مقایسه سلول‌های دندریتیک کبد و طحال موش در القای پاسخ تکثیرلنفوسیتی

دکتر قاسم مسیبی[1]، دکتر سید محمد مؤذنی[2]

چکیده

مقدمه: سلول‌های دندریتیک در القاء پاسخ ایمنی سلولی نقش اساسی را ایفا می‌کنند. مطالعات نشان می دهد که در بافت‌های مختلف نوع پاسخ ایمنی متفاوت می‌باشد. این احتمال وجود دارد که توانایی سلول‌های دندریتیک در القاء پاسخ تکثیری در بافت‌های مختلف یک سان نباشد و ممکن است خصوصیت تولروژنیک ذاتی کبد نیز بخاطر عدم توانایی سلول‌های دندریتیک کبدی در القاء پاسخ ایمنی باشد.

روش کار: در این مطالعه سلول‌های دندریتیک طحال (بافت لنفاوی) و کبد (بافت غیر لنفاوی) موش نرمال C57BL/6 با روش هضم آنزیمی و محیط گرادیان نایکودنز جدا و در محیط کشت با غلظت مناسبی از پپتید میلین الیگودندروسیت گلیکوپروتئین ۵۵-۳۵ [3] پالس گردید. حدود ۶×۱۰^{۵} سلول دندریتیک کبدی و طحالی پالس شده به طور مجزا و به صورت زیر جلدی به کف پای هر موش تجویز گردید. به گروه‌های کنترل نیز سلول‌های دندریتیک پالس نشده تزریق شد. پس از گذشت ۵ روز، سلول‌های تک هسته‌ا ی غدد لنفاوی ناحیه‌ای پشت زانویی[4] موش‌های ایمونیزه جدا و میزان پاسخ تکثیری این سلول‌ها در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 ارزیابی گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان پاسخ تکثیری 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 ($p< ۰/۰۰۴$). از طرفی تفاوت معنی‌داری در میزان تکثیر سلولی بین موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبد و طحال مشاهده نشد.

نتیجه گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های دندریتیک کبد و طحال بخوبی قادرند در محیط کشت، با آنتی ژن پالس شده و پاسخ تکثیری مناسبی را القاء کنند. عدم تفاوت در توانائی سلول‌های دندریتیک کبد و طحال در القاء پاسخ تکثیری ممکن است مبین این موضوع باشد که نوع پاسخ در شرایط داخل بدن[5] و خارج بدن[6] متفاوت است و فاکتورهای ریز محیطی بافتی می‌توانند بر سرنوشت پاسخ ایمنی تاثیر گذار باشند.

واژگان کلیدی: سلول‌های دندریتیک، پاسخ تکثیرلنفوسیتی، کبد، طحال

مقدمه

سلول‌های دندریتیک[7] در تحریک پاسخ ایمنی اولیه سلولی نقش مهمی را به عهده دارند. این سلول‌ها قادرند آنتی ژن‌ها را از قسمت‌های مختلف بدن ازجمله پوست جمع آوری و به بافت‌های لنفاوی ثانویه منتقل و با عرضه به لنفوسیت‌های T باعث تحریک پاسخ ایمنی سلولی شوند. قدرت سلول‌های دندریتیک در تحریک لنفوسیت‌های T دست نخورده به دلیل بروز بالای مولکولهای کمک تحریکی و MHC [8] نوع دوم در مقایسه با سایر سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن بیشتر است و به همین دلیل نقش اساسی در شروع پاسخ‌های

۱- استادیار،گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک.

۲ – دانشیار، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

3- MOG35-55: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein.

4 – Popliteal.

5 – In vivo.

6 – Ex vivo.

7- DCs: Dendritic Cells.

8- Major histocompatibility complex

ایمنی سلولی ایفا می‌کنند(۱، ۲). در مقابل، سلول‌های دندریتیک مستقر در تیموس با عرضه آنتی ژن‌های خودی به لنفوسیت T در حال تکامل باعث حذف لنفوسیت T خود واکنش‌گر[1] می‌شوند. این فرآیند یکی از مکانیسم‌های مهم تولرانس مرکزی محسوب می‌شود(۳). سلول‌های دندریتیک هم‌چنین در کنترل پاسخ ایمنی و حفظ تحمل محیطی نقش دارند(٤، ٥). به هر حال وجود گزارشات متعدد مبنی بر دخالت سلول‌های دندریتیک در القاء تولرانس یا ایجاد پاسخ ایمنی، نشان از عملکرد دوگانه این سلول‌ها دارد(٦). این دوگانگی در عملکرد را به فاکتورها و عوامل مختلفی از جمله مراحل تمایزی و فنوتیپ سلول دندریتیک و ریز محیطی یا بافتی که سلول در آن مستقر است نسبت می‌دهند.

مطالعه سلول‌های دندریتیک در بافت‌های مختلف از اهمیت خاصی به خصوص در زمینه پیوند اعضاء برخوردار است. بافت‌های لنفاوی ثانویه از جمله طحال و غدد لنفاوی مکان‌های ایمونولوژیکی هستند که شروع پاسخ ایمنی در آنجا اتفاق می‌افتد. غالباً سلول‌های دندریتیک در این اندام‌ها ایمونوژنیک هستند. در حالی که در تیموس سلول‌های دندریتیک باعث القاء تولرانس می‌شوند(۷).

مطالعات انجام شده برروی بافت‌های دیگر از جمله ریه، کبد، کلیه و غدد لنفاوی نشان از تفاوت پاسخ‌های ایمنی در این اعضاء دارد. شاید دلیل این تفاوت ناشی از تفاوت در عملکرد سلول‌های دندریتیک مستقر در آن بافت باشد.

کبد مکان مهمی برای بیماری‌های عفونی، انگلی، بیماری‌های خود ایمن و سرطان‌ها می‌باشد. هم‌چنین خاصیت تولروژنیک ذاتی کبد در پیوند، بر اهمیت مطالعه سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن در این عضو می‌افزاید.

در این مطالعه عملکرد سلول‌های دندریتیک طحال (به عنوان یک بافت لنفاوی) و کبد (به عنوان یک بافت غیر لنفاوی) در القا پاسخ تکثیری مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی است که برروی موش‌های خالص نژاد C57BL/6 با محدود سنی ۸-۶ هفته صورت گرفت.

آنتی ژن، 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 درصد بود. این پپتید از شرکت دیافارم[2] روسیه به سفارش مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی خریداری گردید.

برای جدا سازی DCs از روش ورمک[3] و همکاران با تغییراتی در این مطالعه استفاده شد(۸). اختصاراً بعد از نخاعی نمودن موشها با رعایت شرایط استریل، طحال آن‌ها برداشته شد (در هر بار آزمایش از ٤ تا ٥ طحال استفاده شد). بافت‌های طحالی در ۱۰-۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 (گیبکو[4]) حاوی ۲ درصد FCS[5] (گیبکو)، ۱ میلی گرم در میلی لیتر آنزیم کلاژناز (رش[6]) و ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر آنزیم DNase (رش) با قیچی جراحی تیزی کاملاً خرد گردیده و به مدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷

1 - Autoreactive.

2 - Diapharm.
3 - Vermec.
4 - GIBCO.
5 -Fetal calf serum.
6 -Roche.

درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند. سوسپانسیون سلولی بدست آمده از یک طوری سیمی[1] با منافذی به قطر ۰/۱ میلی‌متر عبور داده شد تا قطعات بافتی هضم نشده جدا گردد. سوسپانسیون تک سلولی به مدت ۵ دقیقه با EDTA (مرک[2]) ۵ میلی مولار مخلوط گردید. EDTA از اتصال سلولی و تشکیل کلامپ سلولی جلوگیری می‌کند. سوسپانسیون سلولی دو بار با بافر فسفات سالین[3] سرد حاوی ۲ میلی مولار EDTA شستشو و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و 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 درصد (۱/۰٦۸ گرم در سانتی‌متر مکعب) نایکودنز (فارما[4]) برده و به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ٦۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در این مرحله سلول‌های با دانسیته کم ازجمله DCs در روی محیط گرادیان باقی می‌مانند. این سلول‌ها با دقت توسط پیپت پاستور برداشته شد و دو بار مثل مرحله قبل شستشو و سانتریفیوژ گردید. پلت سلولی در محیط کشت کامل حاوی ۱۰ درصد FCS بصورت سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^{۷} سلول در میلی‌لیتر در آمد. درون هر پتری دیش ٦۰ میلی‌متری، ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی فوق ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه گردید. در طی این مدت سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها به کف پلیت متصل می‌شوند. با شستشوی آرام پلیت، سلول‌های غیر چسبان (لنفوسیتها) حذف شد. این عمل باید با PBSیا محیط RPMI گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انجام شود. اگر میزان خلوص سلول‌های دندریتیک کم باشد می توان عمل شستشو را بعد از نیم ساعت انکوباسیون، مجددا انجام داد. سلول‌های چسبیده به پلیت به مدت ۱۸ ساعت در محیط کشت کامل و انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شدند. در این مدت سلول‌های دندریتیک پس از بالغ شدن از کف پلیت جدا می‌شوند. این سلول‌ها جمع‌آوری و با روش فلوسیتومتری مشخص شد که ۹۵-۹۰ درصد این سلول‌ها واجد مارکر CD11c (شاخص سلول‌های دندریتیک در موش) هستند.

جهت جداسازی سلول‌های دندریتیک کبدی از روش رائو[5] و همکاران با تغییراتی در این بررسی استفاده شد(۹). اختصاراً، پس از بیهوشی حیوان با کتامین، یک شکاف در طول شکم ایجاد شد. به منظور پرفیوژ کبد، ۳۰-۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سرد از طریق ورید اجوف تحتانی به حیوان تزریق گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول کلاژناز (حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژنازD) به داخل کبد تجویز و بلافاصله کبد خارج و در محلول کلاژناز خرد گردیده و به مدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند. سوسپانسیون سلولی بدست آمده از یک طوری سیمی با منافذی به قطر۰/۱ میلی‌لیتر عبور داده شد تا قطعات بافتی هضم نشده جدا گردد. جهت جداسازی سلول‌های غیر پارانشیمی از محیط گرادیان نایکودنز ۱٤/۵ درصد استفاده شد. سلول‌های بین فازی جمع آوری و پس از شستشو، سوسپانسیون تک سلولی به مدت یک شب در

1 -Cell mesh.
2 - Merk.
3 - PBS.
4 - Pharma.
5 - Rao.

محیط کشت کامل حاوی ۱۰ درصد FCS کشت داده شدند. پس از کشت شبانه سلول‌های شناور جمع آوری و مجدد بر روی محیط گرادیان نایکودنز ۱۳ درصد برده شد و ۱۵ دقیقه در دور g ۶۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در این مرحله سلول‌های با دانسیته کم از جمله DCs در روی محیط گرادیان باقی می‌مانند، این سلول‌ها با دقت توسط پی پت پاستور برداشته شد و به عنوان سلول‌های دندریتیک مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که بیش از ۷۰ درصد این سلول‌ها $CD11c^+$ می‌باشند.

سلول‌های دندریتیک طبق روش ذکر شده در قسمت مربوطه، از کبد و طحال موش C57BL/6 جدا شدند.

طی کشت ۱۸ ساعته در طول شب[1]، به محیط کشت این سلول‌ها ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پپتید MOG35-55 اضافه گردید. بعد از کشت شبانه، سلول‌های دندریتیک جمع آوری و مجدد به مدت ٦-۳ ساعت در محیط کشت بدون FCS با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پپتید MOG35-55 مجاور شدند. جهت حذف پپتیدهای مصرف نشده، سلول‌ها سه بار با بافر فسفات سالین شسته شدند. تعداد DCs $۱۰^٥ \times ۳$ در حجم ۳۰ میکرولیتر بافر فسفات به کف هر پای موش C57BL/6 تجویز گردید (به هر موش DCs ٦×۱۰^٥). به گروه کنترل DCs کشت داده شده در غیاب آنتی ژن تزریق شد. در هر گروه ۷ راس موش در نظر گرفته شد.

بعد از گذشت ۵ روز از زمان ایمونیزاسیون، موش‌های هر دو گروه نخاعی شده و با استفاده از وسایل تشریح، غدد لنفاوی پشت زانویی خارج و بطور جداگانه با له کردن غدد و عبور از طوری سیمی سوسپانسیون تک سلولی تهیه شد(۱۰). سوسپانسیون مذکور بر روی محیط لیمفو پرپ[2] (۱/۰۷۷ گرم در سانتی متر مکعب)، (بیوتست، آلمان[3]) به منظور جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای برده شد و در دور g۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول‌های بین فازی جدا و بعد از شستشو ، یک سوسپانسیون سلولی ۱×۱۰^٦ سلول در میلی لیتر با محیط کشت کامل تهیه گردید. به هر حفره از میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای کشت سلول مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی مذکور ریخته و مقدار ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پپتید MOG35-55 بصورت سه تائی[4] به حفره‌ها اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور کشت سلول انکوبه گردیدند. بعد از ۷۲ ساعت کشت لنفوسیت‌ها در حضور و عدم حضور آنتی ژن، به محیط کشت ۱μCi/well تایمیدین نشان دار[5] (آمرشام[6]) اضافه و ۱۸ ساعت بعد سلول‌ها توسط دستگاه cell harvester (تیترتک[7]) بر روی فیلتر مخصوص هاروست شدند. میزان جذب تایمیدین توسط سلول‌های تکثیر شده با دستگاه بتا کانتر اندازه‌گیری و میانگین نتایج بر حسب شمارش در دقیقه گزارش گردید. بعنوان کنترل مثبت از فیتوهماگلوتینین با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد.

برای مقایسه میانگین میزان پاسخ تکثیری از آزمون من- ویتنی- یو استفاده گردید. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

1 -Over night

2 - LymphoPrep
3 - Biotest, Germany.
4 - triplicate.
5 - H-thymidine.
6 - Amersham.
7 - Titertek.

نتایج

در ارتباط با تعیین غلظت مناسب پپتید MOG35-55 جهت پالس نمودن سلول‌های دندریتیک نتایج نشان داد که پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای موش‌هایی که سلول‌های دندریتیک پالس شده در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را دریافت نموده بودند بیشتر می‌باشد (نمودار۱).

با توجه به اینکه شیب نمودار تا غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر شدید بوده و از آن غلظت به بعد شیب آن کاهش یافته و با افزایش غلظت پپتید میزان شمارش در دقیقه افزایش چندانی نمی‌یابد و از طرفی با توجه به گران بودن پپتید، غلظت قابل قبول جهت پالس نمودن ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در نظر گرفته شد و در ادامه آزمایشات نیز از این غلظت استفاده گردید.

هم‌چنین در ارتباط با مقایسه توانایی سلول‌های دندریتیک کبد و طحال در القاء پاسخ تکثیری نتایج نشان داد که میانگین تکثیر لنفوسیتی موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 به ترتیب ۲۰۰۰±۱۰۳۰۰ شمارش در دقیقه و ۳۰۰±۱۱۲۰ شمارش در دقیقه بود که از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار می‌باشد(p=۰/۰۰٤) (نمودار۲).

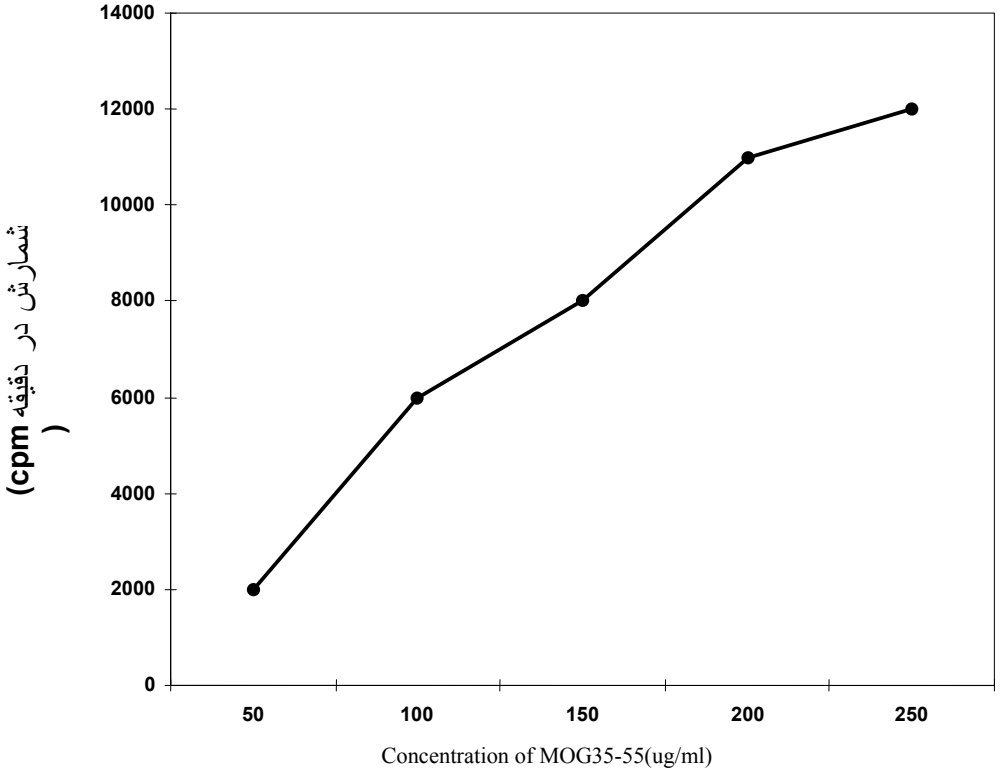
پاسخ تکثیری سلول‌های لنفوسیتی موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس نشده در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 نیز به ترتیب ۲۰۰±۱۰۰۰ شمارش در دقیقه و ۲٦۰±۱۲٤۰ شمارش در دقیقه بود(نمودار۲).

نتایج آنالیز آماری نشان داد که میزان تکثیر لنفوسیتی موش‌هایی که با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده ایمونیزه شده بودند در مقایسه با موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس نشده بطور معنی‌داری بیشتر است (p=۰/۰۰٤). هم‌چنین میانگین تکثیر لنفوسیتی در موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده در حضور پپتید MOG35-55، ۳۰۰۰±۸۲۰۰ شمارش در دقیقه و در غیاب پپتید MOG35-55 حدود ۲۷۰±۸۰۰ شمارش در دقیقه بود، که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود داشت (p=۰/۰۰٤)(نمودار۳).

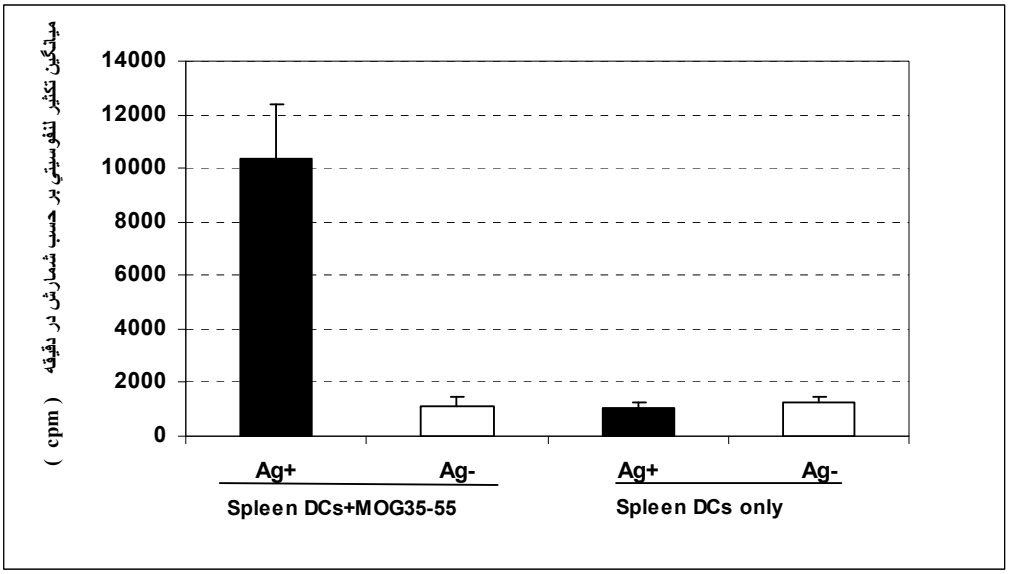
پاسخ تکثیری سلول‌های لنفوسیتی موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس نشده در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 نیز به ترتیب ۵۰±۸۰۰ شمارش در دقیقه و ٦۰±۹٦۰ شمارش در دقیقه بود(نمودار۳).

با مقایسه اندکس تحریکی[1] حاصل از تکثیر لنفوسیتی موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبدی و طحالی مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود ندارد(نمودار٤).

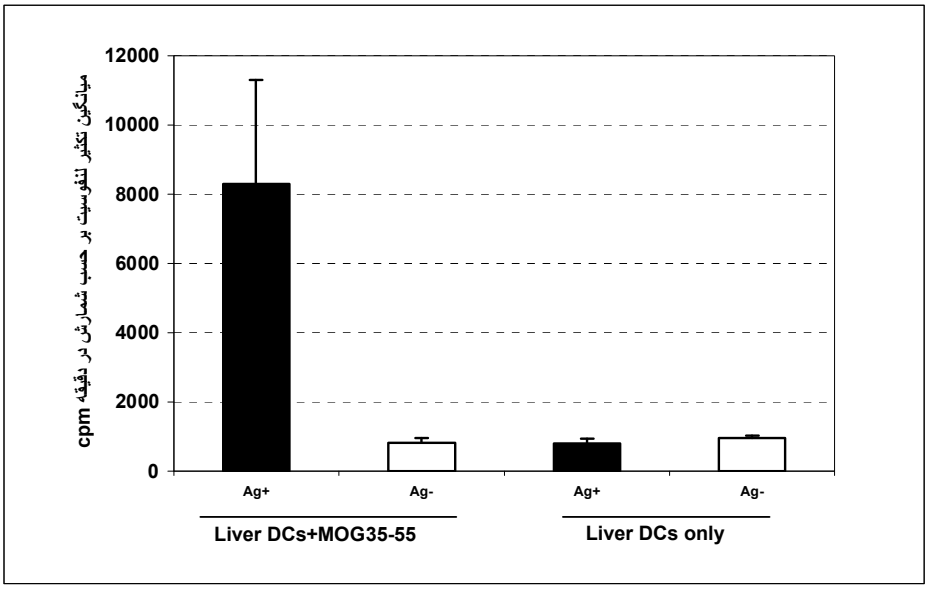
1 - Stimulation index.



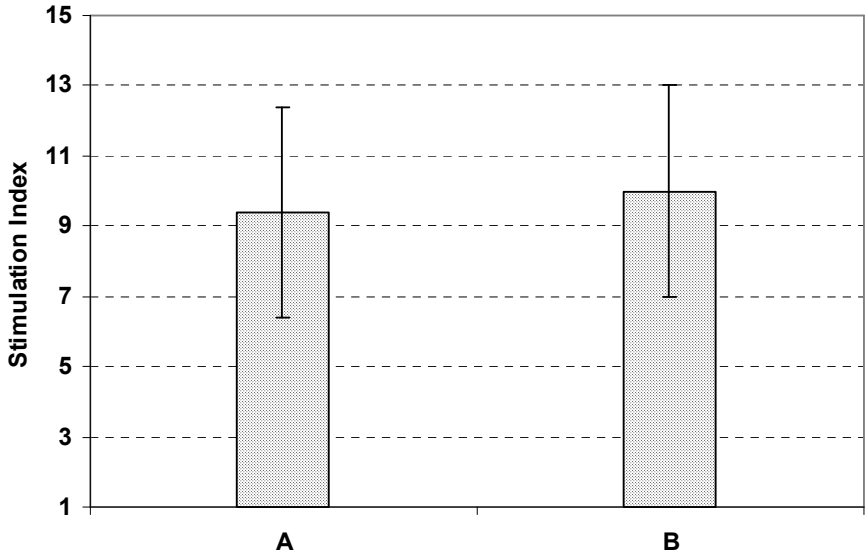
نمودار۱. پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک پالس شده در غلظتهای مختلف پپتید MOG35-55



نمودار۲. مقایسه میانگین تکثیر لنفوسیتی موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده با پپتید MOG35-55 (Spleen DCs+MOG35-55) و پالس نشده (Spleen DCs only) در حضور ■ (+Ag) و عدم حضور□ (-Ag) آنتی ژن اختصاصی نتایج حاصل ۷ آزمایش مجزا می‌باشد.



نمودار۳. مقایسه میانگین تکثیر لنفوسیتی موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده با پپتید MOG35-55 (Liver DCs+MOG35-55) و پالس نشده (Liver DCs only) در حضور ■ (+Ag) و عدم حضور□ (-Ag) آنتی ژن اختصاصی، نتایج حاصل ۷ آزمایش مجزا می‌باشد.



نمودار۴. مقایسه میانگین ضریب تحریک (Stimulation index) لنفوسیت‌های موش‌های ایمونیزه با سلول‌های دندریتیک طحالی (A) و کبدی (B) پالس شده با پپتید MOG35-55

بحث

سلول‌های دندریتیک در تحریک پاسخ ایمنی اولیه سلولی نقش مهمی را به عهده دارند(۱، ۲). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که سلول‌های دندریتیک قادرند در شرایط آزمایشگاهی باعث تکثیر لنفوسیت‌های T اتولوگوس یا لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی ژن شوند. می‌توان این سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی با آنتی ژن (مثلا آنتی ژن سلول‌های توموری) پالس کرد و با تجویز این مجموعه باعث القاء پاسخ ایمنی گردید. فلاماند[1] و همکاران ثابت کردند که تجویز سلول‌های دندریتیک پالس شده با آنتی ژن‌های توموری موجب القاء پاسخ تکثیری لنفوسیتی و پاسخ ایمنی می‌شود(۱۱).

اوکیف[2] و همکاران با کشت سلول‌های دندریتیک در حضور GM-CSF یا Flt_3L در شرایط آزمایشگاهی توانایی این سلول‌ها را در تکثیر لنفوسیتی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که سلول‌های دندریتیک باعث تکثیر لنفوسیت‌های $CD4^+$-T آلوژنیک می‌شوند(۱۲). نیمی[3] و همکاران نیز بیان داشتند که سلول‌های دندریتیک در شرایط آزمایشگاهی قادر به تکثیر لنفوسیت‌های T آلوژنیک می‌باشند در حالی که لنفوسیت‌های B چنین توانایی را ندارند(۱۳).

مطالعات انجام شده بر روی بافت‌های مختلف از جمله طحال نیز بیان می‌کند که سلول‌های دندریتیک این بافتها توانایی القاء پاسخ تکثیری را دارند(۱۴). در مطالعه حاضر با تجویز سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده با پپتید MOG35-55 به موش‌های سینژنیک، مشخص گردید که در موش‌هائی که سلول‌های دندریتیک پالس شده با آنتی ژن دریافت کرده بودند، پاسخ تکثیری لنفوسیت بطور معنی‌داری در مقایسه با گروهی که فقط سلول دندریتیک را دریافت کرده بودند بیشتر بود ($p=۰/۰۰۴$). این نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های دندریتیک در شرایط آزمایشگاهی با آنتی ژن پالس شده و می‌توانند در بدن حیوان موجب تحریک لنفوسیت‌های اختصاصی آنتی ژن شوند.

مورن[4] و همکاران نیز نشان دادند که تزریق سلول‌های دندریتیک طحالی پالس شده با ذرات ویروسی موجب تحریک CD8-T می‌شود(۱۵). سایر محققین نیز در تحقیقات خود نشان داده‌اند که سلول‌های دندریتیک طحال و غدد لنفاوی قادرند در شرایط آزمایشگاهی با آنتی ژن پالس شده و در بدن حیوان سلول‌های T اختصاصی آنتی ژن را تحریک کنند(۱۶، ۱۷).

با مطالعه فعالیت القاء پاسخ تکثیری توسط سلول‌های دندریتیک جدا شده از کبد موش مشخص شد که میزان تکثیر لنفوسیت‌های جدا شده از موش‌های ایمونیزه شده با سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده با پپتید MOG35-55 در مقایسه با موش‌هائی که با سلول‌های دندریتیک کبدی تنها ایمونیزه شده بودند بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر می‌باشد. این نتایج ثابت می‌کند که سلول‌های دندریتیک کبدی نیز می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی با آنتی ژن پالس شده و سبب القاء پاسخ تکثیری گردند. در خصوص توان القاء پاسخ تکثیری و آلواستیمولاتوری سلول‌های دندریتیک کبد نظرات متفاوتی بیان می‌شود. کانا[5] و

1 - Flamand.
2 - O′Keeffe.
3 - Niimi.
4 - Moron.
5 - Khanna.

همکاران نشان دادند که سلول‌های دندریتیک کبدی در مقایسه با سلول‌های دندریتیک منتج از مغز استخوان پاسخ تکثیری و سیتوتوکسیک ضعیف‌تری را در لنفوسیت‌های T آلوژنیک القاء می‌کنند(۱۸). در مطالعه دیگر نشان داده شد که هر دو زیر دسته سلول‌های دندریتیک کبدی فعالیت آلواسیمولاتوری قوی از خود نشان می‌دهند(۱۲). نتایج این مطالعه نشان داد که توان القاء پاسخ تکثیری سلول‌های دندریتیک کبد و طحال تقریباً یکسان است و این نشان می‌دهد که سلول‌های دندریتیک کبد نیز مثل اعضاء لنفاوی قدرت تکثیر لنفوسیتی را دارند. یکی از دلایل تناقض در نتایج مطالعات صورت گرفته به مرحله تمایزی سلول‌های دندریتیک کبدی مورد استفاده مربوط می‌شود. گزارشات دیگران ثابت می‌کند سلول‌های دندریتیک تازه جدا شده از کبد فنوتیپ نابالغ را دارند و به دلیل کاهش بیان مولکول‌های کمک تحریکی و MHC نوع دوم توان القاء پاسخ تکثیری ضعیفی دارند(۲۲-۲۰).

این احتمال را می‌توان مطرح نمود که سلول‌های دندریتیک کبدی پالس شده نیز پس از تزریق به کف پای موش و مهاجرت به غدد لنفاوی ناحیه‌ای غالباً فنوتیپ بالغ را پیدا کرده و قادرند به خوبی باعث القاء پاسخ تکثیری گردند.

در مجموع با توجه به یکسان بودن توان القاء پاسخ تکثیری سلول‌های دندریتیک در طحال و کبد به نظر می‌رسد آنچه که باعث تفاوت پاسخ‌های ایمنی در این دو بافت و یا بافت‌های دیگر می‌شود، تاثیر فاکتورهای ریز محیط بافتی است که با اثر بر ادامه مراحل تمایزی لنفوسیت‌های T موجب شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمت T_H1 یا T_H2 می‌شود.

بنابر این بررسی عوامل ریز محیطی می‌تواند به درک بهتر پاسخ‌های ایمنی در بافتها به ما کمک کند.

تشکر و قدردانی

در پایان از استاد ارجمند جناب آقای دکتر صنعتی مسئول مرکز تحقیقات ملی ژنتیک که در تهیه پپتید به ما کمک نمودند، سرکار خانم طباطبائی، کارشناس محترم بخش فلوسیتومتری سازمان انتقاللون (پایگاه ویلا) و جناب آقای دکتر شهرا م وائلی همکار محترم بخش فلوسیتومتری که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را عنایت فرمودند تقدیم و تشکر می‌نمائیم.

منابع

1. Ni K, O'Neill HC. The role of dendritic cells in T cell activation. Immunol Cell Biol 1997; 75 (3): 223-30.
2. Knight SC, Burke F, Bedford PA. Dendritic cells, antigen distribution and the initiation of primary immune responses to self and non-self antigens. Semin Cancer Biol 2002;12(4):301-8.
3. Shortman K, Wu L, Ardavin C, et al. Thymic dendritic cells: surface phenotype, developmental origin and function. Adv Exp Med Biol 1995;378:21-9.
4. Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. Pathol Biol (Paris) 2003; 51 (2): 59-60.
5. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med 2001;194(6):769-79.
6. Moser M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? Immunity 2003;19(1):5-8.
7. Vremec D, Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-

exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. J Exp Med 2002; 195(10):1233-45.
16. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, et al. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. J Exp Med 1990; 172(2):631-40.
17. Crowley M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. J Exp Med 1990; 172(1):383-6.
18. Khanna A, Morelli AE, Zhong C, et al. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. J Immunol 2000; 164(3):1346-54.
19. Morelli AE, O'Connell PJ, Khanna A, et al. Preferential induction of Th1 responses by functionally mature hepatic (CD8alpha- and CD8alpha+) dendritic cells: association with conversion from liver transplant tolerance to acute rejection. Transplantation 2000; 69(12):2647-57
20. Thomson AW, O'Connell PJ, Steptoe RJ, et al. Immunobiology of liver dendritic cells. Immunol Cell Biol 2002; 80(1):65-73.
21. Rastellini C, Lu L, Ricordi C, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-stimulated hepatic dendritic cell progenitors prolong pancreatic islet allograft survival. Transplantation 1995; 60(11):1366-70.
22. Abe M, Kajino K, Akbar SM, et al. Loss of immunogenecity of liver dendritic cells from mouse with chronic hepatitis. Int J Mol Med 2002; 9(1):71-6.

correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. J Immunol 1997;159(2):565-73.
8. Vermec D, Zorbas M, Scollay R, et al. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen. Invistagation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. J Exp Med 1992; 176: 47-58.
9. Rao AS, Roake JA, Larsen CP, et al. Isolation of dendritic leukocytes from non-lymphoid organs. Adv Exp Med Biol 1993;329:507-12.
10. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. Eur J Immunol 1998; 28(6):2045-54.
11.Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, et al. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. Eur J Immunol 1994;24(3):605-10.
12.O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, et al. Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice. Blood 2002;99(6):2122-30.
13. Niimi M, Shirasugi N, Ikeda Y, et al. Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway. Transplantation 2001; 72(9):1556-62.
14. Fazekas O. Cook MC, Smith AL, et al. Role of dendritic cells in induction of tolerance and immunity in vivo. Adv Exp Med Biol 1997;417:255-63.
15. Moron G, Rueda P, Casal I, et al. CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present