# واکنش سلول‌های دندریتیک تمایز یافته با سایتوکاین TGF-β1 با سلول‌های $TCD4^{+}$

*دکتر سعید عابدیان(Ph D )[1]- یوسف یوسف‌زاده(Stu)[1]- هادی حسن‌نیا(Stu)[1]

*نویسنده مسئول: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی

پست الکترونیک:abedianlab@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۳

## چکیده

**مقدمه: سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که پیام‌های تنظیمی ضروری برای شروع پاسخ‌های ایمنی به‌وسیله لنفوسیت‌های T را فراهم می‌کنند. این سلول‌ها در تعامل با سلول‌های T تنظیمی(Regulatory) نقش مهمی در درمان بیماری‌ها دارند.**

**هدف: بررسی اثر سایتوکاین TGF-β1(Transforming growth factor β) در تمایزسلول‌های دندریتیک و نیز توانایی این سلول‌ها در گسترش سلول‌های T تنظیمی (T regulatory)در محیط کشت سلولی.**

**مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی از ۵ نفر داوطلب، نمونه‌گیری انجام شد و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی آنها با استفاده از محلول فایکول جدا شدند. سلول‌های دندریتیک از سلول‌های منوسیت خون محیطی با استفاده ازسایتوکاین‌های GM-CSF,IL-4 ±TGF-β1 در مقابل شاهد تولید شدند و میزان تکثیر سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی با سلول‌های دندریتیک تولید شده ارزیابی شد. با استفاده از فلوسیتومتری، درصد سلول‌های $T\ CD4^{+}CD25^{+}$ ، CD14 و شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک تعیین شد.**

**نتایج: در این مطالعه سلول‌های دندریتیک در حضور سایتوکاین TGF-β1 و بدون این سایتوکاین تولید شدند. میزان تکثیر سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی با سلول‌های دندریتیک متأثر از TGF-β1 در مقایسه با کنترل کاهش داشته‌است و به‌علاوه تعداد سلول‌های $TCD25^{+}$ در محیط کشت سلولی حاوی سلول‌های دندریتیک تمایز یافته با TGF-β1 افزایش ۲۷درصدی داشته است($p<0.05$).**

**نتیجه‌گیری: در این مطالعه مولکول‌های TGF-β1 با اثر بر سلول‌های دندریتیک سبب ایجاد سلول‌هایی با توان مهار پاسخ های سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی شد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق به‌نظر می‌رسدکه این سلول‌ها می‌توانند نقش مهمی در جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته ایمنی در محیط آزمایشگاهی داشته باشند.**

**کلید واژه‌ها:** آزمون کشت مختلط لنفوسیت/ سلول‌های دندریتی/ عامل بقای رشد متغیر/ لنفوسیت‌های تی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره نوزدهم شماره ۷۷، صفحات: ۷-۱

## مقدمه

سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که نقش مهمی در سیستم ایمنی اختصاصی و ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. این سلول‌ها واسطه‌های کلیدی ایمنی وابسته به سلول‌های T محسوب می‌شوند که نقش مؤثری در شروع پاسخ‌های ایمنی در شرایط طبیعی و بیماری‌ها دارند (۱و۲) اگرچه سلول‌های دندریتیک‌بالغ، سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن قوی در شروع پاسخ‌های ایمنی هستند، اما انواع معینی از آنها قدرت القاء تولرانس در پاسخ‌های ایمنی را دارند و این سلول‌ها با عرضه پپتید آنتی‌ژنیک همراه با MHC (Major Histocompatibility Antigen) باعث القاء تولرانس در سلول‌های T می‌شوند، که بخشی ازتوانایی این سلول‌ها در آغاز پاسخ ایمنی ناشی از قدرت آنها در ارایه پیام‌های مهم تحریکی اختصاصی برای فعال‌شدن سلول T و تبدیل آن‌ها از حالت ناآزموده به انواع مختلف سلول عمل‌کننده‌است(۳). سلول‌های منوسیت خون محیطی از منابع مهم تولید سلول‌های دندریتیک محسوب می‌شوند. این سلول‌ها تحت اثر سایتوکاین‌های اینترلوکین ۴ و GM-CSF به سلول‌های دندریتیک نابالغ و سپس با اثر سایتوکاین TNF-α یا محرک‌های دیگر از قبیل لیپوپلی‌ساکارید به سلول‌های دندریتیک بالغ تبدیل می‌شوند. شناسایی آنتی‌ژن و پردازش آنها سبب بروز تعداد زیادی از مولکول‌های کمک تحریکی از قبیل CD80, CD86, CD40 می‌شود که از عوامل القاکننده تولرانس یا تحریک سلول‌های T محسوب می‌شوند(۲).

سلول‌هایT تنظیمی طبیعی دارای شاخص‌های CD4 وCD25، سلول‌هایی با توانایی تنظیم سیستم ایمنی هستند که نه تنها پاسخ‌های اتوایمیون را مهار می‌کنند بلکه سبب مهار بسیاری

۱. ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی

از پاسخ‌های ایمنی پاتولوژیک و فیزیولوژیک به آنتی‌ژن‌ها و سبب افتراق سلول‌های خودی از غیرخودی (Self and Non self) نیز می‌شوند. در انسان تا ده درصد سلول‌های $T\ CD4^+$ خون محیطی، شاخص CD25 را بروز می‌دهند که تنها ۱-۲ درصد از آنها سطوح بالایی از این مارکر را بیان می‌کنند(CD25 bright cells) که فعالیت مهاری دارند(۴). این سلول‌ها در تعامل با سلول‌های دندریتیک نقش موثری در تولرانس ایمنی ایفا می‌کنند(۵).سلول‌های دندریتیک در محیط‌های کشت، شکل‌های مختلف و ویژگی‌های عملکردی متفاوتی را بروز می‌دهند که بستگی به حضور سایتوکاین‌های مختلف در محیط‌های کشت‌سلولی دارد(۶و۷). Dardalhon و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سایتوکاین TGF-β1 همراه با اینترلوکین۱۰ سبب تولید سلول‌های دندریتیک می‌شوند که نقش تنظیمی در پاسخ‌های ایمنی را دارند(۸). مطالعات متعدد نشان می‌دهند که سایتوکاین TGF-β1، سایتوکاینی مؤثر در تکثیر، تمایز، چسبندگی سلولی، گسترش اسکلتی، هموستاز و پاسخ‌های التهابی است که به‌عنوان مولکولی مؤثر در تنظیم پاسخ‌های ایمنی شناخته شده‌است(۹).

با توجه به مطالب فوق، مطالعه ما با هدف بررسی اثر سایتوکاین TGF-β1 در تولید سلول‌های دندریتیک و نیز نقش این سلول‌ها در واکنش با سلول‌های T در کشت مختلط لکوسیتی، به‌منظور یافتن راه تازه‌ای برای جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته ایمنی پایه‌ریزی شد.

## مواد و روش‌ها

### ۱-انتخاب افراد

مطالعه از نوع تجربی بوده که از ۵ فرد بالغ داوطلب پس از معاینات دقیق بالینی و کسب رضایت آگاهانه میزان ۵۰-۴۵ میلی‌لیتر نمونه‌خون محیطی از هر نفر در لوله‌های استریل حاوی ماده ضدانعقاد هپارین گرفته شد.

### ۲-جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی(PBMC)

- نمونه‌ها در دور ۲۰۰۰(۴۰۰g)بمدت ۵دقیقه برای جداسازی پلاسما سانتریفوژ شدند و سپس هم حجم گلبول‌های متراکم، محیط RPMI (Gibco, USA) افزوده تا رقیق شود.

- در یک لوله استریل به میزان نصف نمونه رقیق شده محلول فایکول 1.077 (بهار افشان) در شرایط کاملاً استریل ریخته شد.

- نمونه به آرامی با استفاده از یک پیپت پاستور روی فایکول اضافه و سپس در g۴۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌منظور جداکردن سلول‌های تک‌هسته‌ای سانتریفوژ شد.

- پس از سانتریفوژ از ٤ لایه ایجاد شده، لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای که بین فایکول در زیر و RPMI در بالا قرار داشت، جدا شد.

- سلول‌های تک‌هسته‌ای دوبار با RPMI شسته شد و پس از آخرین شستشو به حجم یک میلی‌لیتر رسانده‌شد سپس یک قطره از آن را برای شمارش استفاده شد.

### ۳- تولید سلول‌های دندریتیک از منوسیت‌های خون‌محیطی

- سلول‌های تک‌هسته‌ای خون‌محیطی که با استفاده از فایکول جدا شده‌بود، برای تولید سلول‌های دندریتیک استفاده شد.

- سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به تعداد $۱/۵ - ۳\times۱۰^۶$ سلول در هر میلی‌لیتر و به حجم $۵^{ml}$ در پنج فلاسک کشت T25 به‌طور جداگانه در محیط کشت RPMI– 1640 حاوی پنی‌سیلین(50u/ml) استرپتومایسین (50μ g /ml) و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله(Gibco, USA) به‌مدت ۲ساعت در $۳۷^{\circ}C$ حاوی ۵ درصد $CO^2$ انکوبه شد.

- بعد از پایان زمان انکوباسیون، سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دوبار شستشوی آرام جدا شده و به‌عنوان سلول‌های غیرچسبنده برای جداسازی سلول‌های T استفاده شد.

- به سلول‌های چسبنده که اکثریت آنها را منوسیت‌ها تشکیل می‌دادند ۱۰۰۰واحد در میلی‌لیتر TGF-1β ( Bender med system, Austria)، ۱۰۰۰واحد در میلی‌لیترGM-CSF (Bender med system, Austria) و۵۰۰ واحد در میلی‌لیتر اینترلوکین-۴ (Bender med system, Austria) اضافه شد و به‌مدت ۵ روز در محیط RPMI و در $۳۷^{\circ}C$ در کنار شاهد (فاقد TGF-β) کشت داده شد.

- LPS ( 10 ng/ml) در روز پنجم به‌عنوان عامل بلوغ به هر دو گروه اضافه شد.

- در روز هفتم سلول‌های دندریتیک تولید شده با استفـــاده از

بافرفسفات حاوی ماده تریپسین- EDTA ۰/۵ میلی‌مولار برداشته و از نظر مورفولوژی و فنوتیپ مطالعه شدند.

**٤- تعیین‌فنوتیپ سلول‌های‌دندریتیک به روش فلوسیتومتری**

- سلول‌های دندریتیک پس از یک بار شستشوی با بافر در شرایط سرما روی یخ قرارداده شدند.

- تعداد $۵۰\times۱۰^۳$ عدد سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر آماده شده که مقدار ۱۰میکرولیتر آنتی‌بادی مربوط (10 mg/ml) به‌همراه ایزوتیپ کنترل اضافه و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در $٤^{°C}$ انکوبه شد.

- با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری Partec Pas درصد سلول‌های دارای شاخص CD14 در سطح سلول‌های منوسیت، شاخص‌های CD4,CD25 در سطح سلول‌های T وشاخص‌های CD83, CD80,CD86,HLA-DR در سطح سلول‌های دندریتیک با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال کنژوگه با FITC وPRE (Dako, Germany) بعد از واکنش مختلط لکوسیتی اتولوگ بررسی شدند.

**۵-واکنش مختلط لکوسیتی اتولوگ**

برای سنجش توانایی سلول‌های دندریتیک تولید شده (سلول‌های محرک) برای تکثیر لنفوسیت‌های T (سلول‌های پاسخ دهنده) واکنش مختلط لوکوسیتی (MLR) به شرح زیر انجام شد:

- لنفوسیت‌های $CD4^+$ T از PBMC افراد با خلوص بیش‌از ۹۰٪ با استفاده از مگنتیک بید(Milteny roy, USA) تهیه شد.

- تعداد ۱۰۰۰۰۰ لنفوسیت T به صورت سه تایی با $۱\times۱۰^٤$ سلول‌های دندریتیک متأثر از TGF-β و بدون تأثیر از TGF-β (شاهد) مخلوط و به مدت ۳ روز در پلیت ۹٦ خانه‌ای ته‌گرد در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS در حجم µl ۲۰۰ در دمای $۳۷^{°C}$ و پنج درصد $CO^2$ کشت داده شد.

- در روز سوم سوپرناتانت محیط کشت سلولی برداشت و ذخیره شد و سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر ماده رنگی-3-[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) MTT ) به‌عنوان اندیکاتور به هر خانه اضافه شد (۱۰) .

- پلیت به‌مدت ٤ ساعت در دمای $۳۷^{°C}$ انکوبه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl solfuxide) به هر خانه میکروپلیت اضافه شد.

- تغییرات رنگ ایجادشده در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط الیزا خوانده شد.

- تمامی آزمایش‌ها به‌صورت سه‌تایی انجام و نتایج به‌دست‌آمده به صورت (Mean± SD) محاسبه و گزارش شد.

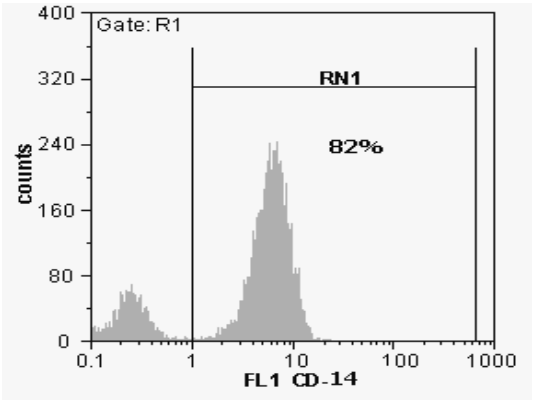
**۶-آنالیز آماری**

پس از جمع‌آوری داده‌ها و تجزیه‌وتحلیل آن‌ها، از آزمون Paired T-Test برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد و $p<0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

## نتایج

**۱- فلوسیتومتری**

سلول‌های دندریتیک که از سلول‌های منوسیت $CD14^+$ تولید شده‌بودند (نمودار۱)، علاوه بر فلوسیتومتری از نظر ریخت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ معکوس(Invert) همواره بررسی شدند.




**نمودار۱:درصد سلول‌های منوسیت +CD14 که برای تولید سلول‌های دندریتیک از آن‌ها استفاده شده‌است**

آنالیز فلوسیتومتری در سلول‌های دندریتیک متأثر از TGF-β1 در حالت نابالغ نشان می‌دهد که درصد بیان HLA-DR ۸۰ درصد و شاخص CD83 کمتر از یک درصد قبل از تحریک با لیپو پلی‌ساکارید بوده‌است، در حالی‌که بعد از تحریک با لیپوپلی ساکارید تظاهر سطحی مولکول‌های-HLA CD83, DR, CD80 افزایش معنی‌داری در سلول‌های دندریتیک بالغ در مقایسه با حالت نابالغ نشان داد($p<0.05$) که تظاهر CD83 و افزایش بیانHLA-DR نشان‌دهنده بلوغ سلول‌های

دندریتیک است. به‌علاوه نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که درصد سلول‌های $CD4^{+}CD25^{+}$ در واکنش مختلط لکوسیتی بین لنفوسیت‌های T و سلول‌های دندریتیک متأثر از سایتوکاین TGF-β در مقایسه با شاهد ۲۷ درصد بیشتر بوده‌است و اختلاف معنی‌داری داشت($p<0.05$ – نمودار ۳).

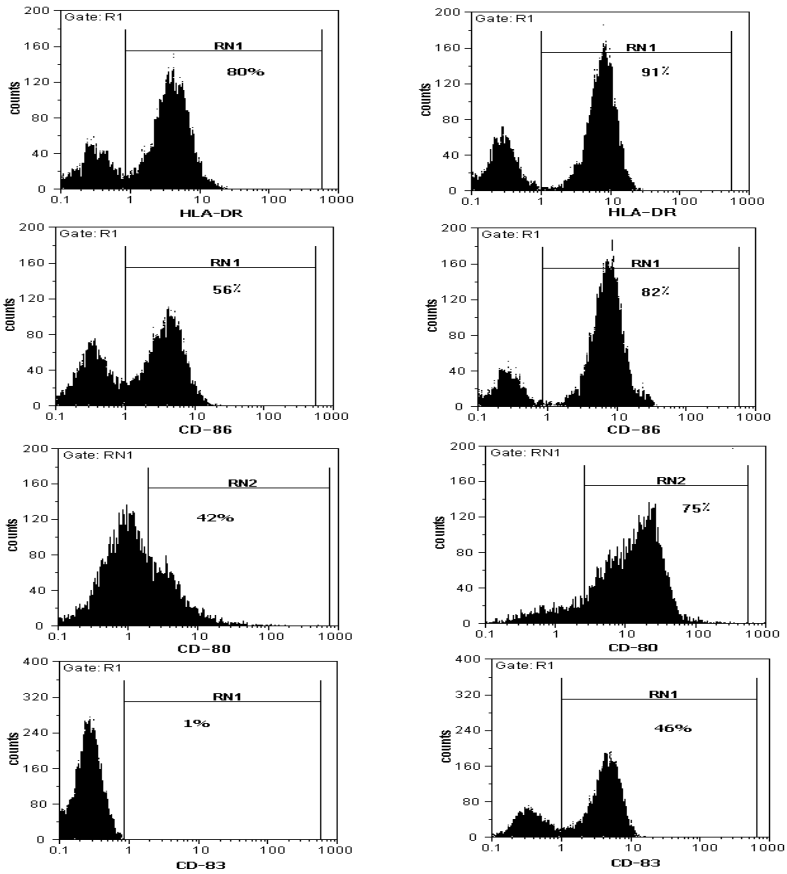
**۲- نتایج پرولیفراسیون سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی**

پاسخ تکثیری سلول‌های T در محیط کشت مختلط سلولی در حضور سلول‌های دندریتیک متأثر از TGF-β با استفـــاده از ماده MTT به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش داشت ($p=0.03$ ، جدول ۱)].

**جدول ۱: اثر سلول‌های دندریتیک متاثر از TGF-β و شاهد بر روی تکثیر سلول‌های T اتولوگ در واکنش مختلط لکوسیتی که میزان جذب نوری حاصل از پرولیفراسیون سلولی با استفاده از ماده MTT در طول موج ۵۵۰ نانومتر ارزیابی شد.**

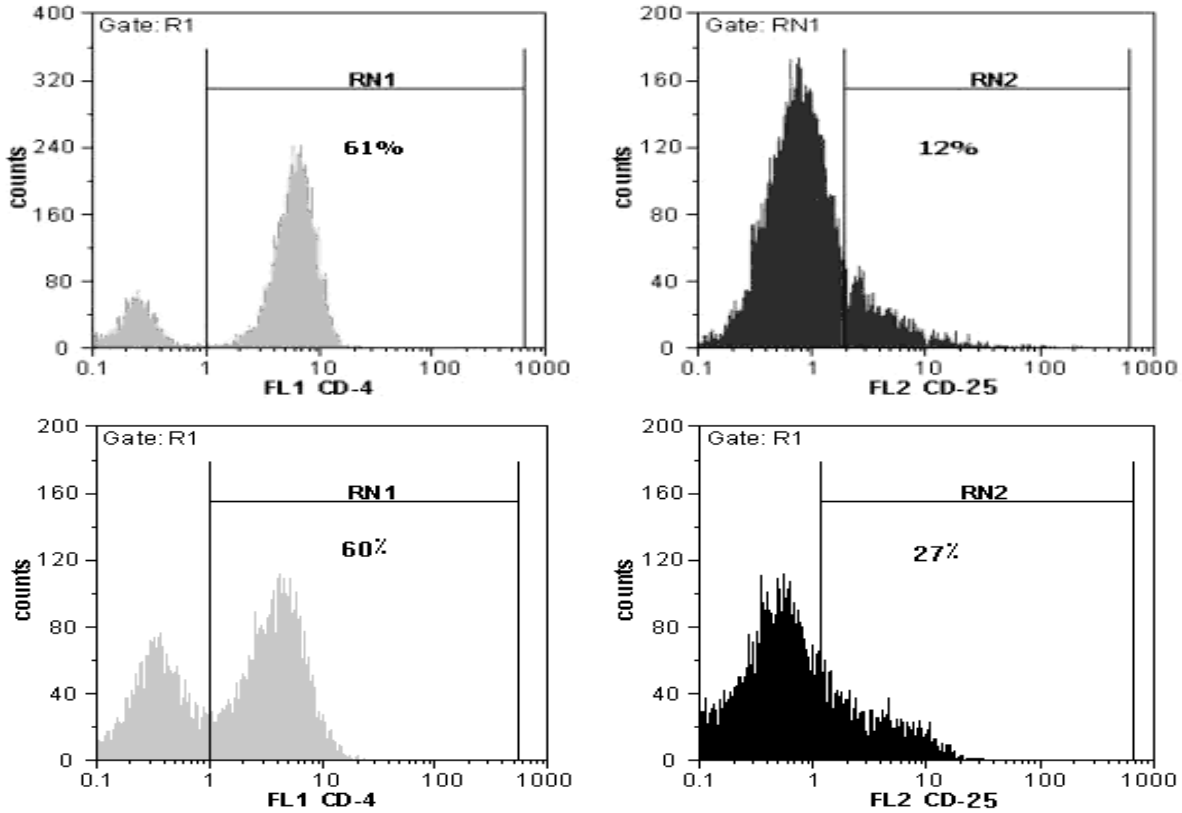
| واکنش مختلط لکوسیتی | میانگین± انحراف معیار از ۵ نمونه | P value |
|---|---|---|
| سلول دندریتیک متاثر از (۱/۱۰)T+TGFβ | 141±5.53 | 0.03 |
| سلول دندریتیک بدون تاثیر از (۱/۱۰)T+ TGFβ | 182±30.02 | |

**Mature Dc** **Immature Dc**




**نمودار۲: منوسیت‌های خون‌محیطی در محیط کشت سلولی تحت اثر سایتوکاین‌های GM-CSF و IL-4 همراه با TGF-β برای مدت ۵روز کشت داده شدند. سپس برای بلوغ سلول‌های دندریتیک، محرک لیپوپلی‌ساکارید به‌مدت دو روز به محیط کشت سلول اضافه شد و سپس با استفاده ازآنتـی‌بادی‌های منوکلونال CD86,CD80, CD83, HLA-DR کنژوگه به مواد فلوئورسانس، فنوتیپ سلول‌های دندریتیک در حالت بالغ(راست) و در حالت نابالغ (چپ) با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری بررسی شد.**


۱. ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی




**نمودار ۳: نتایج فلوسیتومتری حاصل از تعیین درصد سلول‌های $T\ CD4^{+}, CD25^{+}$ در واکنش مختلط لکوسیتی پس از واکنش با سلول‌های دندریتیک متاثر از TGF-β(پایین) و بدون تاثیر از TGF-β (بالا). تعداد سلول‌های $T\ CD4^{+}, CD25^{+}$ در دوگروه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری**

## بحث و نتیجه‌گیری

از مهم‌ترین یافته‌های تحقیق حاضر تولید سلول‌های دندریتیک با توانایی کاهش پاسخ تکثیری در لنفوسیت‌های T $CD4^{+}$ است. محققان حاضر در این بررسی اقدام به طراحی یک سیستم ایمنی نمودند که اجزای آن شامل سلول‌های عرضه‌کننده انتی‌ژن به‌عنوان سلول‌های محرک(Stimulator) و لنفوسیت‌های T به‌عنوان سلول‌های پاسخ‌دهنده (Responder) بود. برای این منظور سلول‌های منوسیت را از گردش خون محیطی و با استفاده از سایتوکین‌های مناسب به سلول‌های دندریتیک تبدیل شدند. در فاصله کشت سلولی، لیپوپلی ساکارید به‌عنوان محرک در اختیار سلول‌های دندریتیک قرار داده‌شد و پس از حساس‌سازی سلول‌های دندریتیک، این سلول‌ها در مجاورت سلول‌های T به‌منظور مطالعه پاسخ ایمنی قرار گرفت.

در این تحقیق از مولکول TGF-β1 به‌عنوان مداخله‌گر اصلی فرایند در کشت سلولی (تبدیل منوسیت به سلول دندریتیک) استفاده شد که این مولکول سبب ایجاد سلول دندریتیک با نقش مهاری در کشت مختلط لوکوسیتی شد. در این راستا به‌منظور بررسی علت کاهش پاسخ تکثیری سلول T در کشت مختلط لوکوسیتی بروز مولکول CD4,CD25 در سطح سلول‌های T به‌عنوان نمونه‌ای از مولکول‌های تنظیم‌کننده ایمنی مطالعه و اندازه‌گیری شد(نمودار ۳). در مطالعه‌ای که آقای Fogel و همکاران با بررسی نقش مولکول TGF-β در تولید سلول‌های دندریتیک و در نتیجه بررسی اثراین سلول‌ها بر تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(PBMC) در واکنش مختلط لکوسیتی انجام دادند نشان داده‌شد که سلول‌های دندریتیک متأثر از TGF-β نقش مؤثری در کاهش پرولیفراسیون سلول‌های تک‌هسته‌ای دارد(۱۱) که این تحقیق برخلاف مطالعه ما به‌طور اختصاصی در سطح سلول‌های +TCD4 انجام نشده‌است؛ به‌طوری‌که نقش سلول‌های +TCD4 در بروز بیماری‌ها از جمله بیماری‌های اتوایمیون ثابت شده‌است. به‌علاوه مطالعات دیگر نشان می‌دهند که آثار این سایتوکاین نقش موثری در ایمونولوژی پیوند و

ایمونولوژی تومور دارد(۱۲و۱۳) به‌طوری‌که ارتباط این مولکول و بیماری‌های اتوایمیون و نقش آن در فروکش‌نمودن التهاب در برخی بیماری‌ها و حضور این مولکول‌ها به‌عنوان یک عامل تنظیمی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است(۱٤).

مطالعات انجام شده توسط محققین دیگرنشان داده‌است که TGF-β می‌تواند پاسخ‌های التهابی را در بیماری مولتیپل اسکلروزیس از طریق بروز CD4,CD25 کاهش دهد؛ بنابراین منجر به کاهش دفعات بروز مجدد بیماری شود(۱۵). به‌علاوه مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که عدم‌وجود TGF– β در برخی از بافت‌ها می‌تواند با شدت اتوایمنی همراه باشد(۱۶و۱۷). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های T در واکنش مختلط لکوسیتی با سلول‌های دندریتیک متاثر از TGF-β افزایش ۲۷ درصدی مولکول CD25 را داشته‌است که بروز این مولکول یکی‌از شاخص‌های مرتبط با سلول‌های T تنظیمی بوده که نقشی مؤثر در تعدیل پاسخ ایمنی دارد.

بنابراین یافته‌های حاضر پیشنهاد می‌کند که احتمالاً برخی از آثار تنظیمیTGF-β بر سلول‌های دندریتیک همراه با گسترش سلول‌های T تنظیمی در کشت مختلط لنفوسیتی می‌تواند سبب پیشگیری از بیماری اتوایمیون و جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته شود.

**تشکروقدردانی:** این تحقیق به شماره ۱۹-۸۷ در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به تصویب رسیده‌است که مراتب قدردانی و تشکر خود را از آن معاونت محترم اعلام می‌داریم.

## منابع

1. Banchereau J, Steinman R. Dendritic Cells and The Control Of Immunity. Nature 1998; 392:245-252.

2. Mohammed Zadeh M, Lufting R. Dendritic Cell in the Fore- Front of Immunopathogenesis and Vaccine Developmeut, Areview. J Immune Based Therapies and Vaccines 2004; 2: 2-10.

3. Efron PA, Matsumoto T, Mcauliffe PF, et al. Major Hepatectomy Induces Phenotype Changes in Circulating Dendritic Cells and Monocytes. J Clinical Immunology 2009; 29(5):568-81.

4. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4+ CD25+Thymocytes and Peripheral T Cells Have Immune Suppressive Activity in Vitro. Eur J Imunol 2001; 31(4):1247-54.

5. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hatler DA. CD4+ CD25 High Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. J Immunol 2001; 167:1245-53

6. Na Zhang, Xi-Yu Wu, Xian-Ping Wu, Xiao-Hua Fu et al. Relationship Between Age-Related Serum Concentrations Of TGF-B1 And TGF-B2 and Those of Osteoprotegerin And Leptin In Native Chinese Women. Clinica Chimica Acta 2009; 403(1-2):63-9.

7. Rupen A, Lopa M. Liver Stem Cells and TGF-B in Hepatic Carcinogenesis. Gstrointestinal Cancer Research 2008; 2(4): 27-30.

8. Dardalhon V, Awasthi A, Kown H, Galileos G, Gao W, Sobel R.A and Etal. IL-4 Inhibits TGF-B Induced Foxp3 T Cells and Together with TGF-B Generates IL-9+ IL-10+ Foxp3 (-) Effector T Cells. Nat. Immunol 2008; 9: 1347-1355.

9. Efron PA, Moldawer Ll. Sepsis and the Dendritic Cell. Shock 2003; 20:386-401.

10. Mosman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J Immunol Methods 1983; 65 55-63.

11. Fogel-Petrovic M, Long JA, Misso NL, Foster PS, Bhoola KD, Thampson PJ. Physiological Concentrations of Transforming Growth Factor Beta1 Selectively Inhibit Human Dendritic Cell Fiunction. Int Immunopharmacol 2007; 7(14):1924-33.

12. Schulz R, Vogel T, Dressel R, Krieglstein K. TGF-Beta Superfamily Members, Activin A and TGF-Beta1, Induce Apoptosis in Oligodendrocytes By Different Pathways. Cell Tissue Res 2008; 334(3):327-38.

13. Ripamonti U, Ferretti C, Heliotis M. Soluble And Insoluble Signals And Induction Of Bone Formation: Molecular Therapeuticsd Recapitulating Development. J Anat 2006; 209(4): 447-68.

14. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation Of TGF-Beta Signaling By Smad7.Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2009; 4(4 ) : 263-72.

15. Maitra U, Davis S, Reilly CM, Li L. Differential Regulation of Foxp3 and IL-17 Expression in CD4 T Helper Cells by IRAK-1. J Immunol 2009; 182(9): 5763-9.

16. Yu F, Chou CW, Chen CC. TNF-Alpha Suppressed TGF-Beta –Induced CTGF Expression By Switching The Binding Preference of P300 from Smad4 To P65 Cell Signal 2009; 2(6 ): 867-72

17. Peng R, Li Y, Brezner K, Litherland S, Clare-Salzler MJ. Abnormal Peripheral Blood Dendritic Cell Populations in Type 1 Diabetes. Ann N Y Acad Sci 2003; 1005: 222-5.

# Differentiated Dendritic Cell with TGFβ in Reaction with $TCD4^+$

Abedian S.(Ph D)[1]- Yousefzadeh Y.(Stu)[1]- Hasannia H.(Stu)[1]

***Corresponding Address:** Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Sari, IRAN

**E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk**

**Received:30 May/2010 Accepted: 25/Sep/2010**

## Abstract

**Introduction**: Dendritic cells are professional antigen presenting cells that obtain necessary regulatory signals for T cells. T regulatory cells are effective cells in reaction with dendritic cells and have an important role in treating of diseases.

**Objective:** To evaluated the effect of TGF-β(Trancforming Growth Factor β) Cytokine in dendritic cell generation and capacity of these cells in regulatory T cells development in culture media.

**Materials and Methods:** In this experimental study, blood samples were obtained from 5 volunteers, then peripheral blood mononuclear cells were isolated by using Phicole Hypaque, dendritic cells of peripheral blood monocyte were produced by GM-CSF, IL-4 and TGF-β in comparison with control group. Mixed leukocyte reaction was accesed in allogenic T cell and dendritic cell. The number of $CD4^+CD25^+$ T cells, CD14+ and their surface markers were evaluated by Flowcytometry.

**Results:** In this study, dendritic cells produced in presence and without presence of TGF-β cytokine. The proliferation level of T cells decreased in mixed leukocyte reaction with dendritic cell-treated TGF-β in comparison with control group. In addition, the number of T $CD25^+$ cells increased 27 percent in culture media including dendritic cell-treated TGF-β in comparison with control group($p<0.05$).

**Conclusion:** The TGF-Beta molecule caused effect on the dendritic cells and producted cells with inhibiting of immune responses in mixed leukocyte reaction. So it concluded that, these cells can be have an important role in preventing of unwanted immune reaction invitro.

**Key words**: Dendritic Cells/ Lymphocyte Culture Test/ Mixed/ T- Lymphocytes/ Transforming Growth Factor Beta

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 77, Pages: 1-7

1. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Sari, IRAN