Original Article

Induction of Specific T-Cell Response Following *In Vivo* Treatment of Dendritic Cells by 1,25-Dihydroxycholecalciferol

Mohammad Madhi Eftekharian, M.Sc.[1], Seyed Mohammad Moazzeni, Ph.D.[1]*, Amir Hassan Zarnani, Ph.D.[2, 3]

1. Immunology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Nanotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran
3. Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 141158-331, Immunology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran***
Email: moazzeni@modares.ac.ir

Received: 3/Nov/2009, Accepted: 25/Apr/2010

Abstract

Objective: Dendritic cells (DCs), as the managers of the immune response, have a crucial role in forming the direction and nature of the immune response. Some compounds such as 1,25-dihydroxycholecalciferol affect the function of DCs and can be used to shift the immune functions toward favorite directions. The aim of this study was to investigate the *in vivo* effects of 1, 25- dihydroxycholecalciferol on DCs surface markers, their potential to induce specific T-cell responses and the cytokines profile.

Materials and Methods: 1, 25-dihidroxycholecolciferol was regularly injected intraperitoneal into C57BL/6 mice. DCs were separated from the spleens of calciferol treated and non-treated mice using magnetic beads. The expression of DCs surface markers was investigated by flow cytometric analysis. The separated cells were pulsed by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) and injected subcutaneously into front footpads of syngeneic mice. After five days, the lymphocytes from regional lymph nodes were separated and used for the lymphocyte transformation test (LTT) and determination of the interferon gamma/interleukin 4 (IFNγ/IL-4) ratio by ELISA technique.

Results: Statistical analysis of the obtained results showed reduced expression of maturation markers and co-stimulatory molecules by cholecalciferol treated DCs. The specific T-cell stimulation potential of treated DCs as well as the induced IFNγ/IL-4 ratio was also down-regulated compared to non-treated cells (p value<0.05).

Conclusion: It seems that 1,25-dihydroxycholecolciferol can regulate the DCs function and maturation state *in vivo*. The T-cell stimulation rate and Th1/Th2 cytokines ratio also changes following interaction with cholecalciferol treated DCs.

Keywords: Dendritic Cells, Cholecalciferol, Interleukin-4, Interferon-gamma

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 215-222

Archive of SID

www.SID.ir

القای پاسخ اختصاصی در لنفوسیت‌های T توسط سلول‌های دندریتیک متعاقب تاثیر درون تن ۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول

محمدمهدی افتخاریان M.Sc.[۱]، سیدمحمد مؤذنی Ph.D.[۱*]، امیرحسن زرنانی Ph.D.[۲،۳]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی، تهران، ایران
۲. پژوهشکده ابن‌سینا، مرکز تحقیقاتی نانوتکنولوژی، ACECR، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: moazzeni@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۸/۱۲، پذیرش مقاله: ۸۹/۲/۵

چکیده

* **هدف:** بررسی تاثیر درون تن کلسیتریول بر سلول‌های دندریتیک از نظر بیان شاخص‌های سطحی، القای پاسخ اختصاصی در لنفوسیت‌های T و شیفت پاسخ سایتوکاینی

* **مواد و روش‌ها:** موش‌های C57BL/6 تحت تزریقات منظم درون صفاقی ۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول قرار گرفته و پس از جداسازی سلول‌های دندریتیک با کمک بیدهای مغناطیسی، ابتدا شاخص‌های سطحی این سلول‌ها با فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفته، سپس با پپتید Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) پالس گردیده و به کف دست موش‌های سینژن تزریق شدند. پس از گذشت ۵ روز، سلول‌های غدد لنفاوی منطقه‌ای جدا شده و جهت انجام آزمون Lymphocyte Transformation Test (LTT) مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین نسبت سایتوکاین‌های Interferon gamma/Interleukin-4 (IFN-γ/IL-4) به عنوان نماینده نسبت پاسخ‌های Th1/Th2 با انجام آزمون الایزا بر روی سوپ حاصل از کشت آنها تعیین گردید. در تمام مراحل، هر کدام از گروه‌های تست و کنترل، از ۶ سر موش ماده - که از لحاظ سن همسان‌سازی شده بودند - تشکیل شده بود.

* **یافته‌ها:** آنالیز آماری نتایج، نشان داد که سلول‌های دندریتیکی - که تحت تاثیر ترکیب فوق قرار گرفته‌اند - در اغلب موارد شاخص‌های بلوغ و کمک تحریکی کمتری بیان کرده و لنفوسیت‌های تحت القای آنان نیز توانایی تکثیر اختصاصی کمتری داشته‌اند. همچنین نسبت سایتوکاین‌های IFN-γ/IL-4 به عنوان نماینده نسبت پاسخ‌های Th1/Th2 در آنان کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد (در تمام موارد $p<0/05$).

* **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که ۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول در درون تن، اثر تنظیمی قوی بر سلول‌های دندریتیک داشته است که هم باعث کاهش بیان برخی شاخص‌های سطحی و هم متعاقب تعامل آنها با لنفوسیت‌ها، موجب مهار عملکرد تکثیری آنها و کاهش نسبت سایتوکاین‌های IFN-γ/IL-4 به عنوان نماینده نسبت پاسخ‌های Th1/Th2 می‌شود.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های دندریتیک، کوله کلسیفرول، اینترلوکین ۴، اینترفرون گاما

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۲۲-۲۱۵

مقدمه

سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells; DCs) علاوه بر پردازش و عرضه حرفه‌ای آنتی‌ژن، نقش مهمی در مدیریت پاسخ ایمنی نیز ایفا می‌کنند. به همین علت، می‌توان با استفاده از ترکیبات شیمیایی و بیوشیمیایی موثر بر این سلول‌ها، عملکرد سیستم ایمنی را به سمت مطلوب هدایت کرد. در واقع هدف این است که بتوان ماهیت عملکرد این سیستم (تولرانس یا پاسخ ایمنی) و نیز جهت آن (Th2 یا Th1) را کنترل نموده و از این توانایی در راستای پیشگیری یا درمان بیماری‌های مرتبط با دستگاه ایمنی بهره جست.

مطابق گزارش‌های پیشین، هم در موش و هم در انسان، دو زیر گروه اصلی از سلول‌های دندریتیک با خصوصیات فنوتایپیک (Phenotypic) و عملکردی متفاوت وجود دارد: لنفوییدی و میلوییدی. در موش، سلول‌های دندریتیک لنفوییدی، $CD8\alpha^+$ $CD11b^-$ و میلوییدی، $CD8\alpha^-$ $CD11b^+$ می‌باشند. همچنین زیر گروه اول پس از عرضه آنتی‌ژن و ترشح مقادیر متنابهی اینترلوکین ۱۲ (Interleukin-12; IL-12) و اینترفرون گاما (Interferon gamma; IFNγ)، پاسخ ایمنی سلولی (Th1) را برانگیخته در حالی که زیر گروه دوم با ترشح (IL-4) و اینترلوکین ۱۰ (Interleukin-10; IL-10) مسیر را به سمت پاسخ هومورال (Th2) هدایت می‌کند (به عکس انسان) (۵-۱).

بدیهی است که تغییر مسیر پاسخ‌های ایمنی به سمت Th2 می‌تواند در پیشگیری و درمان بیماری‌های خود ایمن وابسته به Th1 نظیر مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis; MS) موثر و مفید باشد. ۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول (کلسیتریول) فرم فعال ویتامین D3 است که در بدن نقش

Archive of SID
www.SID.ir

هورمونی ایفا می‌کند (۹-۶). اگر چه بخشی از ویتامین D3 مورد نیاز بدن از طریق تغذیه تامین می‌شود، ولی منبع اصلی آن واکنش‌های بیوشیمیایی ناشی از برخورد نور خورشید به پوست است. اصابت اشعه ماورای‌بنفش (UltraViolet; UV) خورشید اولین مرحله این واکنش‌ها را سبب می‌شود. به این صورت که ۷- دهیدروکلسترول (7-Dehydrocholestrol) به پره ویتامین D3(Pre-vitamin D3) تبدیل شده و متعاقب آن ویتامین D3 طی یک واکنش خود به خودی وابسته به دما تولید می‌گردد. در مرحله بعد ویتامین D3 در کبد و کلیه‌ها به ترتیب تحت اثر آنزیم‌های ۲۵- هیدروکسیلاز (-25 Hydroxylase) و ۱- هیدروکسیلاز (1-Hydroxylase)، در دو موقعیت، هیدروکسیله شده و به فرم فعال ویتامین D - که همان ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 (۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول) است - تبدیل می‌شود. علاوه بر مسیر کلاسیک فوق، برخی از سلول‌های بدن نظیر مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و کراتینوسیت‌ها نیز قادرند فرم فعال ویتامین D3 را تولید نمایند (۹-۶).

کلسیتریول و همچنین آنالوگ‌های سنتتیک آن نظیر TX527 اثرات تنظیمی شدیدی بر سیستم ایمنی دارند که سبب می‌شود آنها را در زمره مواد تنظیم‌گر ایمنی (Immunomodulator) قرار دهند. این اثرات تنظیمی پس از اتصال کلسیتریول به رسپتورهای اختصاصی‌اش Vitamin D Receptor (VDR) در سلول‌های هدف رخ می‌دهد. این رسپتور جزو ابر خانواده رسپتورهای هورمونی هسته‌ای محسوب می‌شود که در بسیاری از سلول‌های سیستم ایمنی، نظیر لنفوسیت‌های T و NK، B سل‌ها و DCها وجود دارد (۶، ۱۳-۹). البته مطالعات دقیق‌تر نشان داده‌اند که نحوه عرضه VDR توسط این سلول‌ها متفاوت است؛ بدین‌صورت که در سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن به صورت ثابت و در لنفوسیت‌ها به صورت القا پذیر بیان می گردد (۱۴-۹).

کلسیتریول پس از اتصال به بسیاری از سلول‌ها از جمله T سل‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها موجبات تنظیم پاسخ‌های ایمنی را فراهم می‌آورد. همچنین واسطه‌های مسیر Th1 (ایمنی سلولی) نظیر IL-12، Interleukin-2 (IL-2)، TNF-α; Tumor Necrosis) Factor-α) و INFγ را به شدت کاهش می‌دهد. آثار مشابه در محیط خارج بدن (برون تن) در مورد سلول‌های دندریتیک نیز گزارش شده است (۶، ۱۳، ۱۵، ۱۶). هر چند بر طبق اطلاعات موجود، تاکنون در مورد تاثیر درون تن این ماده بر سلول‌های دندریتیک مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

با توجه به اینکه تعاملات بین سلولی و شرایط حاکم بر ریزمحیط در درون تن بسیار متفاوت از شرایط برون تن می‌باشد، بنابراین نتایج تحقیقات برون‌تن قابلیت تعمیم به درون تن را ندارد. به همین جهت در این مطالعه سعی شده است تا به طور مجزا اثرات درون تن کلسیتریول بر سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

حیوان آزمایشگاهی

موش‌های ۶ تا ۸ هفته‌ای ماده با نژاد C57BL/6، از انستیتو پاستور ایران خریداری و در شرایط استاندارد نگاه‌داری شدند. کلیه آزمایش‌های انجام گرفته روی موش‌ها به تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

تیمار حیوانات (۱۸، ۱۷ با کمی تغییرات)

۰/۱ میکروگرم کلسیتریول (Sigma, USA) محلول در اتانول مطلق (Merck, Germany) با حجم ۲۰۰ میکرولیتر به صورت داخل صفاقی یک روز در میان به مدت ۳ هفته به حیوانات تزریق شد. به گروه کنترل فقط حلال تزریق گردید. هر کدام از گروه‌ها از ۶ سر موش ماده - که از لحاظ سن همسان‌سازی شده بودند - تشکیل شده بود.

جداسازی سلول‌های دندریتیک توسط بیدهای مغناطیسی (۲۰، ۱۹ با کمی تغییرات)

طحال موش‌های هر دو گروه کنترل و آزمایش پس از نخاعی کردن و کشتن حیوان، برداشته شد و سوسپانسیونی از سلول‌های آن در محیط PBS (بافر فسفات-سالین) حاوی کلاژناز D (Collagenase D) (Roche,Germany) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سلول‌ها پس از انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 (Gallenkamp,UK) و غیر فعال‌سازی کلاژناز توسط Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) ۵ میلی‌مولار، از مش سیمی سلولی عبور داده شده و دو بار شسته شدند. در مرحله بعد سلول‌های تک‌هسته‌ای (Mononuclear Cells; MNC) توسط محلول نایکودنز (Nycodenz) (Axis-shield,Norway) با دانسیته ۱/۰۷۷ و براساس اختلاف در جرم حجمی از بقیه سلول‌های طحالی جدا شده و پس از ۳ بار شست‌وشو، به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۲/۵ درصد (حجمی/حجمی) سرم موش مجاور شدند تا جایگاه‌های غیراختصاصی سطح سلول پوشیده شود. سپس ۳۵ میکرولیتر آنتی‌بادی (به ازای هر طحال موش که پس از عبور سلول‌ها از مرحله نایکودنز به تقریب ۶ میلیون عدد خواهند بود.) ضد CD11c متصل به ذرات مغناطیسی (Miltenyebiotech, Germany) به مجموعه فوق اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از سانتریفیوژ و خارج نمودن مایع رویی حاوی بیدهای متصل نشده، سوسپانسیون سلولی تهیه شده در ۵۰۰ میکرولیتر PBS-EDTA از ستون‌های مخصوص MS (همان کمپانی) که در میدان مغناطیسی (MS Separation Unit) قرار داده شده و دوبار با (هر بار ۵۰۰ میکرولیتر) PBS-EDTA شست‌وشو داده شده بودند، عبور داده شد. با توجه به اینکه شاخص CD11c در سطح سلول‌های DC قرار دارد، این سلول‌ها به جداره ستون متصل می‌شوند. سپس سه بار ستون به وسیله PBS-EDTA شست‌وشو داده شده (هر بار با ۵۰۰ میکرولیتر) تا سایر سلول‌ها از ستون خارج شوند. در مرحله آخر، ستون از میدان مغناطیسی جدا شده و بلافاصله پس از ریختن ۱ میلی‌لیتر PBS-EDTA روی ستون با فشار پیستون مخصوص، سلول‌های DC از آن به بیرون رانده شدند.

فلوسایتومتری دو رنگی

یک میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های متصل به (FITC) Fluorescein Isothiocyanate ضد CD11b، MHC-II، CD8α، CD40 و CD86 (همگی تهیه شده از کمپانی BD Biosciences, USA) و یا ایزوتیپ کنترل‌های

Archive of SID

www.SID.ir

(Isotype Control) مربوطه در لوله‌های مجزا به ۵۰/۰۰۰ سلول DC (تهیه شده از مرحله قبل) اضافه شدند. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در محیط تاریک و روی یخ، یک میکرولیتر آنتی‌بادی ضد CD11c متصل به Phycoerythrin (PE) (همان کمپانی) به تمام لوله‌ها اضافه شد. انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه و در شرایط ذکر شده انجام گردید. در مرحله بعد نمونه‌ها به وسیله (PBS) Phosphate Buffered Saline شست‌وشو داده شده و سلول‌ها توسط پارا فرمالدیید با غلظت نهایی ۲ درصد فیکس گردیدند. برای تعیین میزان خلوص DC ها نیز از همین روش استفاده گردید با این تفاوت که سلول‌ها فقط با آنتی‌بادی PE-anti CD11c رنگ‌آمیزی شدند. قرائت و آنالیز نتایج به ترتیب، توسط دستگاه FACScan (BD Biosciences, USA) و نرم افزار Win MDI انجام گرفت.

آزمون تکثیر اختصاص لنفوسیتی (۲۱ و ۲۲ با کمی تغییرات)

بعد از جداسازی DCها، بارگذاری آنها به وسیله پپتید انجام گرفت. بدین منظور سوسپانسیونی از ۱×۱۰^{۶} عدد DC در ۱ میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰درصد FCS (Fetal Calf Serum) تهیه شده و ۱۰۰ میکروگرم Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG_{33-35}) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (Ariagen, Iran) به آن اضافه گردید (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). مدت زمان انکوباسیون ۶ ساعت بوده و در این مدت سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵ درصد CO_2 قرار گرفتند. سپس سلول‌ها سه بار به خوبی با PBS شسته شده و ۳۵۰/۰۰۰ عدد از آنهادر حجم ۳۰ میکرولیتر در PBS، به کف دست موش هم نژاد تزریق گردید. گروه‌های کنترل در این مرحله عبارت بودند از:

شش سر موش که DCهای استخراج شده از طحال موش‌هایی که فقط با حلال ویتامین تیمار شده بودند، پس از بارگذاری به آنها تزریق شده بود.

شش سر موش که DCهای بارگذاری نشده به کف دست آنها تزریق شده بود.

بعد از ۵ روز، غدد لنفاوی براکیال (Brachial) منطقه‌ای موش برداشته شده و سوسپانسیونی سلولی در محیط Click (Sigma, USA) حاوی ۰/۵ درصد سرم موش با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد. از این سوسپانسیون در هر چاهک پلیت کشت ۹۶ خانه (ته صاف) ۲۰۰ میکرولیتر قرار داده شد، سپس به کلیه چاهک‌ها، MOG (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه و پلیت‌ها به مدت ۷۸ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2، انکوبه شدند. این نکته قابل ذکر است که تمام آزمایشات به‌صورت سه تایی (Triplicate) انجام گرفتند. در مرحله بعد یک میکرولیتر تایمیدین (Thymidine) نشان‌دار معادل یک میکروکوری (Amersham Biosciences , UK) به هر چاهک اضافه شده و پس از ۱۸ ساعت سلول‌ها به وسیله Cell Harvester هاروست گردیدند. در نهایت میزان تکثیر سلولی توسط دستگاه شمارش‌گر بتا (WALLAC 1410, Pharmacia, Sweden) (β-counter) اندازه‌گیری شد. گروه‌های کنترل منفی و مثبت در این مرحله نیز به ترتیب شامل چاهک‌های فاقد MOG و چاهک‌های محتوی Phytohemaglutinin Antigen (PHA) که یک فعال‌کننده پلی‌کلونال قوی است؛ در نظر گرفته شدند. سوپ تعدادی از چاهک‌ها پس از ۴۸ اولیه کشت برداشت شده و برای تعیین سطح سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-4 به‌وسیله آزمون الایزا (ELISA) مورد سنجش قرار گرفتند.

آزمون الایزا

آزمون الایزا با استفاده از کیت سنجش IFN-γ و IL-4 (R&D System, USA) و روش ساندویچی اویدین – بیوتین (Avidin-Biotin) انجام گرفت. به طور خلاصه از Rat-Anti Mouse ضد IFN-γ و IL-4 با غلظت ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت یک شب در دمای اتاق برای Coating هر چاهک استفاده گردیده و در مرحله بعد پس از مسدودسازی (بلاکینگ) به وسیله PBS حاوی ۱درصد BSA، مایع رویی کشت سلول‌ها و استانداردهای مربوط به کیت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. لایه سوم نیز Goat Anti-Mouse بیوتینیله ضد IFN-γ و IL-4 بوده که با همان حجم مراحل قبل و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق به مجموعه اضافه گردید. در نهایت محلول استرپتوآویدین متصل به HRP (Horseradish Peroxidase-Streptoavidin) به هر چاهک اضافه شده و پس از طی ۲۰ دقیقه انکوباسیون و سه بار شست‌وشو، با افزودن (Razi Biotech, Iran) (TMB) Tetramethylbenzidine و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریک، واکنش رنگی ایجاد گردید. از اسیدسولفوریک ۲ مولار به‌عنوان پایان دهنده واکنش استفاده شده و نتایج توسط دستگاه خواننده الایزا (ELISA Reader) (Labsystem, Finland) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. کلیه حجم‌ها ۱۰۰ میکرولیتر بوده و در فواصل بین تمام مراحل، شست‌وشو به‌وسیله PBS حاوی ۰/۰۵درصد Tween ۲۰ انجام گرفت. همچنین تمام آزمایش‌ها به‌صورت سه‌تایی (Triplicate) صورت گرفتند.

آنالیز آماری نتایج

تمام نتایج توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ و با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و p value های کمتر از ۰/۰۵ به عنوان نتایج معنی‌دار تلقی شدند. چنان که ذکر شد آزمایش‌ها بر روی گروه‌های شش‌تایی موش‌های ماده هم نژاد – که از لحاظ سن همسان‌سازی شده بودند – انجام شده و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار شش آزمایش مستقل نشان داده شد.

یافته ها

جداسازی DCها و تعیین خلوص آنها

چنان که پیشتر اشاره شد، خلوص DCهای جدا شده توسط بیدهای مغناطیسی به وسیله فلوسایتومتری تک رنگ با آنتی‌بادی PE-anti CD11c انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که خلوص DCهای به دست آمده با این روش ۱/۱۱ ± ۹۱/۲۸ درصد است (شکل ۱).

فلوسایتومتری دو رنگی

نتایج فلوسایتومتری و آنالیز آنها با نرم افزار Win MDI از نظر

Archive of SID

www.SID.ir

درصد سلول‌های واجد شاخص‌های مورد مطالعه و نیز متوسط شدت فلوئورسنت (Mean Fluorescent Intensity; MFI) هر شاخص در جدول ۱ آمده است. چنان که ملاحظه می‌گردد، DCهای تیمار شده با کلسیتریول در درون تن، میزان کاهش یافته‌ای از شاخص‌های بلوغ نظیر CD86 و MHC II و شاخص سلول‌های دندریتیک لنفوییدی یعنی CD8α (به عکس $CD_{11}b$) به عنوان شاخص سلول‌های دندریتیک میلوییدی و همین طور شاخص عدم بلوغ DCها که افزایش داشته است) را نشان می‌دهند. نکته جالب توجه این است که این تغییرات به طور عمده در MFI خود را نشان می‌دهند و این بدان معناست که پس از تاثیر کلسیتریول بر سلول‌های دندریتیک، تغییر در میزان تراکم مولکول‌ها بر سطح سلول در برخی شاخص‌ها اتفاق افتاده است. تجزیه و تحلیل آماری نتایج به‌وسیله نرم‌افزار SPSS و آزمون Mann-Whitney نیز نشان داد که درصد سلول‌های واجد هر مارکر در دو گروه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$) در حالی که تغییر در شدت بروز برخی از شاخص‌ها بر سطح سلول‌ها که در MFI بروز می‌کند، معنی‌دار است. بر اساس مشاهده مستقیم صورت گرفته، اندازه طحال در دو گروه نیز با یکدیگر اختلاف داشته و براساس انتظار، در گروه تست در مقایسه با گروه کنترل کوچک‌تر بود (اطلاعات نشان داده نشده است).

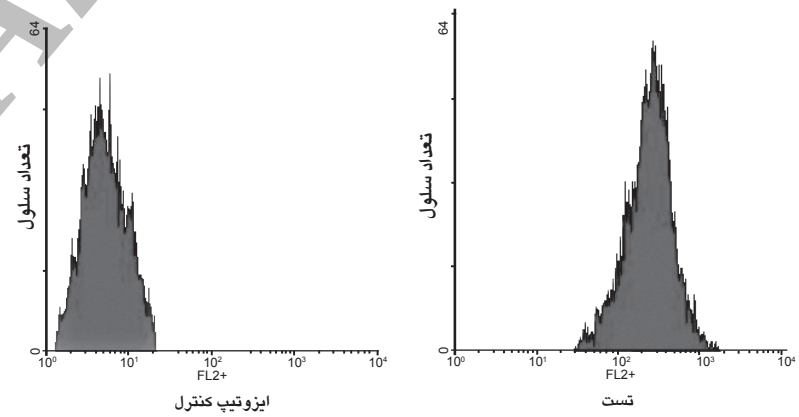
جدول ۱: نتایج فلوسایتومتری دو رنگی: شاخص‌های سطحی سلول‌های دندریتیک موش‌های هر دو گروه آزمایش و کنترل پس از جداسازی، با فلوسایتومتری دو رنگی مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین شدت فلورسانس (MFI) این شاخص‌های سطحی در دو گروه مقایسه شده است. هر گروه متشکل از شش سر موش هم‌نژاد ماده که از لحاظ سنی همسان‌سازی شده‌اند، می‌باشد.

شاخص‌ها	گروه آزمایش	گروه کنترل	p-value
CD8α	۱۵۵/۹۶ ± ۳۵/۳	۱۸۸/۱۶ ± ۲۸/۱	۰/۱۱۷
CD40	۹۶/۲۶ ± ۱۶/۲۱	۱۰۹/۰۶ ± ۱۳/۹۵	۰/۲۵۱
CD11b	۸۷/۹۸ ± ۱۸/۶	۵۸/۵ ± ۹/۴	۰/۰۱۱
MHC class II	۱۶۳/۹۶ ± ۴۸	۲۴۲/۵۶ ± ۳۰/۱۸	۰/۰۴۷
CD86	۹۲/۶۶ ± ۹/۸۹	۱۴۳/۷۲ ± ۳۹/۹۶	۰/۰۲۸

تکثیر اختصاصی لنفوسیت‌ها و آزمون الایزا

به منظور بررسی تاثیر کلسیتریول بر عرضه آنتی‌ژن اختصاصی توسط DCها به لنفوسیت‌ها در درون تن، DCهای استخراج شده از طحال موش‌های تیمار شده (در مقایسه با DCهای طحال موش‌های تیمار نشده)، با MOG به عنوان یک آنتی‌ژن اختصاصی مجاور شدند و سپس به کف دست موش‌های هم‌نژاد تزریق گردیدند. بدیهی است که DCهای فوق، از طریق عروق لنفاوی آوران وارد غدد لنفاوی منطقه‌ای در ناحیه براکیال شده و در آنجا با لنفوسیت‌های اختصاصی برخورد می‌نمایند. بنابراین در این مکان، لنفوسیت‌ها اولین برخورد با آنتی‌ژن اختصاصی را انجام داده و اصطلاحا پرایم (Prime) می‌شوند. هر چقدر توانایی DCها در عرضه آنتی‌ژن و فعال‌سازی لنفوسیت‌های اختصاصی بیشتر باشد، در برخورد ثانویه با همان آنتی‌ژن که در برون تن صورت می‌گیرد، فعال‌سازی و تکثیر لنفوسیت‌ها بیشتر و شدیدتر خواهد بود. بعد از گذشت ۵ روز، لنفوسیت‌های به دست آمده از غدد لنفاوی منطقه‌ای در محیط برون‌تن با آنتی‌ژن مجاور گردیدند. مطابق نتایج حاصله، میزان تحریک و تکثیر لنفوسیت‌های غدد لنفاوی براکیال پس از مجاورت با MOG در گروه تست، ۷۵۹ ± ۹۳۳۵ و در گروه کنترل، ۴۸۳ ± ۱۰۷۳۳ شمارش در دقیقه (CPM) بوده که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار ($p = 0/009$) است. همچنین حتی در غیاب MOG نیز میزان تحریک در گروه تست به طور قابل توجهی ($p=0/018$) کمتر از گروه کنترل است (به ترتیب ۳۰۷ ± ۲۴۰۴ و ۱۷۵ ± ۲۹۳۶) (نمودار ۱).

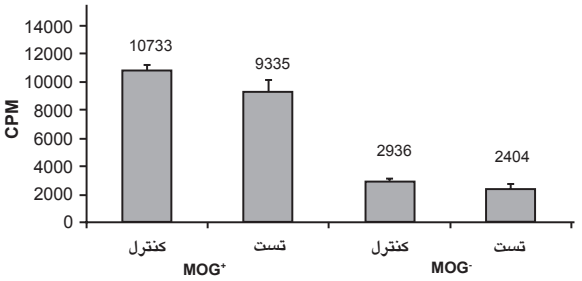
میزان سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-4 با آزمون الایزا نیز مورد سنجش قرار گرفته و برای یافتن نسبت IFN-γ/IL-4 ابتدا به وسیله نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ و رسم منحنی کالیبراسیون، غلظت هر یک از سایتوکاین‌ها بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر و سپس نسبت IFN-γ/IL-4 در هر نمونه به دست آمده و پس از محاسبه میانگین این نسبت در هر گروه، به عنوان نسبت IFN-γ/IL-4 آن گروه در نظر گرفته شد. نتایج حاصله نشان داد که نسبت IFN-γ/IL-4 به نمایندگی از نسبت Th1/Th2 در گروه تست و کنترل به ترتیب ۰/۲۸ ± ۳/۳۰۶ و ۰/۲۳ ± ۵/۳۹۲ می‌باشد ($p=0/006$). بنابراین به نظر می‌رسد که سایتوکاین‌های تولید شده در سوپ حاصل از تکثیر اختصاصی لنفوسیت‌ها در گروه تست نسبت به گروه کنترل به سمت Th2 سوق پیدا کرده است.



شکل ۱: نتیجه فلوسایتومتری تک رنگی با Anti-CD11c برای تعیین خلوص DCهای به دست آمده با Magnetic Beads. جابه‌جایی نمودار به سمت راست در مقایسه با کنترل ایزوتیپ نشان دهنده مثبت بودن سلول‌ها می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار۱: نتایج آزمون تکثیر اختصاصی لنفوسیت‌ها. سلول‌های دندریتیک جدا شده از طحال موش‌های هر دو گروه آزمایش (Test) و کنترل و سپس پالس شده با MOG به طور جداگانه به موش‌های سینژن تزریق گردیدند (در این نمودار منظور از Control و Test موش‌هایی هستند که به ترتیب سلول‌های دندریتیک موش‌های گروه آزمایش (Test) و کنترل به آنها تزریق شده است. هر کدام از این دو گروه نیز متشکل از ۶ سر موش ماده که از لحاظ سنی هم‌سان‌سازی شده‌اند می‌باشد). پس از گذشت ۵ روز سلول‌های غدد لنفاوی موش‌های جدید، در مجاورت MOG و در عدم حضور MOG کشت داده شده و شدت تکثیر آنها اندازه‌گیری شد. اعداد نشان داده شده روی نمودار میانگین شمارش در دقیقه (CPM) هر گروه را نشان می‌دهد.

بحث

کلسیتریول به عنوان فرم فعال ویتامین D3 اثرات متعددی بر سیستم ایمنی دارد که این آثار را پس از اتصال به گیرنده‌های خود در سلول‌های ایمنی (نظیر DCها) اعمال می‌کند. تحقیقات متعددی در زمینه اثرات کلسیتریول بر سلول‌های DC در برون تن توسط محققین به انجام رسیده است (۶، ۸، ۹، ۲۳). لیکن بر اساس اطلاعات ما تا کنون هیچ گزارشی در مورد تاثیر کلسیتریول در محیط درون تن بر سلول‌های دندریتیک وجود ندارد و از آنجا که شرایط درون تن به صورت کامل متفاوت از شرایط برون‌تن است، در این تحقیق به بررسی اثر ویتامین D3 در محیط درون‌تن بر روی سلول‌های دندریتیک پرداختیم. نتایج نشان داد که کلسیتریول اثراتی بر میزان بیان برخی از شاخص‌های سطحی سلول‌های DC دارد؛ به این صورت که بر عرضه CD8α و CD11b به عنوان شاخص‌های زیر گروه‌های سلول‌های دندریتیک القاکننده مسیرهای Th1 و Th2 و MHC کلاس ۲، CD40 و CD86 به عنوان شاخص‌های بلوغ و فعالیت تاثیرگذار است و این تاثیرات را به طور عمده بر میزان بیان و تراکم این شاخص‌ها در غشای سلول – که با متوسط شدت فلوئورسانس (MFI) نشان داده می‌شود – اعمال می‌کند. این تغییر در تراکم شاخص‌های سطحی در موارد ذکر شده به استثنای CD40 و CD8α از نظر آماری معنی‌دار بوده است.

چنان که می‌دانیم پس از اتصال کلسیتریول به گیرنده‌های درون سلولی‌اش (VDR)، سیگنال‌های ارسالی از طریق فاکتورهای نسخه‌برداری بر بیان برخی از ژن‌ها اثر گذاشته و از این طریق اثرات تنظیم ایمنی خود را اعمال می‌کند (۸، ۹، ۲۳). گازی و همکارانش (۲۴) نشان دادند که Interferon Regulatory Factor 4 (IRF-4) یکی از مهم‌ترین فاکتورهای نسخه‌برداری است که در این مسیر نقش ایفا می‌نماید.

همان طور که در مقدمه مقاله نیز ذکر شد، درموش سلول‌های دندریتیک به دو دسته لنفوییدی و میلوییدی تقسیم‌بندی می‌شود که انواع لنفوئید، $CD8\alpha^+$, $CD11b^-$ و انواع میلوئید، $CD11b^+CD8\alpha^-$ می‌باشد. همچنین زیر گروه اول پس از عرضه آنتی‌ژن و ترشح مقادیر معتنابهی IL-12 و IFN-γ پاسخ ایمنی سلولی (Th1) را بر انگیخته در حالی که زیر گروه دوم با ترشح IL-4 و IL-10 مسیر را به سمت پاسخ هومورال (Th2) هدایت می‌کند. حال با توجه به اینکه در مطالعه ما کلسیتریول به ترتیب موجب کاهش و افزایش بیان CD8α و CD11b شده است، به نظر می‌رسد که این ترکیب ویتامینی موجب کاهش نسبت Th1/Th2 می‌شود. به عبارت دیگر پاسخ ایمنی را به سمت ایمنی هومورال هدایت می‌کند. همچنین چون CD11b در جذب آنتی‌ژن توسط DCها نقش دارد، افزایش عرضه آن پس از تیمار با کلسیتریول، به معنای ابقای سلول در وضعیت نابالغ است. منطبق با یافته ما، پنا و همکارانش (۸)، گزارشی منتشر کردند مبنی بر اینکه DCهای انسان از اهداف اصلی اثرات مهارگر ایمنی کلسیتریول است. به این معنا که موجب کاهش شدید تمایز DCهای نابالغ و مونوسیت‌ها در برون تن شده و همچنین سبب می‌شود که در حین بلوغ ناشی از القای LPS، بیان رسپتورهای مانوز و CD83 به ترتیب افزایش و کاهش یابند. براساس گزارش این محققین عرضه CD40، CD80، CD86 و MHC کلاس دو نیز به‌طور معنی‌داری مهار می‌گردد. مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که بلوغ DCهای انسانی نیز در اثر تیمار با کلسیتریول در برون تن کاهش می‌یابد. آنها همچنین نشان دادند که تولید IL-12 و IL-10 متعاقب تحریک DCها و درحضور سلول‌های T، به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری دارند.

در همان سال برر و همکارانش (۶) نتایج مشابهی را ارایه دادند. آنها متوجه شدند که تمایز DCهای مشتق از مونوسیت که در غلظت 10^{-9} تا 10^{-7} مولار کلسیتریول کشت داده می‌شوند، به شدت مهار می‌گردد. همچنین مواجهه DCهای نابالغ با این ماده باعث کاهش بیان مولکول‌های CD40، CD80 و MHC کلاس دو می‌شود، در حالی که عرضه CD14 به عنوان مهم‌ترین شاخص ماکروفاژ مونوسیتی، افزایش معنی‌داری از خود نشان می‌دهد. بنابراین مسیر تمایز مونوسیت به سمت سلول‌های دندریتیک در حضور کلسیتریول دچار وقفه شده و به همین لحاظ بیان مارکر ماکروفاژی CD14 (نسبت به زمانی که کلسیتریول حضور نداشته باشد) افزایش می‌یابد.

اثرات تنظیم ایمنی کلسیتریول در غلظت 10^{-10} مولار و بیشتر از آن اعمال می‌گردد که برای تامین این غلظت به نسبت بالا در مواضع ایمونولوژیک داخل بدن، برخی از سلول‌های سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژهای فعال به سنتز این ماده می‌پردازند. با توجه به عوارض خطرناک دوز بالای تجویز گسترده کلسیتریول، محققین تلاش کرده‌اند تا اشکال سنتتیک این ماده را که فاقد آثار نا خواسته از قبیل هایپرکلسمی (Hypercalcemia)، کلسیفیکاسیون کلیه (Calcification) و آسیب استخوانی باشد، تولید نمایند. TX527 یکی از این اشکال است که در آزمایشگاه ساخته شده و کاربردهای گسترده‌ای در تحقیقات دارد و در بسیاری از موارد، جایگزین کلسیتریول شده است. به‌عنوان مثال ون هالترن و همکارانش (۲۳) طی پژوهش انجام شده بر روی اثرات تنظیم ایمنی این ماده سنتتیک، متوجه شدند که افزودن مداوم TX527 به محیط کشت، موجب نقصان در تمایز DCها (چه ناشی از القای با IL-4+GM-CSF باشد و چه ناشی از القای با (IFN-γ+LPS)می‌شود. همچنین تولید IL-12 به‌عنوان شاخص عمده مسیر Th1 و ایمنی سلولی به شدت کاهش یافته و حتی مورفولوژی DCها نیز تغییر پیدا می‌کند. همچنین این محققین نشان دادند که این اثرات به نوبه خود عملکرد

Archive of SID

www.SID.ir

T سل‌ها و تولید سایتوکاین از آنها را پس از تکامل با DCهای تیمار شده تحت تاثیر قرار می‌دهد.

گازی و همکارانش نیز (۲۵) گزارش مشابهی را منتشر کردند. طی گزارش دیگر، برخی از اشکال سنتتیک فرم فعال ویتامین D3، علاوه بر اثرات جانبی کمتر، نشان داده شد که توانایی بیشتری برای مهار عملکرد DCهادارند(۲۶).درسال۲۰۰۴نشان‌داده‌شد که کلسیتریول‌ودگزامتازون (Dexamethazone) (یک داروی گلوکوکورتیکوئیدی (Glucocorticoid) که اثرات مهار ایمنی دارد) اثرات سینرژیک روی یکدیگر داشته و موجب مهار بلوغ ناشی از LPS در DC ها می‌شود (۲۷). در یک مطالعه درون تن در سال ۲۰۰۱ که توسط گریفین و همکارانش (۲۸) انجام گرفت، اعلام شد که تنظیم عملکرد DCها توسط آنالوگ‌های سنتتیک کلسیتریول از یک مسیر وابسته به VDR به انجام می‌رسد و موجب می‌شود که DCها در وضعیت نابالغ باقی بمانند. براساس این گزارش، موش‌های فاقد VDR (ناک اوت شده در ژن VDR) در غدد لنفاوی زیرپوستی خود دچار هیپرتروفی شده و تعداد DCهای بالغ آنها در این نواحی افزایش معنی‌داری می‌یابد. در حالی که در مورد طحال، این وضعیت مشاهده نمی‌شود. اما براساس مشاهدات ما، تزریق داخل صفاقی کلسیتریول هم بر اندازه طحال (اطلاعات نشان داده نشده است) و هم بر وضعیت بلوغ DCهای این ارگان اثرگذار است.

لیاخ و همکارانش (۲۹) نشان دادند که بر خلاف اثرات مهار ایمنی مشترک بین TGF-β و کلسیتریول بر DCها، تفاوت‌های فاحشی در مسیرهای سیگنالینگ به کار گرفته شده توسط این دو ماده وجود دارد. چنانچه پیشتر اشاره شد، IRF-4 یک فاکتور نسخه‌برداری رده میلوییدی و لنفوییدی است که نقش مرکزی در سیگنالینگ وابسته به کلسیتریول دارد.

همچنین مشخص شده است که کلسیتریول، بیان ILT3; Immunoglobulin-like Transcript 3 را در DCها افزایش می‌دهد. بیان ILT3 با القای لنفوسیت‌های T تنظیمی (Treg) نسبت مستقیم داشته و ثابت شده است که نقش مهمی در مهار و درمان برخی از بیماری‌های خود ایمن مثل پسوریازیس (Psoriasis) بر عهده دارد (۱۶، ۳۰).

زلس و همکارانش (۳۱) با استفاده از PCR کمی ثابت کردند که کلسیتریول، بیان یک مجموعه بزرگ از ژن‌ها را تنظیم می‌نماید. در مقاله دیگری که توسط پنا و همکارانش (۱۹) منتشر گردید، بیان شده که کلسیتریول به طور انتخابی روی DCهای میلوییدی (و نه پلاسماسیتوید) انسانی اثر گذاشته و خصوصیات مهاری را به آنها القا می‌کند.

براساس گزارش آنها، پس از مجاورت DCهای میلوئید با کلسیتریول، تولید IL-12 و در نتیجه توانایی آنها برای القای لنفوسیت‌های Th1 به شدت کاهش می‌یابد. این نتایج با آنچه که توسط ما به دست آمده است، مطابقت می‌کند؛ زیرا در انسان، DCهای میلوییدمشابه انواع لنفوییدر موش عمل می‌کنند.

مطالعات برون تن دیگر نیز توسط سایر دانشمندان تأییدی بر نتایج قبلی است. به‌عنوان مثال تمایز DC از مونوسیت‌های انسانی در حضور 10^{-9} مولار کلسیتریول به ترتیب باعث کاهش و افزایش بیان CD1α و CD14 می‌شود. همچنین بیان CD32 و فعالیت اندوسیتوزی به شدت افزایش می‌یابد و در نقطه مقابل، عرضه مولکول‌های کمک تحریکی CD40 و CD86 مهار می‌گردد (۳۲). همچنین ثابت شده است که متابولیت‌های فعال ویتامین D3 که به صورت موضعی در پوست ترشح می‌شود، در پروسه مهاجرت و ترافیک DCها در درون‌تن اثرگذار است (۳۳).

براساس یافته‌های ما، از طرف دیگر لنفوسیت‌های T پرایم شده با DCهای تیمار شده با کلسیتریول توانایی تکثیر کمتری در *ex vivo* و در آزمون LTT دارند. اما سوال مطرح شده این است که موضع اصلی القای این آثار تنظیمی کجا و در کدام مرحله است؟ آیا سلول‌های دندریتیک در مرحله پالس شدن در برون تن دچار کاهش عملکرد در فاگوسیتوز آنتی‌ژن شده‌اند و یا در درون تن، عرضه آنتی‌ژن به لنفوسیت‌ها با میزان کمتری صورت گرفته است؟ با توجه به نتایج تحقیقات گذشته، بعید است که کلسیتریول موجبات کاهش فاگوسیتوز را فراهم بیاورد؛ زیرا باعث افزایش خصوصیات مونوسیتی – ماکروفاژی در سلول‌های دندریتیک می‌شود (۶-۸). بنابراین به نظر می‌رسد که عرضه آنتی‌ژن به وسیله سلول‌های دندریتیک، توسط کلسیتریول تغییر یافته است. بنابراین لنفوسیت‌های T در هنگام پرایمینگ، تحت القای آثار تنظیمی DCهای تیمار شده، واقع می‌شوند و از این طریق است که نتایج LTT کاهش چشم‌گیری در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد. البته با توجه به کاهش عرضه مولکول‌های کمک تحریکی و همچنین MHC کلاس دو در سلول‌های DC، متعاقب تیمار با کلسیتریول که جزو یافته‌های ما نیز هستند، استنتاج فوق منطقی به نظر می‌رسد؛ چون DCها علاوه بر تحریک پاسخ‌های ایمنی در کنترل پاسخ‌های ایمنی هم نقش دارند و با توجه به اثرات ممانعت‌کنندگی که کلسیتریول روی این سلول‌ها نشان داده و همچنین اثراتی که روی شیفت سایتوکاین‌ها داشته، می‌توان از نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه برای کنترل تظاهرات بیماری‌های خودایمن استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد که کلسیتریول در درون تن، اثرات مهاری قابل توجهی بر روند بلوغ DCها، بیان مولکول‌های کمک تحریکی و عرضه آنتی‌ژن به لنفوسیت‌ها اعمال می‌کند. همچنین باعث شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمت Th2 می‌گردد.

تقدیر و تشکر

هزینه‌های مالی این طرح توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است که بدین‌وسیله ازمسؤولین این دانشگاه تشکر می‌گردد.

References

1. Jung S. Good, bad and beautiful-the role of dendritic cells in autoimmunity. Autoimmun Rev. 2004; 3(1): 45-60.
2. Dakic A, Wu L. Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations. Leuk Lymphoma. 2003; 44(9): 1469-1475.
3. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol. 2002; 2(3): 151-161.
4. Hochrein H, O'Keeffe M, Wagner H. Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. Hum Immunol. 2002; 63(12): 1103-1110.
5. Ardavín C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. Nat Rev Immunol. 2003; 3(7):

Archive of SID
www.SID.ir

582-590.
6. Berer A, Stöckl J, Majdic O, Wagner T, Kollars M, Lechner K, et al.1, 25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. Exp Hematol. 2000; 28(5): 575-583.
7. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. Blood. 1993; 82(4): 1300-1307.
8. Penna G, Adorini L. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. J Immunol. 2000; 164(5): 2405-2411.
9.van Etten E, Mathieu C.Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005; 97(1-2): 93-101.
10. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. J Bone Miner Res. 1998; 13(3): 325-349.
11. Adorini L Penna G, Giarratana N, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, et al. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by vitamin D receptor ligands. J Ster Biochem Mol Biol. 2004; 89-90(1-5): 437-441.
12. Adorini L. Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. Int Immunopharmacol. 2002; 2(7): 1017-1028.
13. Griffin MD, Kumar R. Effects of 1alpha,25(OH)2D3 and its analogs on dendritic cell function. J Cell Biochem. 2003; 88(2): 323-326.
14. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents. Trends Mol Med. 2002; 8(4): 174-179.
15. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. Vitamin D3-mediated alteration to myeloid dendritic cell trafficking in vivo expand the scope of their antigen presenting properties. Vaccine. 2007; 25(7): 1236-1249.
16. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. Semin Immunol. 2004; 16(2): 127-134.
17. Muthian G, Raikwar HP, Rajasingh J, Bright JJ. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 modulates JAK-STAT pathway in IL-12/IFNgamma axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. J Neurosci Res. 2006; 83(7): 1299-1309.
18. Lemire JM, Archer DC. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest. 1991; 87(3): 1103-1107.
19. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. J Immunol, 2007; 178(1): 145-153.
20. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol. 2000; 165(11) : 6037-6046.
21. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime Antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. J Exp Med. 1990; 172(2): 631-640.
22. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Dokouhaki P, Shojaeian J, et al. The efficient isolation of murine splenic dendritic cells and their cytochemical features. Histochem Cell Biol. 2006; 126(2): 275-282.
23. van Halteren AG, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D3. Diabetes. 2002; 51(7): 2119-2125
24. Gauzzi MC, Purificato C, Conti L, Adorini L, Belardelli F, Gessani S. IRF-4 expression in the human myeloid lineage: up-regulation during dendritic cell differentiation and inhibition by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. J Leukoc Biol. 2005; 77(6): 944-947.
25. Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, Jin Y, Wang L, Daniel KC, et al. Suppressive effect of 1 alpha, 25-didydroxyvitamin D3 on type I IFN-Mediated monocyte differentiation into dendritic cells: Impairment of functional activities and chemotaxis. J Immunol. 2005; 174(1): 270-276.
26. Shimazaki M, Miyamoto Y, Yamamoto K, Yamada S, Takami M, Shinki T, et al. Analogs of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 with high potency in induction of osteoclastogenesis and prevention of dendritic cell differentiation: Synthesis and biological evaluation of 2-substituted 19-norvitamin D analogs. Bioorgan Med Chem. 2006; 14(13): 4645-4656.
27. Pedersen AE, Gad M, Walter MR, Claesson MH. Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. Immunol Lett. 2004; 91(1): 63-69.
28. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, Mckean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(12): 6800-6805.
29. Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young HA , Roberts AB. TGF-β and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. J Immunol. 2005; 174(4): 2061-2070.
30. Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Blood. 2005; 106(10): 3490-3497.
31. Szeles L, Keresztes G, Torocsik D, Balajthy Z, Krenacs L, Poliska S, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype. J Immunol. 2009; 182(4): 2074-2083.
32. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Cin ED, et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. J Immunol. 2000; 164 (9): 4443-4451.
33. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. TLR ligands that stimulate the metabolism of vitamin D3 in activated murine dendritic cells can function as effective mucosal adjuvants to subcutaneously administered vaccines. Vaccine. 2008; 26(5): 601-613.

Archive of SID

www.SID.ir