

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-dihydroxycholecalciferol 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 (IFN γ /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 IFN γ /IL-4 ratio was also down-regulated compared to non-treated cells (p value<0.05).

Conclusion: It seems that 1,25-dihydroxycholecalciferol 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

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

محمد مهدی افتخاریان ^۱M.Sc.، سید محمد مؤذنی ^{۲*}Ph.D.، امیرحسین زرنانی ^{۳*}Ph.D.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی، تهران، ایران

۲. پژوهشکده ابن‌سینا، مرکز تحقیقاتی نانوتکنولوژی، ACECR، تهران، ایران

۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی

پست الکترونیک: Email: moazzeni@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۸/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۵

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر درون تن کلستیرول بر سلول‌های دندریتیک از نظر بیان شاخص‌های سطحی، القای پاسخ اختصاصی در لنفوسیت‌های T و شیفیت 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 IFN- γ /IL-4 (Interferon gamma/Interleukin-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 موش ماده - که از لحاظ سن همسان‌سازی شده بودند - تشکیل شده بود.

* **یافته‌ها:** آنالیز آماری نتایج، نشان داد که سلول‌های دندریتیک - که تحت تأثیر 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 (Th1 یا Th2) 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 میلویدی. در موش، سلول‌های دندریتیک لنفوییدی، $CD8a^+ CD11b^-$ و میلویدی، $CD8a^- CD11b^+$ می‌باشند. همچنین زیر گروه اول پس از عرضه آنتی‌ژن و ترشح مقادیر متنابهی اینترلوکین ۱۲ (IL-12; Interleukin-12) و اینترفرون گاما (Interferon gamma; IFN γ)، پاسخ ایمنی سلولی (Th1) را برانگیخته در حالی که زیر گروه دوم با ترشح (IL-4) و اینترلوکین ۱۰ (IL-10; Interleukin-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 (کلستیرول) فرم فعال ویتامین D3 است که در بدن نقش

تاثیر ویتامین D3 بر سلول‌های دندرتیک

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 دندرتیک 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 (Roche, Germany) (Collagenase D) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سلول‌ها پس از انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO₂ (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 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

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 ماورای بنفش (UltraViolet; UV) خورشید اولین مرحله این واکنش‌ها را سبب می‌شود. به این صورت که ۷-دهیدروکلسترول (7-Dehydrocholesterol) 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 (Hydroxylase 25-) و ۱-هیدروکسیلاز (1-Hydroxylase)، در دو موقعیت، هیدروکسیله شده و به فرم فعال ویتامین D - که همان ۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی 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 رسیپورهای اختصاصی‌اش Vitamin D Receptor (VDR) در سلول‌های هدف رخ می‌دهد. این رسیپور جزو ابر خانواده رسیپورهای هورمونی هسته‌ای محسوب می‌شود که در بسیاری از سلول‌های سیستم ایمنی، نظیر لنفوسیت‌های T و NK، سل‌ها و DCها وجود دارد (۶، ۱۳-۹). البته مطالعات دقیق‌تر نشان داده‌اند که نحوه عرضه VDR توسط این سلول‌ها متفاوت است؛ بدین صورت که در سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن به صورت ثابت و در لنفوسیت‌ها به صورت القا پذیر بیان می‌گردد (۱۴-۹).

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

مواد و روش‌ها

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

پلی کلونال قوی است؛ در نظر گرفته شدند. سوپ تعدادی از چاهک‌ها پس از ۴۸ اولیه کشت برداشت شده و برای تعیین سطح سایتو کاین‌های IFN- γ و IL-4 به وسیله 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 ۱ درصد 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 بیوتینیل 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-Streptavidin) به هر چاهک اضافه شده و پس از طی ۲۰ دقیقه انکوباسیون و سه بار شست‌وشو، با افزودن Tetramethylbenzidine (TMB) (Razi Biotech, Iran) شده 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 به وسیله PBS حاوی ۰/۰۵ درصد Tween ۲۰ انجام گرفت. همچنین تمام آزمایش‌ها به صورت سه تایی (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 شش تایی موش‌های ماده هم نژاد - که از لحاظ سن همسان‌سازی شده بودند - انجام شده و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار شش آزمایش مستقل نشان داده شد.

یافته‌ها

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 $1/11 \pm 91/28$ درصد است (شکل ۱).

فلوسایتومتری دو رنگی

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

(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 PE (Phycoerythrin) (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 پارافرمالید با غلظت نهایی ۲ درصد فیکس گردیدند. برای تعیین میزان خلوص DCها 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 1×10^6 عدد DC در ۱ میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum) تهیه شده و ۱۰۰ میکروگرم Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG₃₃₋₃₅) (Ariagen, Iran) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) به آن اضافه گردید (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). مدت زمان انکوباسیون ۶ ساعت بوده و در این مدت سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO₂ قرار گرفتند. سپس سلول‌ها سه بار به خوبی با PBS شسته شده و ۳۵۰/۰۰۰ عدد از آنها در 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 $1/5 \times 10^6$ 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 CO₂، انکوبه شدند. این نکته قابل ذکر است که تمام آزمایشات به صورت 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 شمارش گر بتا (β -counter) (WALLAC 1410, Pharmacia, Sweden) اندازه‌گیری شد. گروه‌های کنترل منفی و مثبت در این مرحله نیز به ترتیب شامل چاهک‌های فاقد MOG و چاهک‌های محتوی Phytohemagglutinin Antigen (PHA) که یک فعال‌کننده

تکثیر اختصاصی لنفوسیت‌ها و آزمون الایزا

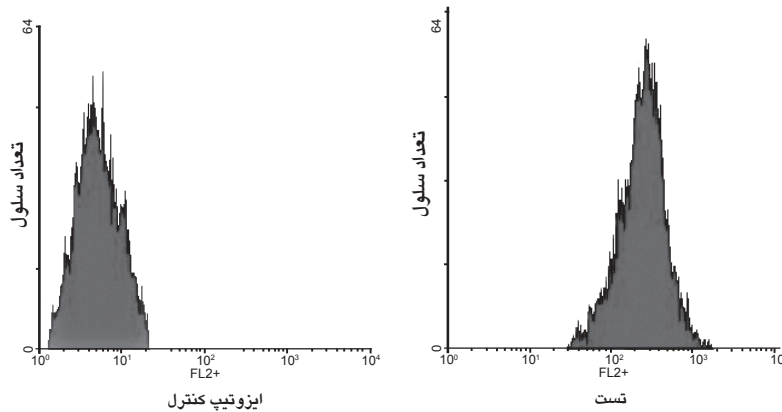
به منظور بررسی تاثیر کلسیتریول بر عرضه آنتی‌ژن اختصاصی توسط DCها به لنفوسیت‌ها در درون تن، DCهای استخراج شده از طحال موش‌های تیمار شده (در مقایسه با DCهای طحال موش‌های تیمار نشده)، با MOG به عنوان یک آنتی‌ژن اختصاصی مجاور شدند و سپس به کف دست موش‌های هم‌نژاد تزریق گردیدند. بدیهی است که DCهای فوق، از طریق عروق لنفاوی آوران وارد غدد لنفاوی منطقه‌ای در ناحیه براکیال شده و در آنجا به لنفوسیت‌های اختصاصی برخورد می‌نمایند. بنابراین در این مکان، لنفوسیت‌ها اولین برخورد با آنتی‌ژن اختصاصی را انجام داده و اصطلاحاً 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، 759 ± 9335 و در گروه کنترل، 483 ± 10733 شمارش در دقیقه (CPM) بوده که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار ($p = 0/009$) است. همچنین حتی در غياب MOG نیز میزان تحریک در گروه تست به طور قابل توجهی ($p=0/018$) کمتر از گروه کنترل است (به ترتیب 307 ± 2404 و 175 ± 2936) (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 IL-4/IFN- γ 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 $0/28 \pm 3/306$ و $0/23 \pm 5/392$ می‌باشد ($p=0/006$). بنابر این 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.

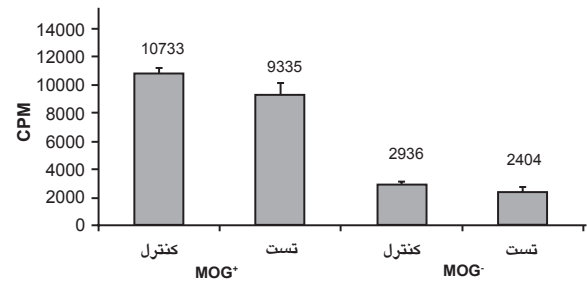
درصد سلول‌های واجد شاخص‌های مورد مطالعه و نیز متوسط شدت فلورسنت (Mean Fluorescent Intensity; MFI) هر شاخص در جدول ۱ آمده است. چنان که ملاحظه می‌گردد، DCهای تیمار شده با کلسیتریول در درون تن، میزان کاهش یافته‌ای از شاخص‌های بلوغ نظیر CD86 و MHC II و شاخص سلول‌های دندریتیک لنفوبیدی یعنی CD8 α (به عکس CD11b به عنوان شاخص سلول‌های دندریتیک میلویدی 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 به وسیله 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
CD8 α	155/96 \pm 35/3	188/16 \pm 28/1	0/117
CD40	96/26 \pm 16/21	109/06 \pm 13/95	0/251
CD11b	87/98 \pm 18/6	58/5 \pm 9/4	0/011
MHC class II	163/96 \pm 48	242/56 \pm 30/18	0/047
CD86	92/66 \pm 9/89	143/72 \pm 39/96	0/028



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.



نمودار ۱: نتایج آزمون تکثیر اختصاصی لنفوسیت‌ها. سلول‌های دندریتیک جدا شده از طحال موش‌های هر دو گروه آزمایش (Test) و کنترل و سپس پالسی شده با MOG به طور جداگانه به موش‌های سیزن 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

کلستریول 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 کلستریول 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 کلستریول در محیط درون تن بر سلول‌های دندریتیک وجود ندارد و از آنجا که شرایط درون تن به صورت کامل متفاوت از شرایط برون تن است، در این تحقیق به بررسی اثر ویتامین D3 در محیط درون تن بر روی سلول‌های دندریتیک پرداختیم. نتایج نشان داد که کلستریول 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 الفاکتنده مسیرهای Th1 و Th2 و MHC کلاس ۲، CD40 و CD86 به عنوان شاخص‌های بلوغ و فعالیت تاثیر گذار است و این تاثیرات را به طور عمده بر میزان بیان و تراکم این شاخص‌ها در غشای سلول - که به متوسط شدت فلوروسانس (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 کلستریول 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 لنفوبیدی و میلوبیدی تقسیم‌بندی می‌شود که انواع لنفوبیدی، CD11b⁻، CD8α⁺ و انواع میلوبیدی، CD11b⁺CD8α⁻

می‌باشد. همچنین زیر گروه اول پس از عرضه آنتی‌ژن و ترشح مقادیر معتدله‌ی IL-12 و IFN-γ پاسخ ایمنی سلولی (Th1) را برانگیخته 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 کلستریول 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 کلستریول، 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 کلستریول 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 کلستریول 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 ارائه دادند. آنها متوجه شدند که تمایز DCهای مشتق از مونوسیت که در غلظت ۱۰^{-۱۰} تا ۷۰^{-۱۰} مولار کلستریول کشت داده می‌شوند، به شدت مهار می‌گردد. همچنین مواجهه DCهای نابالغ با این ماده باعث کاهش بیان مولکول‌های CD40، CD80، 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 کلستریول دچار وقفه شده و به همین لحاظ بیان مارکر ماکروفاژی CD14 (نسبت به زمانی که کلستریول حضور نداشته باشد) افزایش می‌یابد.

اثرات تنظیم ایمنی کلستریول در غلظت ۱۰^{-۱۰} مولار و بیشتر از آن اعمال می‌گردد که برای تامین این غلظت به نسبت بالا در مواضع ایمنولوژیک داخل بدن، برخی از سلول‌های سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژهای فعال به سنتز این ماده می‌پردازند. با توجه به عوارض خطرناک دوز بالای تجویز گسترده کلستریول، محققین تلاش کرده‌اند تا اشکال سنتتیک این ماده را که فاقد آثار ناخواسته 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 کلستریول 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

میلوئید مشابه انواع لنفویید در 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 کلستریول به ترتیب باعث کاهش و افزایش بیان CD1 α و CD14 می‌شود. همچنین بیان CD32 و فعالیت اندوسیتوزی به شدت افزایش می‌یابد و در نقطه مقابل، عرضه مولکول‌های کمک‌تحریکی 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 درون تن اثرگذار است (۳۳).

براساس یافته‌های ما، از طرف دیگر لنفوسیت‌های T پراپم شده با DC‌های تیمار شده با کلستریول 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 کلستریول 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 کلستریول تغییر یافته است. بنابراین لنفوسیت‌های T در هنگام پراپمینگ، 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 کمک‌تحریکی و همچنین MHC کلاس دو در سلول‌های DC، متعاقب تیمار با کلستریول 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 کلستریول 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 کلستریول در درون تن، اثرات مهاری قابل توجهی بر روند بلوغ DC‌ها، بیان مولکول‌های کمک‌تحریکی 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 بدین وسیله از مسؤولین این دانشگاه تشکر می‌گردد.

References

- Jung S. Good, bad and beautiful-the role of dendritic cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2004; 3(1): 45-60.
- Dacic A, Wu L. Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44(9): 1469-1475.

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

گازری 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 DC‌ها دارند (۲۶). در سال ۲۰۰۴ نشان داده شد که کلستریول و دگزامتازون (Dexamethazone) (یک داروی گلوکوکورتیکوئیدی (Glucocorticoid) که اثرات مهار ایمنی دارد) اثرات سینرژیک روی یکدیگر داشته و موجب مهار بلوغ ناشی از LPS در DC‌ها 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 کلستریول 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 کلستریول 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 مهاری ایمنی مشترک بین TGF- β و کلستریول 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 کلستریول دارد.

همچنین مشخص شده است که کلستریول، بیان 3 Immunoglobulin-like Transcript 3 (ILT3) 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 کلستریول، بیان یک مجموعه بزرگ از ژن‌ها را تنظیم می‌نماید. در مقاله دیگری که توسط پنا و همکارانش (۱۹) منتشر گردید، بیان شده که کلستریول به طور انتخابی روی DC‌های میلوییدی (و نه پلاسماستویید) انسانی اثر گذاشته و خصوصیات مهاری را به آنها القا می‌کند.

براساس گزارش آنها، پس از مجاورت DC‌های میلویید با کلستریول، 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

- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(3): 151-161.
- Hochrein H, O'Keeffe M, Wagner H. Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol.* 2002; 63(12): 1103-1110.
- Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(7):

- 582-590.
6. Berer A, Stöckl J, Majdic O, Wagner T, Kollars M, Lechner K, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ 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/IFN γ 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-dihydroxyvitamin 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.