Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.39; No.1; 2015

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 13:33 +0430 on Wednesday June 20th 2018

Assessing the gene expression of IL4, TNFα, TGFβ and IFNγ in studying M1 and M2 macrophages derived from human monocyte

Arsalan Jalili[1], Elham Moslemi[1], Nariman Mosaffa[2]

1. Department of Biology School of Basic Science, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran Iran
2. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

(Received: 2015/10/31 Accept: 2016/1/27)

Abstract

Background: *Classical macrophages (M1) and alternative macrophages (M2) are responsible for various functions in order to maintain homeostasis. BCG vaccine and hydatid cyst fluid can be examples of stimulants, which can cause M1 and M2 macrophage polarization. Evaluating the expression of markers such as IFNγ and TNFα for M1 phenotype and TGFβ and IL4 for M2 phenotype is one of the confirmatory ways of polarization. The purpose of this study is to verify the polarization of macrophages, which was induced by BCG vaccine and hydatid cyst fluid by studying the gene expression of aforementioned markers.*
Methods: *Using ficol 1077 and gradient concentration separated mononuclear normal human peripheral blood cells. Monocyte populations were separated by adhesion technique from cultured cells in complete tissue culture medium. Monocyte derived macrophages were treated by BCG intravesical vaccine and fertile hydatid cyst fluid for 8 hours. RT-PCR was performed to confirm the polarization. The expression of amplified genes was compared with control groups.*
Results: *Amplification of TNFα and IFNγ genes in M1, and TGFβ and IL4 in M2 group confirmed the polarization procedure. Moreover, lack of PCR product in negative control samples indicates either the absence or a very low expression of this gene in control group.*
Conclusion: *The ability of these stimulants in macrophage polarization can be used in experimental studies. It is also possible to take advantage of this model to achieve useful goals in cell therapy and develop more efficient therapeutic methods in inflammatory diseases and cancer immunotherapy.*

Keywords: *Classical macrophages, Alternative macrophages, Polarization, BCG, Hydatid cyst fluid*

• *Corresponding Author: Dr. Elham Moslemi,*
EMAIL: Elham_moslemi60@yahoo.com

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دور۳۹، شماره ۱، ۱۳۹۴، صفحات ۹ تا ۱۳

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 13:33 +0430 on Wednesday June 20th 2018

بررسی بیان ژن‌های TGFβ، TNFα، IL4 و IFNγ در تایید پلاریزاسیون ماکروفاژهای M1 و M2 حاصل از کشت مونوسیت‌های انسانی

ارسلان جلیلی[۱]، دکتر الهام مسلمی*[۱]، امیر ایزدی[۲]، دکتر نریمان مصفا[۳]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران
۲-باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران
۳-گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۷

چکیده

مقدمه: ماکروفاژهای کلاسیک *(M1)* و آلترناتیو *(M2)* عملکردهای مختلفی را درمقابله با عفونت‌ها به عهده دارند. درجریان پاسخ ایمنی در مقابل *BCG* ماکروفاژهای *M1* ودربیماری‌هیداتیدوزماکروفاژهای *M2* فعال می‌شوند. درمکانیسم‌های تنظیم ایمنی پلاریزاسیون این جمعیت اساس هومئوستاز را تشکیل می‌دهد. یکی از راه‌های تایید پلاریزاسیون، بیان سایتوکاین‌های *IFNγ* و *TNFα* برای فنوتیپ *M1* و *TGFβ* جهت فنوتیپ *M2* است. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن این سایتوکاین‌ها در جهت تایید پلاریزاسیون ماکروفاژهای تحریک شده با *BCG* ومایع کیست هیداتید باروردر شرایط آزمایشگاهی بوده است. بیان ژن *IL4* که به تازگی‌تولیدآن توسط رده منوسیتی ماکروفاژی گزارش شده است بررسی شد.

مواد وروش‌ها: تک هسته‌ای‌های خون محیطی باروش به‌کارگیری از گرادیان غلظتی فایکول تخلیص وجداسازی شد. جمعیت مونوسیتی- ماکروفاژی با تکنیک چسبندگی از سلول‌های شناور در محیط کامل کشت سلول تفکیک شد. به مدت هشت ساعت ماکروفاژها با محرک‌های *BCG* و مایع کیست هیداتید بارور تیمار شد. به منظور تایید پلاریزاسیون ماکروفاژی، بیان سایتوکاین‌های اختصاصی با استفاده از *RT-PCR* و بررسی توالی تکثیر یافته، در مقایسه با نمونه کنترل مقایسه شد.

نتایج: تکثیر ژن‌های اختصاصی سایتوکاین‌های هر گروه نشان‌دهنده تایید فرآیند پلاریزاسیون بود. ماکروفاژهای بامحرک *BCG* بیان افزایش داشته‌ای را از *IFN-γ*و*TNF-α*نشان دادند. درگروه با تحریک مایع کیست بارور هیداتید بیان ژن *TGF-β*مشهود بود. ژن *IL4* نیزدراین جمعیت ملاحظه شد. همچنین عدم مشاهده محصول *PCR* در نمونه کنترل نشان‌دهنده عدم یا بیان بسیار کم ژن مذکور در گروه کنترل است.

نتیجه‌گیری: توانایی *BCG* و مایع کیست هیداتید بارور در القای پلاریزاسیون ماکروفاژها می‌تواند در مطالعات تجربی مرتبط با تمایز ماکروفاژی استفاده شود. تاکید برکارایی این روش ساده وکم هزینه در مقایسه با به‌کارگیری ازکیت‌های پرهزینه تمایز ماکروفاژی نیاز به پژوهش‌های تکمیلی دارد.

واژگان کلیدی: پلاریزاسیون ماکروفاژ *M1*، *M2*، *BCG*، مایع کیست بارورهیداتید

مقدمه

ایمنی ذاتی یکی از مهم‌ترین سدهای دفاعی مهره‌داران در برابر عوامل بیماری‌زا است. در سیستم ایمنی ذاتی مونوسیت‌ها و ماکروفاژها سلول‌هایی هستند که نقش کلیدی را ایفا می‌کنند. این سلول‌ها پاتوژن‌های خطرناک و مهاجم را در خون و بافت‌ها شناسایی کرده و یک واکنش التهابی ایمنی قوی را اعمال می‌کنند که در نهایت به پاکسازی پاتوژن و برقراری هموستازی بدن منجر می‌شود.(۱) در واکنش به پاتوژن‌ها، ماکروفاژها دچار تغییرهای فنوتیپی می‌شوند. این امرباعث می‌شود به شکل بهتری با محیط سازگار شوند.(۲و۳) ماکروفاژها فاگوسیت‌های ساکن در بافت و برداشت‌کننده آنتی ژن بوده که از سلول‌های شناور در خون تمایز پیدا می‌کنند. آن‌ها نقش مهمی در فعال‌سازی و همچنین تنظیم سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا می‌کنند.(۲و۴) ماکروفاژهای فعال شده به فنوتیپ‌های مختلف M1 و M2 تمایز پیدا می‌کنند. این فنوتیپ‌ها از لحاظ سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، گیرنده‌های لیگاند و عملکرد با یکدیگر متفاوت هستند.(۵) با توجه به تاثیر پلاریزاسیون ماکروفاژها در روند کنترل یا پیشرفت بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی مانند عفونت‌های میکروبی (۶)، اختلالات التهابی، بیماری‌های خودایمنی و همچنین تاثیرعوامل تحریکی مختلف در تکامل آن‌ها، بررسی و مطالعه پلاریزاسیون در شرایط آزمایشگاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۷). ماکروفاژهایی که به‌صورت کلاسیک یا آلترناتیو فعال می‌شوند، سلول‌های اثرگذار ایمنی هستند و حجم زیادی لیمفوکین تولید می‌کنند (۸) و با بیان ژن‌هایی مانند IFNγ، TNFβ و TNFα همراه هستند. در فنوتیپ M2 تولید زیاد TGFβ، IL10، نیز مشاهده می‌شود (۸) که ماکروفاژهای ضد التهابی هستند و عملکردهای تولرانس، تنظیم ایمنی و ترمیم بافت را ایفا می‌کنند (۹) در این فنوتیپ مقدار زیاد آنزیم آرژیناز و مقدار کم IL12 و IL23 تولید می‌شود (۱۰) همچنین قرارگیری در معرض IL4 یا IL13، کمپلکس‌های ایمنی و IL10 ماکروفاژهای M2 را از راه آلترناتیو فعال می‌کنند.(۱۰) هدف از این مطالعه بررسی

نویسنده مسئول: دکتر الهام مسلمی
elham_moslemi60@yahoo. com

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 13:33 +0430 on Wednesday June 20th 2018

پروفایل مولکولی ماکروفاژهای کلاسیک و آلترناتیو حاصل از کشت مونوسیت‌های خونی بوده است. پلاریزاسیون، سیستم بیان ژنی سایتوکاین TNFα و IFNγ برای مجموعه M1 و TGFβ و برای مجموعه M2 بررسی شد.

همچنین گزارش‌هایی در باره تولید IL4 مونوسیت‌های تحت کشت نیز موجود است که در این بررسی به بیان ژن آن نیز پرداختیم. از طرفی در منابع و مراجع انجام پلاریزاسیون ماکروفاژی در محیط کشت به کمک کیت تخصصی آن‌که بسیار گرانقیمت است پیشنهاد می‌شود.(۱۱) بنابراین دراین کوشش امکان به‌کارگیری از یک روش ساده پلاریزاسیون ماکروفاژی به کمک محرک‌های نامبرده مطالعه شد. سیستم بیان ژنی سایتوکاین TNFα و IFNγ برای مجموعه M1 و TGFβ و برای مجموعه M2 توسط تکنیک RT-PCR مشخص شد. ازآنجا که به تازگی‌گزارش‌هایی در باره تولید IL4 توسط مونوسیت‌های تحت کشت موجود است، در این بررسی به بیان ژن آن نیز پرداختیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و گسترش مجموعه ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت:

در این مطالعه برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، ابتدا ۱۵ سی سی خون وریدی تازه حاوی هپارین تهیه شد. برای گرفتن بهینه سلول‌ها به کمک محیط کشت خون رابا نسبت ۲/۱ با RPMI رقیق و به وسیله فایکول ۱۰۷۷ و سانتریفیوژ براساس شیب غلظتی لایه‌گذاری شد. لایه تک هسته‌ای‌ها برداشت شد. به کمک سانتریفیوژ شست‌وشو و با تریپان‌بلو شمارش و درصد حیات تعیین شد. سپس در فلاسک‌های مخصوص کشت سلول در محیط کامل حاوی ، RPMI (10%) FBS جمعیت مونوسیتی باتکنیک چسبندگی از سلول‌های شناور در محیط کامل کشت سلول تفکیک شد. سلول‌های تک هسته‌ای به بستر کشت متصل و به سلول‌های ماکروفاژی تبدیل شدند و با به کارگیری میکروسکوپ فاز کنتراست دستیابی به مورفولوژی ماکروفاژی تایید شد. به مدت هشت ساعت ماکروفاژها با محرک‌های BCG و مایع کیست هیداتید بارور تیمار شد. لازم به ذکر است که غلظت محرک‌های مورد تیماربا سلول‌ها پیش از این با انجام تعیین سمیت سلولی به کمک تریپان‌بلوتعیین شد.

انکوباسیون در انکوباتور با دمای 37 c° و جریان ۵درصد CO2 انجام شد. برای هر گروه (تست BCG، تست مایع هیدراتید بارور و کنترل بدون محرک)، دو فلاسک مجزا در نظر گرفته شد. ماکروفاژهای متصل به بسترکشت توسط اسکراپر از فلاسک جدا شد و پس از شست‌وشو با محیط بدون سرم (سانتریفیوژ دور ۲۰۰۰ به مدت پنج دقیقه) ته‌نشین سلولی برای انجام تمهیدات بررسی بیان ژن مورد استفاده در مرحله بعدی قرار گرفت. مراحل فوق در سه نوبت تکرار شد تا نتایج بهینه در دسترس قرار گیرد. لازم به ذکر است که ته‌نشین سلولی حاصله از تمامی نمونه‌های کشت ماکروفاژ برای هر چهار سیتوکاین IL4/TNF-α/TGF-β و IFNγ بررسی ملکولی بیان ژن (RT - PCR) شد.

تعیین غلظت محرک‌ها:

مقادیر مناسب یک محرک یا هر افزودنی باید قبل از انجام کار تحریک سلول‌ها در شرایط کشت، با چند تجربه مناسب تعیین شود. در بروشور BCG ازنوع تزریقی اینتراوزیکال تعداد باکتری مشخص شده است. سویه P۱۱۷۳ ضعیف شده باسیل‌های زنده مایکوباکتریوم بویس حاوی ۳۲×۱۰^{۷} پارتیکل باکتری درمیلی لیتر است. به کمک انجام تست تریپان‌بلو میزان مناسب در مجاورت ۳ میزان BCG ارزیابی شد. که برای هر فلاسک سلول ماکروفاژی باشمارش تک هسته‌ای‌ها، بااحتساب حجم ثابت محیط کشت $۱۰^{۳}\times۲۰$ پارتیکل درمیلی لیتردر نظرگرفته شد که معادل ۱۰۰میکرولیترازمحتوی ویال اولیه بود.

در باره مایع کیست هیداتید نیز همان روش فوق انجام و میزان پروتئین تعیین شد. با استفاده از رقت‌های سریال وتیمار سلول‌های ماکروفاژی با غلظت‌های تهیه شده به ترتیب با ۵۰,۲۵, ۱۲/۵, ۶/۵ و ۳/۲۵ میکروگرم در میلی لیترمحیط کشت در هر فلاسک پوشیده از ماکروفاژهای انسانی تست تریپان بلو انجام شد. غلظت مناسب۶/۵ میکروگرم در هر میلی لیترتعیین شد.

استخراج RNA به کمک محلول RNX PLUS (سینا ژن – ایران):

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ته‌نشین سلولی را همراه با ۱۰۰۰ lμ از محلول plus RNX مخلوط و به مدت پنج ثانیه ورتکس کرده، لوله را به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار داده، سپس [1] ۲۰۰ کلروفورم اضافه شد. پس از ۱۵ ثانیه ورتکس دوباره به مدت پنج دقیقه روی یخ انکوبه، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی به لوله جدید انتقال داده و به حجم آن ایزوپروپانول افزوده و سپس ۱۰ بار وارونه شد. لوله به مدت شش ساعت در c° 20- درجه نگهداری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ، مایع رویی به آرامی تخلیه شد. به پلت حاصل ۱ ml اتانول ۷۵ درجه اضافه دوباره به مدت هشت دقیقه در ۷۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی تخلیه و پس از خشک شدن پلت، رسوب در ۵۰ ماکرولیتر آب DEPC حل و در فریزر c° 80- درجه نگهداری شد.

سنتز cDNA:

برای سنتز cDNA از کیت vivantis (steps RT-PCR KIT-2) استفاده شد. مراحل کار مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. ابتدا مقدار µl ۱۰ از RNA، به همراه µl ۱ از ۱۰ mM dNTP[3] و Random Hexamer 1µµ1 مخلوط شد. سپس به مدت پنج دقیقه در c° 65 قرار داده شد. مقدار µl 5 .0 از MMULV وµl 2 از بافر 10X MMULV به هر واکنش اضافه شد و در نهایت با اضافه کردن آب، حجم نهایی به µl 20 رسید و لوله نهایی به مدت یک ساعت در دمای c° 42 انکوبه شد.

پرایمرهای ویژه RT-PCR:

در این مطالعه ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. پس از تهیه توالی این ژن و همچنین توالی ژن‌های TGFβ، IL4، TNFα و IFNγ از سایت NCBI[4]، پرایمرهای اختصاصی هر ژن توسط برنامه Primer Express طراحی و توالی پرایمرها Blast شد تا دقت و تخصصی بودن آنها تایید شود. توالی پرایمرها در جدول یک آمده است.

جدول۱: پرایمرهای ژن‌های مربوط به سایتوکاین‌های اختصاصی

نام پرایمر	توالی	وزن مولکولی
TGFβ F	GGTCTCCATCCCTGACCTT	Bp95
TGFβ R	GGGCAAAGGAATAGTGCAG	
IFNγ F	TTGGGTTCTCTTGGCTGTTA	bp151
IFNγ R	TTCTGTCACTCTCCTCCTCCA	
β-actin F	AGAAAATCTGGCACCACACC	bp395
β-actin R	CTCCTTAATGTCACGCACGA	
TNFα F	TTGGGTTCTCTTGGCTGTTA	bp 251
TNFα R	TTCTGTCACTCTCCTCCTCCA	
IL4 F	GCCTCCAAGAACACAACTGA	bp223
IL4 R	ACGTACTCTGGTTGGCTTCC	

واکنش RT-PCR:

هر واکنش شامل 2µl cDNA الگو (cDNA ساخته شده)، 5.2 µl Buffer 10X PCR 1µl از هر یک دو پرایمر جلویی و عقبی، 75.01 از $MgCl_2$ 50 mM، 0. 5 µl از (dTTP, dTP, dCTP, dGTP) mM10 dNTP و 0.4µl از Tag DNA Polymerase بود، حجم نهایی واکنش 25 µl تهیه شد. پروتکل دمایی به‌صورت دناتوراسیون اولیه در دمای c° 95 به مدت سه دقیقه، به دنبال آن ۳۵ سیکل به‌صورت دناتوراسیون در دمای c° 95 به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در دمای c° 61 به مدت ۳۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای c° 72 به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت پلیمریزاسیون نهایی در دمای c° ۷۲ به مدت پنج دقیقه انجام شد.

نتایج

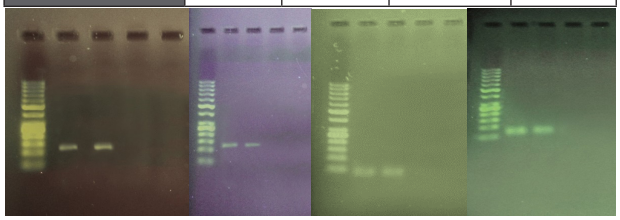
پس از بهینه‌سازی تست RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن، آمپلیکون تکثیر یافته روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی سایبرگرین (سیناژن–ایران) در بافر TBE X ۰/۵ الکتروفورز شد. در این مطالعه از ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. از آنجا که این ژن جزو ژن‌هایی است که بیان دائمی در سلول‌ها دارند، از این رو هدف مناسبی برای بررسی به‌عنوان کنترل داخلی به حساب می‌آید. نتایج آزمایش RT-PCR برای ژن β-actin به‌عنوان کنترل داخلی در تمامی تست‌ها مثبت دیده شد که این مطلب نشان‌دهنده صحت و دقت روش استخراج RNA مورد استفاده و همچنین تایید سنتز cDNA نمونه‌ها بود.

1- diethylpyrocarbonate 2- Complementary DNA
3- deoxyribonucleotide 4- National Center Of Biotechnology

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 13:33 +0430 on Wednesday June 20th 2018

بیان ژن مربوط به سایتوکاین‌های اختصاصی TGFβ، IL4، TNFα و IFNγ در ماکروفاژهای حاصله بررسی شد. بیان IFNγ و TNFα تاییدکننده پلاریزاسیون به سمت فنوتیپ M1 و TGFβ و IL4 تاییدکننده تشکیل ماکروفاژ M2 است. نتایج حاصله در جدول و شکل شماره یک قابل مشاهده هستند.

نمونه‌ها / ژن‌های مورد نظر	ماکروفاژ آلترناتیو	ماکروفاژ کلاسیک	کنترل ماکروفاژی	کنترل منفی
TGFβ	+	-	+	_
IFNγ	-	+	+	_
IL4	+	-	+	-
TNFα	-	+	+	-



شکل۱: تصاویر شماره ۱،۲،۳ و ۴ نشان دهنده تکثیر ژن‌های سایتوکاین‌های IFNγ، TGFβ، IL4، و TNFα در نمونه های تحریک شده با کیست هیداتید بارور و واکسن BCG، کنترل مثبت و کنترل منفی می باشد که در تصویر شماره یک مربوط به IFNγ ، SM.۱ ۲. محصول ماکروفاژ کلاسیک ۳۱۵ bp، کنترل منفی ۴. محصول ماکروفاژ آلترناتیو، در تصویر شماره دو مربوط به TGFβ SM.۱ ۲. محصول ماکروفاژ آلترناتیو ۹۵ bp ، ۳.کنترل منفی ۴. محصول ماکروفاژ کلاسیک، تصویر شماره سه موبوط به IL4، ۱.کنترل مثبت، ۲.محصول ماکروفاژ آلترناتیو ۳،۲۲۳bp.کنترل منفی، ۴. محصول ماکروفاژ کلاسیک و تصور شماره چهار مربوط به TNFα.۱. کنترل مثبت، ۲. محصول ماکروفاژ کلاسیک ۳،۲۵۱bp.کنترل منفی، ۴.محصول ماکروفاژ آلترناتیو می باشد

بحث

پاسخ دفاع سلولی در مواجه با پاتوژن‌های داخل سلولی، همواره با عملکرد اجرایی و اثر سلول‌های سیستم ماکروفاژی همراه است. از بین گروه‌های مختلف سلول‌های ماکروفاژی که در تمامی بافت‌ها و ارگان‌های بدن پراکنده‌اند، گروه‌های M1 با حضور و گسترش وسیع در محل، با تولید و ترشح مدیاتورهای موثر و سایتوکاین‌های اجرایی، به سرکوب و تجمع پاتوژن‌های مهاجم منتهی شده که نتیجه آن رهایی میزبان از حمله میکروب و از سوی دیگر وقوع واکنش ازدیاد حساسیت است.(۱۳) پاسخ‌های دفایی ضد پاتوژن‌های داخل سلولی بنا بردلایلی از جمله نوع میکروب، گونه اختصاصی، ژنتیک میزبان و برخی شرایط محیطی مانند تغذیه و استرس سمت‌وسویی دیگر یافته‌ودر صورت پلاریزه شدن سلول‌های سیستم ماکروفاژی به‌طرف ماکروفاژهای M2، منجر به رهایی پاتوژن و در عوض شکست میزبان می‌شود. ماکروفاژهای M2 با تولید سایتوکاین‌های تعدیل‌کننده و سرکوب‌کننده وقایع دفاعی مانند مسیر TGFβ پاسخ ضد میکروبی را به سمت ایمنی هومورال کشانیده و با توقف مکانیسم کشندگی داخل سلولی، در مقابل به تولید و ترشح مدیاتورهای بازسازی و ترمیم بافت هدایت می‌شود که حاصل آن بقای عفونت است (۱۴). هر چند که چنین پاسخ‌های ضدالتهابی، لازمه بسیاری از واکنش‌های ازدیاد حساسیت است اما در برخی موارد نیز می‌تواند مفید و به نفع میزبان قلمداد شود. جمعیت متفاوت ماکروفاژی در شرایط عفونت و ازدیاد حساسیت، سرنوشت میزبان را تعیین می‌کنند. این امر می‌تواند بیان‌کننده امکان استفاده از ماکروفاژها در شرایط آزمایشگاهی، به نفع میزبان و کاربرد آنها در ایمونوتراپی باشد (۱۵) باسیل کالمت گرین (BCG) از دیرباز به‌عنوان یک یاری‌دهنده قوی ایمنی سلولی، نه تنها برای مبارزه با گسترش بیماری سل، بلکه به‌عنوان یک محرک قوی ایمنی سلولی و سیستم ماکروفاژی نیز کارایی داشته و استفاده از آن در چندین نمونه از تومورهای انسانی مشاهده شده است.(۱۶)

عملکرد BCG درروند القایی پلاریزاسیون ماکروفاژی که در بسیاری از تومورهابه فرم آلترناتیو، به سمت جمعیت M1، کاربردهای درمانی بسیار ازجمله ایمونوتراپی تومورها گرایش دارد.(۱۷و۱۸)

BCG تراپی در کنترل بدخیمی‌های مثانه که فنوتیپ ماکروفاژ همراه تومور از نوع M2 است، سال‌هاست که کاربرد فراوانی دارد. دراین موارد به دلیل اثر آدجوانتی BCG علاوه بر پلاریزاسیون ماکروفاژی به سمت M1 شاهد افزایش تولید اینترفرون گاماتوسط لنفوسیت‌های اطراف تومور هستیم.(۱۹) این محرک میکروبی می‌تواند در شرایط vivo In سلول‌های سیستم ماکروفاژی را به بیان ژن‌های موثر ایمنی سلولی مانند IFNγ و TNFα هدایت کرده و زمینه را برای مصونیت ودفاع حفاظتی علیه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس فراهم آورد.

در پاسخ دفاعی علیه ترشحات کیست هیداتید، تنظیم دفاع ماکروفاژی و پلاریزه شده جمعیت سلولی به سمت M1 یا M2 موجب تعیین سرنوشت دفاع میزبان علیه انگل آنکیسته شده مهاجم می‌شود. بنابراین مایع کیست هیداتید بارور می‌تواند به‌عنوان محرک موثر جمعیت ماکروفاژی به سمت پلاریزه شدن و تمایز به سوی مجموعه M2 شود. در استراتژی تهاجمی عفونت هیداتیدوز، لایه لامینه شده (LL) کیست مسئول برانگیختن فعالیت ضدالتهابی ماکروفاژهای M2 و به دنبال آن فعال‌سازی T لنفوسیت‌های تنظیمی (Treg) است. دراین صورت است که به پاسخ‌های حفاظتی حاصله از مجموعه سلول‌های M1/Th1/Th2 به‌شدت صدمه می‌زندودر نتیجه به رهایی انگل یاری می‌رساند. ازسویی گزارش‌های اخیر نشان می‌دهدکه فاکتورهای LL تاثیر شدیدی برافزایش تولید IL10,TGF-β و همچنین کاهش تولید iNOS, NO توسط ماکروفاژها داشته و واجد اثر قوی ضد التهابی است. جالب است که از این خاصیت غشاء کیست برای درمان مدل تجربی بیماری التهاب روده‌ای (IBD) استفاده شده است (۱۹). سایر تجربیات آزمایشگاهی نیز موارد فوق را تایید کرده‌اند. لایه لامینه شده کیست هیداتیددر تحریک ماکروفاژهای موشی در کشت ۷۲ ساعت به ترشح سیتوکاین TGF-β، آنزیم آرژیناز وادار شده و فعالیت NOS در آن‌ها کاهش یافته است. سه مورد فوق اصلی‌ترین مارکرهای پلاریزاسیون ماکروفاژی به سمت جمعیت M2 یا آلترناتیو است.(۲۰)

در عفونت وضایعات لپروماتوز لپروسی تجمع ماکروفاژهای M2 در مقایسه با فرم توبرکولوئیدی چشمگیر است. دراین رابطه محققان با تغییر الگوی بیان ژنی جمعیت ماکروفاژی بیماران از طریق مجاورت با BCG موفق به ارتقای سطح ایمنی علیه مایکو باکتریوم لپره از طریق پلاریزاسیون ماکروفاژی به سمت M1 وافزایش تولیدIFN-γ شدند.(۲۱)

Tiffany M و Michel J Davis در سال ۲۰۱۳ سایتوکاین IFNγ و iNOS رادرعفونت حاصل از Cryptococcus Neoformous و ماکروفاژها را بررسی و طی این آزمایش از تکنیک‌های کشت سلول، الیزا، فلوسایتومتری، Real Time PCR و Immuno Florescence استفاده کردند. آن‌ها دریافتندکه برتری فنوتیپ M1 موجب محدودشدن عفونت ودرصورت غلبه نوع M2 شاهد وخیم‌تر شدن وگسترش عفونت قارچی در مبتلایان می‌شود.(۲۲)

درجریان فعالیت پاسخ‌های دفاعی مرتبط با Th2 تولید IL4 موجب تمایز سلول‌های ماکروفاژی به سمت فنوتیپ M2 می‌شود به طوری‌که موجب تقویت وحمایت لنفوسیت‌های Th2 شده و وقایع ضدالتهابی را در یک مسیر تنظیمی القا می‌کند. در تجربه‌ای که روی مدل‌های موشی به انجام رساندند ثابت کردند که ماکروفاژهای M2 نیز دریک روند دفاعی ذاتی می‌توانند IL4 تولید کنند ودر شکل‌گیری مسیر دفاع اختصاصی و تقویت آن نقش داشته باشند(۲۳) هرچند تحقیق‌های دیگری نیز نشان داده که ماکروفاژهای تیپ ۲ در جریان پاکسازی قطعات نوترفیل‌های آپپتوتیک به تولید وترشح IL4 می‌پردازند(۲۴) سایر گزارش‌ها نیز توانمندی سلول‌های ماکروفاژی در پاسخ به محرک‌هایی مانند LPS را به اثبات رساندند.(۲۵) ماکروفاژهای‌آلوئولار انسانی جداشده از مایع برونکوآلوئولاردر پاسخ به محرک‌های میکربی واجد بیان افزایش یافته در mRNA سیتوکاین IL4 شده‌اند. این توانایی بخشی از دفاع ذاتی دستگاه تنفس را تشکیل می‌دهد.همچنین

در هدایت پاسخ‌های دفاعی اختصاصی باواسطه Th2 نیز نقش مهمی دارند.(۲۶)

نتیجه گیری:

در این تحقیق برای نخستین بار بیان ژن IL4 درسلول‌های مونوسیتی ماکروفاژی در شرایط کشت بررسی شد. آن‌هم درهمراهی با بیان ژنTGF-β. شاید بتوان اذعان داشت که این مورد می‌تواند بخشی از عملکرد فنوتیپ ضدالتهابی در پروفایل M2/Th2/Treg در جریان عفونت پیشرونده ناشی از هیداتیدوز باشد. مایع کیست هیداتید بارور در شرایط کشت قادر به تحریک بیان ژن IL4 شده است. تاکید براین یافته نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن IFNγ و TNFα در ماکروفاژهای M1 بیان شده و هیچ محصولی از این واکنش‌ها در نمونه M2 دیده نشد، درحالی که ژن TGFβ و IL4 در ماکروفاژهای M2 بیان شده و واکنشی در نمونه M1 مشاهده نشد. با توجه به نقش فنوتیپ‌های مختلف ماکروفاژی در عفونت، فاگوسیتوز و حذف سلول‌های آسیب دیده و پیر، همچنین نقش آنها در توقف رشد و تحریک تمایز سلول‌ها، امکان پلاریزاسیون آن‌ها در آزمایشگاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همچنین با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که امکان پلاریزاسیون سلول‌های سیستم ماکروفاژی در شرایط کشت سلولی آزمایشگاهی به کمک محرک‌های مورد نظر فراهم می‌شود. ازآنجا که دسترسی و تهیه کیت تخصصی پلاریزاسیون ماکروفاژی بسیار پر هزینه است شایدبابررسی‌های تکمیلی ازجمله طولانی کردن زمان کشت و انکوباسیون سلول‌های مونوسیتی ماکروفاژی انسانی و نیز اندازه‌گیری سیتوکاین‌های مربوطه و ارزیابی سایر پروفایل‌های مولکولی در مجموعه‌های حاصل از کشت دلایل محکم ومستدلی در کارایی این روش ساده و کم هزینه به دست آورد.

منابع

1. Biswas, Subhra K. , ManeshC hittezhath, Irina N. Shalova, and Jyue. Yuan Lim. “Macrophage polarization and plasticity in health and disease. “ Immunologic research 2012; 53: 11-24.
2. Biswas, Subhra K. , and Alberto Mantovani. “Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nature immunology 2010; 10(11): 889-896.
3. Stout, Robert D. , and Jill Suttles. “Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. “ Journal of leukocyte biology 2004; 3(79): 509-513
4. Mantovani, Alberto, Antonio Sica, and Massimo Locati. “Macrophage polarization comes of age. “ Immunity 2005; 4(23): 344-346.
5. Mantovani, Alberto, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena, Annunciata Vecchi, and Massimo Locati. “The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. “ Trends in immunology 2004; 12(25): 677-686.
6. Benoit, Marie, Benoît Desnues, and Jean-Louis Mege. “Macrophage polarization in bacterial infections. “ The Journal of Immunology 2008; 181(6): 3733-3739.
7. Mia, Sohel, Andreas Warnecke, X-M. Zhang, Vivianne Malmström, and Robert A. Harris. “An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. “Scandinavian journal of immunology 2014; 79(5): 305-314.
8. Martinez, Fernando O and Siamon Gordon. “The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. 2014; (6): 11-22
9. Murray, Peter J., and Thomas A. Wynn. “Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nature Reviews Immunology 2011; 11(11): 723-737.
10. Sica Antonio, and Alberto Mantovani. “Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. The Journal of clinical investigation 2012; 122(3): 787-795.
11. PromoCell GmbH. Differentiation of M1- or M2-Macrophages from PBMC . 3: Protocol overview using PromoCell M1-/M2-Macrophage Generation Medium DXF-10 PromoCell GmbH. Sickingenstr. 63/65. 69126 Heidelberg. Germany
12. Mihai G. Netea*, Reinout van Crevel.BCG-induced protection: Effects on innate immune memory Seminars in Immunology 2014; (26): 512-517.
13. Charles Dudly Miles, Anatomy of a discovery: M1 M2 macrophages”. Fronties in immunology 2015; (6): Article212.
14. Keneth Morphy “Janaway Immunology” 2012 , 8th edition. Garland Science ,Taylor&Francis group. LLC. Page: 37-73
15. Daniela Filipa Dias OliveiraMacrophages as biomarkers in BCG treatment response in bladder cancer Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde Setembro de 2013Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto Instituto Politécnico do Porto.
16. Najeeha Talat Iqbal, Rabia Hussain bNon-specific immunity of BCG vaccine: A perspective of BCG immunotherapy Trial .Vaccinology 2014; (2):143-149
17. Manel Amri1 and Chafi Touil-Boukoffa1 Involvement of Treg and alternatively activated macrophages inevasion strategies during hydatidosis . frontiersin. 2013; (2): 425/event
18. Imene Soufli, Ryma Toumi, Hayet Rafa, Manel Amri, Moussa Labsi, Lila Khelifi, Ferdinando Nicolettiand Chafia Touil-Boukoffa Crude extract of hydatid laminated layer from Echinococcus granulosus cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice . Journal of Inflammation 2015; (12): 19-27
19. Manel Amri, Chafia Touil-Boukoffa A protective effect of the laminated layer on Echinococcusgranulosus survival dependent on upregulation of host arginase .Acta Tropica. 2015; 186-194.
20. Manel Amri ,Touilboukoffa Chafia. Impairment of TH1/TH17 host protective responsesby macrophages alternative activation as a mechanism forhelminthes survival. Cytokine 2012; 59 (3): 523-39
21. Ricardo Lardone, Yi Guo, Seema Plaisier, Babu Singh, Rosane Teles, RobertModlin, Peter Sieling, and Delphine Lee, BCG-treated M2-macrophages enhance IFN production of T cells .The Journal of Immunology 2013; (190): 134-49
22. Davis, Michael J. , Tiffany M. Tsang, Yafeng Qiu, Jeremy K. Dayrit, Joudeh B. Freij, Gary B. Huffnagle, and Michal A. Olszewski. “Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in Cryptococcus neoformans infection. “ M Bio 2013;(4): 264-73.
23. Anne Camille La Flamme, Marie Kharkrang, Sarrabeth Stone, Sara Mirmoeini, Delgertsetseg Chuluundorj, Ryan Kyle, Type II-Activated Murine Macrophages Produce IL-4. PLOS ONE 2012 (7): 469-89
24. Melody Zeng, Duy Pham,1Randy Brutkiewicz, Mark Kaplan, and Mary Dinauer, Efferocytosis induces macrophages to produce IL-10 and activate invariant NKT cells to suppress inflammation .The Journal of Immunology 2012; (188): 117-27
25. Sumanta Mukherjee, Ling-Yu Chen, Thomas J. Papadimos, Shuang Huang, Bruce L. Zuraw and Zhixing K. Pan Lipopolysaccharide-driven Th2 Cytokine Production in Macrophages Is Regulated by Both MyD88 and Tram. The Journal of Biological Chemistry 2009; 284(43): 29391–29398
26. Pouliot,Turmel, Gelinas E, Laviolette Bhssonetti, Interleukin-4 production by human zalveolar macrophages” Clin Exp Allergy 2005; 35 (6):804-10

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 13:33 +0430 on Wednesday June 20th 2018