

تأثیر گلیکاسیون محیط کشت بر عملکرد فاگوسیتیک و انفجار تنفسی ماکروفاژهای پریتونئال موش Balb/C

دکتر نریمان مصafa*, دکتر سانا ز جوادی**, سودابه طاهری***

* گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

** پزشک عمومی

*** گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: افزایش غلظت قندها، چه در داخل بدن و فضای پلاسمای و چه در محیط‌های کشت سلولی در آزمایشگاه می‌تواند تاثیرات محربی در فرآیند حیات و عملکرد سلولها داشته باشد. در دیابت و گالاکتوزمیا، این اختلال، منجر به توقف اعمال دفاعی سیستم ایمنی بدن گردیده و ابتلاء به عفونتها مختلف، از جمه نتایج زیان بار آن می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق، مطالعه اثرات غلظت افزایش یافته گلوکز و گالاکتوز در محیط کشت سلولی است.

مواد و روشها: این پژوهش بصورت تجربی انجام گرفت. از ماکروفاژهای پریتونئال موش خالص نژاد *Balb/c* (۴-۶) هفتگی استفاده شد. سلولها در شرایط مختلف حضور غلظت‌های افزایش یافته گلوکز و گالاکتوز، (۵ میلی مولار الی ۳۰ میلی مولار) به تنها یا هر دو قرار گرفتند. از محیط کامل کشت سلول برای ادامه حیات سلولها استفاده گردید. گروه کنترل فاقد هرگونه قند در محیط کشت بود. از محركهای سیستم ماکروفاژی منجمله *PMA* و *FmlP* و *LPS* استفاده گردید. فعالیت اکسیداتیو و انفجار تنفسی سلولها توسط آزمون *NBT* مورد ارزیابی قرار گرفت. با شمارش تعداد باکتری بلع شده در سلولها و همچنین درصد سلولهایی که باکتری را بلع نمودند میزان فعالیت فاگوسیتیک تعیین گردید. قدرت کشنندگی فاگوسیتیها توسط تعیین تعداد باکتریها در محیط کشت به دو روش اوله‌های مک فارلند و همچنین کلنتی کانت، محاسبه و مقایسه شد.

یافته‌های سلولهای تحت کشت در حضور مقدار ۱۵ و ۳۰ میلی مولار گالاکتوز در مقایسه با سایر شرایط و نیز گروه کنترل کاهش چسبندگی و مورفوژنز فاگوسیتیک را نشان دادند. این تغییرات کاملاً معنی دار بود. همچنین فاگوسیتیها در محیط کشت همراه با غلظت‌های ۳۰ میلی مولار از حیث میانگین تعداد باکتریهای بلع شده تغییرات معنی داری را با گروه کنترل نشان دادند. قدرت کشنندگی و حذف باکتریها از محیط کشت توسط فاگوسیتی‌های پریتونئال، کاهش محسوسی را از حیث باکتریهای باقیمانده در محیط، نشان داد که با افزایش غلظت گلوکز و گالاکتوز، این تغییرات چشمگیر بود. افزایش غلظت قند در محیط کشت، قادر به تأثیر در وقوع فعالیت‌های اکسیداتیو نگردید.

نتیجه گیری: فعالیت‌های غشایی سلولهای فاگوسیتیک، از جمله بلع و قدرت چسبندگی، در اثر افزایش قند محیط مختلف می‌گردد لیکن سیستمهای پیام رسانی برای وقوع انفجار تنفسی تابع این تغییرات نمی‌باشد. وقوع عفونتها مکرر در دیابت و هیپرگالاکتوزمیا می‌تواند به دلیل اختلال در فرآیند فاگوسیتوز باشد.

واژگان کلیدی: گلیکاسیون محیط کشت، ماکروفاژهای پریتونئال، بلع، انفجار تنفسی.

مقدمه

قندی شدن محیط اطراف و آنهم در طول مدت زمان کوتاه، عالمتی را دال بر عدم شناسایی عوامل بیگانه از خود بروز می دهند، فعالیت دفاعی خویش را از دست داده و ناتوان از فعالیت باکتریسیدی می گردد^(۴).

پژوهش حاضر با هدف بررسی نقش فاکتورهای قندی کننده محیط (گلوکز و گالاکتوز) با توجه به حضور غلظتهای تحت مولاری آنها که با همان مقادیر پلاسمایی و مایع میان بافتی هماهنگی می نماید، پایه ریزی گردید. بطوریکه اقدام به کشت سلولهای ماکروفاژی در این شرایط نمودیم. علاوه بر فعالیتهای فاگوسیتیک شامل بلع و توان کشندگی و نیز تغییرات مورفولوژیک سلولهای تحت آزمایش، وقوع انفجار تنفسی و توان اکسیداتیو سلولها در حضور محركهای رایج آزمایشگاهی به روش آزمون NBT (نیتروبلوتروازولیوم) ارزیابی گردید. نتایج این تحقیق گامی است در جهت فهم مکانیسمهای مرتبط با وقوع عفونتهای مکرر در بیماران دیابتیک و مبتلیان به هیپر گالاکتوز میباشد.

مواد و روشها

تهیه محیط کشت قندی شده: توسط RPMI 1640 (ساخت شرکت Gibco) و مقادیر افزاینده از گلوکز و گالاکتوز براساس میلی مولار و با محاسبه وزن مولکولی قند، اقدام به تهیه محیط کشت سلولی نمودیم (جدول ۱). محیط کامل کشت FBS، توسط مواد فوق و اجزاء تكمیلی شامل (بمیزان ۱۲٪) تهیه گردید. به دلیل بررسی مکانیسمهای بلع و کشندگی ماکروفاژها در مجاورت باکتری از افزودن آنتی بیوتیک به محیط کشت خودداری نمودیم.

جداسازی و تخلیص ماکروفاژهای پریتوئن موش: با انجام عمل لاواز پریتوئال، ماکروفاژهای محوطه صفاقی موش نژاد خالص Balb/C (۶ هفته، به وزن 30 ± 5 گرم) اخذ گردید. بدین صورت که ابتدا با عمل Cervical Dislocation، حیوان قطع حیات گردید. با رعایت شرایط کامل استریلیزاسیون، در زیر هود لامینار، توسط وسایل جراحی در قطع میکروسرجری، محوطه صفاقی با مایع HBSS^۱ لاواز گردید. مایع حاصله از لاواز در $400 \times g$ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلولهای ته نشین شده، یکبار توسط هنکس شستشو و سانتریفیوژ گردیدند. سپس اقدام به شمارش سلولها و تعیین وایابیلتی به کمک رنگ تریپان بلو نمودیم. (حداقل ۹۵٪ سلولها باید زنده باشند) (۱۱). (شکل شماره ۱)

ترکیبات موجود در بدن جانداران، بویژه مولکولها و موادی که به عنوان منابع انرژی و حیات سلول مورد استفاده قرار می گیرند، دارای نقش و وظیفه مشخصی بوده و بالطبع از غلظتهای معین و ثابتی برخوردارند. حضور این مواد در مایعات در گردش بدن و نیز آب میان بافتی، نقش مهمی را در حفظ تعادل و عملکرد بافت ایفا می نماید. از جمله مهمترین این ترکیبات، قندها می باشند که اساس فعالیتهای متابولیکی را در سلول تشکیل می دهند. عمدۀ ترین اختلالات مرتبط با تغییرات غلظت قند، افزایش گلوکز در بیماری دیابت و هیپر گالاکتوز میباشد (۱،۲).

مطالعات بالینی و آزمایشگاهی نشان داده است که عملکرد بیگانه خواری و دفاع ایمنی در این افراد، در هر دو سیستم ماکروفاژی و نوتروفیلی، اختلال عمده دارد (۳-۶). بررسیهای in vitro نیز تأثیر قندی شدن محیط کشت را بر فعالیت دفاعی سلولهای فوق به اثبات رسانیده است. اثر افزایش غلظت قند (گالاکتوز و گلوکز) بر فرآیند بیگانه خواری، اولین بار در سال ۱۹۷۵ بصورت اختلال در بلع باکتری Ecoli توسط ماکروفاژهای خوکجه هندی گزارش گردید. غلظت ۵ میلی مولار گلوکز بهمراه غلظت ۳۰ میلی مولار گالاکتوز، تاثیر معنی داری را بر فعالیت فاگوسیتیک نشان داد (۷). یکی از دلایل عمده بروز این اثرات، کاهش میزان ATP داخل سلولی و تولید مواد واسطه ای از جمله آدنوزین دی فسفات و آدنوزین منوفسفات می باشد. در حضور گالاکتوز، دخول گلوکز به داخل سلولها، مهار می شود. مسیر گلیکولیز مختلط می گردد (۸). تحقیق دیگری نشان داد که عملکرد باکتریسیدی لکوسیتهای خون محیطی جوجه های ۹ روزه که رژیم پر گالاکتوزی داشته اند، به شدت کاهش یافته است (۹). مطالعات تکمیلی در این زمینه با بررسی نحوه تولید^۱ AGE نشان داده شده است. قندی شدن آلبومین بصورت تأخیری آنهم در محیط کشت، موجب صدمه فراوان به مکانیسمهای انفجار تنفسی سلولهای بیگانه خوار گردیده و وقوع عفونتهای مکرر باکتریایی را در بیماران دیابتی توجیه می نماید. اتصال AGE بصورت Scavenger به O_2 مسئول توقف در روند بیگانه خواری سلولها می باشد. در چنین مواردی، سلولهای بیگانه خوار که تحت تأثیر محركهای رایج مانند ترکیبات فوربوراستر قرار می گیرند، ناتوان از فعالیت اکسیداتیو می باشند (۱۰). در شرایطی که سلولهای فوق، تنها به دلیل

² Hanks Buffer Sault Solution

^۱ Advanced glycosylation end product

جدول ۱- ماکروفازهای پریتونیال موش Balb/C در مجاورت محرکهای مختلف و در حضور غلظتهای ۳۰-۰ میلی مولار از گلوکز و گالاکتوز، کشت گردید. درجات تکاملی و میانگین تعداد سلولهای چسبیده نشان داده شده است.

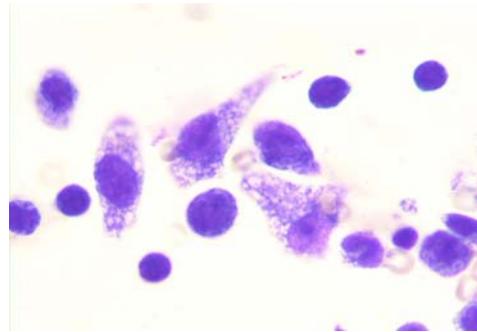
محركهای محیط کشت						محتویات کربوهیدراتی				
Endotoxin	M	PMA	M	FMLP	M	Control	M	گالاکتوز	گلوکز	Plate
	تعداد سلولهای چسبیده		تعداد سلولهای چسبیده		تعداد سلولهای چسبیده		تعداد سلولهای چسبیده			
+++	۷۸	++	۹۱	++++	۶۴	<+	۳۷/۷	۵	۵	۱
+	۹۳	++	۲۹	++	۵۳	++	۳۹	۱۵	۵	۲
+++	۱۱۲	++	۱۰۰/۳	<+	۷۷/۷	+	۷۶	۳۰	۵	۳
+++	۹۰/۵	++	۸۷	++++	۷۳/۵	++	۱۰۸	۰	۰	۴
+++	۱۰۷/۶	+++	۱۱۳/۵	+	۶۴/۵	+	۹۲	۰	۵	۵
++	۳۰	+++	۷۵/۷	+++	۸۸/۶	+	۱۰۰	۰	۱۵	۶
++	۴۲	++	۷۲/۳	++	۴۷/۷	+	۶۸	۰	۳۰	۷

پس از انکوباسیون سلولها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، جریان ۵٪ CO₂-Incubator و رطوبت حداقل ۷۰٪، مایع رویی کشت سلولها که حاوی محیط کشت و سلولهای غیرچسبنده بود از ظروف خارج و با شستشو توسط RPMI گرم، سلولهای باقیمانده و غیر چسبنده، بطور کامل از محیط خارج گردیدند. به کمک میکروسکوپ فاز کنتراست سلولهای چسبنده در حداقل ۱۰ فیلد میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰، شمارش گردیدند. میانگین اعداد بدست آمده (در چند نوبت) محاسبه و ثبت گردید (۱).

- آزمون برآورد تغییرات مورفولوژیک سلولها سلولهای چسبنده به سطح پلاستیک محیط کشت، نشان از ظهور خصوصیات ماکروفازی و فاگوسیتیک دارند. با روش رنگ آمیزی گیمسا و با استفاده از معیارهای زیر، تغییرات مورفولوژیک سلولها بررسی شد: تغییر شکل هندسی سلولها، ظهور پاهای کاذب در سطح بدن و ظهور گرانولهای سیتوپلاسمیک و واکوئلهای فاگوسیتیک. حداقل ۱۰ فیلد میکروسکوپی برای امتیاز بندی به سلولهای ماکروفازی کشت شده در سیستمهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. اخذ نتایج این مرحله با روش سیتوولوژیک زیر امکان پذیر گردید:

اگر ۲۰٪ کل سلولهای hpf، تغییرات مورفولوژیک فوق را نشان دادند، (+) تلقی گردیدند و چنانچه ۴۰٪ و ۸۰٪ کل سلولهای hpf، تغییرات مورفولوژیک فوق را نشان دادند به ترتیب (++), (+++) و (++++) تلقی گردیدند (۱۲).

تعیین فعالیت اکسیداتیو و انفحار تنفسی سلولها: ابتدا پودر NBT (ساخت شرکت زیگما) با غلظت ۵mg در ۵ میلی لیتر نرمال سالین (۰.۹٪) محلول گردید. سلولهای ماکروفازی طبق بندهای فوق تحت کشت و انکوباسیون قرار گرفتند. در



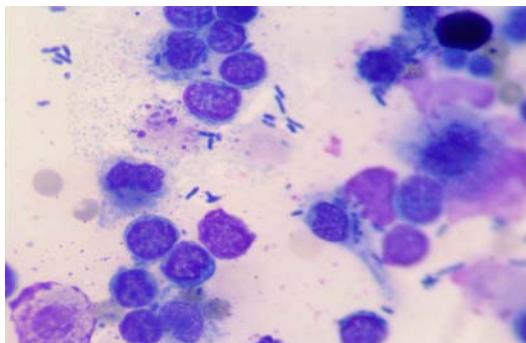
شکل ۱= سلولهای ماکروفازی حاصل از لاواز و کشت پریتونیال موش Balb/C که به خوبی علائم تحریک و چسبندگی را نشان می دهند (۱۰۰×) ایمرسیون

کشت ماکروفازها در محیط قندی شده: با رعایت کامل شرایط کشت سلول، در ظروف مخصوص (۲۴ خانه ای) Falcon Multiplate Tissue Culture Dish سلولها را در محیط کشت تهیه شده به تعداد ۳×۱۰^۵ در هر گوده، قرار دادیم (هر گوده با ۲۰۰ میلی لیتری محیط کشت). در این مرحله سلولها برای انجام مرحله آزمون، مورد تفکیک و گروه بندی قرار گرفتند. در گوده های مختلف غلظتهای مختلف قند در نظر گرفته شده بود.

- آزمون تعیین خصوصیات چسبندگی سلولها: در این روش آزمایشگاهی، سلولها تحت تاثیر محرکهای مختلف آزمایشگاهی قرار گرفتند. این محرکها عبارت بودند از: FLMP (فورمیل میتونین لوسین فنیل آلانین، ساخت شرکت زیگما): بمقدار ۶-۱۰ µ/ml (فوربول میربستات استات، ساخت شرکت زیگما): بمقدار ۲۵.۰ ng/ml (LPS (لیپو پلی ساکارید-اندوتوکسین، ساخت شرکت زیگما): بمقدار ۱.۵ µg/ml) گروه کنترل در این آزمون، عاری از هرگونه محرک بوده و برای هر چهار گروه کنترل و آزمایش شرایط عاری از قدر اضافی نیز در نظر گرفته شد.

تأثیر گلیکاسیون بر عملکرد فاگوسیتیک ماکروفاز

در همین مرحله، به کمک روش اجرا شده، درصد سلولهای مثبت از حیث بلع باکتری در هر ۱۰۰ سلول شمارش گردید. حداقل ۳۰۰ سلول برای هر سیستم قندی شده و کنترل شمارش شد. در اینجا این نکته را اضافه می کنیم که به دلیل محدودیتهای آزمایشگاهی و عدم وجود امکانات لازم، تنها به افزدن دو نمونه از غلظت قندها آنهم با مولاریته بالا اقدام نمودیم.



شکل ۲- سلولهای ماکروفاز در شرایط گلیکولاسیون محیط کشت (غلظت بالای گالاکتوز) قادر به بلع تعداد کمتری از باکتریهای محیط گردیده است. ملاحظه می شود که باکتریهای آزاد در فضای خارج سلولها فراوان هستند (۱۰۰ \times) ایمرسیون

ج- محاسبه قدرت کشنندگی ماکروفازها: تعداد 6×10^8 باکتری وارد هر یک از سیستمهای محیط کشت گردید (مشابه بند ب). پس از انکوباسیون، مایع رویی با استفاده از لوله های مک فارلنده که تعداد مشخصی از باکتری را در هر مرحله با کدورتهای مختلف نشان می دهد، مورد ارزیابی از حیث تعداد باکتری بلع نشده قرار گرفت. برای اطمینان از خلوص باکتری، از محیط کشت مک کانکی و ژلوز خوندار و آگار EMB استفاده گردید.

برای انجام مرحله تکمیلی برآوردهای خصوصیت کشنندگی و ارزیابی تعداد باکتریهای زنده در محیط کشت اقدام به انجام آزمون کلني کانت نمودیم. هر کلونی رشد کرده معادل 10^7 باکتری است. بدین ترتیب تفاوت بین تعداد باکتریها، قبل از آغاز کشت سلولها و پس از اختتام مراحل آزمون، تعیین گردید.

یافته‌ها

همانگونه که جدول ۱ نشان می دهد، سلولهای فاگوسیتیک پریتونئال، در شرایط کنترل و عاری از قند اضافی بالاترین میزان چسبندگی را نشان می دهند. در همین وضعیت محرک FMLP نقش مهمی را در تکامل و مورفوژنز سلولها اعمال

سیستم مربوط به ارزیابی فعالیت اکسیداتیو، مایع رویی کشت سلولها برداشته شد. سلولهای چسبنده باقیمانده با RPMI گرم شستشو شدند. به هر گوده ۱۰۰ لانداز RPMI و ۱۰۰ لاندا NBT محلول اضافه گردید. ۲۰ دقیقه در انکوباتور کشت سلول قرار گرفتند. سپس مایع رویی تخلیه گردید و ۳ بار با متانول شستشو شد. سپس به بررسی سلولهایی که فعالیت اکسیداتیو داشتند، پرداختیم. طبق روش استاندارد، سلولهایی که در سیتوپلاسم، رسب آبی رنگ فورمازان را که نشانه احیاء ماده NBT است داشتند، شمارش گردیدند. حداقل ۳۰۰ سلول شمارش شدند و درصد سلولهای NBT مثبت تعیین گردید. بدین ترتیب توان اکسیداتیو هریک از سیستمهای سلولی تحت کشت و گروههای مختلف مشخص شد (۱۳).

انجام تست بلع^۳ و کشنندگی^۴:

الف- تهیه سوسپانسیون زنده و متحرک از باکتری *E. coli* کلني ایزوله *E. coli* در ژلوز خوندار بمدت ۲۴ ساعت کشت شد و در ۲ میلی لیتر تیوگلیکولات استریل شناور گردید. برای حفظ حیات باکتریها و سلولها، استفاده از این محیط کشت اجتناب ناپذیر بود. تیترنهاei، بمقدار 6×10^8 در ۲ میلی لیتر محیط تیوگلیکولات بود. این تعداد برای استفاده از لوله های مک فارلنده، تعیین و محاسبه گردید.

ب- برآورد فعالیت بلع ماکروفازها: لوله محتوی باکتری در دور ۴۰۰xg بمدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. ته نشین به محیطهای کشت سلولی حاوی غلظتها مختلف قند منتقل گردید. بلاfacele سلولهای تحت بررسی به افزوده شدند. انکوباسیون ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در گردیدند (شکل ۲). ۱۰ فیلد بررسی گردیدند. تعداد متوسط باکتریهای بلع شده در داخل سیتوپلاسم سلولها مشاهده گردید. حداقل ۱۰۰ سلول مثبت از حیث بلع باکتری، مورد شمارش تعداد باکتری در سیتوپلاسم هر سلول قرار گرفتند. ۳ بار عمل برآوردهای میزان بلع انجام پذیرفت. بدین ترتیب، میانگین تعداد باکتری بلع شده در هر یک از سیستمهای قندی شده کشت سلول با سیستم کنترل مقایسه گردید.

³ Ingestion
⁴ Killing

٪۸ گردید که بسیار محسوس و چشمگیر می باشد. بر اساس نتایج بالا، میانگین تعداد باکتریهای بلع شده در هر سلول ماکروفاژی نیز در شرایط طبیعی بالاتر از میانگین تعداد باکتری بلع شده در شرایط ۳۰ میلی مولار گلوکز و گالاکتوز است که انطباق نسبی با فرایند قبلی دارد.

جدول ۳ بیانگر مشاهدات مربوط به فعالیت کشنده فاگوسیتها در رابطه با تغییرات تعداد باکتری در محیط کشت است، که بدون شک بدون در نظر گرفتن یک سیستم کنترل، اعتبار لازم را نخواهد داشت. محیط کشت عاری از ماکروفاژ موجب فراهم نمودن زمینه برای افزایش تعداد باکتری می شود لیکن با توجه به سیستم شمارش باکتری در محیط کشت به روش لوله های مک فارلند، باکتریهای بلع نشده شمارش گردیده و مشخص شد که غلظت ۳۰ میلی مولار گالاکتوز در مقایسه با محیط عاری از هر گونه قند موجب بقاء تعداد بیشتری از باکتری در محیط کشت گردیده است. غلظت ۳۰ میلی مولار گلوکز این تفاوت را بطور بارزی نشان می دهد.

جدول ۲ - عملکرد بلع سلولهای ماکروفاژی در سه وضعیت غلظت بالای گالاکتوز، غلظت بالای گلوکز و محیط کشت بدون قند اضافی

باکتری	درصد سلولهای بلع شده توسط باکتری	میانگین تعداد باکتری بلع شده در هر سلول ماکروفاژی (۱۰۰ سلول)	محیط کشت		
			پلیت	گالاکتوز	گلوکز
٪۳۴/۵	٪۲۳	.	.	۱	
٪۱۹	٪۲۳۸	.	۳۰	۲	
٪۸	٪۰/۶	۳۰	.	۳	

نموده سپس اندوتوکسین و در رتبه بعد PMA، قدرت تحریک و ایجاد خصوصیات چسبندگی را در سلولها افزایش داده است.

افزایش غلظت گالاکتوز موجب کاهش تعداد سلولهای چسبنده به سطوح محیط کشت گردیده و غلظت ۳۰ میلی مولار گلوکز نیز نه تنها سلولهای فاگوسیتیک را فعال ننموده بلکه اثر منفی برروی مورفوژن آنها بجا گذاشته است. در مجاورت محرکهای مختلف آزمایشگاهی، غلظتهای مختلف گلوکز و گالاکتوز، تغییرات محسوس و چشمگیری را بر مورفوژن و تکامل سلولها و نیز تعداد سلولهای چسبنده ایجاد ننموده است. لیکن ملاحظه می شود که تغییرات تکامل سلولها در مجاورت FMLP آنهم در غلظتهای بالای گالاکتوز و گلوکز کاهش نسبتاً محسوسی را نشان می دهد. ستون مربوط به عملکرد اندوتوکسین بر غلظتهای مختلف قند و نحوده اعمال فعالیتهای چسبنده و مورفوژن نشان می دهد که افزایش غلظت گلوکز ۱۵ و ۳۰ میلی مولار (موجب کاهش تعداد سلولهای چسبنده در محیط گردیده است).

همانگونه که در بخش روشهای ذکر گردید، بمنظور بررسی وضعیت بلع فاگوسیتها، تعداد مشخصی باکتری در اختیار ماکروفاژها قرار گرفت. جدول ۲ نشان می دهد که غلظت بالای گلوکز صدمه عملکردی محسوسی را در پروسه بلع فاگوسیتها در محیط کشت اعمال نموده بطوریکه تنها ٪۱۹ سلولهای فاگوسیت قادر به بلع باکتریها بودند (در مقایسه با رقم ٪۳۴/۵٪ محیط کشت عاری از قند اضافی). همچنین افزایش غلظت گالاکتوز در غلظت ۳۰ میلی مولار در مقایسه با محیط قبلی، موجب کاهش درصد سلولهای بلع کننده بمیزان

جدول ۳ - تفاوت در تعداد و بقا باکتریها قبل و بعد از انجام انکوباسیون و در طول کشت سلولهای فاگوسیت

انکوباسیون	انکوباسیون	انکوباسیون	قبل از انکوباسیون	پلیت	گلوکز	گالاکتوز	ماکروفاژ	سلول	میلی لیتر محیط کشت	تعداد باکتری در هر	محیط کشت	محتویات کربوهیدراتی در
2×10^{-7}		$1/5 \times 10^{-8}$								6×10^{-8}	+	۰
11×10^{-7}		3×10^{-8}								6×10^{-8}	+	۰
6×10^{-7}		2×10^{-8}								6×10^{-8}	+	۳۰
40×10^{-7}		6×10^{-8}								6×10^{-8}	-	۰

جدول ۴- آزمون NBT به منظور برآورده فعالیت اکسیداتیو و انفجار تنفسی سلولهای کشت شده در محیط‌های قندی مختلف

درصد سلولهای NBT مثبت در مجاورت محركها					محتويات قندی محیط کشت		
FMLP	PMA	Endotoxin	Control	گالاكتوز	گلوکز	پلیت	
۷۴	۷۵	۷۴	۷۶	۵	۵	۱	
۷۵	۷۷	۷۸	۶۳	۱۵	۵	۲	
۶۴	۶۵	۷۴	۵۸	۳۰	۵	۳	
۸۱/۵	۸۴/۷	۸۳	۶۷	۰	۰	۴	
۶۶	۶۴	۵۶	۶۷/۵	۰	۵	۵	
۴۵	۵۶	۵۸	۵۹	۰	۱۵	۶	
۷۹/۲	۸۴/۲	۶۰/۵	۶۹/۲	۰	۳۰	۷	

با مطالعه نحوه اثر گلیکاسیون بر مراحل مختلف بیگانه خواری شامل چسبندگی، تکامل مورفوژیک، توان بلع و کشنندگی و فعالیتهای اکسیداتیو، بر آن شدیدم تا عملکرد مهاری پدیده فوق را در بخش‌های مختلف اعمال فاگوسیتیک مطالعه نماییم. با مروری بر یافته‌های این تحقیق، مشخص گردید که غلظتهاي بالاي گالاكتوز و گلوکز مانع چسبندگی و مورفوژنز سلولهای ماکروفاز می‌گردد. این مراحل در روند تکامل التهاب و بکارگیری فاگوسیتیها در بدن اهمیت ویژه‌ای داشته و از مهمترین ارکانهای دفاع غیر اختصاصی محسوب می‌شوند. اثر محركهای آرمایشگاهی در فعالیت فاگوسیتیها تک هسته که در این تحقیق نشان داده شده است با سایر مقالات و پژوهش‌های مشابه، هماهنگی و تطبیق دارد. FMLP که محرك قوی سیستم ماکروفازها است با وجود غلظت افزاینده گلوکز و گالاكتوز همچنان توان عملکردی این سلولها را در تمامی شرایط افزایش داده است.

نتایج حاصله از مراحل وضعیت بلع سیستم ماکروفازی در محیط قندی نشان می‌دهد که در افزایش غلظت گلوکز و گالاكتوز تنها به غلظت ۳۰ میلی مولار بسته نمودیم) سیستم بلع باکتریایی بشدت تضعیف می‌شود. گالاكتوز توان بلع ماکروفازها را به مقدار ۲۵٪ کنترل کاهش داده است (۰/۸٪). در سیستم کنترل بلع و با توجه به شرایط طبیعی محیط کشت تعداد باکتری بلع شده در مقایسه با افزایش غلظت گلوکز بالاست. وقوع عفونتهای مکرر باکتریال در هیپر گالاكتوزمیا، الگویی کاملاً بیولوژیک و همراه با یافته فوق می‌باشد. لازم است ذکر شود که اضافه کردن ۵ میلی مولار گلوکز به محیط حاوی گالاكتوز با غلظت بالا، موجب عدم استفاده سلولها از گالاكتوز برای تامین انرژی می‌شود زیرا چنانچه گلوکز اضافی محیط وجود نداشته باشد، سلولها مقادیری از گالاكتوز را به عنوان منبع انرژی استفاده نموده و ترتیب افزایش یافته غلظت گالاكتوز مختلف می‌گردد.

در روش کلني کانت باکتری برای هر محیط باقیمانده از فعالیت فاگوسیتیها ملاحظه می‌شود که فعالیت کشنندگی ماکروفازها در مجاورت مقادیر افزاینده قند بشدت کاهش یافته و با ملاحظه نتایج حاصله از محیط کشت عاری از سلول، این اثرات مهاری کاملاً مشخص می‌شود. غلظت ۳۰ میلی مولار گالاكتوز امکان ادامه حیات و رشد باکتریها را در محیط‌های مخصوص به شدت افزایش داده و غلظت ۳۰ میلی مولار گلوکز نیز به ادامه حیات باکتریها و رهایی از فعالیت کشنندگی ماکروفازها یاری می‌رساند.

بخش تكميلي اين یافته ها مربوط به برآورده فعالیت اکسیداتیو و ادامه انفجار تنفسی فاگوسیتی است. جدول ۴ تغیيرات احياء NBT را در سیستمهای مختلف کشت همراه یا بدون قند اضافی را نشان می‌دهد. این جدول نشان می‌دهد که PMA و FMLP بالاترین قدرت فعالیت اکسیداتیو را در سلولهای فراهم می‌آورند. سایر اعداد مربوط به درصد سلولهای احياء کننده NBT تفاوت قابل تأملی را در سیستم‌های مختلف کشت سلول نشان نمی‌دهد.

بحث

تأثیر گلیکاسیون محیط رشد و تکامل سلولهای فاگوسیتیک بر فعالیت دفاعی این سلولها نشان داده است که صدمات عملکردی متعاقب افزایش غلظت قند در اطراف سلولها، از طریق مکانیسم تولید AGE، مسئول بروز عفونتهای مکرر در بیماریها و ناهنجاریهای مرتبط است. اینکه این صدمات در کدامیک از مراحل و فرایندهای بیگانه خواری به وقوع می‌پیوندد انگیزه اصلی در ابداع روش تحقیق در این کوشش بوده است. بدون شک اجزاء سطحی بسیاری که مسئول شناسایی عوامل بیگانه و سپس راه اندازی مکانیسمهای بیگانه خواری هستند تحت تاثیر تغییرات غلظت قند محیط، دگرگون گردیده امکان بروز پدیده ای مهاری در فعالیت گیرندگی آنها وجود دارد.

از آن استفاده نمودیم. می‌توان ادعا نمود که پژوهش مشابهی در این راستا انجام نگرفته است. البته در تحقیقی تقریباً مشابه با اندازه گیری NADPH اکسیداز، کوشش بسیار ارزنده‌ای را برای تعیین توان اکسیداتیو ماکروفازها در مجاورت غلظت‌های مختلف قندی انجام گرفته است که مانع از اجرای روش پژوهشی فوق بودیم. لیکن تست NBT نیز ارزش والای در تعیین روند اکسیداتیو و انفجار تفسی در سلولها دارد. جدول ۴ نشان می‌دهد که با وجود تاثیر قابل ملاحظه و چشمگیر غلظت افزاینده قندها بر مکانیسمهای فاگوسیتیک، چسبندگی و بخصوص بلع و کشندگی، وقایع اکسیداتیو که کاملاً درون سلولی می‌باشند، تغییرات قابل ملاحظه‌ای را در مقایسه با سیستم کنترل نشان نمی‌دهند. بنابراین بالاترین اثر مهاری این قندها بر مکانیسمهای وابسته به گیرنده و برون سلولی است. احتمالاً سیستمهای پیام رسانی و استه به اکسیژن تحت تاثیر این تغییرات قرار نمی‌گیرند. پژوهش‌های مشابه در سلولهای اخذ شده از مبتلایان به دیابت نشان داده است که بر عکس، فعالیت اکسیداتیو در این بیماران افزایش می‌یابد و این عامل خود باعث ایجاد جراحات عروقی و بافتی شرایطی مانند پای دیابتیک می‌شود (۱۴). نتایج ما نیز نشان داد که فعالیتهای اکسیداتیو فاگوسیتیها، در اثر افزایش غلظت قند محیط تغییر نمی‌کند.

امید است با انجام آزمونهای دقیقت در برآورد توان چسبندگی لکوسیتها و فعالیت کشندگی فاگوسیتها مانند اندازه گیری مولکولهای چسبان و گیرنده‌های کمکی سطح فاگوسیتها، گامهای موثرتری در فهم مکانیسمهای مرتبط با وقایع بیگانه خواری در دیابت و هیپرگالاکتوز می‌برداریم.

میانگین افزایش یافته تعداد باکتریهای بلع شده در ۱۰۰ سلول نیز در محیط عاری از قند، بیانگر نقش مهاری قندها در اشغال گیرنده‌های لکتینی برای بلع باکتری است. جدول ۳ نشان می‌دهد که تعداد باکتریهای محیط کشت در صورت عدم وجود سلولهای ماکروفازی، ثابت و زنده باقیمانده و حتی در محیط کشت باکتریابی، تعداد آنها افزایش بسیار یافته است. غلظت بالای گلوکز سبب بقاء تعداد بیشتری از باکتریهای بلع نشده گردیده است زیرا فاگوسیتها نیز ناتوان از بلع آنها می‌باشند. می‌توان موارد فوق را با شمارش باکتری به روش مک فارلند در محیط نرمال کشت سلولی، مقایسه نمود. افزایش غلظت گالاکتوز نیز سبب بقاء باکتریهای بلع نشده توسط سلول فاگوسیتیک، در محیط گردیده است.

بمنظور تعیین هر چه دقیقت نحوه عملکرد مهاری قندها بر فعالیت فاگوسیتها لازم بود تا باکتریهای بلع نشده با روش کلنی کانت، مورد بررسی از حیث بقاء حیات قرار گیرند. امکان دارد فعالیتهای اکسیداتیو ماکروفازها، بر حیات آنها حتی در خارج سلول، تاثیر بگذارد زیرا روش کلنی کانت، برآورده صحیح از تعداد باکتریهای زنده موجود در محیط می‌باشد و همانگونه که ذکر شد مکانیسمهای فاگوسیتیک و خروج عوامل باکتریسیدال چه در داخل واکوئلهای و چه خارج سلولها اثرات کشندگی و انهدامی بر حیات باکتریها اعمال می‌نماید.

در جدول ۳ نفاوت بین اعداد کلنی کانت، بیانگر این است که

قررت کشندگی سلولهای بیگانه خوار بر حفظ حیات باکتری آنهم در مجاورت قندها، کاهش شدیدی را نشان می‌دهد. این نتایج با مقالات و پژوهش‌های مشابه مطابقت دارد

(۲،۴،۸،۵،۷،۹).

یکی از روش‌های آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت کشندگی فاگوسیتها، تست احیاء ماده NBT است که مانع این تحقیق

REFERENCES

- Behrman RE, Kliegman RM, editors. Nelson essential of pediatrics. 4th edi. Philadelphia: WB Saunders; 2002. p. 161-2.
- Newsholme P, Newsholme EA. Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture. Biochem J 1989; 261(1): 211-8.
- Carpenter CCJ, Griggs RC, Loscalzo J, editors. Cecil essential of medicine. 5th edi. Philadelphia: WB Saunders; 2001.
- Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. Diabetes 1974; 231: 9-15.
- Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. Diabetes. 1989; 38(8): 1031-5.
- Sanchez A, Reeser JL, Lau HS, Yahiku PY, Willard RE, McMillan PJ, Cho SY, Magie AR, Register UD. Role of sugars in human neutrophilic phagocytosis. Am J Clin Nutr 1973; 26(11):1180-4.

7. Litchfield WJ, Wells WW. Inhibitory action of D-galactose on phagocyte metabolism and function. *Infect Immun* 1976; 13(3): 728-34.
8. Newsholme P, Gordon S, Newsholme EA. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem J* 1987; 242(3): 631-6.
9. Litchfield WJ, Wells WW. Inhibitory action of galactose on phagocytes from normal and hypergalactosemic chicks. *Infect Immun* 1977; 16(1): 198-202.
10. Roith DL, editor. Diabetes mellitus; A fundamental clinical text. 2nd edi. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
11. Rafael F, editor. Methods in cellular immunology. 2nd edi. CRC press; 2001. p. 5-6.
12. میرزا حسین یزدی ب، مصفا ن. بررسی خصوصیات چسبندگی ماکروفازهای پریتونال موش Balb/c در حضور محرک PMA. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۲؛ سال ۶۱، شماره فروردین.
13. Sonnenwirth AC, Jarett L, editors. Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 8th edi. New York: Mosby Company; 1980. p. 1363, 1760.
14. شوشتري زاده پ. بررسی كمی و كيفی فرآيند انفجار تنفسی سيسitem فاگوسیتی و ميزان روی سرمی در افراد دیابتی. پایان نامه کارشناسی ارشد ايمونولوژي. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. سال ۱۳۸۱.