بررسی نقش سلول‌های دندریتیک کبد و طحال در القای پاسخ‌های سلولی TH_1 و TH_2

*دکتر قاسم مسیبی I
دکتر سیدمحمد مؤذنی II
دکتر محمدحسین صنعتی III

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های دندریتیک یکی از عوامل موثر در هدایت پاسخ ایمنی به سمت سلول‌های TH_1 یا TH_2(T Helper cell) محسوب می‌شوند. سلول‌های دندریتیک ممکن است موجب تولید سیتوکین با الگوی متفاوت در بافت‌های مختلف شوند. احتمالاً الگوی تولید سیتوکین توسط سلول‌های دندریتیک کبد با طحال متفاوت می‌باشد. به منظور بررسی علت تفاوت پاسخ‌های ایمنی در بافت کبد (به عنوان یک بافت غیر لنفاوی و تولروژن) و طحال (به عنوان یک بافت لنفاوی و ایمونوژن)، عملکرد سلول‌های دندریتیک طحال و کبد در القای پاسخ در سلول‌های TH_1 و TH_2 در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار: در این بررسی سلول‌های دندریتیک طحال(بافت لنفاوی) و کبد(بافت غیرلنفاوی) موش نرمال از نژاد C57BL/6 با روش هضم آنزیمی و محیط گرادیان نایکودنز، جدا و در محیط کشت با غلظت مناسبی از پپتید میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین (Myelin Oligoelectrocyte Glycoprotein=MOG35-55) پالس گردیدند. حدود ۶×۱۰^{۵} سلول دندریتیک کبدی و طحالی پالس شده، به طور مجزا و به صورت زیر جلدی به کف پای هر موش تزریق گردید. به گروه‌های کنترل نیز سلول‌های دندریتیک پالس نشده تزریق شد. پس از گذشت ۵ روز، سلول‌های تک هسته‌ای غدد لنفاوی ناحیه‌ای(popliteal) موش‌های ایمونیزه جدا شدند و در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 کشت داده شدند. مایع رویی کشت سلول پس از گذشت ۹۶ ساعت، جمع‌آوری و میزان تولید IL-10 (Interleukin 10) و IFN-γ(Interferon γ) با روش ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه نشان داد که میزان تولید IL-10 و IFN-γ در موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبدی یا طحالی پالس شده با پپتید MOG35-55 در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوطه به طور قابل ملاحظه‌ای بیش‌تر بود($p=۰/۰۰٤$). از طرفی تفاوت معنی‌داری در میزان تولید IFN-γ بین موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبد و طحال مشاهده نشد، در حالی که اختلاف فاحشی در تولید IL-10 بین این دو گروه وجود داشت($p= ۰/۰۱$).

نتیجه گیری کلی: از این یافته‌ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که القای تولید میزان بالایی از IL-10 توسط سلول‌های دندریتیک کبد ممکن است یکی از عوامل موثر در کاهش و تنظیم پاسخ ایمنی در این عضو باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – سلول‌های دندریتیک ۲ – پاسخ‌های سلولی TH_1 و TH_2 ۳ – کبد ۴ – طحال

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۳، تاریخ پذیرش: ۸٤/۳/۱۸

I) استادیار گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی اراک، اراک، ایران(*مولف مسؤول).
II) دانشیار گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
III) دانشیار گروه ژنتیک انسانی، مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

سلول‌های دندریتیک نقش مهمی را در القای پاسخ‌های ایمنی سلولی به عهده دارند. تفاوت پاسخ‌های ایمنی در بافت‌های مختلف را به عملکرد سلول‌های دندریتیک مستقر در آن بافت نسبت می‌دهند.[۱و ۲] درباره تفاوت پاسخ‌های ایمنی در بافت‌های مختلف دو نظریه وجود دارد. برخی از بررسی‌ها نشان می‌دهند که استقرار ترجیحی زیر گروه‌های مختلف سلول‌های دندریتیک در ارگان‌های مختلف ممکن است تحت کنترل مکانیسم‌های خاص باشد.[۳و ٤] به نظر می‌رسد در بافت‌های مختلف، از نظر فنوتیپی یک هتروژنی بین این سلول‌ها وجود داشته باشد.[۵]

مطالعات دیگر نشان می‌دهند که با وجود فراوانی یکسان سلول‌های دندریتیک میلوییید و لنفوییید در بافت، فاکتورهای ریز محیطی از جمله، سیتوکین‌ها با دخالت در مراحل تکوین سلول‌های دندریتیک بر توانایی آنها در القای پاسخ‌های ایمنی تاثیر می‌گذارند.[٦و ۷] سلول‌های دندریتیک جدا شده از پلاک‌های پی‌یر و ریه موش صحرایی(Rat) باعث القای پاسخ در سلول‌های TH_2 می‌شوند.[۸و ۹] در حالی که سلول‌های دندریتیک جدا شده از مدولای تیموسی باعث حذف لنفوسیت‌های T خود واکنش‌گر و القای تولرانس می‌شوند.[۱۰] به هر حال علاوه بر زیر رده سلول‌های دندریتیک، ماهیت پاسخ ایمنی به نوع بافت و ریز محیطی که سلول دندریتیک در آن پرورش یافته نیز بستگی دارد.[۷]

تفاوت پاسخ‌های ایمنی در طحال(به عنوان یک بافت ایمونوژنیک) و کبد(به عنوان یک بافت تولروژنیک) ممکن است به دلیل تفاوت عملکرد سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ در سلول‌های TH_1 و TH_2 باشد. در این مطالعه توانایی سلول‌های دندریتیک کبد و طحال موش نرمال در القای پاسخ سلول‌های TH_1 و TH_2 از طریق سنجش پروفایل سیتوکینی(IL-10, IFN-γ) مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

موش‌های خالص از نژاد C57BL/6 با سن ۸-٦ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. پپتید MOG35-55 با توالی M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K و درجه خلوص بیش‌تر از ۹۵٪ از شرکت Diapharm روسیه به سفارش مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی خریداری گردید.

این مطالعه از نوع تجربی است که به صورت مورد - شاهدی انجام شد. برای جداسازی سلول‌های دندرتیک (Dendritic Cell=DC) از کبد و طحال به ترتیب از روش‌های تغییر یافته Vremec[۱۱] و Rao[۱۲] استفاده شد. بعد از نخاعی نمودن موش‌ها با رعایت شرایط استریل، طحال و کبد آنها برداشته شـد. بافت‌ها به طور مجزا در ۱۰-۵ میلی‌لیتـر محیط کشت RPMI-1640(GIBCO) حاوی ۲٪ سرم جنین گوساله (Fetal Calf Serum=FCS) (GIBCO)، ۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز(Roche) و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنزیم DNase (Roche) با قیچی جراحی تیزی کاملا خرد گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند.

سوسپانسیون سلولی به دست آمده از توری سیمی (cell mesh) با منافذی به قطر ۰/۱میلی‌متر عبور داده شد تا قطعات بافتی هضم نشده جدا گردد. سوسپانسیون تک سلولی به مدت ۵ دقیقه با ۵ میلی‌مولار EDTA (Merk) مخلوط گردید.

EDTA(Ethyelen-Diethyel Tetra Acetic Acid) از اتصال سلولی و تشکیل کلامپ سلولی جلوگیری می‌کند. سوسپانسیون سلولی ۲ بار با بافر فسفات سالین (Phosphate Bafer Salin=PBS) سرد حاوی ۲ میلی مولارEDTA شستشو و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و با دور g ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

پلت(توده) سلولی در ۳-۲ میلی‌لیتر محیط RPMI به صورت سوسپانسیون در آمده و به آرامی بر روی ۳-۲ میلی‌لیتر محیط گرادیان ۱۳٪(۱/۰٦۸ گرم در سانتی‌متر مکعب) نایکودنز(Pharma) برده و ۱۵ دقیقه با دور g ٦۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در این مرحله سلول‌های با دانسیته کم ازجمله DCs در روی محیط

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

گرادیان باقی ماندند، این سلول‌ها با دقت توسط پیپت پاستور برداشته شده و ۲ بار مثل مرحله قبل شستشو و سانتریفیوژ گردیدند. پلت سلولی در محیط کشت کامل حاوی ۱۰٪ FCS به صورت سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر درآمد. درون هر پتری دیش ۶۰میلی‌لیتر(NUNC)، ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی فوق ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور با ۵٪ CO_2 انکوبه گردید. در طی این مدت سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها به کف پلیت متصل می‌شدند. با شستشوی آرام پلیت، سلول‌های غیر چسبان (لنفوسیت‌ها) حذف شدند. این عمل باید با PBS یا محیط RPMI گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انجام شود. اگر میزان خلوص سلول‌های دندریتیک کم باشد می‌توان عمل شستشو را بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، مجدداً انجام داد. سلول‌های چسبیده به پلیت به مدت ۱۸ ساعت در محیط کشت کامل و انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. در این مدت سلول‌های دندریتیک پس از بالغ شدن از کف پلیت جدا می‌شدند. این سلول‌ها جمع‌آوری شدند و با روش فلوسیتومتری مشخص شد که ۹۵٪-۹۰٪ این سلول‌ها واجد مارکر CD11c(شاخص سلول‌های دندریتیک در موش) هستند.[۱۳] لازم به توضیح است که بعد از کشت شبانه سلول‌های کبدی، به منظور حذف سلول‌های غیر پارانشیمی، سلول‌های شناور مجدد بر روی محیط گرادیان نایکودنز برده شد و سلول‌های بین فازی به عنوان سلول‌های دندریتیک، هاروست(Harvest) شد.

سلول‌های دندریتیک طبق روش ذکر شده از کبد و طحال موش از نژاد C57BL/6 جدا شدند. طی کشت ۱۸ ساعته (over night)، به محیط کشت این سلول‌ها، ۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر پپتید MOG35-55 اضافه گردید. بعد از کشت شبانه، سلول‌های دندریتیک جمع‌آوری و مجدداً به مدت ۶-۳ ساعت در محیط کشت بدون FCS با غلظت ۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید MOG35-55 مجاور شدند. جهت حذف پپتیدهای مصرف نشده، سلول‌ها ۳ بار با بافر فسفات سالین شسته شدند. تعداد $۱۰^{۵}\times۳$ از DCs در حجم ۳۰ میکرولیتر بافر فسفات به کف هر پای موش از نژاد C57BL/6 تزریق گردید. (به هر موش تعداد $Dcs۶\times۱۰^{۵}$). به گروه کنترل DCs کشت داده شده در غیاب آنتی ژن تزریق شد. برای هر گروه ۷ سر موش در نظر گرفته شد.

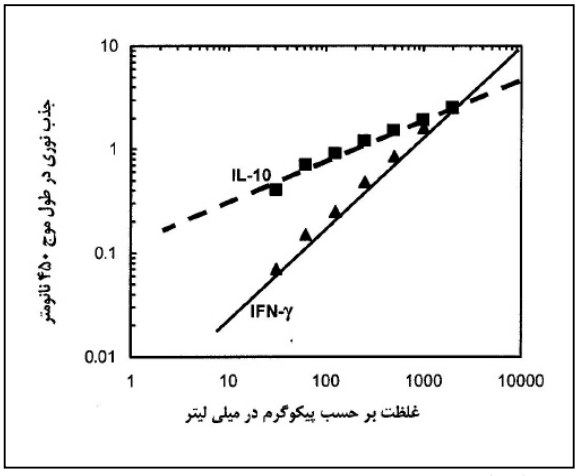
به منظور سنجش سیتوکین‌های تولید شده از سلول‌های تک هسته‌ای به دست آمده از غدد لنفاوی موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک پالس شده کبدی و طحالی، سوسپانسیون سلولی با غلظت $۱/۵-۲\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر در محیط کشت حاوی سرم نرمال ۱٪ موش تهیه شد. در هر حفره از پلیت ۹۶ حفره‌ای، مقدار ۲۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی فوق ریخته شد. غلظت مناسبی از پپتید MOG35-55 به صورت ۳ تایی(triplicate) به حفره‌ها اضافه گردید. به حفره‌های کنترل منفی، پپتید اضافه نشد. میکروپلیت‌ها در انکوباتور کشت سلول انکوبه گردیدند. بعد از گذشت ۹۶ ساعت از کشت لنفوسیت‌ها در حضور و عدم حضور آنتی‌ژن، مایع رویی جهت سنجش سیتوکین‌های IL-10 و IFN-γ، جمع‌آوری و تا زمان آزمایش در ۷۰- درجه سانتیگراد فریز شد.

جهت سنجش IL-10 و IFN-γ به ترتیب از ست سنجش IL-10(BD; OptEIATM Mouse IL-10 set) و ست سنجش IFN-γ(BD; OptEIATM Mouse IFN-γ set) استفاده شد. تیتر مناسب Anti-mouse IL-10 mAb (۱:۱۲۵) و Anti-mouse IFN-γ mAb(۱:۱۰۰۰) تعیین گردید.

رقت ۱:۱۲۵ ازAnti-mouse IL-10 mAb و ۱:۱۰۰۰ از Anti-mouse IFN-γ mAb در بافرهای پوشاننده مربوط به خود تهیه و به هر حفره ۱۰۰میکرولیتر اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۱ شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، پلیت‌ها ۵-۳ بار با بافر شستشو، شسته شدند. ۲۰۰میکرولیتر از بافر بلوکه کننده به هر حفره اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. شستشوی پلیت مانند مرحله ۳ انجام گرفت و با قرار دادن پلیت بر روی دستمال کاغذی، بافر اضافی آن کاملاً خشک شد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

غلظت‌های مختلفی از استاندارد IL-10 و IFN-γ در بافر رقیق کننده تهیه شد و به صورت جداگانه در هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. نمونه‌ها(مایع رویی کشت سلول) نیز به صورت رقیق نشده و duplicate به حفره‌های مورد نظر اضافه گردیدند. انکوباسیون به مدت ۲-۱/۵ ساعت در ۳۷درجه سانتی‌گراد انجام شد و شستشو و خشک کردن مانند مرحله ۵ صورت گرفت. تیتر مناسب آنتی بادی‌های سنجشی [آنتی بادی‌های بیوتینه شده ضد IL-10(۱:۱۲۵) و IFN-γ(۱:۱۲۵)] و کونژوگه آویدین ـ پراکسیداز(۱:۱۲۵)، تعیین و با نسبت یکسان در بافر رقیق کننده تهیه و به هرحفره ۱۰۰میکرولیتر از مجموعه مذکور اضافه گردید. انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد انجام شد و شستشو و خشک کردن مانند مرحله ۵ صورت گرفت. سوبسترای آنزیمی در حجم ۱۰۰میکرولیتر به هر حفره اضافه گردید. تا زمان تغییر رنگ حفره‌های کنترل منفی(Blank)، پلیت در تاریکی انکوبه شد و در انتها، واکنش با اسید سولفوریک ۲۰٪ متوقف شد. با استفاده از دستگاه ELISA Reader، میزان جذب نور (Optical density=OD) در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده شد. با استفاده از OD نمونه‌های استاندارد، منحنی استاندارد بر روی کاغذ لگاریتمی رسم شد و غلظت سیتوکین‌ها در نمونه‌های مورد آزمایش(مایع رویی کشت لنفوسیت‌ها) با توجه به منحنی استاندارد تعیین گردید(نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱-منحنی استاندارد جهت سنجش IFN-γ و IL-10

برای مقایسه اختلاف میانگین سیتوکین‌ها از روش‌های غیر پارامتریک (آزمون Mann-Whitney U) استفاده گردید.

نتایج

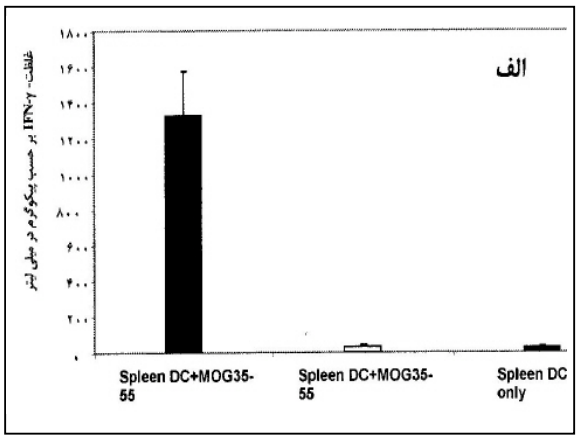
به منظور مطالعه عملکرد سلول‌های دندریتیک در القای پروفایل سیتوکینی، سلول‌های دندریتیک جدا شده از کبد و طحال با ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پپتید MOG35-55 پالس شدند و تعداد ٦×١٠^{٥} سلول دندریتیک کبدی و طحالی پالس شده به کف پای هر موش(به کف هر پا ٣×١٠^{٥} سلول دندریتیک) به صورت مجزا تزریق شد. در هر گروه ۷ سر موش آزمایش شد.

به گروه‌های کنترل سلول‌های دندریتیک کبدی و طحالی پالس نشده تزریق گردید. پس از گذشت ۵ روز سلول‌های تک هسته‌ای غدد لنفاوی popliteal از این موش‌ها جدا و میزان تولید IFN-γ و IL-10 در مایع رویی کشت این سلول‌ها بعد از گذشت ۹٦ ساعت از کشت در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55، با روش ELISA مورد سنجش قرار گرفت.

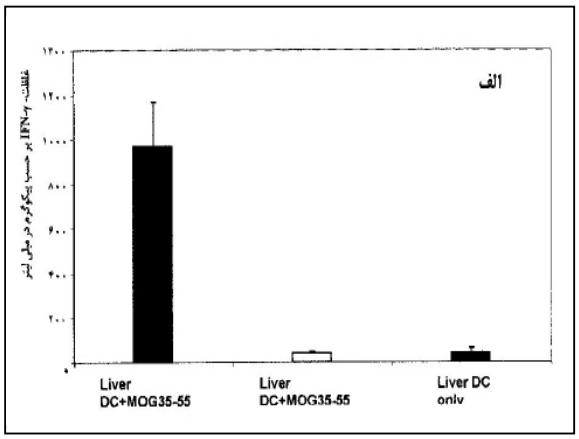
نتایج نشان داد که میانگین میزان تولید IFN-γ در مایع رویی کشت سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 به ترتیب ۲۵۰±۱۳۲۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ۱٦±۳۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین تفاوت معنی‌داری در میانگین تولید IFN-γ توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده(۲۵۰±۱۳۲۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) و پالس نشده(۱۰±۲۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) مشاهده گردید ($p=٠/٠٠٢$)،(نمودار شماره ۲- الف).

میزان تولید IFN-γ توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده(۲۰۰±۹٦۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر) و پالس نشده(۸±٤۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر) به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت بود($p=٠/٠٠٣٧$)،(نمودار شماره ۳- الف).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]



نمودار شماره ۲- الف: میانگین تولید IFN-γ توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده با پپتید MOG35-55(Spleen DCs+MOG35-55) و پالس‌نشده(Spleen DCs only) در حضور(■) و عدم حضور(□) آنتی‌ژن اختصاصی

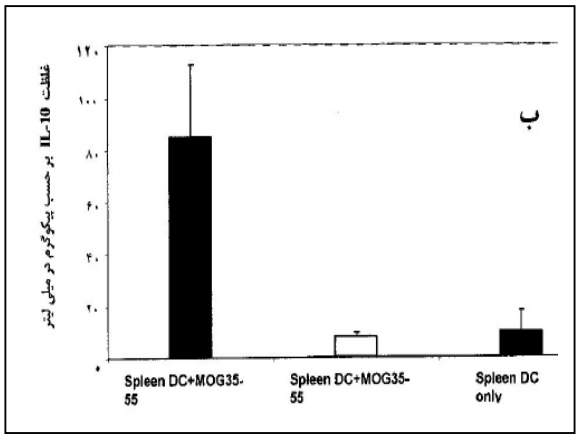


نمودار شماره ۳- الف: میانگین تولید IFN-γ توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده با پپتید MOG35-55(Liver DCs+MOG35-55) و پالس‌نشده (Liver DCs only) در حضور(■) و عدم حضور(□) آنتی‌ژن اختصاصی

در هر صورت نتایج به دست آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میانگین IFN-γ تولید شده توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی و طحالی وجود نداشت.

نتایج به دست آمده از غلظت IL-10 در مایع رویی کشت سلولی نشان داد که میزان تولید IL-10 در مایع رویی کشت سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده در حضور و عدم حضور پپتید به ترتیب ۳۰±۸۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر و ۵±۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین تفاوت معنی‌داری در میانگین تولید IL-10 توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده و پالس نشده مشاهده گردید($p=۰/۰۰٤$)، (نمودار شماره ۲- ب).

میزان تولید IL-10 توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده (۵۰±۲٦۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) و پالس نشده(۷±۱٦ پیکوگرم در میلی‌لیتر) به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت بود ($p=۰/۰۰۳۵$)، (نمودار شماره ۳- ب).



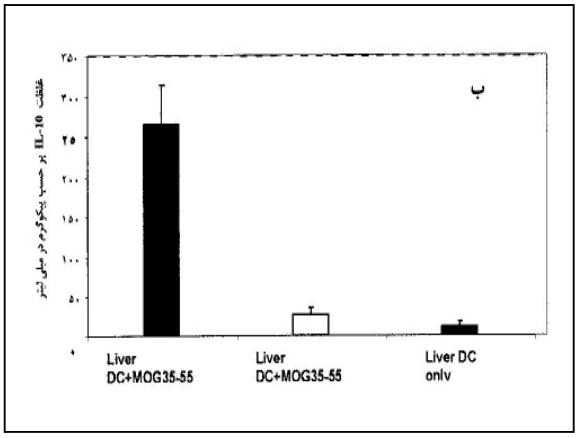
نمودار شماره ۲- ب: میانگین تولید IL-10 توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده با پپتید MOG35-55(Spleen DCs+MOG35-55) و پالس‌نشده(Spleen DCs only) در حضور(■) و عدم حضور(□) آنتی‌ژن اختصاصی

همچنین نتایج به دست آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میانگین IL-10 تولید شده توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی (۵۰±۲٦۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) و طحالی(۳۰±۸۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) وجود داشت($p=۰/۰۱۷$).

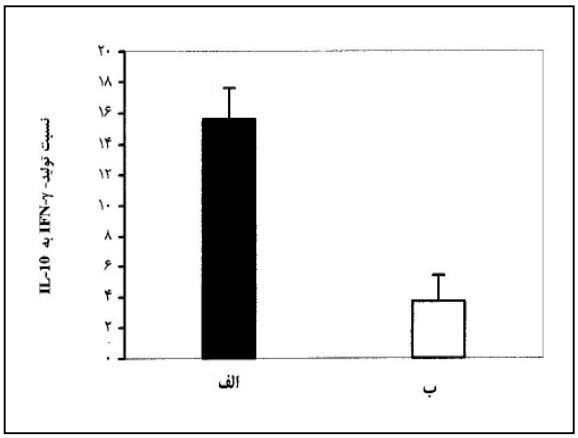
با مقایسه نسبت IFN-γ به IL-10 تولید شده توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک طحالی(۱۵/٦) و کبدی(۳/۷) مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری در میانگین نسبت IFN-γ به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

IL-10 تولید شده و در دو گروه وجود داشت(p=۰/۰۱٤)، (نمودار شماره ٤).



نمودار شماره ۳- ب: میانگین تولید IL-10 توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده با پپتیدMOG35-55(Liver DCs+MOG35-55) و پالس‌نشده (Liver DCs only) در حضور(■) و عدم حضور(□) آنتی‌ژن اختصاصی



نمودار شماره ۴- مقایسه میانگین نسبت تولید IFN-γ به IL-10 توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی(الف) و کبدی(ب) پالس شده با پپتید MOG35-55

بحث

حاصل میان کنش سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌هایT، تکثیر لنفوسیت و تولید دستجات سیتوکینی توسط این سلول‌ها می‌باشد. فعال شدن و تکثیر لنفوسیت‌های T ممکن است به تولرانس یا پاسخ ایمنی منجر شود.[۱٤] چگونگی القای لنفوسیت‌های T عمل کننده یا تنظیم کننده و یا لنفوسیت‌های T که الگوی سیتوکینی متفاوتی را تولید می‌کنند توسط سلول‌های دندریتیک مشخص نیست. گزارشات متعددی وجود دارد که نشان دهنده دخالت سلول‌های دندریتیک در هدایت پاسخ‌های ایمنی به سمت سلول‌های TH_1 یا TH_2 می‌باشد.[۱۵و ۱٦]

در این مطالعه با اندازه‌گیری غلظت سیتوکین‌های IFN-γ و IL-10 تولید شده توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلل‌های دندریتیک طحالی و کبدی پالس شده با پپتید MOG35-55 مشخص گردید که غلظت سیتوکین‌های فوق در موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک طحالی یا کبدی پالس شده با پپتید MOG35-55 در مقایسه با موش‌هایی که فقط سلول‌های دندریتیک را دریافت نموده بودند به طور معنی‌داری بیش‌تر بود. از طرفی در موش‌هایی که با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده با پپتید MOG35-55 ایمونیزه شده بودند، مقدار تولید IFN-γ (۲۵۰±۱۳۲۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) توسط سلول‌های تک هسته‌ای در مقایسه با مقدار IL-10 (۳۰±۸۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) به طور قابل ملاحظه‌ای بیش‌تر بود. IFN-γ نقش مهمی در هدایت پاسخ به سمت سلول‌های TH_1 دارد و به نظر می‌رسد که سلول‌های دندریتیک طحالی باعث القا پاسخ در سلول‌های TH_1 می‌شوند.[۱۷] مطالعات انجام شده قبلی نیز نشان می‌دهند که سلول‌های دندریتیک طحالی پاسخ‌های سلول‌های TH_1 را القا می‌کنند.[۱۸]

سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده نیز توانایی تحریک تولید IFN-γ و IL-10 را دارند. نتایج نشان داد که مقدار تولید IFN-γ(۲۰۰±۹٦۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با میزان تولید IL-10(۵۰±۲٦۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده بیش‌تر بود.

هر چند در مقدار تولیدIFN-γ توسط سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک طحالی و کبدی تفاوت زیادی وجود نداشت، اما میزان تولید IL-10 در موش‌هایی که سلول‌های دندریتیک کبدی پالس

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

شده با پپتید MOG35-55 را دریافت نموده بودند(۵۰±۲۶۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با گروهی که با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده ایمونیزه شده بودند(۳۰±۸۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری بیش‌تر بود (p=۰/۰۱).

میانگین نسبت تولید IFN-γ به IL-10 در موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی، ۹۶۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر به ۲۶۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر (۳/۷) بود. در حالی که این نسبت در موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی حدود ۱۵/۶ بود. این نتایج بیان می‌کند که سلول‌های دندریتیک کبدی توانایی بیش‌تری در تحریک تولید IL-10 دارند و احتمالاً پاسخ سلول‌های TH_2 را القا می‌کنند. این احتمال وجود دارد که خصوصیت تولروژنیک بودن کبد به دلیل تولید مقادیر بیش‌تر IL-10 باشد. چرا که این سیتوکین نقش مهمی در تنظیم و مهار پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کند.[۱۹و ۲۰]

Khanna و همکاران نشان دادند که تجویز سلول‌های دندریتیک کبدی به حیوان آلوژنیک باعث افزایش انتخابی تولید IL-10 در بافت‌های لنفاوی ثانویه می‌شود، در حالی که سلول‌های دندریتیک مشتق از مغز استخوان باعث افزایش تولیدIFN-γ می‌شوند.[۲۱] سلول‌های دندریتیک جدا شده از بافت‌های غیر لنفاوی دیگر مانند پلاک‌های پی‌یر و ریه موش نیز باعث القای پاسخ در سلول‌های TH_2 می‌شوند.[۸، ۲۲و ۲۳] هر چند سیگنال‌های ایجاد شده توسط سلول دندرتیک که موجب هدایت پاسخ ایمنی به سمت سلول‌هایTH_1 یا TH_2 می‌شوند مشخص نیست، اما عوامل مختلفی از جمله فاکتورهای ریز محیطی (بافتی که سلول دندریتیک در آن پرورش می یابد) در هدایت پاسخ ایمنی نقش دارند.[۲۴و ۲۵]

مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های دندریتیک مشتق از مغز استخوان نشان می‌دهد که با استفاده از ترکیبات مختلف سیتوکینی، می‌توان بر عملکرد سلول‌های دندریتیک تاثیر گذاشت. Sato و همکاران نشان دادند، سلول‌های دندریتیک رده لنفوییدی در شرایط مختلف کشت می‌توانند پاسخ‌های سلول‌های TH_1 یا TH_2 را القا کنند.[۲۶]

این مطالعه این فرضیه را تایید می‌کند که فاکتورهای ریز محیطی در مقایسه با منشای سلول‌های دندریتیک، نقش موثرتری را در هدایت پاسخ‌های ایمنی به عهده دارند.

در مجموع با توجه به یکسان بودن نسبت سلول‌های دندریتیک رده لنفوییدی و میلوییدی در طحال و کبد (نتایج ذکر نشده)، ممکن است هتروژن بودن سلول‌های دندریتیک و یا توانایی متفاوت زیر دسته‌های مختلف سلول‌های دندریتیک در این دو بافت در تحریک تولید سیتوکین، از دلایل تفاوت پاسخ‌های ایمنی در این بافت‌ها باشد. همچنین ممکن است ریز محیطی که سلول دندریتیک در آن پرورش می‌یابد با ایجاد سیگنال‌های خاص در مرحله انتهایی تمایز لنفوسیت‌های T_H در هدایت پاسخ به سمت سلول‌های TH_1 یا TH_2 موثر باشد. هر چند سلول‌های دندریتیک کبد و طحال موجب تولید هر دو دسته سیتوکین می‌شوند ولی به نظر می‌رسد که برآیند این سیتوکین‌ها تعیین کننده ماهیت پاسخ ایمنی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نقش سلول‌های دندرتیک کبد و طحال در القای پروفایل سیتوکین می‌توان با کشت سلول‌های دندریتیک در شرایط آزمایشگاهی در مجاورت سیتوکین‌های خاص به نوع پاسخ ایمنی مناسب(تولرانس یا پاسخ ایمنی) دست یافت و جهت درمان بیماری‌های خودایمن استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی اراک در قالب طرح تحقیقاتی(سال ۱۳۸۳) انجام گردیده است، که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز و جناب آقای دکتر وائیلی و سرکار خانم طباطبایی کارشناسان محترم انتقال خون تهران که در انجام فلوسیتومتری نهایت همکاری را عنایت فرمودند، ابراز می‌دارند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

منابع

1- Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. Pathol Biol (Paris); 2003 Mar. 51(2): 59-60.

2- Reid SD, Penna G, Adorini L.The control of T cell responses by dendritic cell subsets. Curr Opin Immunol; 2000 Feb.12(1): 114-21.

3- Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. J Leukoc Biol; 1999 Aug. 66(2): 205-8.

4- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol; 1991. 9: 271-96.

5- Sozzani S, Mantovani A, Allavena P. Control of dendritic cell migration by chemokines. Forum (Genova); 1999 Oct-Dec. 9(4): 325-38.

6- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol; 2000. 18: 767-811.

7- Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. Ann N Y Acad Sci; 2003 Apr. 987:15-25.

8- Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. J Exp Med; 1999 Jul 19. 190(2): 229-39.

9- Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, et al. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. J Exp Med; 1998 Dec 7. 188(11): 2019-31.

10- Shortman K, Wu L, Ardavin C, Vremec D, Stozik F, Winkel K, et al. Thymic dendritic cells: surface phenotype, developmental origin and function. Adv Exp Med Biol; 1995. 378: 21-9.

11- Vremec D, Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. J Immunol. 1997; Jul 15. 159(2): 565-73.

12- Rao AS, Roake JA, Larsen CP, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Isolation of dendritic leukocytes from non-lymphoid organs. Adv Exp Med Biol; 1993. 329: 507-12.

13- Agger R, Crowley MT, Witmer-Pack MD. The surface of dendritic cells in the mouse as studied with monoclonal antibodies. Int Rev Immunol; 1990. 6(2-3): 89-101.

14- Ni K, O'Neill HC. The role of dendritic cells in T cell activation. Immunol Cell Biol; 1997 Jun. 75(3): 223-30.

15- Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal.Immunol Today; 1999 Dec. 20(12): 561-7.

16- Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol; 2000 Sep. 1(3): 199-205.

17- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. J Immunol; 2000 Mar 15. 164(6): 2978-86.

18- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, et al. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. J Exp Med; 1992 Jul 1. 176(1): 47-58.

19- Thomson AW, O'Connell PJ, Steptoe RJ, Lu L. Immunobiology of liver dendritic cells. Immunol Cell Biol; 2002 Feb. 80(1): 65-73.

20- Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. Gut; 2003 Feb. 52(2): 307-14.

21- Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. J Immunol; 2000 Feb 1. 164(3): 1346-54.

22- Kelsall BL, Strober W. The role of dendritic cells in antigen processing in the Peyer's patch. Ann N Y Acad Sci; 1996 Feb 13. 778: 47-54.

23- Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, et al. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. J Exp Med; 1998 Dec 7. 188(11): 2019-31.

24- Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. J Immunol; 1999 Mar 15. 162(6): 3231-6.

25- Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. J Immunol; 2000 May 1. 164(9): 4507-12.

26- Sato M, Takayama T, Tanaka H, Konishi J, Suzuki T, Kaiga T, et al. Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2). Cancer Sci; 2003 Dec. 94(12): 1091-8.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

The Role of Spleen and Liver Dendritic Cells in Induction of TH_1 and TH_2 Responses

*G. Mosayebi, PhD [I] S.M. Moazzeni, PhD [II] M.H. Sanati, PhD [III]

Abstract

Background & Objective: Dendritic cells(DCs) play an important role in directing immune response toward TH_1(T-Helper 1) or TH_2(T-Helper 2). These cells may induce distinct cytokine patterns in different tissues. So the pattern of cytokine induction by liver and spleen DCs may differ from each other. To investigate the difference between immune responses in the liver(as a non-lymphoid organ and tolerogenic tissue) and the spleen(as a lymphoid organ and an immunogenic tissue), we analyzed the function of spleen and liver DCs in the induction of TH_1 and TH_2 immune responses.

Method: DCs were isolated from the liver and spleen of normal C57BL/6 mice by enzymatic digestion and nycodenz centrifugation gradient. Isolated DCs were pulsed with a proper concentration of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide(MOG35-55). About 6×10^5 pulsed DCs from liver and spleen were injected to the footpad of two different groups of mice. Unpulsed DCs were injected to the control group. After 5 days, mononuclear cells(MNCs) of the poplital lymph nodes were isolated from immunized mice and cultured in the presence and absence of MOG35-55 for 96 hours. The supernatant of the cultured cells was collected and the amount of produced cytokines(IL-10: Interleukin-10 and IFN-γ: Interferon gamma) was measured by ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Results: Our findings showed that IL-10 and IFN-γ production in mice immunized with DCs pulsed with MOG35-55 was significantly higher than the control group($p=0.004$). There was no significant difference in IFN-γ production between mice immunized with liver DCs and those immunized with splenic DCs, but the amount of IL-10 production in the first group was higher than the second group($p=0.01$).

Conclusion: It seems that higher IL-10 production induced by liver DCs may be one of the main factors in down regulation of immune responses in this organ.

Key Words: 1) Dendritic Cells 2) TH_1 and TH_2 Responses 3) Liver 4) Spleen

I) *Assistant Professor of Immunology. Faculty of Medicine. Arak University of Medical Sciences and Health Services. Arak, Iran. (*Corresponding Author)*

II) *Associate Professor of Immunology. Faculty of Medical Sciences.Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.*

III) *Associate Professor of Human Genetics. National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]