

Özet

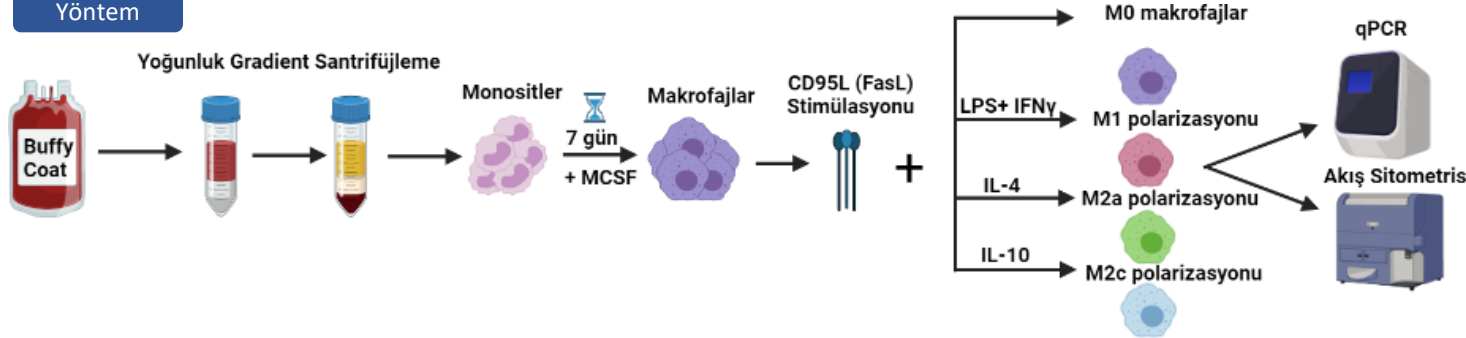
Makrofajlar, bağışıklık sistemimizde rol alan ana hücrelerden biridir. Yüksek plastisite potansiyelleri nedeniyle makrofajlar; inflammatuar hastalıkların yanında yara iyileşmesi ve doku homeostazisinde çok önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, makrofaj polarizasyon mekanizmalarını ortaya çıkarmak, inflamasyon süreçlerini anlamamızı ve yeni immünoterapötik yöntemler geliştirmemizi sağlayabilir. Fas/FasL etkileşiminin temel işlevleri olan apoptotik mekanizmalar aydınlatılmış olsa da Fas aktivasyonunun apoptotik olmayan mekanizmaları hakkında mevcut bilgilerimiz yetersizdir. Bu nedenle Fas aktivasyonunun apoptotik olmayan yollarının aydınlatılması gerekmektedir. FasL'nin non-apoptotik yollarının insan makrofajlarında aydınlatılması yeni immünoterapötik yöntemlerin geliştirilmesinde faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: hücre ölümü, CD95L, makrofaj polarizasyonu

Giriş

İmmün sistemimizde yer alan bir hücre grubu olan makrofajlar dokularımızda bulunurlar veya gerekli uyarımlar ile periferik kan monositlerinin dokuya yönelmesi ile bu monositlerden farklılaşabilirler. Makrofajlar M1 ve M2 olarak 2 ana gruba ayrılırlar. M1 makrofajlar pro-inflammatuar özellikte olup patojenlerle savaşan fenotipte iken M2 makrofajlar anti-inflammatuar özelliklere sahiptir ve doku rejenerasyonu ve anjiyogeneze görev alır. TNF reseptörleri süper ailesinin bir üyesi olan CD95 (Fas), ölüm reseptörlerinden biridir. CD95, ilgili ligandı CD95L (FasL) ile etkileşime girdiğinde, iki farklı mekanizma etkinleştirilebilir. Bunlardan ilki olan apoptotik yolağın birçok mekanizması aydınlatılmış olmasına rağmen, non-apoptotik yolağın özellikleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak Fas aktivasyonunun makrofaj yanıtı ve polarizasyon üzerindeki etkisine ilişkin sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmanın amacı, CD95L'nin (çözünür Fas Ligand/sFasL) primer insan makrofaj polarizasyonu üzerindeki etkisini araştırmaktır.

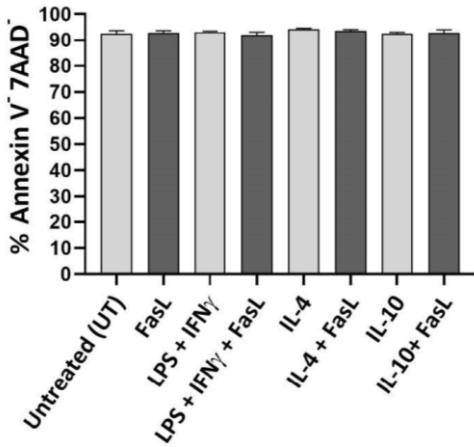
Yöntem



CD95L'nin primer insan makrofaj polarizasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için, öncelikle sağlıklı donörlerden buffy coatlar alındı. Ardından bu buffy coatlardan, yoğunluk gradyanlı santrifüj yöntemiyle primer insan monositleri izole edildi. Ardından monositler 7 gün boyunca RPMI ortamında monosit/makrofaj koloni stimulan faktör (MCSF) ile inkübe edilip makrofajlara dönüştürüldü. İnkübasyondan sonra, makrofajlar toplandı ve CD95L ile uyarıldı. Aynı anda bu makrofajlar LPS+IFN-γ ile M1 fenotipine, IL-4 ile M2a fenotipine ve IL-10 ile M2c fenotipine polarize edildi. Makrofaj alt tiplerindeki M1 ve M2 belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri, qPCR ve akış sitometrisi yöntemleriyle analiz edildi. İstatistiksel analizler Student's t testi ile yapıldı.

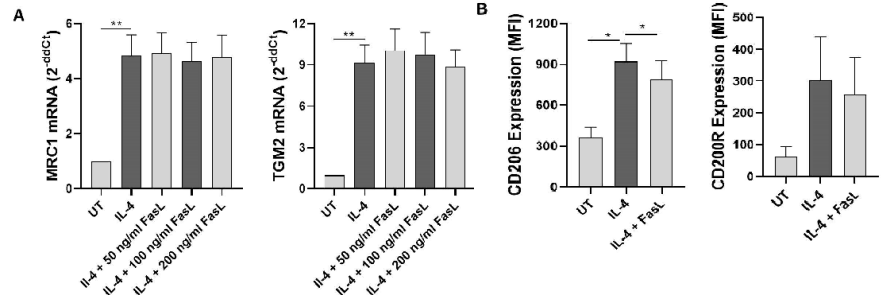
Bulgular

CD95L, primer insan makrofaj alt tiplerinde sağkalımı etkilememektedir.



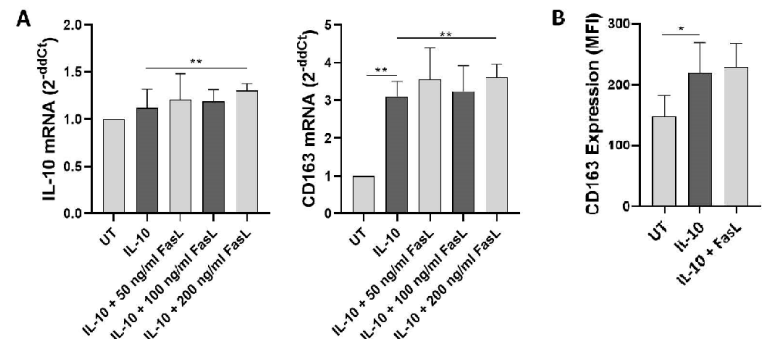
Figür 1. CD95L, primer insan makrofaj alt tiplerinde sağkalım üzerine etkisi: CD95L ile uyarılan M0, M1, M2a ve M2c makrofaj alt tiplerindeki canlı hücrelerin (AnnexinV-7AAD) yüzdesi, akış sitometrisi ile analiz edildi. Veriler, ortalama değerler ± SEM (n = 3) olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, iki bağımsız deney sonucunda elde edilen verilerin gösterimidir.

M2a makrofajlarında CD95L, protein düzeyinde belirli M2 belirteçlerinin ekspresyonunu azaltırken, mRNA düzeyinde ekspresyonunu etkilememektedir.



Figür 4. CD95L uyarısının M2a polarizasyonu üzerindeki etkisi: CD95L'nin M2a makrofajları üzerindeki M2a belirteçlerine etkisi qPCR (A) ve akış sitometrisi (B) yöntemleriyle analiz edilmiştir. Veriler, ortalama değerler ± SEM (n = 3) olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, iki bağımsız deney sonucunda elde edilen verilerin gösterimidir. (*P<0.05, **P<0.01)

CD95L, mRNA ve protein seviyelerinde M2c makrofaj polarizasyonunu değiştirmemektedir.



Figür 5. CD95L uyarısının M2c polarizasyonu üzerindeki etkisi: CD95L'nin M2c makrofajları üzerindeki M2c belirteçlerine etkisi qPCR (A) ve akış sitometrisi (B) yöntemleriyle analiz edilmiştir. Veriler, ortalama değerler ± SEM (n = 3) olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, iki bağımsız deney sonucunda elde edilen verilerin gösterimidir. (*P<0.05, **P<0.01)

Tartışma

CD95 aktivasyonunun apoptotik olmayan yollarının aydınlatılmasına yönelik bu çalışmamızda öncelikle CD95L'nin makrofajlarda apoptotik yolları etkileyip etkilemediğini araştırdık. Literatürde makrofajların Fas aracılı apoptoza dirençli olduğu bildirilmektedir ki bu da bizim sonuçlarımızla uyumludur (Park ve ark. 2003). Bunun yanında Park ve arkadaşları daha önce Fas aktivasyonunun makrofajlarda proinflatuar yanıtı arttırdığını bildirmişti (Park ve diğerleri, 2003). Ancak, bu bulgunun aksine, sonuçlarımız CD95L'nin polarize olmayan (M0) insan monosit türevli makrofajlarda proinflatuar ve antiinflatuar sitokinlerin gen ekspresyonunu değiştirmedikçe gösterdi.

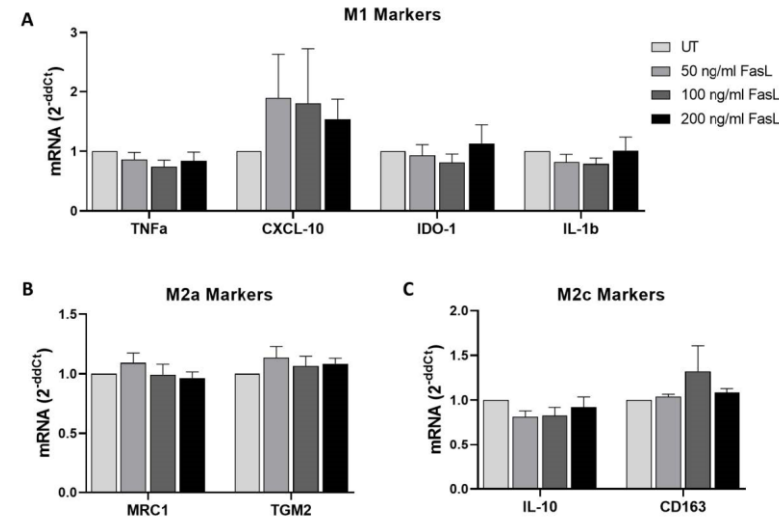
Sonuç

Bu çalışmada, CD95L'nin makrofaj alt tiplerinin sağkalımı üzerindeki etkisini ve CD95L'nin primer insan makrofajlarının polarizasyonu üzerindeki etkisini araştırdık. Bu, inflammatuar hastalıklarda artan FasL ekspresyonunun makrofajların yanıtı üzerinde doğrudan bir etkisi olup olmadığını anlamamıza yardımcı olabilir. Sonuçlarımız, CD95L'nin polarize olmayan (M0) veya polarize olmuş insan monosit kökenli makrofajların proinflatuar sitokin üretimi üzerinde fonksiyonel bir etkisi olmadığını ortaya koydu. M2a makrofaj gruplarında ise CD95L'nin CD206 yüzey belirteci ekspresyonunu azaltması, M2a fenotipinin azalmasının bir göstergesi olabilir. Bunun dışında M1 makrofajlarında mRNA düzeyinde artan M1 belirteçleri pro-inflammatuar yanıtın arttığını gösterebilir. Verilerimiz ile tümör mikroçevresinde bol miktarda bulunan CD95L'nin insan makrofajlarında bazı fenotiplere etki edip bazı fenotiplere ise doğrudan bir etkisinin olmadığı söylenebilir. CD95L'nin makrofaj yanıtı üzerinde dolaylı bir etkisi olup olmadığını anlamak için farklı hücreler veya hayvan modelleri ile birlikte kültür deneyleri yapılabilir. Buna ek olarak CD95L'nin farklı tipteki formülasyonları veya başka terapötik formları makrofajlar üzerinde denebilir.

Referanslar

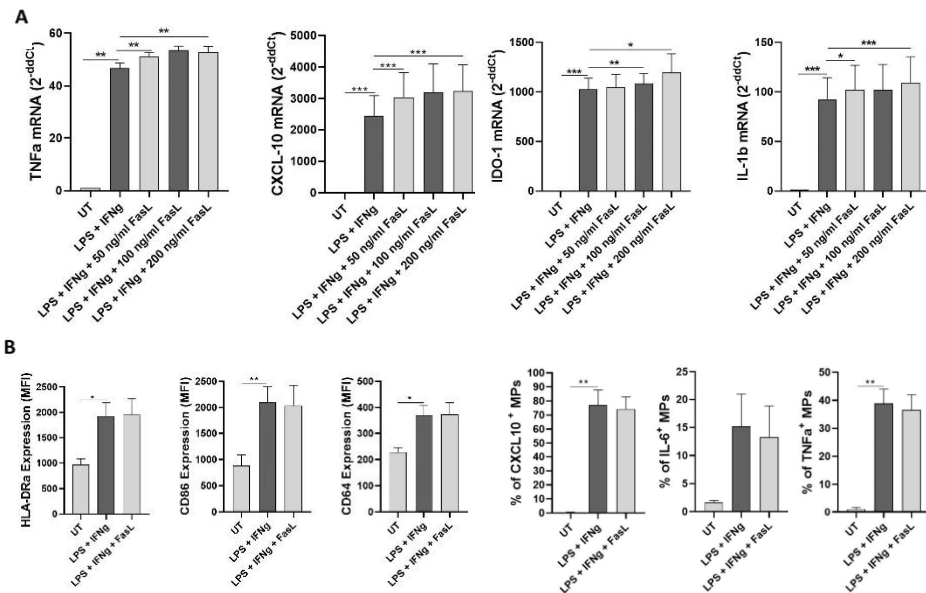
Park H, Jung Y-K, Park O-J, Lee YJ, Choi J-Y, Choi Y. Interaction of Fas Ligand and Fas Expressed on Osteoclast Precursors Increases Osteoclastogenesis. J Immunol. 2005;175(11):7193-7201. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7193

CD95L, polarize olmayan (M0) makrofajlarında mRNA düzeyinde M1 ve M2 belirteçlerini değiştirmemektedir.



Figür 2. CD95L'nin polarize olmayan (M0) makrofajlar üzerindeki etkisi: M1 (A) ve M2 (B-C) belirteçlerinin insan M0 makrofajları üzerindeki ifadesi qPCR ile analiz edildi. Veriler, ortalama değerler ± SEM (n = 3) olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, iki bağımsız deney sonucunda elde edilen verilerin gösterimidir.

M1 makrofajlarında CD95L, M1 belirteçlerinin ekspresyonunu mRNA düzeyinde artırırken protein düzeyinde değiştirmemektedir.



Figür 3. CD95L uyarısının M1 polarizasyonu üzerindeki etkisi: CD95L'nin M1 makrofajlarında M1 belirteçlerine etkisi qPCR(A) ve akış sitometrisi(B) yöntemleri ile analiz edildi. Veriler, ortalama değerler ± SEM (n = 3) olarak gösterilmiştir. Sonuçlar, iki bağımsız deney sonucunda elde edilen verilerin gösterimidir. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)