مقاله اصیل پژوهشی

اثر نانوپلیمرهای چیتوزان در فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک مشتق‌شده از مغز استخوان موش

سعید دانشمندی[۱]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، مهدی فروزنده‌مقدم[۳]

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به مشکلات متعدّد عوامل مختلف در فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک و پاسخ‌های ایمنی، نیاز به ماده‌ای مطمئن، مؤثّر و کاربردی در روندهای ایمن‌درمانی است. چیتوزان، مادّه‌ای مؤثّر برای انتقال ژن و نیز جزئی از نانوداربست‌هاست. در این مطالعه، به تعیین اثر نانوپلیمرهای چیتوزان بر روی سلول‌های دندریتیک پرداخته شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، محلول چیتوزان (۱۵۰ کیلودالتون)، در اسیداستیک ۱% با استفاده از NaNO2 به‌صورت الیگومرهای ۱۰ کیلودالتون در آمد. ذرّات الیگومر، با استفاده از ۲NaOH نرمال حاصل گردید. سلول‌های دندریتیک، با استفاده از GM-CSF از مغز استخوان موش‌ها تولید شدند. بر روی سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان، نشانگرهای بلوغ CD40، CD86 و MHC-II با روش فلوسیتومتری بررسی شد و تولید TNF-α، با روش ELISA و تکثیر سلول‌های T مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در روز هشتم، خلوص سلول‌های دندریتیک، بیش از ۹۰٪ بود. افزایش در همه نشانگرهای بلوغ بررسی‌شده CD40، CD86 و MHC-II، به‌صورت مشخص‌کننده بود (P<۰/۰۵). ترشح TNF-α و القای تکثیر سلول‌های T توسط سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان، به‌طور مشخص بیشتر از سلول‌های بدون تحریک بود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نانوپلیمرهای چیتوزان، می‌توانند باعث ارتقای فنوتیپ بلوغ، تولید سایتوکاین پیش‌التهابی و القای تکثیر سلول‌های T گردند؛ بنابراین، نانوکمپلکس‌ها و داربست‌های چیتوزان، می‌توانند باعث القا شده و ارتقای عملکردهای سلول‌های دندریتیک و پاسخ‌های ایمنی را سبب شوند.

واژه‌های کلیدی: چیتوزان؛ سلول دندریتیک؛ TNF-α؛ سلول T؛ نشانگر بلوغ

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۳؛ ۲۱ (۲): ۱۶۰-۱۶۸.

دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۶ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۰۹

[۱] دانشجوی دکترای ایمنی‌شناسی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛

[۲] نویسنده مسؤول؛ استاد؛ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛

آدرس پستی: تهران- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده پزشکی- گروه ایمنی‌شناسی

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۲۹ نمابر: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۵۵ پست الکترونیکی: Pourfa@modares.ac.ir

[۳] استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

مقدمه

سلول‌های دندریتیک که عرضه‌کننده آنتی‌ژن و فعال‌کننده‌های بااهمیّتِ پاسخ‌های ایمنی هستند، نقش مشخصی در شروع و تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارند. از سلول‌های دندریتیک، به‌طور گسترده در دهه‌های اخیر، در بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان استفاده شده است (۱). سلول‌های دندریتیک، در مواجهه با عامل خارجی و برداشت آنتی‌ژن، فنوتیپ خود را تغییر داده و نشانگرهایی مانند: CD40، CD86 و MHC-II را بر روی سطح خود افزایش می‌دهد که این مولکول‌ها، برای عرضه آنتی‌ژن برداشت‌شده به سلول‌های T شرکت می‌کنند. در آزمایشگاه، برای بررسی توانایی و قدرت عرضه آنتی‌ژنی سلول‌های دندریتیک، از سنجش این نشانگرها استفاده می‌شود؛ همچنین سلول‌های دندریتیک، با فعال‌شدن، میانجی‌های التهابی مختلفی نیز در جهت ارتقای پاسخ‌ها تولید می‌کنند که از جمله آنها سایتوکاین TNF-α است. TNF-α، سایتوکاینی مهم به‌ویژه در ایجاد التهاب موضعی و شروع پاسخ‌های سیستماتیک است (۲)؛ از سوی دیگر، یکی از جنبه‌هایی که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است، ژن‌درمانی و دستکاری‌ها در سلول‌های دندریتیک، به‌منظور ارتقای کارایی پاسخ‌های ایمنی است (۱، ۲)؛ بدین‌منظور و برای این انتقال مؤثّر، مطالعات گذشته، از توانمندبودن این اجزا با ابعاد نانو، حکایت دارند (۳). مطالعاتی نشان داده‌اند که ملکول‌های چیتوزان، توانایی قابل‌توجهی در اتصال به مولکول‌های DNA و حفاظت آنها در انتقال دارند (۳). از مشخّصه‌های دیگری که نانوذارّات تولیدی با چیتوران دارند، توانایی سلول‌های دندریتیک به‌عنوان شروع‌کننده‌های پاسخ ایمنی در جذب اختصاصی و قابل توجه این نانوذرات می‌باشد که استفاده مؤثّر از آنها را امکان‌پذیر می‌سازد (۴). از دیگر امتیازات چیتوزان، کاربرد آن در نانودرابست‌هاست که استفاده فراوانی یافته است. در حال حاضر، شرایط کشت سلول در محیط‌های دوبعدی است که چندان تشابهی با محیط واقعی رشد سلول‌ها ندارد. در مطالعات اخیر تلاش می‌شود با کشت سلول‌ها بر روی نانودرابست‌ها، بتوان شرایطی را فراهم کرد که در آن سلول‌های تحت مطالعه، در محیطی مشابه با بافت طبیعی و در شرایط مشابه in vivo باشند (۵). با وجود استفاده گسترده چیتوزان ،هنوز اثرات این ماده بر روی سلول‌های سیستم ایمنی بررسی قابل توجهی نشده است؛ از سوی دیگر، یافتن مادّه‌ای که اثراتی مفید و کاربردی بر روی سلول‌های ایمنی داشته باشد، می‌تواند مطلوب باشد؛ بنابراین مطالعه حاضر، به‌منظور تعیین اثرات نانوالیگومرهای چیتوران بر روی رشد سلوی‌های دندریتیک و نیز تعیین اثراتی که بر فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک می‌گذارند، طراحی گردید.

روش تحقیق

این مطالعه تجربی، بر روی سلول‌های حاصل از موش‌های نژاد Balb/c ۸-۱۰ هفته‌ای انجام گرفت. مجوز مربوط به رعایت حقوق حیوانات، از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه دریافت گردید.

تولید سلول‌های دندریتیک

برای تولید سلول‌های دندریتیک، سلول‌های مونونوکلئر، از استخوان فمور و تیبیا، به کمک محیط کشت، جمع‌آوری گردید. گلبول‌های قرمز، با استفاده از محلول کلرید آمونیوم، لیز گردید و پس از شستشو، در محیط کشت RPMI کامل (حاوی ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد پنیسیلین) در مجاورت ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از GM-CSF به‌مدت ۳ روز کشت داده شد. در روز سوم، مقدار مساوی اولیه سایتوکاین به‌همراه محیط کشت تازه، به سلول‌ها اضافه گردید. در روزهای پنجم و هفتم نیز نصف محیط رویی برداشته شد و پس از سانترفیوژ سلول‌های باقیمانده با حجم اولیه محیط کشت کامل تازه و GM-CSF جایگزین گردید. سلول‌ها تا هشت روز کشت شدند تا تمایز سلول‌های دندریتیک نابالغ کامل گردد و در روز هشتم، سلول‌های با چسبندگی کم برداشت‌شده، به‌عنوان سلول‌های

دندریتیک نابالغ در آزمون‌ها استفاده گردیدند.

ایجاد الیگومرهای نانوچیتوزان

برای ایجاد الیگومرهای نانوچیتوزان از پلیمرها، محلول یک درصد چیتوزان (سیگما آلمان) در اسیداستیک ۱٪ تهیه شد و ۴ میلی‌لیتر از این محلول، با ۰/۲ میلی‌لیتر محلول سدیم‌نیتریت ($NaNO_2$) ۰/۱ مولار، به‌مدت ۳ ساعت مخلوط گردید تا الیگومرها تشکیل شوند. در نهایت، الیگومرها با ۲NaOH نرمال رسوب داده شد و پس از ۵ بار شستشو با PBS، در اسیداستیک یک‌درصد حل شده و فیلتر گردید.

نحوه تیمار سلول های دندریتیک

سلول‌های دندریتیک تولیدی نابالغ، در شرایط محیط کشت کامل، با محلول الیگومر شده حاوی مقدار ۵ میکروگرم از چیتوزان مجاور گردید. این سلول‌ها و سلول‌های دندریتیک تیمارنشده، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، سوپ رویی سلول برداشت شد و برای بررسی تولید TNF-α به‌روش الایزا (eBioscience، آلمان) مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی میزان سمیّت

برای بررسی میزان توکسیسیته الیگومرها بر روی سلول‌های دندریتیک، پس از طی ۲۴ ساعت کشت، میزان بقای سلول‌های کشت داده‌شده، با استفاده از روش MTT سنجیده شد؛ بدین منظور، ۲۰ میکرولیتر (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS) MTT (Merk– آلمان) به چاهک‌ها اضافه و به‌مدت ۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. پس از انکوباسیون، محیط رویی کشت به آرامی برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول ۵٪ HCl (سیگما) به چاهک‌ها اضافه گردید تا کریستال‌های فرمازان تشکیل‌شده، حل گردند و سبب ایجاد رنگ شوند. میزان جذب چاهک‌ها در ۵۴۰nm خوانده شد. نتایج به‌دست‌آمده، بر حسب اندکس بقا (SI) محاسبه گردید. SI میزان ۵۴۰OD هر تست به ۵۴۰OD کنترل منفی (سلول‌های دندریتیک تیمارنشده) می‌باشد.

بررسی نشانگرهای بلوغ

بررسی نشانگرهای بلوغ سطحی سلول‌های دندریتیک در دو گروه مورد نظر با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه اختصاصی PE-CD40، PE-CD86 و PE-MHC-II و نیز آنتی‌بادی اختصاصی نشانگر سلول‌های دندریتیک؛ یعنی، PEcy5-CD11c از شرکت eBioscience انجام گردید و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (BD، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

واکنش مختلط لکوسیتی

برای بررسی عملکرد سلول‌های دندریتیک تیمارشده (برگرفته از موش Balb/c)، این سلول‌ها با سلول‌های T جداشده از غدد لنفاوی موش‌های C57/B6 در واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) مجاور گردیدند؛ بدین‌منظور، غدد لنفاوی موش C57/B6 خارج گردید و پس از له‌کردن، سلول‌ها جمع‌آوری و گلبول‌های قرمز با محلول کلرید آمونیوم، لیز و از فیلتر (mesh) عبور داده شدند.

سلول‌های دندریتیک دست‌نخورده و تیمارشده با سلول‌های T حاصل، به نسبت ۱۰/۱ (۲۰۰۰۰ سلول دندریتیک/۲۰۰۰۰۰ سلول T) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI کامل، کشت داده شدند. به‌عنوان گروه کنترل، سلول‌های T، تنها به تعداد مساوی (۲۰۰۰۰۰ در هر چاهک) کشت داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسید کربن، میزان تکثیر سلول‌های T با استفاده از آزمون MTT سنجیده شد.

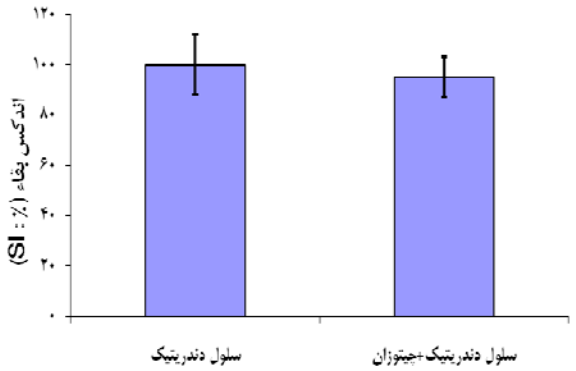
آنالیز آماری

نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شد و مقایسه نتایج بین ۲ گروه، توسط آزمون T–test بررسی گردید. نتایج با $P\leq ۰/۰۵$، به‌صورت معنی‌دار تفسیر گردید.

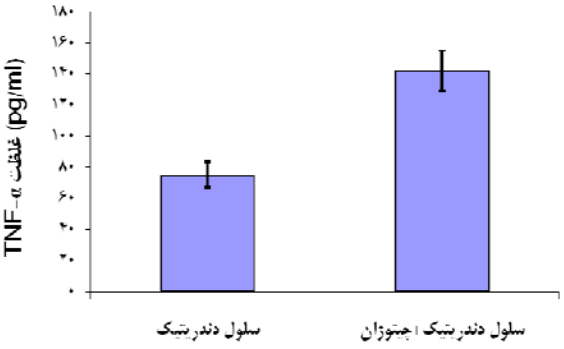
یافته‌ها

خلوص سلول‌های دندریتیک تولیدی، در روز هشتم بیش از ۹۰٪ بود. در بررسی میزان بقای سلول‌های دندریتیک در مواجهه با چیتوزان، میزان بقا در دو گروه، تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)؛ درنتیجه چیتوزان بر روی سلول‌های دندریتیک، سمیّت قابل توجهی نداشت (نمودار ۱).

مقادیر درصد بقای سلول‌های ندریتیک و سلول‌های دندریتیک+چیتوزان به‌ترتیب: ۱۲/۲±۱۰۰/۳ و ۸/۶±۹۵/۴ بود. بررسی نتایج سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان

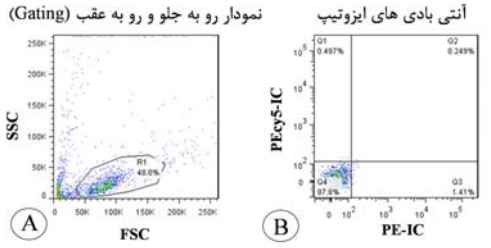


نمودار ۱- میزان بقای سلول‌های دندریتیک در مواجهه با چیتوزان. میزان بقا در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵).

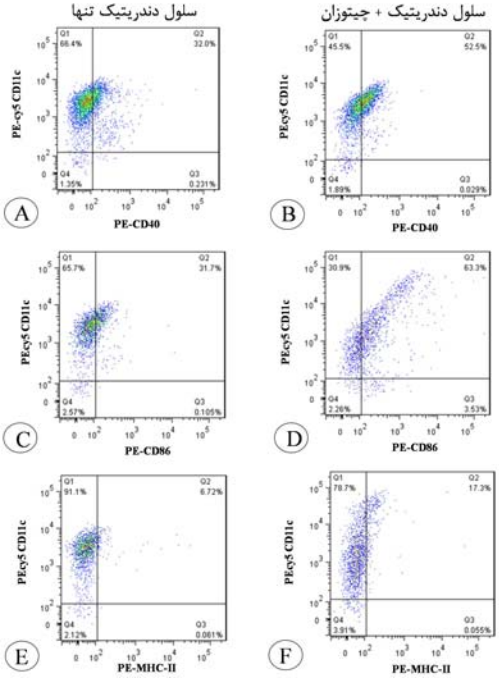


نمودار ٤- سنجش میزان TNF-α تولیدی در سوپ کشت سلول‌های دندریتیک تنها و سلول‌های دندریتیک مواجه‌شده با چیتوزان. سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان، به‌طور مشخصی TNF-α بالاتری تولید می‌کنند (P=۰/۰۰۷۱).

در آزمون فلوسایتومتری، نشان‌دهنده افزایش همه نشانگرهای بلوغ سلول‌های دندریتیک بررسی‌شده در مواجهه با نانوالیگومرهای چیتوران بود. در گروه تیمارشده و تیمارنشده، تفاوت در نشانگر CD40 (P=۰/۰۴۳)، در نشانگر CD86 (P=۰/۰۱۲) و همچنین نشانگر MHC-II (P=۰/۰۳۱) از نظر آماری معنی دار بود (نمودار ۲ و ۳). در سنجش میزان TNF-α تولیدی در سوپ کشت (نمودار ۴)، سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان، به‌طور مشخصی TNF-α بالاتری تولید کردند (P=۰/۰۰۷۱).

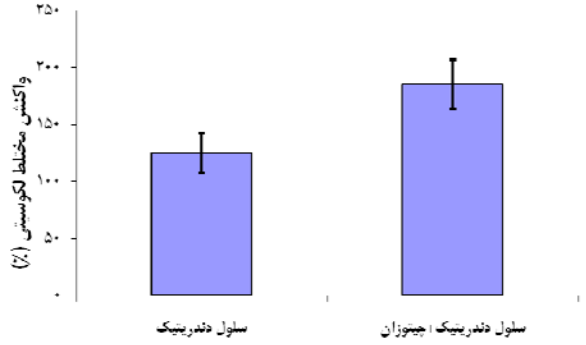


نمودار ۲- آزمون فلوسایتومتری بر روی سلول‌های دندریتیک. A: نمودار پرتوهای رو به جلو و رو به عقب و تعیین (gating) سلول‌های دندریتیک در جمعیت تام؛ B: آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ و تعیین آستانه مثبت.



نمودار ۳- نتایج آزمون فلوسایتومتری بر روی سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان. A و B: تفاوت در ماکر CD40 (p=۰/۰۴۳)؛ C و D: تفاوت در ماکر CD86 (p=۰/۰۱۲)؛ E و F: تفاوت در نشانگر MHC-II (P=۰/۰۳۱).

مقادیر TNF-α تولیدی برای گروه سلول‌های دندریتیک و گروه سلول‌های دندریتیک مجاورشده با چیتوزان، به‌ترتیب: ۸/۱±۷۵/۲ و ۱۳/۵±۱۴۲/۷ بود (P=۰/۰۰۷۱). واکنش مختلط لکوسیتی (MLR) تکثیر سلول‌های T، در کشت همزمان با گروه سلول‌های دندریتیک مجاورشده با چیتوزان، به‌طور معنی داری بالاتر بود (۲۲/۶±۱۸۵/۳ در مقایسه با ۱۷/۴±۱۲۵/۱)(P=۰/۰۱۲) (نمودار ۵).



نمودار ۵- مقایسه نتایج واکنش مختلط لکوسیتی (MLR). تکثیر سلول‌های T در گروه مجاور داده‌شده با چیتوزان، به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P=۰/۰۱۲).

بحث

سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) و قوی‌ترین محرک‌های سلول‌های T دست‌نخورده می‌باشند که در شروع این پاسخ‌های ایمنی، نقشی کلیدی ایفا می‌کنند (۱، ۲). مطالعات پیش‌بالینی نشان داده‌اند که بلوغ سلول‌های دندریتیک، توانایی آنها را در تحریک سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن افزایش می‌دهد (۱، ۳)، ولی در بیشتر مطالعات بالینی اولیه، سلول‌های دندریتیک نابالغ استفاده شده‌اند. مطالعات بالینی اخیر، این نگرانی را مطرح نموده‌اند که استفاده از سلول‌های دندریتیک نابالغ، ممکن است پاسخ ایمنی را کاهش دهد. برخی مطالعات، با مقایسه ایمنی‌زایی سلول‌های دندریتیک نابالغ در برابر سلول‌های دندریتیک بالغ، نشان داده‌اند که بلوغ، برای القای پاسخ‌های ایمنی در بیماران سرطانی ضروری است (۶). Dhoadpkar و همکاران، گزارش کردند که تزریق سلول‌های دندریتیک نابالغ، منجر به مهار عملکرد T CD8 اختصاصی آنتی‌ژن و کاهش تولید IFN-γ توسط سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن پس از تحریک شد (۷). مهمتر از آن، شاید به نظر بیاید که استفاده از سلول‌های دندریتیک بالغ، رابطه مستقیمی با نتیجه بالینی بهتر داشته باشد (۸). سلول‌های دندریتیک، می‌توانند با محرک‌های متنوعی شامل: TNF-α، CD40L و ایونوفورهای کلسیم، از نظر فنوتیپی بالغ شوند، ولی لزوماً همه ترکیبات، باعث بلوغ مناسب و همه‌جانبه سلول‌های دندریتیک نمی‌شوند؛ به‌عنوان نمونه، همه این ترکیبات، موجب افزایش تولید IL-12 که عامل مهم محرک سلول‌های T است، نمی‌شوند. نشان داده شده است که فقط ترکیباتی که حاوی IFN-γ و CD40L باشند، باعث القای تولید قابل‌توجه IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک می‌شوند (۹). Czerniechki و همکاران، مشاهده کردند که سایتوکین‌های مختلف شامل: TNF-α، IL-4، GM-CSF، ایونوفورهای کلسیم، IL-3 و PGE2، می‌توانند بلوغ سلول‌های دندریتیک را القا نمایند، ولی فقط سلول‌های دندریتیک فعال‌شده با TNF-α، IFN-γ، GM-CSF و CD40L ،مقادیر قابل توجهی IL-12 تولید کردند (۱۰). در حال حاضر بیشتر مطالعات بالینی، از TNF-α یا یک کوکتل سیتوکینی شامل: TNF-α، IL-6، IL-1β و PGE2، به‌عنوان عوامل بلوغ استفاده می‌کنند؛ این کوکتل سیتوکینی، بر این اساس انتخاب شد که مشاهده گردید بیان CD83، HLA-DR و CD86، به‌وسیله سلول‌های دندریتیک، افزایش یافت و تکثیر بیشتری را در سلول T آلوژن القا کرد (۱۱). ولی داخل‌نمودن PGE2 در این کوکتل سیتوکینی، مستلزم تعمّق بیشتری است؛ چرا که گزارش شده است که PGE2، ترشح IL-12 به‌وسیله سلول‌های دندریتیک را مهار می‌کند (۱۲) و از سوی دیگر، باعث مهاجرت سلول‌های دندریتیک به گره‌های لنفاوی می‌شود که در واقع پیش‌نیاز تحریک سلول‌های T است (۱۳). اگونیست‌های IFN-γ،

IL-12، IL-2 و TLR نیز به‌عنوان عوامل التهابی یا تعدیل‌کننده ایمنی گزارش شده‌اند. اگونیست‌های TLR مثل: LPS، RNA دو رشته‌ای، poly I:C یا CpG، می‌توانند در غیاب سایر عوامل التهابی، بلوغ سلول‌های دندریتیک را القا نمایند و این ممکن است ضامن تحقیقات بیشتر بر روی آنها، به‌منظور استفاده بالقوه در تحقیقات بالینی باشد (۱۴). با وجود بسط و تحقیق واکسیناسیون با سلول‌های دندریتیک به‌منظور درمان سرطان، در واقع مشکلات پایه بهینه‌سازی درمان، با این روش مرتفع نشده است؛ برخلاف بحث‌های متعددی که در مورد چگونگی ارتقای روش تولید برای واکسیناسیون بیماران شده است، هیچ روش عمومی برای تهیه، بلوغ و پالس‌کردن سلول‌های دندریتیک به‌صورت ex vivo وجود ندارد؛ از سوی دیگر، چیتوزان که ماده تجزیه‌پذیر زیستی‌ای است، کاربردهای گسترده‌ای در علوم پزشکی نوین یافته است. محیط کشت‌های کنونی، دوبعدی و جایگاه اصلی سلول‌ها، سه‌بعدی است و سلول‌ها در بافت ماتریکسی قرار گرفته‌اند. نشان داده شده است که محیط‌های دوبعدی (2D)، در درمان‌های ضدّ توموری کارایی لازم را ندارند (۱۵). نشان داده شده است که محیط‌های کشت in vitro دوبعدی، موجب کاهش و تغییر در فنوتیپ توموری در مقایسه با مدل in vivo تومور می‌گردند (۱۶). پیشنهادهای کنونی، در استفاده از محیط‌های سه‌بعدی (3D) به‌عنوان جایگزین مدل توموری است (۱۷). چیتوزان، از مواد تجزیه‌پذیر زیستی است که کارایی و عدم سمّیت آن، در چندین مدل مهندسی بافتی نشان داده شده است؛ از جمله، مطالعاتی که بر روی تولید استخوان و غضروف انجام گردیده (۱۸) و یا مطالعاتی که بر روی بازسازی سلول‌های بنیادی صورت گرفته است (۱۹). یکی دیگر از نکات کاربردی در مورد نانوداربست‌ها، امکان استفاده از آنها به‌عنوان مدل‌های In vitro است؛ با توجه به مشکلات متعددی که در مورد مدل‌ها در حیوان وجود دارد، مانند: عدم قابلیت و دسترسی گسترده، هزینه‌های زیاد، اثرات جانبی عوامل مختلف و مداخله‌گر بر روی حیوان مدل آزمایشگاهی و ...، چیتوزان را می‌توان به‌صورت در دسترس برای انواع مدل‌ها تهیه نمود. بر روی استفاده از سلول‌های دندریتیک بر روی نانوداربست‌های چیتوزان، مطالعه مشخصی انجام نشده است، اما نشان داده شده است که نانوذرات چیتوزان، می‌توانند به‌صورت ناقل‌های مناسب برای انتقال مولکول‌های DNA و پروتئین‌ها عمل نمایند (۲۰). با توجه به این مطالب و احتمال کاربردهای مختلفی که می‌تواند وجود داشته باشد، در این مطالعه، به بررسی اثرات نانوالیگومرهای چیتوزان بر روی سلول‌های دندریتیک پرداخته شد. در ابتدا بررسی سیتوتوکسیسیته نشان داد که الیگومرهای چیتوزان، سمیّت مشخص‌کننده‌ای بر روی سلول‌های دندریتیک ندارد؛ همچنین میزان بقای سلول‌های دندریتیک تیمارشده، مقداری کاهش در بقا را نشان داد که می‌تواند به‌علت وجود اسید استیک در محیط باشد. لازم به ذکر است که برای تولید نانوذرّات و نانوداربست‌ها، چیتوزان به‌صورت محلول در اسیداستیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج نشان داد که همه نشانگرهای بلوغ بررسی‌شده CD40، CD86 و MHC-II، بر روی سلول‌های دندریتیک که با چیتوزان مواجه شده بودند، به‌صورت مشخصی افزایش می‌یابد. MHC-II، مولکولی است که آنتی‌ژن‌ها را به سلول‌های T عرضه می‌کند و CD40 و CD86 از جمله مولکول‌های کمک‌تحریکی هستند که پیام‌های ثانویه را در فعال‌سازی سلول‌های T ایجاد می‌نمایند. افرایش بیان این مولکول‌ها، حکایت از ارتقای قدرت عرضه آنتی‌ژنی سلول‌های دندریتیک دارد. این فنوتیپ، در بررسی القای تکثیر لنفوسیتی نیز به‌صورت عملی نشان داده شد. در واکنش MLR، سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان، به‌طور مشخص تکثیر سلول‌های T را ارتقا دادند. در بررسی سایتوکاین پیش‌التهابی TNF-α نیز که از مدیاتوری مهم در التهاب موضعی و شروع پاسخ‌هاست، نتایج نشان داد که میزان تولید TNF-α در تیمار با چیتوزان افزایش می‌یابد. در این رابطه، در مطالعه‌ای بیان شده است که الیگومرهای چیتوزان، باعث افزایش بیان نشانگرهای

MHC-II، CD80 و CD86 می‌شوند، اما موجب ارتقای سایتوکاین‌های پیش‌التهابی نشده و نمی‌تواند موجب تحریک و تکثیر سلول‌های T گردد (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر، عکس این مطلب بیان شده و گفته شده است که سلول‌های دندریتیک تیمارشده با چیتوزان، علاوه بر افزایش بیان CD86، مقادیر افزایش‌یافته سایتوکین‌های پیش‌التهابی TNF-α و IL-1β را ترشح می‌کنند و میزان سایتوکین ضدّ التهابی IL-10 در آنها کاهش می‌یابد (۲۲). در همین مطالعه بیان شده است که چیتوزان، بر روی ماکروفاژها موجب کاهش بیان MHC-II و CD86 و ترشح TNF-α شده و میزان سایتوکاین‌های ضدّ التهابی IL-10 و TGF-β را افزایش می‌دهد (۲۲).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر حاکی از توانمندی الیگومرهای چیتوزان در افزایش ماکرهای بلوغ، ترشح TNF-α و ارتقای تکثیر سلول‌های T می‌باشد. احتمالاً می‌توان از چیتوزان برای القای بلوغ و عملکرد سلول‌های دندریتیک، در مطالعات مختلف واکسیناسیون درمانی سلول‌های دندریتیک استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله قسمتی از رساله دکترا در گروه ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس با شماره ثبت ۵۲۷۸۶۱۱ می‌باشد. نویسندگان از اعضای گروه ایمنی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری داشته‌اند، کمال تشکر را می‌نماید.

منابع:

1- Onaitis M, Kalady MF, Pruitt S, Tyler DS. Dendritic cell gene therapy. Surg Oncol Clin N Am. 2002; 11(3): 645-60.

2- Pletinckx K, Döhler A, Pavlovic V, Lutz MB. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. Front Immunol. 2011; 2: 39.

3- Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. J Control Release. 2001; 70(3): 399-421.

4- Kim TH, Jin H, Kim HW, Cho MH, Cho CS. Mannosylated chitosan nanoparticle-based cytokine gene therapy suppressed cancer growth in BALB/c mice bearing CT-26 carcinoma cells. Mol Cancer Ther. 2006; 5(7):1723-32.

5- Li H, Wijekoon A, Leipzig ND. 3D differentiation of neural stem cells in macroporous photopolymerizable hydrogel scaffolds. PLoS One. 2012; 7(11): e48824.

6- de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LP, Ruiter DJ, Gerritsen MJ, et al. Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. Clin Cancer Res. 2003; 9(14): 5091-100.

7- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J Exp Med. 2001; 193(2): 233-8.

8- McIlroy D, Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. Cancer Immunol Immunother. 2003; 52(10): 583-91.

9- Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Nair SK, Thomas EK, Morse MA, et al. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. Blood. 2000; 96(10):3499-504.

10- Czerniecki BJ, Cohen PA, Faries M, Xu S, Roros JG, Bedrosian I. Diverse functional activity of CD83þ monocyte-derived dendritic cells and the implications for cancer vaccines. Crit Rev Immunol. 2001; 21(1-3): 157-78.

11- Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur J Immunol. 1997; 27(12): 3135-42.

12- Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. J Immunol. 1998; 161(6): 2804-9.

13- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2002; 100(4): 1354-61.

14- Pasare C. Medzhitov R. Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity. Microbes Infect. 2004; 6(15): 1382-7.

15- Hambley TW, Hait WN. Is anticancer drug development heading in the right direction? Cancer Res. 2009; 69(4): 1259-62.

16- Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2006; 42(8-9): 242-7.

17- Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nat Biotechnol. 2005; 23: 47-55.

18- Li Z, Leung M, Hopper R, Ellenbogen R, Zhang M. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. Biomaterials 2010; 31(3): 404-12.

19- Shen G, Shen F, Shi Z, Liu W, Hu W, Zheng X, et al. Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2008; 44(7): 280-9.

20- Raghuwanshi D, Mishra V, Das D, Kaur K, Suresh MR. Dendritic Cell Targeted Chitosan Nanoparticles for Nasal DNA Immunization against SARS CoV Nucleocapsid Protein. Mol Pharm. 2012; 9(4): 946-56.

21- Villiers C, Chevallet M, Diemer H, Couderc R, Freitas H, Van Dorsselaer A, et al. From secretome analysis to immunology: chitosan induces major alterations in the activation of dendritic cells via a TLR4-dependent mechanism. Mol Cell Proteomics. 2009; 8(6): 1252-64.

22- Oliveira MI, Santos SG, Oliveira MJ, Torres AL, Barbosa MA. Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. Eur Cell Mater. 2012; 24: 136-52.

Abstract *Original Article*

Chitosan nanopolymers effect in activating of mouse bone marrow derived dendritic cells

Saeed Daneshmandi[1], Ali Akbar Pourfathollah[2], Mehdi Forouzandeh-Moghaddam[3]

Background and Aim: Regarding to various problems in the activation of dendritic cells and immune system's responses, finding of a safe, effective and applicable agent is highly desirable. Chitosan is an effective gene delivery agent and also a part of nanoscaffolds. In the present study, chitosan nanopolymers effect on dendritic immune cells were assessed.

Materials and Methods: In this experimental-laboratory study, chitosan (150 KD) in acetic acid 1% solution was depolymerized to 10 KD oligomers using $NaNO_2$. The oligomers particles were obtained by means of 2 normal NAOH molecules. Denderitic cells were derived from the rats' bone marrow using GM-SCF. On the treated denderitic cells CD40, CD86 and MHC-II maturation markers were evaluated by flowcytometery; and TNF-α release was evaluated using ELISA method and T cell proliferation.

Results: It was observed that dendrtic cells purity on the 8^{th} day was more than 90%. Flowcytometery analysis showed an increase in all evaluated CD40, CD86 and MHC-II maturation markers ($p<0.05$). TNF-α release and T cell proliferation significantly increased by chitosan treated denderitic cells compared to unstimulated or lipofectamin treated cells ($P<0.05$).

Conclusion: Results showed that chitosan nanopolymers significantly increased dendertic cell maturation phenotype, proinflamatory cytokine production, and induction of T cell proliferation. Therefore, chitosan nanocomplexes and scaffolds can induce and accelerate immune responses.

Key Words: Chitosan; Denderitic cell; TNF-α; T cell; Maturation marker

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (2): 160-168.

Received: July 28, 2013 ***Accepted: December 30, 2013***

[1] *PhD. student of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran;*
[2] *Corresponding author, Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran Pourfa@modares.ac.ir*
[3] *Professor of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*