

# بهینه‌سازی تخلیص سلولهای دندریتیک طحال موش به منظور استفاده در تخلیص و مطالعه سلولهای دندریتیک ارگانهای تولید مثل

امیر حسن زرنانی<sup>۱،۲</sup> (M.L.D.)، سید محمد مودنی<sup>۳</sup> (Ph.D.)، فاضل شکری<sup>۴</sup> (Ph.D.)، مژده صالح نیا<sup>۵</sup> (Ph.D.)، علی احمد بیات<sup>۶</sup> (B.S.)، محمود جدی‌تهرانی<sup>۷</sup> (Ph.D.)

- ۱- دانشجوی دکترا، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۲- دکترای علوم آزمایشگاهی، گروه ایمنی‌شناسی تولیدمثل، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.
- ۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۴- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.
- ۵- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۶- کارشناس، گروه ایمنی‌شناسی تولیدمثل، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.
- ۷- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی تولیدمثل، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

## چکیده

سلولهای دندریتیک، سلولهای اصلی عرضه‌کننده آنتی‌ژن و مسئول القاء پاسخهای ایمنی اولیه بوسیله لنفوسیت‌های T هستند. اگرچه سلولهای دندریتیک در بسیاری از بافت‌های لنفاوی حضور دارند ولی تعداد آنها بسیار کم بوده و کمتر از ۰/۵٪ سلولهای هسته دار اعضای لنفوئیدی محیطی را به خود اختصاص می‌دهند. در این پژوهش، روش تخلیص سلولهای دندریتیک از طحال موش با بازده و خلوص قابل توجه با استفاده از یک تکنیک سه مرحله‌ای گزارش شده است. مراحل تخلیص به ترتیب عبارت بود از: هضم آنزیمی بافت توسط کلاژنان، جداسازی سلولهای کم چگال با استفاده از محیط اپتی پرپ و اتصال به پلاستیک. با بکارگیری تکنیک‌های فوق‌الذکر از هر طحال  $10^6 \times 5-7$  سلول دندریتیک با خلوص بالاتر از ۹۷٪ بدست آمد. در دسترس بودن سلولهای دندریتیک خالص، ما را قادر خواهد ساخت که خصوصیات مختلف این سلولها نظیر مرفولوژی، ایمونوفنوتیپ و نقش آنها را در سیستم ایمنی، بیشتر و دقیق‌تر مورد ارزیابی قرار دهیم. از طرف دیگر با توجه به حضور سلولهای دندریتیک در اعضای تولید مثل، از این روش می‌توان در تخلیص و مطالعه سلولهای دندریتیک اعضای مذکور استفاده کرد.

گل واژگان: سلولهای دندریتیک، طحال، تخلیص و سانتریفوژ گرادیان غلظتی.

آدرس مکاتبه: دکتر امیرحسن زرنانی، گروه ایمونولوژی تولیدمثل، پژوهشکده ابن‌سینا، اوین، صندوق پستی ۱۷۷-۱۹۸۳۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: zarnani25@yahoo.com

## مقدمه

سلولهای دندریتیک (DC) برای اولین بار در سال ۱۹۷۳ توسط Steinman و همکارانش در ارگانهای لنفاوی موش شناسایی شدند (۱). سلولهای DC، سلولهای عرضه کننده حفره ای آنتی ژن (pAPC) هستند و دارای توانایی منحصر به فرد در القای پاسخهای ایمنی اولیه می باشند. پیش سازهای سلولهای DC از مغزاستخوان منشأ گرفته و پس از عبور از خون محیطی در بافت های مختلف مستقر می شوند (۲). بدنبال عفونت، سلولهای DC آنتی ژن های عوامل بیماریزا را برداشت کرده و از طریق عروق لنفاوی آوران به نواحی سلولهای T ارگانهای لنفاوی ثانویه مهاجرت می کنند (۲، ۴، ۳). در ارگانهای مذکور، سلولهای DC آنتی ژن را به لنفوسیت های  $TCD4^+$  اختصاصی آنتی ژن عرضه می نمایند و موجب فعال شدن سلولهای مذکور و القای پاسخهای ایمنی اولیه می شوند. سلولهای  $TCD4^+$  نیز به نوبه خود پاسخ سایر سلولهای سیستم ایمنی نظیر لنفوسیت های B، لنفوسیت های  $TCD8^+$ ، سلولهای NK و ماکروفاژها را تنظیم می کنند (۲). بنابراین سلولهای DC در تنظیم پاسخهای ایمنی سلولی و هومورال نقش محوری دارند.

سلولهای دندریتیک علاوه بر اعضا لنفاوی نظیر طحال، غده لنفاوی و تیموس در اعضای غیر لنفاوی نیز حضور دارند. این سلولها در مناطقی نظیر پوست، مجرای تنفسی، دستگاه گوارش، کبد، کلیه، پانکراس، سیستم عصبی مرکزی، چشم، و دستگاه تولید مثل یافت می شوند (۵).

سلولهای DC در ارگانهای مذکور، علاوه بر عرضه آنتی ژن و کمک به دفاع بر علیه عوامل بیماریزا، در تنظیم پاسخهای ایمنی نیز نقش مهمی ایفاء می کنند (۲). با توجه به اینکه تنظیم دقیق سیستم ایمنی در ارگانهای

تولید مثل نظیر رحم، برای حفظ بقاء جنین، به عنوان یک پیوند نیمه بیگانه، ضرورت تام دارد، سلولهای DC می توانند به عنوان سلول اصلی و کلیدی تنظیم ایمنی در بقاء جنین نقش موثری ایفاء نمایند.

در مطالعات مختلف حضور سلولهای دندریتیک در دسیدوآی سه ماهه اول انسان (۶)، دسیدوآی ترم انسان (۷ و ۸)، واژن و سرویکس موش (۹ و ۱۰) و اگزوسرویکس انسان (۱۱) گزارش شده است.

یکی از مشکلات اساسی مطالعه سلولهای DC، فراوانی بسیار کم آنها در بافت های مختلف است. به عنوان مثال در سوسپانسیون تک سلولی طحال موش، این سلولها کمتر از ۰/۵٪ کل جمعیت سلولهای هسته دار را به خود اختصاص می دهند (۱ و ۱۲). مطالعه ویژگی های مختلف سلولهای DC، نظیر قدرت القاء تولید سیتوکین ها توسط سلولهای T، توانایی عرضه آنتی ژن، تحریک سلولهای T و بررسی فراساختار این سلولها نیاز به دسترسی به جمعیت خالص سلولی دارد.

برای تخلیص سلولهای DC بافت های مختلف موش از روش های مختلفی نظیر سانتریفوژ گرادیان غلظتی به همراه انتخاب منفی<sup>۳</sup> با آنتی بادیهای منوکلونال (۱۴، ۱۳)، سانتریفوژ گرادیان غلظتی به همراه انتخاب مثبت<sup>۴</sup> با آنتی بادیهای منوکلونال (۱۵، ۱۷، ۱۶)، آمیزه ای از انتخاب مثبت و منفی (۱۸، ۱۴)، انتخاب مثبت به تنهایی (۱۹)، سانتریفوژ گرادیان غلظتی به تنهایی (۲۰) و سانتریفوژ گرادیان غلظتی به همراه کشت سلول (۲۴-۲۱) بکار گرفته شده است.

در این مقاله روش بهینه تخلیص سلولهای DC طحال موش با خلوص و بازده بسیار بالا با استفاده از روش سانتریفوژ گرادیان غلظتی و کشت سلول شرح داده می شود. از این روش می توان در تخلیص سلولهای DC از بافت های اعضای تولید مثل بهره جست.

3-Negative Selection  
4-Positive Selection

1-Dendritic cell  
2-Professional antigen presenting cell

## مواد و روش‌ها

## الف) حیوانات مورد استفاده:

موش و خرگوش: موشهای Balb/c و NMRI و خرگوش نیوزلندی از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند. موشهای DBA/2 و BCD<sub>2</sub> F1 (Balb/c×DBA/2) از مرکز نگه‌داری حیوانات انستیتوکارولینسکا (سوئد) تأمین شد. موش‌ها در شرایط مناسب از نظر بهداشت، دما، رطوبت و روشنایی (سیکل ۱۲ ساعته تاریکی - روشنایی) نگه‌داری شدند. تمام روش‌های تجربی مورد استفاده در این کار پژوهشی توسط کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده ابن سینا مورد بررسی و تصویب قرار گرفت.

ب) مواد: آنتی‌بادی ضد MHC II (IA/IE) کونژوگه با بیوتین، آنتی‌بادی ضد DC11c موش با منشأ همستر، آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین همستر با منشأ موش کونژوگه با بیوتین از شرکت pharmingen (pharmingen, San Diego, CA, USA)، استرپت اویدین کونژوگه با بیوتین از شرکت Biosource (Biosource International Camarillo, CA, USA)، ABC کمپلکس با آلکان فسفاتاز از شرکت DAKO (DAKO A/S, Produktionsvej, Glostrup, Denmark) سوبسترای آبی الکان فسفاتاز<sup>۱</sup> از شرکت Vector (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) اپتی‌پرپ<sup>۲</sup> از شرکت Axis-Shield (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)، کلاژناز<sup>۳</sup>، DNase و DAB<sup>۴</sup> از شرکت Roche (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim Germany) RPMI-1640 از شرکت Sigma (Sigma, St. Louis, Mo) و سرم جنین گاوی (FCS)<sup>۵</sup>، اسید آمینه‌های غیرضروری و سدیم پیروات از شرکت Gibco (Gibco, Eggenstein, Germany) خریداری شد.

ج) تهیه سرم خرگوشی ضد گلبولهای قرمز گوسفند: تعداد ۱۰<sup>۹</sup> گلبول قرمز گوسفند (SRBC)<sup>۶</sup>، پس از شستشو با PBS<sup>۷</sup>، در ۱ ml از بافر مزبور از بافر مزبور به صورت سوسپانسیون درآمد و به صورت داخل صفاتی (IP)<sup>۸</sup> به خرگوش تزریق شد. تزریق گلبول قرمز گوسفند ۴ بار و به فواصل زمانی ۲ هفته تکرار شد. یک هفته پس از آخرین دوز تزریق، از خرگوش خونگیری به عمل آمد و عیار آنتی‌بادی ضد SRBC به روش آزمون میکروآگلوتیناسیون<sup>۹</sup> تعیین گردید.

د) حساس کردن گلبولهای قرمز گوسفند با آنتی‌بادی (EA)<sup>۱۱</sup>: ۲/۵ ml گلبولهای قرمز گوسفند سه بار با PBS شسته شد و هر بار بمدت ۱۰ دقیقه در ۲۸۰×g و ۴°C سانتیفریوژ گردید. رسوب سلولی با PBS تازه به نسبت ۵٪ رقیق شد و سرم خرگوشی ضد گلبولهای قرمز گوسفند به نسبت ۱:۷۰ به آن اضافه گردید. سوسپانسیون سلولی بمدت ۲ ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه و در فاصله زمانی مذکور هر ۱۵ دقیقه یکبار بآرامی مخلوط شد. گلبولهای قرمز حساس شده ۳ بار با RPMI-1640<sup>۱۲</sup> شسته شد و با همان محیط به نسبت ۵٪ رقیق گردید (۱۲).

ه) تخلیص سلولهای دندریتیک طحال: سلولهای کم چگال (LD)<sup>۱۳</sup> با روش Ruedl (۱۷) و با اعمال تغییراتی از طحال ۵-۲ موش ۱۲-۱۰ هفته‌ای تهیه شد. طحال موش‌ها پس از نخاعی کردن حیوان به صورت استریل خارج و در PBS قرار داده شد. به هر طحال ۱ ml از محلول کلاژناز D ۰/۵ mg/ml حاوی سرم جنین گاوی ۲٪ و (DNase I (type II) ۳۰ μg/ml تزریق و سوسپانسیون سلولی حاصله جمع‌آوری و در مجاورت یخ قرار داده شد.

6-Rabbit anti Sheep RBC serum

7-Sheep Red Blood Cell

8-Phosphate Buffered Saline

9-Intraperitoneal

10-Microagglutination assay

11-Antibody-coated sheep erythrocytes

12-Roswell park memorial institute

13-Low Density

۱۹

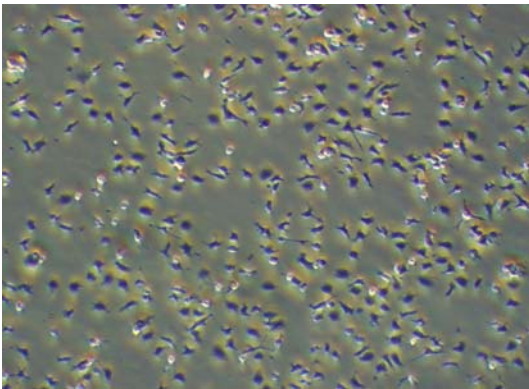
1-Avidin Biotin Complex

2- Alkaline phosphates blue substrate

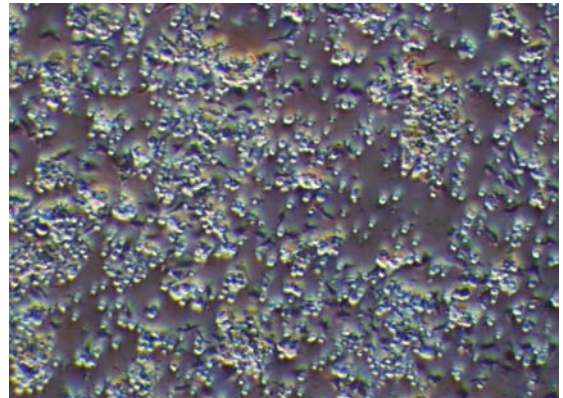
3-Optiprep

4-Diaminobenzidine

5-Fetal calf serum



شکل ۲- سلولهای DC دو ساعت پس از کشت. سلولهای غیرچسبان شسته و حذف شده‌اند



شکل ۱- سلولهای LD، ۱۵ دقیقه پس از کشت

روی آن محلول CMF HBSS به آرامی اضافه شد و لوله‌ها بمدت ۱۵ دقیقه در دور  $600 \times g$ ، در  $20^\circ C$  و بدون ترمز، سانتریفوژ گردید. سلولهای کم چگال (LD) از حد فاصل محلول CMF HBSS و اپتی‌پرپ ۱۲٪ جمع‌آوری و ۲ بار با  $5mM$  PBS-EDTA سرد در  $4^\circ C$  و  $280 \times g$  شسته شد. سپس مطابق با روش Steinman (۲۴) و با اعمال تغییراتی رسوب سلولی با RPMI-1640 کامل حاوی سرم جنین گاوی ۵٪، پنی‌سیلین<sup>۶</sup>  $100 IU/ml$ ، استرپتومایسین<sup>۷</sup>  $100 \mu g/ml$ ، ال-گلوکوماتین<sup>۸</sup>  $2mm$ ، HEPES  $2mm$ ، اسیدهای آمینه غیرضروری و سدیم پیروات با غلظت  $1mm$  و  $2ME$   $50mM$  مخلوط و در پلیت‌های کشت  $60 \times 150mm$  کشت و به مدت ۲ ساعت در  $37^\circ C$  و  $5\% CO_2$  انکوبه گردید. پس از پایان مدت انکوباسیون، سلولهای غیرچسبان با RPMI-1640 گرم  $(37^\circ C)$  حاوی سرم جنین گاوی ۵٪ چندین بار شسته و دور ریخته شدند. به سلولهای باقیمانده در کف پلیت محیط کامل RPMI گرم اضافه گردید و پلیت‌ها بمدت ۲۰-۱۴ ساعت در انکوباتور  $37^\circ C$  و  $5\% CO_2$  قرار داده شدند. پس از پایان مدت انکوباسیون، سلولهای DC که به صورت شناور درآمده بودند جمع‌آوری و ۲ بار با

سپس طحالها با قیچی به قطعات ریز  $1mm$  تقسیم شدند و به آنها محلول کلاژناز  $1/2 mg/ml$  در محلول HBSS<sup>۱</sup> حاوی سرم جنین گاوی ۲٪ و DNase  $30 \mu g/ml$  اضافه شد. قطعات بافتی به همراه کلاژناز بمدت ۴۵-۳۵ دقیقه در انکوباتور  $37^\circ C$  حاوی  $CO_2$  ۵٪ انکوبه شد.

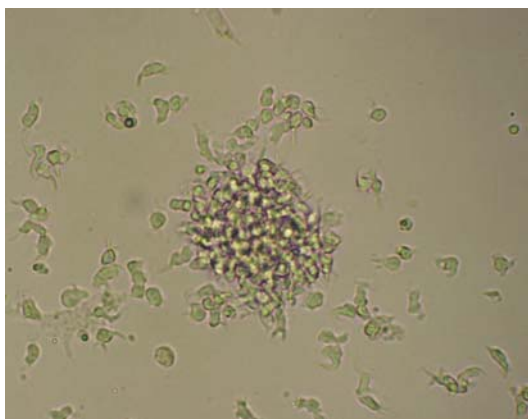
پس از پایان انکوباسیون به قطعات بافتی، EDTA با غلظت نهایی  $5mM$  اضافه و مخلوط بافتی چندین بار پیپت شد. سوسپانسیون سلولی بدست‌آمده از غربال فلزی<sup>۲</sup> عبور داده شد و سوسپانسیون حاصله با سوسپانسیون سلولی حاصل از تزریق کلاژناز مخلوط گردید. مخلوط سلولی ۲ بار با PBS حاوی EDTA  $5mM$  به مدت ۱۰ دقیقه در  $4^\circ C$  و  $280 \times g$  شسته شد. رسوب سلولی حاصل بلافاصله با محلول اپتی‌پرپ ۱۵٪ ( $d=1/0.85 g/ml$ ) مخلوط گردید.

برای رقیق‌کردن اپتی‌پرپ غلیظ (۶۰٪) از محلول CMF HBSS استفاده شد.

روی سوسپانسیون سلولی حاصل، محلول اپتی‌پرپ ۱۲٪ رقیق‌شده با  $NaCl$  (w/v)  $0/88$ ، HEPES  $10mM$ ، EDTA  $1mM$  و BSA<sup>۴</sup>  $0/5$ ،  $pH=7/4$  و بر

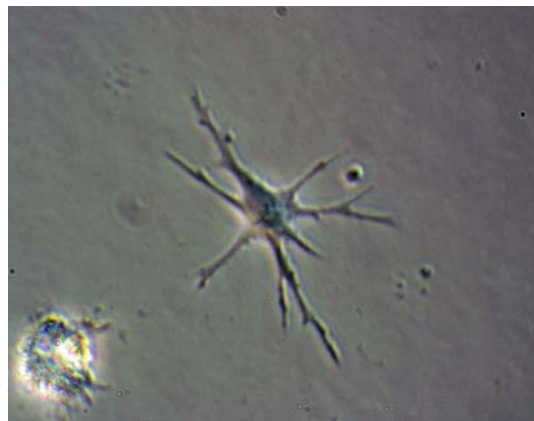
5-Ca++,Mg++Free Hanks Balanced Salt Solution  
6-Penicilin  
7-Streptomycin  
8-L-glutamine  
9-2-Mercaptoethanol

1-Hanks Balanced Salt Solution  
2-Wire mesh  
3-Density  
4-Bovine Serum Albumin



شکل ۴- سلولهای دندریتیک پس از کشت شبانه. اکثر سلولهای DC بالغ شده و بصورت غیرچسبان درآمده‌اند.

تعداد زوائد اطراف سلولی بیشتر شده و طولشان افزایش یافته است. در مرکز شکل یک توده بزرگ سلولی حاصل تجمع سلولهای دندریتیک دیده می‌شود.



شکل ۳- نمای یک سلول دندریتیک با زوائد سیتوپلاسمی کاملاً مشخص (۲ ساعت پس از کشت)

(و مطالعه ایمونوسیتوشیمیایی سلولهای تخلیص شده:

برای رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی ضد MHC II<sup>۳</sup>، سلولهای سیتواسپین شده بمدت ۲ دقیقه در استون سرد ثابت<sup>۴</sup> و سپس ۳ بار با PBS شسته شدند. جهت خنثی کردن پراکسیداز اندوژن از محلول H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۳٪ در PBS بمدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پس از شستشوی مجدد با PBS، سلولها با آنتی‌بادی ضد IA/IE<sup>۵</sup> کونژگه با بیوتین با غلظت ۱ μg/ml بمدت یک ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS استرپت اویدین کونژگه با HRP<sup>۶</sup> بمدت ۳۰ دقیقه اضافه و پس از ۳ بار شستشو با PBS، محلول DAB بر روی لامها اضافه شد. بعد از ۱۵-۵ دقیقه، لامها با آب شسته شده و پس از انجام مراحل آب‌گیری با الکل و رنگ‌آمیزی افتراقی با همتوکسیلین، مانته<sup>۷</sup> شدند.

برای رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی ضد CD11c، پس از انجام مراحل مقدماتی فوق‌الذکر، لامها با آنتی‌بادی ضد CD11c با غلظت ۲ μg/ml در طول شب<sup>۷</sup> در ۴°C انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS، آنتی‌بادی ضد

PBS سرد در ۴°C شسته شدند. برای مطالعات مرفولوژیک و نیز انجام آزمایشهای ایمونوسیتوشیمی، سلولها بر روی لامهای پوشش داده شده با پلی‌ال-لیزین<sup>۱</sup> سیتواسپین<sup>۲</sup> شدند.

در برخی از موارد برای افزایش خلوص سلولهای DC از روش رزت با EA استفاده شد. برای اینکار، پس از کشت شبانه و جمع آوری سلولهای دندریتیک، ۵۰ عدد گلبول قرمز حساس شده گوسفند بازای هر لکوسیت اضافه و با آرامی مخلوط و سوسپانسیون سلولی حاصل بمدت ۱۰ دقیقه در دور آرام (۴°C و ۷۰×g) سانتریفوژ گردید. بدون خارج ساختن محلول رویی، لوله حاوی سلول بمدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. پس از مدت مذکور تمام مایع رویی بجز ۲ml دور ریخته شد و سلولها با پیپت پاستور به آرامی مخلوط گردید. سوسپانسیون سلولی به آرامی بر روی ۱ml از محیط اپتی‌پرپ با چگالی ۱/۰۷۷g/ml اضافه و سانتریفوژ گردید. سلولهای ناحیه حد واسط، که سلولهای DC خالص بود، جمع‌آوری و ۲ بار با PBS سرد در ۴°C شسته شد.

3-Major Histocompatibility Complex

4-Fix

5-Horse Radish Peroxidase

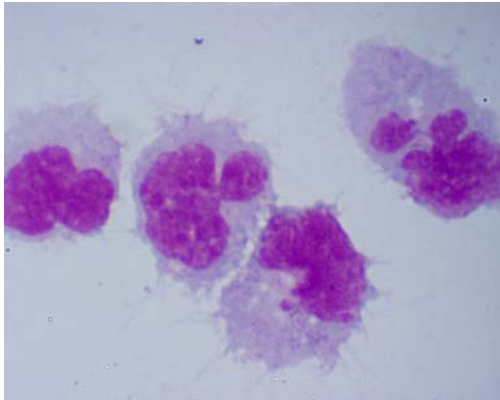
6-Mount

7-overnight

۲۱

1-Poly-L-Lysine

2-Cytospin



شکل ۶- رنگ آمیزی سلولهای دندریتیک با گیمسا. سلولهای DC پس از تخلیص نهایی، سیتواسپین و رنگ آمیزی شده اند. اکثر سلولهای DC هسته لوبوله و یا لوبیایی شکل دارند. زوائد سیتوپلاسمی در اطراف سلولها دیده می شود.

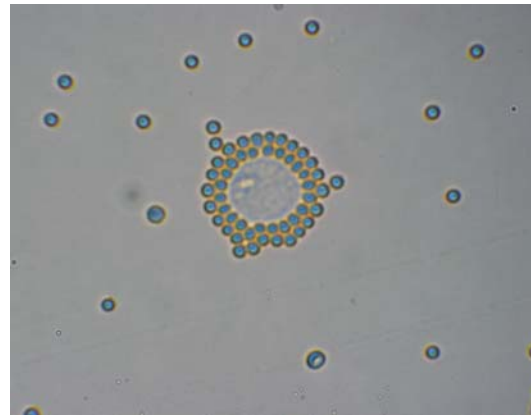
بدون استفاده از آنزیم تعداد کل لکوسیت های طحالی به ازاء هر موش حدود  $10^6 \times 100$  سلول بود.

برای هضم طحال از آمیزه آنزیمی کلاژناز D ( $1/2 \text{ mg/ml}$ ) و DNase ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) بمدت ۳۵-۴۵ دقیقه در  $37^\circ\text{C}$  استفاده شد. افزایش زمان انکوباسیون و یا غلظت آنزیمهای مذکور سبب تجمع سلولی و کاهش میزان حیات<sup>۳</sup> شد.

در این مطالعه از محیط گرادیان اپتی پرپ با چگالی های مختلف  $1/0.77$ - $1/0.65$  برای غنی سازی اولیه سلولهای DC طحال استفاده شد.

میزان بازیافت سلولهای LD در  $d=1/0.77$ ،  $10\%$ - $15\%$  کل لکوسیت های طحال بود. کاهش چگالی محیط گرادیان سبب کاهش تعداد سلولهای LD می گردید. بطوریکه تعداد سلولهای LD در  $d=1/0.68$ ،  $3\%$ - $6\%$  و در  $d=1/0.65$  تنها  $2/4\%$  سلولهای اولیه بود. درجه حرارت سانتیفرود نیز تعداد سلولهای LD را تحت تأثیر قرار می داد بطوریکه کاهش دما از  $20^\circ\text{C}$  سبب افزایش جمعیت سلولی مذکور می شد.

مطالعه با میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus-Japan) نشان داد که تنها، ۱۵ دقیقه پس از کشت سلولهای LD،



شکل ۵- رزت. یک ماکروفاژ که توسط تعداد زیادی از گلبولهای قرمز حساس شده گوسفند رزت شده است.

ایمونوگلوبولین موش کونژوگه با بیوتین ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) حاوی  $1\%$  سرم موش بر روی لامها اضافه شد. پس از یکساعت انکوباسیون در درجه حرارت آزمایشگاه و شستشو با PBS سایر مراحل مطابق با روش فوق (رنگ آمیزی با آنتی بادی ضد MHC II) انجام گرفت.

در برخی از موارد برای افزایش حساسیت واکنش، بجای استریت اویدین<sup>۱</sup> کونژوگه با HRP، از کمپکس ABC کونژوگه با الکان فسفاتاز و به عنوان سوبسترا از سوبسترای آبی الکان فسفاتاز استفاده شد. در مرحله آخر از متیل گرین به عنوان رنگ زمینه استفاده گردید.

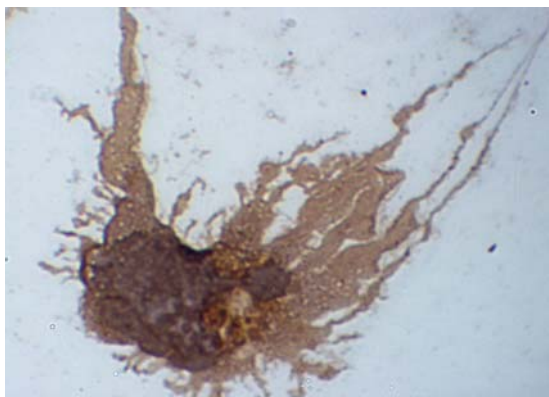
## نتایج

### الف: جداسازی و تخلیص سلولهای DC طحال:

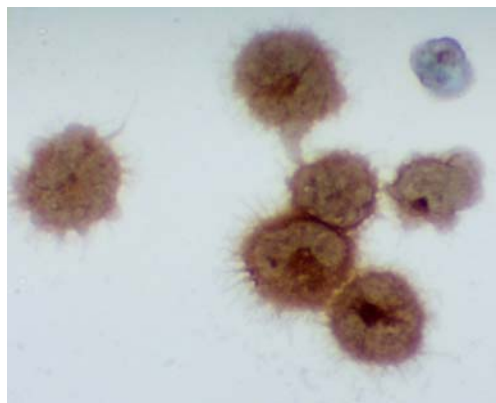
پس از هضم آنزیمی طحال موشهای همخون<sup>۲</sup> با آنزیمهای کلاژناز و DNase، تعداد  $200-300 \times 10^6$  و بطور متوسط  $250 \times 10^6$  لکوسیت به ازای هر طحال بدست آمد. با استفاده از روش های مکانیکی هضم و

1-Streptavidin  
2-Inbred

3-Viability



شکل ۸- ایمونوسیتوشیمی سلولهای DC با استفاده از آنتی‌بادی ضد MHC II. سلولهای DC پس از تخلیص نهایی سیتواسپین و رنگ‌آمیزی شده‌اند



شکل ۷- ایمونوسیتوشیمی سلولهای DC با استفاده از آنتی‌بادی ضد CD11C. سلولهای DC پس از تخلیص نهایی سیتواسپین و رنگ‌آمیزی شده‌اند. به زوائد فراوان اطراف سلول توجه کنید.

شکل و برخی دیگر نازک و بلند بود. تعداد این زواید، از یک زائده تا بیش از ۷ زائده متغیر بود. برخی از این زواید در طول مسیر خود دارای تقسیمات جانبی نیز بودند (شکل ۲ و ۳). در مطالعه با میکروسکپ فاز کنتراست، این سلولها کاملاً تیره دیده می‌شدند. علت این امر وجود تعداد زیادی میتوکندری در سیتوپلاسم سلول است (۲۳).

پس از حدود ۱۶-۱۲ ساعت سلولهای DC بالغ شدند و به صورت شناور درآمدند؛ در حالیکه اکثر سلولهای غیر DC، شامل لنفوسیت‌های B و ماکروفاژها به صورت چسبیده باقی ماندند. تعدادی از سلولهای DC پس از شناور شدن بهم متصل شده و تجمعات کوچک تا بزرگ سلولی را تشکیل می‌دادند. این تجمعات سلولی براحتی با پیپت کردن محیط کشت حاوی سلول، شکسته می‌شد. پس از کشت شبانه و بلوغ سلولی ناشی از آن، تعداد زواید سیتوپلاسمی اطراف سلولهای DC افزایش و قطر آنها کاهش و طولشان افزایش می‌یافت (شکل ۴).

کشت سلولهای LD با تعداد مختلف بازای واحد سطح نشان داد که تعداد بهینه سلول بازای واحد سطح  $10^6 \times (1-1/7)$  و بطور متوسط  $10^6 \times 1/2$

سلولهای دندریتیک به کف پلیت متصل شده و به آرامی در سطح آن گسترش می‌یابند (شکل ۱). ولی بدلیل بالابودن تعداد سلولهای کشت داده به ازای واحد سطح (حدود  $10^6 \times 1/2$ ) و مخفی ماندن زوائد سلولهای DC در زیر سایر سلولهای همراه، مشخصات دقیق این سلولها از جمله زوائد سیتوپلاسمی بخوبی قابل رویت نبود. پس از حدود ۲-۱/۵ ساعت، سلولهای DC کاملاً به سطح پلیت چسبیده و زواید سیتوپلاسمی خود را در کف پلیت انتشار می‌دادند. سایر سلولها از جمله اکثر لنفوسیت‌ها، برخی از ماکروفاژها و تعداد خیلی از سلولهای DC پس از این مدت به صورت غیر چسبان باقی می‌ماندند. شستشوی پلیت پس از مدت مذکور سبب حذف سلولهای غیر چسبان شده و مرفولوژی دقیق سلولهای DC نمایان می‌گردید (شکل ۲). پس از شستشو، تنها حدود ۳/۰٪ کل سلولهای اولیه طحال در کف پلیت باقی می‌ماند.

مطالعه با میکروسکپ فاز کنتراست نشان داد که این سلولها دارای شکل غیر منظم بوده و در اطراف خود دارای زوائد متعددی می‌باشند. جسم سلول غالباً به صورت کشیده و زوائد اطراف سلولی به صورت شعاعی از آن خارج شده بود. برخی از این زواید به صورت برجستگی‌های کوچک، برخی بزرگ و انگشتی

پس از جداسازی سلولهای LD با اپتی پرپ ( $d=1/0.68$ ) و انجام مراحل بعدی تخلیص (بدون رزت)، مطالعه بیان مارکر CD11c نشان داد که خلوص نهایی سلولهای DC بیش از ۹۷٪ است (۷). تمام سلولهایی که ظاهر دندریتیک داشتند، CD11c و MHC II را بیان می‌کردند. بیان MHC II بر روی سلولهای DC بمراتب بیش از بیان CD11c بود. از طرف دیگر در مقایسه با CD11c، رنگ آمیزی با MHC II، زوائد سیتوپلاسمی اطراف سلولی را بهتر نمایان می‌کرد (شکل ۸). میزان بیان MHC II یا CD11c در برخی از سلولها بیش از سایرین بود.

### بحث

در این مقاله، روش بهینه تخلیص سلولهای دندریتیک طحال موش ارائه شده است. از آنجا که هیچ رده سلولی وابسته به سلولهای DC وجود ندارد، این سلولها را برای هر آزمایش باید به صورت تازه از بافت مورد نظر تخلیص نمود.

یکی از مشکلات اساسی جداسازی سلولهای DC از بافت‌های مختلف، فراوانی بسیار کم این سلولها می‌باشد. در طحال موش فراوانی این سلولها کمتر از ۵٪ کل لکوسیت‌های طحال است (۱۲). بنابراین بعید به نظر می‌رسد که بتوان تنها با استفاده از روش تخلیص یک مرحله‌ای این سلولها را با خلوص و بازده بالا تخلیص نمود. چنانچه خلوص سلولهای DC غدد لنفاوی موش پس از تخلیص با روش سانتریفوژ گرادیان غلظتی به تنهایی، حدود ۶۰٪ گزارش شده است (۲۵). همچنین استفاده از روش انتخاب مثبت با آنتی‌بادی ضد CD11c برای تخلیص سلولهای DC مغز استخوان موش، خلوص ۷۰٪ را بدست خواهد داد (۲۶). از این رو با تلفیق روشهای مختلف تخلیص، خلوص بالاتری بدست خواهد آمد. در مطالعات مختلف از روش‌های مختلفی نظیر انتخاب منفی لکوسیت‌های T، B،

می‌باشد. افزایش و یا کاهش نسبت مذکور سبب کاهش بازده و یا کاهش میزان حیات سلولهای DC می‌گردد. پس از بلوغ و شناور شدن در محیط کشت، سلولهای DC غالباً به سمت کناره‌های پلیت کشیده شده و در آنجا تجمع می‌یافتند.

مرحله نهایی تخلیص سلولهای DC، تست EA rosett بود. سلولهای DC بالغ با گلبولهای قرمز حساس شده گوسفند، رزت تشکیل نمی‌دادند؛ در حالیکه ماکروفاژها با ۲۰-۳۰ گلبول قرمز و لنفوسیت‌های کوچک، که احتمالاً از نوع لنفوسیت B بودند، با ۱-۲ گلبول رزت تشکیل می‌دادند (شکل ۵).

پس از سانتریفوژ در محیط گرادیان غلظتی، گلبولهای قرمز آزاد به همراه رزتهای تشکیل شده رسوب می‌کردند؛ در حالیکه سلولهای DC خالص در لایه میانی باقی می‌ماندند. به هنگام استفاده از چگالی ۱/۰۷۷ در جداسازی سلولهای LD، انجام تست رزت خلوص را به میزان ۱۰-۵٪ افزایش می‌داد؛ در حالیکه افزایش خلوص با رزت به هنگام استفاده از چگالی ۱/۰۶۸ تنها ۱-۲٪ بود.

مطالعه میکروسکپی سلولهای DC پس از رنگ آمیزی گیمسا نشان داد که این سلولها غالباً هسته لوبیایی یا دو لبه دارند (شکل ۶). در این رنگ‌آمیزی زوائد برخی از سلولهای DC دیده می‌شد. در مجموع، کل سلولهای DC تخلیص شده از هر موش همخون،  $10^6 \times 5-7$  عدد بود. در مقایسه با موشهای همخون، میزان سلولهای DC طحال نژادهای غیرهمخون<sup>۱</sup> و یا موشهای F1 و F2 حاصل از لقاح موشهای همخون (Balb/c×DBA/2) حدود ۴۰٪-۲۰٪ بیشتر بود.

ب: ایمونوسیتوشیمی:

سلولهای DC پس از خالص‌سازی نهایی بر روی لامهای پوشش داده شده با پلی‌ال - لیزین سیتواسپین شدند.



ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها و سلولهای NK با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال (۱۳ و ۱۴)، انتخاب مثبت با آنتی‌بادی ضد CD11c (۱۹) و یا تلفیقی از این دو روش (۱۴، ۱۸) برای تخلیص سلولهای DC استفاده شده است. یکی از مزایای اینگونه روش‌ها در این است که می‌توان سلولهای DC نابالغ و تازه را تخلیص کرد. ولی برخی از آزمون‌ها نظیر بررسی قدرت القای تولید سیتوکین در سلولهای T، یا عرضه آنتی ژن، مستلزم بلوغ سلولهای DC در شرایط *in vitro* است. به همین سبب القاء بلوغ سلولهای DC برای آزمونهای مذکور ضروری است. القاء بلوغ سلولهای DC با استفاده از محرک‌های مختلفی مانند پاتوژن‌ها، LPS<sup>۱</sup>، TNF<sup>۲</sup>، IL-1<sup>۳</sup> (۲۷)، DNA باکتریایی (۲۸)، پروستاگلاندین‌ها (۲) و کشت کوتاه مدت در شرایط آزمایشگاهی امکان پذیر است (۲۹-۳۲). به همین دلیل لحاظ کردن یک دوره شبانه کشت در تخلیص سلولهای DC نه تنها موجب بلوغ سلولهای DC می‌گردد، بلکه بدلیل شناور شدن سلولهای DC پس از بلوغ، امکان جداسازی آنها را از سایر سلولهای چسبان نظیر ماکروفاژها فراهم می‌آورد. یکی از رایج‌ترین روشهایی که در تخلیص سلولهای DC بکار برده می‌شود، مبتنی بر برخی خصوصیات سلولهای دندریتیک از جمله چگالی پائین، توان اتصال سریع به پلاستیک و سطوح شیشه‌ای و شناور شدن پس از کشت شبانه است. در این مطالعه نیز از همین روش برای تخلیص سلولهای DC طحال موش استفاده شده است. در اولین فاز تخلیص، سلولهای DC از سایر سلولهای دارای چگالی بالا جدا می‌شوند (۲۴، ۳۳). سلولهای مختلف دارای چگالی مختلف می‌باشند. به عنوان مثال، چگالی گلبولهای قرمز، گرانولوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و منوسیت‌ها به ترتیب ۱/۱، ۱/۰۸۵، ۱/۰۷۲ و ۱/۰۶۵ است (۳۴).

سلولهای DC دارای چگالی پائین‌تری می‌باشند؛ از این رو می‌توان با استفاده از محیط‌های گرادیان غلظتی، این سلولها را به میزان زیادی غنی‌سازی کرد. تعداد سلولهای LD با چگالی محیط گرادیان رابطه مستقیم دارد. کاهش چگالی محیط از ۱/۰۷۷ به ۱/۰۶۵ سبب می‌شود که تعداد سلولهای LD از ۱۵-۱۰٪ به ۲/۴٪ کل سلولهای هسته‌دار طحال تقلیل یابد. افزایش تعداد سلولهای LD اگرچه امکان بازیافت تعداد بیشتری از سلولهای DC را در ناحیه حد واسط فراهم می‌کند، ولی بدلیل افزایش تعداد سلولهای همراه از جمله لنفوسیت‌های B و ماکروفاژها، شرایط انتخاب سلولهای DC را مشکل‌تر می‌سازد. بطوریکه تعداد سلولهای چسبان مرحله اول کشت بطور قابل توجهی افزایش می‌یابد و شستشوی بیشتر پلیت به منظور دسترسی به خلوص بالاتر سبب کنده شدن برخی از سلولهای DC و کاهش بازده می‌گردد. از طرف دیگر این امر سبب می‌شود که در نهایت خلوص نهایی سلولهای DC کاهش یابد. استفاده از محیط‌های گرادیان با چگالی پائین تر از ۱/۰۶۵ احتمال از دست رفتن تعدادی از سلولهای DC را به همراه خواهد داشت. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد که چگالی ۱/۰۶۸، چگالی بهینه محیط‌های گرادیان برای تخلیص اولیه سلولهای DC طحال موش باشد. در مطالعات مختلف از محیط‌های مختلفی مانند نیکودنز<sup>۴</sup> (۲۱)، BSA (۲۴ و ۱۶)، متریزامید (۲۶ و ۲۵ و ۱۳)، اپتی‌پرپ (۲۰ و ۱۷) و پرکل<sup>۵</sup> (۳۵) استفاده شده است در این مطالعه از اپتی‌پرپ برای تخلیص اولیه سلولهای DC استفاده شد. اپتی‌پرپ نام تجاری یدوکسانول<sup>۱</sup> (یک دی مرنیکودنز) است (۳۶). نیکودنز و مشتقات آن بر روی مرفولوژی سلول تأثیر نداشته و برای سلول، غیرسمی است. از طرف دیگر توسط سلولها متابولیزه نمی‌شود. ولی

4-Nycodenz  
5-Percoll  
6-Iodoxanol  
۲۵

1-Liopolysaccharide  
2-Tumor Necrotic Factor  
3-Interleukin

می‌یابد. بدنبال بلوغ ناشی از کشت شبانه تعدادی از این سلولها به یکدیگر چسبیده و تشکیل تجمعات سلولی می‌دهند. همچنین تعداد زواید سلولی اطراف سلول به نحو قابل توجهی افزایش می‌یابد.

سلولهای DC بالغ فاقد گیرنده ناحیه FC مولکولهای IgG (FCγR) هستند و این خصوصیت اساس مرحله چهارم تخلیص سلولهای دندریتیک است. ماکروفاژها و لنفوسیت‌های B دارای این گیرنده هستند و لذا با گلبولهای قرمز حساس شده گوسفند با آنتی‌بادی ضد SRBC، رزت تشکیل می‌دهند، در حالیکه سلولهای DC به این گلبولها وصل نمی‌شوند (۲۴).

براساس این مطالعه در صورتی که از محیط گرادیان غلظتی با  $d=1/0.77$  برای غنی‌سازی اولیه سلولهای DC استفاده شود. تست رزت می‌تواند میزان خلوص را حدود ۱۰-۵٪ افزایش دهد. در حالیکه در روش بهینه پیشنهادی و با استفاده از اپتی‌پرپ  $d=1/0.68$ ، تست رزت تنها ۲-۱٪ خلوص را افزایش می‌دهد.

بنابراین با روش پیشنهادی مذکور دیگر نیازی به انجام تست رزت نیست.

از طرف دیگر مراحل رزت نسبتاً طولانی است و نیاز به چندین بار شستشو و انجام سانتریفوژ دارد و طی مراحل این تست امکان کاهش میزان حیات و از دست رفتن تعدادی از سلولهای DC وجود دارد.

در مجموع با استفاده از این روش، از هر طحال موش‌های همخون،  $10^7 \times 5-7$  سلول DC با میزان حیات بیشتر از ۹۵٪ بدست آمد. میزان جداسازی سلولهای DC با استفاده از محیط گرادیان غلظتی آلبومین  $10^5 \times 3-5$  گزارش شده است (۳۳). همچنین علی‌رغم حساسیت بالای سلولهای DC و کاهش میزان حیات آنها در محیط کشت (۳۲)، میزان حیات بدست آمده در این مقاله قابل توجه است.

حداقل دو مسیر تکاملی مختلف و متمایز در سلولهای DC موش شناخته شده است که عبارتند از مسیر

آلبومین و متریزامید سبب تغییراتی در عملکرد سلول می‌شوند (۳۷). با توجه به اینکه تنها ۶-۳٪ کل سلولهای طحالی پس از سانتریفوژ با اپتی‌پرپ  $d=1/0.68$  در ناحیه حد واسط باقی می‌مانند، می‌توان دریافت که این مرحله از تخلیص سبب غنی‌سازی سلولهای DC به میزان ۲۰-۳۰ برابر می‌شود. دومین فاز برای تخلیص سلولهای DC طحال، استفاده از توانایی بالای این سلولها در اتصال به سطوح پلاستیکی یا شیشه‌ای می‌باشد.

سلولهای دندریتیک طحال انسان و موش در ابتدای جداسازی، زمانی که نابالغ هستند، به سطوح شیشه‌ای، پلاستیکی، Nylon wool و سفادکس متصل می‌شوند (۲۴ و ۳۳). با این خصوصیت می‌توان سلولهای DC را از سلولهای غیر چسبان که قسمت اعظم آلودگی سلولی را در جمعیت LD تشکیل می‌دهند، جدا کرد.

فاز سوم تخلیص بهره‌گیری از عدم توانایی سلولهای DC بالغ در اتصال به کف پلیت است. کشت کوتاه مدت در شرایط آزمایشگاهی سبب بلوغ و شناور شدن سلولهای DC شود. این فرآیند، خاص سلولهای DC است و در سایر سلولهای چسبان نظیر ماکروفاژها دیده نمی‌شود. ماکروفاژها ۱ ساعت پس از کشت به سطح پلیت متصل شده و این اتصال تا چندین روز پایدار است و لذا با کشت شبانه می‌توان سلولهای DC را از سایر سلولهای چسبان جدا نمود (۲۴).

همانطور که در بخش نتایج اشاره شد، یکی از مشخصات سلولهای DC وجود تعداد زیادی میتوکندری است که سبب می‌شود، این سلولها در زیر میکروسکپ فاز کنتراست سیاه دیده شوند. در این مطالعه نشان داده شد که این خصوصیت در سلولهای DC تازه جدا شده وجود دارد؛ ولی پس از گذشت مدتی احتمالاً بدلیل بلوغ سلولی و افزایش اندازه و کاهش چگالی سلول، تراکم میتوکندری‌ها کاهش یافته و منظره سیاه سلولهای DC بتدریج در طول کشت شبانه کاهش

در تعیین خلوص سلولهای DC بهره جست. حضور سلولهای دندریتیک در دسیدوآی سه ماهه اول انسان، دسیدوآی ترم انسان، واژن و سرویکس موش و اگزوسرویکس انسان گزارش شده است. با توجه به گزارشهای موجود در مورد حضور سلولهای DC در بافت های مرتبط با حاملگی و نیز با توجه به نقش سلولهای DC لنفوئید در القاء تحمل ایمنولوژیک، به نظر می رسد این سلولها در بقاء پیوند نیمه بیگانه جنین نقش مهمی داشته باشند و لذا مطالعه این سلولها در ارگانهای تولید مثل می تواند جوابگوی بسیاری از مسائل ناشناخته در این مورد باشد. در تنها مطالعه انجام شده برای تخلیص سلولهای DC دسیدوآی سه ماهه اول انسان خلوص نهایی سلولهای DC ۳۰٪ بوده است (۶). با توجه به نیاز به دسترسی به خلوص بالای سلولهای DC جهت مطالعه خصوصیات عملکردی آنها و نیز نقش مهم این سلولها در تنظیم ایمنی بافت های مختلف از جمله بافت های مرتبط با حاملگی، از روش ارائه شده در این مقاله می توان در تخلیص سلولهای دندریتیک ارگانهای تولید مثل استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات و همکاری سرکار خانم پروانه احمدی که در تایپ این مقاله ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

تکاملی لنفوئیدی و مسیر تکاملی میلوئیدی. سلولهای DC میلوئید و لنفوئید در فنوتیپ، لوکالیزاسیون و نوع فعالیت با یکدیگر فرق دارند. هر دو زیر گروه مقادیر بالایی از CD40 و CD86, MHC II, CD11c را بیان می کنند. سلولهای دندریتیک میلوئید علاوه بر مارکرهای فوق DC11b را نیز بیان می کنند؛ در حالیکه سلولهای دندریتیک لنفوئید<sup>-</sup> CD11b می باشند و مارکرهای دیگری نظیر DEC-205 و CD8α را بیان می کنند.

در این مطالعه از آنتی بادی منوکلونال ضد MHC II و DC11c برای بررسی ایمنوفنوتیپ سلولهای DC تخلیص شده استفاده شد. بیان DC11c به همراه نمای دندریتیک خاص سلولهای DC بوده و از این دو خصیصه می توان برای تعیین خلوص سلولهای DC موش استفاده کرد (۳۸). سلولهای DC تعداد بالایی از مولکولهای MHC II را بیان می کنند (۱۳). در این مطالعه نیز بیان سطح بالایی از مولکولهای MHC II بر روی سلولهای DC طحال موش نشان داده شد. مطالعه ایمنوسیتوشیمی با DC11c، خلوص بالای ۹۷٪ را نشان داد که با توجه به عدم استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال در روند تخلیص سلولهای DC قابل توجه است. از طرف دیگر با توجه به مرفولوژی کاملاً مشخص سلولهای DC بدنبال بلوغ به نظر می رسد که علیرغم بیان MHC II توسط سایر سلولهای عرضه کننده آنتی ژن نظیر ماکروفاژها و لنفوسیت های B، بتوان از تلفیق بیان بالای این مارکر به همراه مرفولوژی

## References

- 1-Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-62.
- 2-Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K.

- 3-Reid S.D., Penna G., Adorini L. The Control of T cell response by dendritic cell Subset. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):114-21.
- 4-Moser M., Murphy K.M. Dendritic cell regulation of Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> development. *Nat Immunol.* 2000; 1(3):199-205.
- 5-Lotze M.T., Thomson A.W (eds). *Dendritic Cells.* Academic Press. Chapters. 23-30:2001.

- bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today*. 1999;20(5):200-3.
- 6-Kammerer U., Schoppet M., McLellan A.D., Kapp M., Huppertz H.I., Kampgen E., Dietl J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am J Pathol*. 2000;157(1):159-69.
- 7-Sutton L., Mason D.Y., Redman C.W. HLA-DR positive cells in the human placenta. *Immunol*. 1983;49(1):103-12.
- 8-Abraham S., Indrasingh I., Vettivel S., Chandi G. Gross morphology and ultrastructure of dendritic cells in the normal human decidua. *Clin Anat*. 2000;13(3):177-80.
- 9-Parr M.B., Parr E.L. Langerhans cells and T lymphocyte subsets in the murine vagina and cervix. *Biol Reprod*. 1991;44(3):491-8.
- 10-Parr M.B., Kepple L., Parr E.L. Antigen recognition in the female reproductive tract. II. Endocytosis of horseradish peroxidase by Langerhans cells in murine vaginal epithelium. *Biol Reprod*. 1991;45(2):261-5.
- 11-Figueroa C.D., Caorsi I. Ultrastructural and morphometric study of the Langerhans cell in the normal human exocervix. *J Anat*. 1980; 131 (Pt4): 669-82.
- 12-Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., In Shevach E.M., Strober W. (Eds). *Current protocols in immunology*. John Willy sons Inc. 1994-1998 Units 3.7 and 5.8.
- 13-Vremec D., Zorbas M., Scollay R., Saunders D.J., Ardavin C.F., Wu L., Shortman K. 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;176(1):47-58.
- 14-Pulendran B., Lingappa J., Kennedy M.K., Smith J., Teepe M., Rudensky A., Maliszewski C.R., Maraskovsky E. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol*. 1997;159(5):2222-31.
- 15-Fukao T., Koyasu S. Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2000;30(5):1453-7.
- 16-Crowley M.T., Inaba K., Witmer-Pack M.D., Gezelter S., Steinman R.M. Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen. *J Immunol Methods*. 1990;133(1):55-66.
- 17-Ruedl C., Rieser C., Bock G., Wick G., Wolf H. Phenotypic and functional characterization of Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- 18-Iwasaki A., Kelsall B.L. 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;190(2):229-39.
- 19-Stoll S., Jonuleit H., Schmitt E., Muller G., Yamauchi H., Kurimoto M., Knop J., Enk A.H. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol*. 1998;28(10):3231-9.
- 20-Brocker T. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med*. 1997;186(8): 1223-32.
- 21-Maldonado-Lopez R., De Smedt T., Michel P., Godfroid J., Pajak B., Heirman C., Thielemans K., Leo O., Urbain J., Moser M. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*. 1999;189(3):587-92.
- 22-Crowley M., Inaba K., Steinman R.M. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med*. 1990;172(1):383-6.
- 23-Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974;139(2):380-97.
- 24-Steinman R.M., Kaplan G., Witmer M.D., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*. 1979;149(1):1-16.
- 25-Gabrilovich D.I., Patterson S., Harvey J.J., Woods G.M., Elsley W., Knight S.C. Murine retrovirus induces defects in the function of dendritic cells at early stages of infection. *Cell Immunol*. 1994;158(1):167-81.
- 26-Stoll S., Jonuleit H., Schmitt E., Muller G., Yamauchi H., Kurimoto M., Knop J., Enk A.H. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol*. 1998;28(10):3231-9.
- 27-Rescigno M., Granucci F., Citterio S., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P. Coordinated events during

- 28-Hartmann G., Weiner G.J., Krieg A.M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(16):9305-10.
- 29-Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
- 30-Ni K., O'Neill H.C. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol*. 1997;75(3):223-30.
- 31-Steinman R.M., Pack M., Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev*. 1997;156:25-37.
- 32-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;159(2):565-73.
- 33-Weir D.M. (Eds). *Handbook of experimental immunology*. Blakwell pub. 4<sup>th</sup> Edition. 1986;vol. 2, chapter 49.
- CD11c+dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur J Immunol*. 1996;26(8):1801-6.
- 34-Boyum A., Lovhaug D., Tresland L., Nordlie E.M. Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand J Immunol*. 1991;34(6): 697-712.
- 35-Ria F., Penna G., Adorini L. Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1998;28(6):2003-16.
- 36-Patel D. (Eds). *Separating cells*. Bios scientific pub., 2001;chapter 2.
- 37-McLellan A.D., Starling G.C., Hart D.N. Isolation of human blood dendritic cells by discontinuous Nycodenz gradient centrifugation. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):81-9.
- 38-Metlay J.P., Witmer-Pack M.D., Agger R., Crowley M.T., Lawless D., Steinman R.M. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1990;171(5):1753-71.