهینه برای تولید iDC به مدت ۵ روز در کنار سلول‌های AEC کشت داده شدند. هم کشتی در نسبت‌های مختلف AEC به مونوسیت و در حضور و عدم حضور AEC انجام گرفت. در انتهای هم کشتی سلول‌های مشتق از مونوسیت جمع‌آوری شده و ایمونوفنوتایپینگ آنها به وسیله دستگاه فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. تمایز سلول‌های مونوسیت (+CD14) به iDC توسط سلول‌های AEC مهار نشد. نتایج حاصل با سلول‌های کنترل (iDC) از نظر بیان مارکرهای CD1a و CD14 و همچنین بیان کمک‌محرک‌ها، CD83 و HLA-DR مقایسه شدند. در مورد ۲ مارکر CD1a و CD14 نتایج به صورت میانگین درصد سلول‌های مثبت و در مورد سایر CD مارکرها نتایج به صورت میانگین MRFI نشان داده شده‌اند.



نمودار ۴. نتایج بررسی ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مشتق از مونوسیت در هم کشتی با سلول‌های AEC در مرحله تولید mDC. سلول‌های مونوسیت در شرایط بهینه برای تولید mDC به مدت ۷ روز در کنار سلول‌های AEC کشت داده شدند. هم کشتی در نسبت‌های مختلف AEC به مونوسیت انجام گرفت. کشت در حضور و عدم حضور AEC انجام شد. به منظور بلوغ در روز ۵ فاکتور بلوغ LPS به محیط کشت اضافه شد. در انتهای هم کشتی سلول‌های مشتق از مونوسیت جمع‌آوری شده و ایمونوفنوتایپینگ آن‌ها به وسیله دستگاه فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل با سلول‌های کنترل (mDC) از نظر بیان مارکرهای CD1a و CD14 (A) و همچنین بیان کمک‌محرک‌ها، CD83 و HLA-DR مقایسه شدند. تمایز سلول‌های مونوسیت (+CD14) به mDC توسط سلول‌های AEC مهار نشد. در مورد ۲ مارکر CD1a و CD14 نتایج به صورت میانگین درصد سلول‌های مثبت و در مورد سایر CD مارکرها نتایج به صورت میانگین MRFI نشان داده شده‌اند.

ترانس ول‌ها، عبور فاکتورهای محلول از سلول‌های تحت هم کشتی امکان‌پذیر بوده است. کشت سلول‌های مونوسیت CD14+ جدا شده از نمونه بافی‌کوت در محیط کشت حاوی سایتوکین‌های IL4 و GM-CSF به منظور تولید سلول‌های iDC و mDC در حضور و عدم حضور سلول‌های AEC انجام گرفت. پس از گذشت ۵ روز، میزان تمایز به سلول‌های iDC و پس از اضافه کردن فاکتور بلوغ و گذشت ۲ روز دیگر در روز ۷ میزان تمایز به سلول‌های mDC در حضور و عدم حضور سلول‌های AEC از طریق تجزیه و تحلیل درصد بیان مارکرهای CD1a و CD14 و همچنین میزان بیان مارکرهای

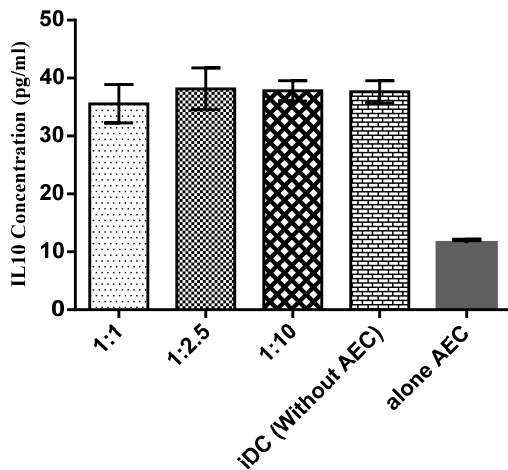
ترانس ول‌ها، عبور فاکتورهای محلول از سلول‌های تحت هم کشتی امکان‌پذیر بوده است. کشت سلول‌های مونوسیت CD14+ جدا شده از نمونه بافی‌کوت در محیط کشت حاوی سایتوکین‌های IL4 و GM-CSF به منظور تولید سلول‌های iDC و mDC در حضور و عدم حضور سلول‌های AEC انجام گرفت. پس از گذشت ۵ روز، میزان تمایز به سلول‌های iDC و پس از اضافه کردن فاکتور بلوغ و گذشت ۲ روز دیگر در روز ۷ میزان تمایز به سلول‌های mDC در حضور و عدم حضور سلول‌های AEC از طریق تجزیه و تحلیل درصد بیان مارکرهای CD1a و CD14 و همچنین میزان بیان مارکرهای

CD40, CD86, CD83, CD80 و HLA-DR به صورت با اندکس MRFI بررسی شد.

ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مشتق از مونوسیت در هم کشتی با سلول‌های AEC در مرحله تولید iDC در مورد سلول‌های iDC تولید شده در حضور AEC بر اساس نتایج فلوسایتمتری، درصد سلول‌های CD1a ($P=0/596$) در گروه تست در سه نسبت ۲/۵/۱، ۱/۱ و ۱۰/۱ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل (کشت در غیاب سلول‌های AEC) نشان نداد (نمودار ۳). در مورد CD14 ($P=0/273$) نیز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد (نمودار ۳). در مورد دو مارکر

بررسی میزان ترشح سایتوکین‌های IL10 و IL12 در مایع رویی هم‌کشتی مونوسیت با hAEC در مرحله iDC

مایع رویی کشت سلول‌های گروه‌های تحت بررسی در ۳ نسبت مختلف و گروه کنترل (عدم حضور AEC) در روز ۵ جمع‌آوری و غلظت سایتوکین IL10 و IL12 در آنها با تکنیک الیزا سنجیده و سپس نتایج مقایسه شدند. البته به منظور بررسی سایتوکین‌های مترشحه از سلول‌های hAECs به تنهایی، پلیت کنترل دیگری در نظر گرفته شد که در آن سلول‌های hAECs به تنهایی کشت داده شدند. اعداد مربوط به غلظت سایتوکین بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. بر اساس نتایج، تفاوت معنی‌داری از نظر تولید IL10 توسط سلول‌های T- {AEC-iDC} با گروه کنترل مشاهده نگردید. میانگین IL10 در مایع رویی گروه T- {AEC-iDC} در نسبت‌های ۲/۵: ۱، ۱۰: ۱ و ۱: ۱ به ترتیب برابر ۳۸/۱۶±۷/۲۲، ۳۵/۵۸±۶/۶۱ و ۳۸/۸۲±۳/۵۱ و در گروه کنترل T- {C-iDC} مقدار IL12 در مایع رویی سلول‌های iDC به دلیل مقادیر بسیار ناچیز قابل ردیابی نبود و با توجه به منحنی استاندارد غلظت‌های بدست آمده در مورد IL12 صفر به دست آمد (نمودار ۶).



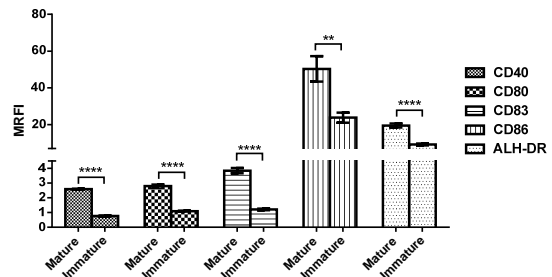
نمودار ۶. بررسی غلظت سایتوکین IL10 در مایع رویی هم‌کشتی مونوسیت با hAEC در مرحله تولید iDC. در پلیت‌های ترانس ول مونوسیت در کنار سلول hAEC در ۳ نسبت مختلف و همچنین در گروه کنترل در عدم حضور AEC در شرایط مطلوب برای تولید iDC کشت داده شدند. در روز ۵ مایع رویی کشت‌ها جمع‌آوری شده و غلظت سایتوکین IL10 در آن‌ها اندازه‌گیری شد. مایع رویی گروهی که در غیاب سلول hAEC کشت داده شد، به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. نتایج به صورت Mean ± SEM گزارش شدند.

CD14 و CD1a نتایج به صورت میانگین درصد سلول‌های مثبت به همراه خطای استاندارد (SEM) گزارش شد. بیان مارکرهای CD80 (P=۰/۴۶۰)، CD86 (P=۰/۸۲۵)، HLA-DR، CD83 (P=۰/۸۷۶)، CD40 (P=۰/۷۶۷) نیز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۳). نتایج بیان مارکرهای CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40 به صورت میانگین MRFI به همراه خطای استاندارد (SEM) گزارش شد. نتایج از انجام ۳ تکرار حاصل شده است. به منظور آنالیز نتایج از آزمون آماری کروس کالوایس استفاده شد.

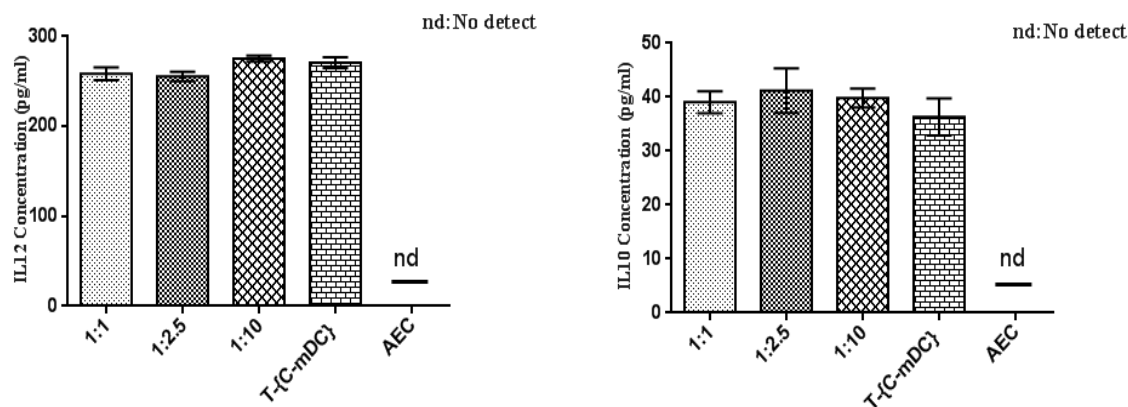
ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مشتق از مونوسیت در هم‌کشتی با سلول‌های AEC در مرحله تولید mDC

بر اساس نتایج فلوسایتومتری، درصد سلول‌های CD1a در گروه تست در سه نسبت ۱/۱۰، ۲/۵/۱ و ۱۰/۱۰ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۴). در مورد مارکر CD14 در نسبت ۲/۵: ۱ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده شد، ولی در مورد سایر نسبت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۴). در مورد دو مارکر CD1a (P=۰/۵۲۵) و CD14 (P=۰/۰۲۶) نتایج به صورت میانگین درصد سلول‌های مثبت به همراه خطای استاندارد (SEM) گزارش شد.

بیان مارکرهای CD80 (P=۰/۸۳۸)، HLA-DR (P=۰/۱۰۸)، CD86 (P=۰/۹۷۵)، CD40 (P=۰/۴۷۶) و CD83 (P=۰/۹۶۹) نیز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۴). نتایج بیان مارکرهای CD80, CD86, HLA-DR, CD83, CD40 به صورت میانگین MRFI به همراه خطای استاندارد (SEM) گزارش شد. نتایج از انجام ۳ تکرار حاصل شده است. به منظور آنالیز نتایج از آزمون آماری کروسکال والیس استفاده شد (نمودار ۵).



نمودار ۵. مقایسه بین نتایج ایمونوفنوتایپینگ مارکرهای iDC ها با mDCهای تولید شده از مونوسیت از نظر بیان مارکرهای کمک‌تحریکی در مرحله بعد از هم‌کشتی



نمودار ۷. نتایج بررسی غلظت سایتوکین IL12 و IL10 در مایع رویی هم کشتی مونوسیت با hAEC در مرحله تولید mDC. مایع رویی های ترانس ول مونوسیت در کنار سلول hAEC در ۳ نسبت مختلف در شرایط مطلوب برای تولید mDC کشت داده شدند. مایع رویی گروهی که در غیاب سلول hAEC کشت داده شد، به عنوان کنترل در نظر گرفته شد (T-{C-mDC}). در روز ۷ مایع رویی کشت ها جمع آوری شده و غلظت سایتوکین IL12 و IL10 با تکنیک الیزا در آن ها اندازه گیری شد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شدند.

است که ذکر آن نشان دهنده اثر ساپرسیو سلول های مزانشیم موجود در مجموعه سلول های پرده آمینون بوده است (۱۳). در شرایط طبیعی نیز لایه اپی تلیالی به دور از تشکیلات سلولی ایمنی واقع در بستر عروقی جفت و پرده ها می باشد. اینکه AECs جدا از فعالیت سرکوبگر سلول های stem cell مزانشیمی، نقشی در مسیر تحمل جنینی توسط سیستم ایمنی مادر داشته و یا خیر؟ مشاهدات invitro که مربوط به بیان مارکرهای تمایزی و فاکتورهای بلوغ سطحی سلول های DC است می تواند فرضیه عملکرد غیرمستقیم سلول های اپیتلیالی آمینونی را قوت بخشد. در مراجع و فرانس های مربوطه در هیچ موردی توجه به این مسیر تکمیلی صورت نپذیرفته بود. با وجود اثبات نقش سرکوبگر سلول های اپیتلیالی در برانگیختن فعالیت فاگوسیتیک و دفاع ذاتی (۳، ۸)، اثبات اثر تولروژنیک سلول های فوق بر بیان مارکرهای بلوغ سلول های دندریتیک هدف اصلی این مطالعه بود. بدین منظوری گردید تا جمعیت نسبتا خالصی از سلول های اپیتلیالی را تخلیص نماییم (۲۸، ۲۹). بررسی مارکر سایتوکراتین که مارکر اصلی سلول های اپیتلیالی است (۲۹)، به کمک تکنیک فلوسایتومتری و خلوص بیان ۹۰٪ این مارکر در سلول های اخذ شده از پرده نشان از خلوص بالای سلول های جدا شده از پرده داشت (نمودار ۱). با انجام فنوتایپینگ جمعیت نیمه چسبنده، خصوصیات اپی تلیالی آنها تعیین گردید. خلوص بالای این مجموعه به لحاظ دارا بودن سایتوکراتین، بیان مولکول های HLA کلاس یک، و سایر مارکرهای اپی تلیالی مانند CD133، CD79 و غیره نشانه ای از خلوص بالای این

بررسی میزان ترشح سایتوکین های IL10 و IL12 در مایع رویی هم کشتی مونوسیت با hAEC در سیستم ترانس ول در مرحله mDC

مایع رویی کشت سلول های هر دو گروه تست در ۳ نسبت مختلف و گروه کنترل (عدم حضور AEC) در روز ۷ جمع آوری و غلظت سایتوکین های IL10 و IL12 در آنها سنجیده و مقایسه شد. اعداد مربوط به غلظت سایتوکین ها بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر می باشد. بر اساس نتایج، تفاوت معنی داری از نظر تولید IL10 توسط سلول های گروه تست با گروه کنترل مشاهده نگردید. میانگین IL10 در مایع رویی گروه های تست و کنترل به ترتیب در گروه کنترل معادل $37/64 \pm 3/81$ ، نسبت ۲/۵:۱ معادل $38/16 \pm 7/22$ ، ۱:۱۰ معادل $35/58 \pm 6/61$ و ۱:۱ معادل $38/82 \pm 3/51$ بود (نمودار ۷).

بحث

در مطالعه حاضر تاثیر سلول های اپی تلیالی پرده آمینون (AEC) بر روند تولید سلول های DC از منشا مونوسیت های خون محیطی بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده سلول های AEC تمایز سلول های مونوسیت (CD14+) را به سلول های iDC و mDC در سیستم کشت ترانس ول مهار نمی نمایند. فرایند هم کشتی مونوسیت های CD14+ با سلول های AEC به دنبال تماس غیرمستقیم در پلیت های کشت ترانس ول صورت پذیرفت. هدف ما عدم برقراری تماس سلول با سلول بود. زیرا این تحقیقات قبلاً صورت پذیرفته

نسبت‌های سلولی از ۱:۱ تا ۱:۱۰ بودیم. سلول‌های iDC دارای توان ترشحی مناسبی از IL-10 در مقایسه با کنترل بودند. این وضعیت در مقایسه با ترشح این سایتوکاین در شرایط تولید mDC کاملاً متفاوت بود، به طوری که همان mAEC گونه که انتظار می‌رفت فاقد هرگونه غلظت IL-10 گزارش گردیدند که کاملاً منطبق با شرایط آنها و ضدیت با اصول تحریک این آدپتیو از نوع سلولی می‌باشد. AEC به تنهایی در مرحله قبل از بلوغ DCها در شرایط کشت واجد ترشح کمی از IL-10 بود و لیکن در ادامه روند کشت، این تولید متوقف گردید و به صورت «no detect» گزارش شد. در حالی که DCهای بالغ در مجاورت AEC نزدیک به محدوده DCها که گزارش گردید، واجد توان ترشحی در تولید IL-10 بودند. این میزان IL-10 در مقایسه با مطالعات و مراجع تحقیق غیر قابل دفاع در مقابل مقادیر بالای ترشحی IL-12 توسط mDCها بوده‌اند. ترشح سایتوکاین IL12 که نشان دهنده بلوغ DCها در شرایط کشت می‌باشد، به صورت معنی‌داری متفاوت از ترشح IL10 بود. در این مرحله از بلوغ DCها با توجه به عدم ترشح IL12 در شرایط غیر هم‌کشتی، ملاحظه نمودیم که AECها فاقد ترشح IL12 می‌باشند که همان گونه که ذکر گردید موافق با اصول تولروژنیسیته در دوران بارداری است. DCهای بالغ با وجود همراهی با AECها و مخالف با انگیزه انجام این بررسی، طبق مقالات (۳۱) توان بالایی را در ترشح IL12 در شرایط هم‌کشتی داشتند و در واقع DCهای بالغ با وجود همراهی با AECها موفق به تولید مقادیر IL12 بسیار بالاتر از IL10 و تا نزدیک ۳۰۰ پیکوگرم شده بودند. آیا سلول‌های اپیتلیال آمینونی در مراحل مختلف تکامل جنینی اعمال متفاوتی را در جهت تولروژنیسیته و یا ایمونوژنیسیته دارند؟ آیا ما با مرحله ایمونوژنیسیته سلول‌های اپی‌تلیالی آمینون روبرو بودیم؟ این می‌تواند به واسطه طبیعت میکروآناتومیک این جایگاه باشد. سلول‌های اپی‌تلیالی در ساختاری دورتر از شریان‌های اسپیرال قرار دارند. پس به نظر میرسد که دسترسی به مونوسیت‌های در گردش داشته باشند. در حالی که سلول‌های مزانشیمال این لایه‌ها به خصوص پرده کوریون در تماس مستقیم با مونوسیت‌های در گردش می‌باشد و امکان وقوع رخدادهای تحمل‌زایی مانند آنچه که در مقالات و پژوهش‌ها ملاحظه می‌کنیم (۱۳)، محتمل بوده و پرده آمینون با وجود ترشح فاکتورهای سوپرسور متعدد و با الگوی مشابهی که در این پژوهش طراحی نمودیم، ناتوان در برانگیختن توان تحمل‌زایی در رده‌های میلوئیدی مونوسیتی است. نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که نه تنها سلول‌های اپیتلیالی

سلول‌ها به لحاظ ماهیت اپی‌تلیالی می‌باشد. همین مجموعه نیمه شناور است که توسط شستشو، شمارش و تعیین وایابلیتی یا درصد توان حیاتی برای مراحل کشت و نیز واقع گردیدن در یک سیستم هم‌کشتی (Co-culture) برگزیده شدند. منفی بودن مارکر CD34 در این سلول‌ها، امکان همراهی با رده‌های سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک را کاملاً منتفی می‌سازد. می‌توان اذعان داشت که از این پس با یک جمعیت یکنواختی از سلول‌های اپی‌تلیالی آمینوتیک روبرو بودیم. حاصل روند رو به تکامل MDDC در غیاب مجاورت با AEC (مرحله قبل هم‌کشتی) ملاحظه تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها بود که به خوبی نشان داد که تفاوت‌های ساختاری بین mDC و iDC با مشاهده میکروسکوپی سلول‌های تحت کشت، دلیلی مستند بر ارائه روند تکامل و بلوغ آنهاست (شکل ۲). این مراحل به خوبی توسط فلوسایتومتری و مطالعات فوتوآپینینگ به اثبات رسید. در نتایج بررسی چگونگی بیان مارکرها در سطح iDC، می‌توان با توجه به تغییرات بیان مارکرهای سطحی منجمله CD40, CD80, CD86, CD83 و HLA-DR به خوبی روند تکامل و بلوغ آنها را ملاحظه نمود که در این یافته‌ها نیز به طور واضحی وجود هتروژنیسیته در مجموعه این سلول‌ها به چشم می‌خورد (نمودار ۳). به طوری که در شرایط مختلف و نسبت‌های تعادل یافته متفاوت گوناگونی در هر سه مرحله تکرار پذیرش انجام کشت و نیز تفاوت بارز بین میانگین‌های هر گروه را به وضوح ملاحظه نمود. در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های AEC نیز عیناً مراحل بلوغ صورت پذیرفته است. روند تکاملی و رو به رشد بیان مارکرها هم در مرحله تولید iDC و mDC کاملاً مشهود است. آن هم با وجود شرایط قابل وضوح در جمعیت‌های با بیان متفاوت که حاصل بررسی نتایج MFI و MRFI می‌باشد. با توجه به نمودارهای این مجموعه به خصوص نمودار ۳ و ۴، بررسی ایمونوفنوتایپینگ نشان داد که iDCها همچنان با تفاوت درصد بیان در دو مارکر CD1a و CD14 در صدر جدول بیان سطحی این دو مارکر قرار دارند و HLA-DR و CD86 بلحاظ فقدان بلوغ و تکامل نمایی، عرضه بالایی را نشان می‌دهد و سایر موارد مانند CD40 و CD80 در مقایسه با mDC تفاوت آشکاری را از نظر درصد بیان سلول‌های مثبت و اندکس MRFI نشان می‌دهند. در بررسی غلظت سایتوکاین IL-10، ملاحظه گردید که سلول‌های AEC به دلیل ماهیت بیولوژیک خاص خود، واجد قدرت ترشح IL-10 در حد زیر ۱۰ پیکوگرم بودند. در تمامی تست‌ها آن طور که انتظار می‌رفت شاهد افزایش غلظت و ترشح IL-10 بدون توجه به تفاوت

در محدوده خاتمه بارداری امکان حذف مکانیسم‌های تولروژنیک سیستم دفاعی مادری به منظور آغاز روند خروج جنین فراهم می‌آید. ولیکن ناگزیر از عدم اثبات آن هستیم زیرا نمی‌توان شرایطی را به وجود آورد که در تجربه‌ای مشابه بتوان از سلول‌های اپی تلیالی پرده آمنیون بارداری کمتر از سی و شش هفته در فرآیند کشت هم‌زمان با سلول‌های دندریتیک استفاده نمود.

آمنیوتیک فاقد قدرت تولروژنیسیته در DCهای مشتق از مونوسیت می‌باشند، بلکه نه به لحاظ فنوتیپیک و نه تغییرات ترشحی سایتوکین‌های ویژه دفاع آداپتیو، قادر به مهار بلوغ این رده سلولی نبوده و هیچ گونه تأثیری در مکانیسم قبول پیوند آلوژنیک جنینی در مقابل سیستم ایمنی مادر به دنبال نخواهد داشت. از مطالعه و بازنگری تمامی یافته‌ها چنین بر می‌آید که AEC متعلق به بارداری خاتمه یافته توان القاء ماهیت تولروژنیک، MDDCها را ندارد. این بدان معناست که

REFERENCES

1. Calvin SE, Oyen ML. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1101:166-85.
2. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000;70:329-37.
3. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20:408-13.
4. Ueta M, Kweon MN, Sano Y, Sotozono C, Yamada J, Koizumi N, et al. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 2002;129:464-70.
5. Li JY. Refrigerated human amnion as a burn dressing: clinical application and histologic observation. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi* 1985;1:44-46. [In Persian]
6. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007;13:1173-83.
7. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, et al. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes *Circ Res*. 2010;106:1613-23.
8. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:900-907.
9. Jin Yu S SM, Kaneko Y, Hess DC, Parolini O, Borlongan CV. Amnion: a potent graft source for cell therapy in stroke. *J Cell Transplant* 2009;18:111-18.
10. Mariya P, Paulon G, Pereira J. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int J Dev Biol* 2010;54:761-77.
11. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, Van Griensven M, Stadler G, et al. Dosedependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007;13:1173-83.
12. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009;30:2-10.
13. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Nassauto C, Albertini A, Wengler GS, et al. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant* 2009;18:899-914.
14. Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol* 2012;3:274.
15. Hintzen G, Ohl L, del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JJ, Pabst O, Kocks JR, et al. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 2006;177:7346-54.
16. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004;21:279-88.
17. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 2010;108:111-65.

18. Laouar Y, Town T, Jeng D, Tran E, Wan Y, Kuchroo VK, et al. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10865-70.
19. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007;7:875-88.
20. Grainger JR, Hall JA, Bouladoux N, Oldenhove G, Belkaid Y. Microbe-dendritic cell dialog controls regulatory T-cell fate. *Immunol Rev* 2010;234:305-16.
21. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 2004;4:941-52.
22. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202:919-29.
23. Harry RA, Anderson AE, Isaacs JD, Hilkens CM. Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:2042-50.
24. Popov I, Li M, Zheng X, San H, Zhang X, Ichim TE, et al. Preventing autoimmune arthritis using antigen-specific immature dendritic cells: a novel tolerogenic vaccine. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R141.
25. Morita Y, Yang J, Gupta R, Shimizu K, Shelden EA, Endres J, et al. Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 2001;107:1275-84.
26. Thome R, Issayama LK, DiGangi R, Bombeiro AL, da Costa TA, Ferreira IT, et al. Dendritic cells treated with chloroquine modulate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol* 2014;92:124-32.
27. Lau AW, Biester S, Cornall RJ, Forrester JV. Lipopolysaccharide-activated IL-10-secreting dendritic cells suppress experimental autoimmune uveoretinitis by MHCII-dependent activation of CD62L-expressing regulatory T cells. *J Immunol* 2008;180:3889-99.
28. Pratama G, Vaghjiani V, Tee J, Liu Y, Chan J, Tan C, et al. Changes in Culture Expanded Human Amniotic Epithelial Cells: Implications for potential therapeutic applications. *PLoS ONE* 2011;6:e26136.
29. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2010; Chapter 1:Unit 1E 6.
30. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009;113:6576-83.
31. Cernadas M, Lu J, Watts G, Brenner MB. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2009;155:523-33.