

بررسی الگوی بیان ژن ایندول آمین ۳ و ۲ دی اکسیژناز در آندومتر موش طی فازهای مختلف سیکل استروس

نرگس عباسی (M.Sc.)^۱، امیر حسن زرنانی (D.M.T., Ph.D.)^۲، پونه دوکوهکی (M.D., Ph.D.)^۳، جمیله قاسمی (B.Sc.)^۴، عبدالامیر فیضی (M.D.)^۵، محمد مهدی آخوندی (Ph.D.)^۶، محمود جدی تهرانی (Ph.D.)^۷

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
- ۲- استادیار، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.
- ۳- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران.
- ۴- استادیار، گروه ایمونولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.
- ۵- کارشناس، گروه ژنتیک تولید مثل و بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.
- ۶- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی زنجان، زنجان، ایران.
- ۷- استادیار، گروه غده تولید مثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.
- ۸- دانشیار، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیان آنزیم ایندول آمین ۳ و ۲ دی اکسیژناز (IDO)، که در کاتابولیسم تریپتوفان نقش دارد، برای القای تحمل ایمونولوژیک مادر علیه جنین و همچنین حفاظت در برابر ارگانیزم‌های درون سلولی و برون سلولی ضروری است. این پژوهش، یک مطالعه تجربی است و هدف از انجام آن بررسی بیان ژن IDO در آندومتر موش و مقایسه میزان بیان ژن این آنزیم در فازهای مختلف سیکل استروس موش است. با توجه به نقش این آنزیم در بقای جنین نیمه بیگانه، از نتایج حاصله از این پژوهش می‌توان به عنوان پایه‌ای در مطالعات کاربردی در خصوص علل ایمونولوژیک سقط جنین استفاده کرد.

روش بررسی: در مطالعه حاضر بیان ژن IDO در آندومتر موش‌های ماده طی فازهای چهارگانه سیکل استروس مورد بررسی قرار گرفت. فازهای سیکل استروس از طریق بررسی سیتولوژی اسمیر واژینال تعیین گردید. در هر فاز، آندومتر از سایر قسمت‌های رحمی جدا و بیان نسبی IDO mRNA به روش RT-PCR نیمه کمی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی IDO و mGAPDH به عنوان ژن House keeping اندازه‌گیری شد. ویژگی واکنش از طریق هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته به دو قطعه ۱۳۸ و ۲۵۹ جفت باز تایید گردید.

نتایج: نتایج این مطالعه برای نخستین بار نشان داد که IDO در آندومتر موش‌های ماده طی تمامی فازهای سیکل استروس بیان می‌شود. بیان این ژن در فاز استروس به بالاترین حد و در فاز دی استروس به کمترین مقدار رسید ($p < 0.001$). **نتیجه‌گیری:** بیان IDO در آندومتر موش طی فازهای سیکل استروس حاکی از نقش احتمالی این آنزیم به عنوان یکی از ابزارهای سیستم ایمنی ذاتی در حفاظت کانال تولید مثل در برابر عفونت می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه در موشها، آمیزش جنسی فقط در فاز استروس انجام می‌شود، بیان سطح بالای آنزیم IDO در این فاز می‌تواند به عنوان یک راهکار مهم در القای تحمل ایمونولوژیک مادر علیه جنین عمل کند.

کلید واژگان: ایندول آمین ۳ و ۲ دی اکسیژناز، موش، آندومتر، سیکل استروس، تحمل ایمونولوژیک، سقط مکرر.

مسئول مکاتبه: دکتر محمود جدی تهرانی، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۸۳۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mahjed@avesina.ac.ir

زمینه و هدف

یکی از مکانیسم‌هایی که اخیراً از سوی بسیاری از محققین در مورد موفقیت بارداری و تحمل ایمنولوژیک مادر در برابر جنین نیمه بیگانه مورد توجه قرار گرفته است، بیان ژن آنزیم ایندول آمین ۳و۲ دی اکسیژناز (IDO)^۱ در سطح تماس مادر- جنین می‌باشد (۴-۱). آنزیم IDO، تریپتوفان را کاتالیز کرده و آن را به N-فورمیل کینورنین^۲ و سپس کینورنین تبدیل می‌کند (۵). IDO از طریق کاتابولیسیم تریپتوفان، موجب کاهش سطح این اسید آمینه شده و در نتیجه تکثیر لنفوسیت‌های T که وابسته به حضور تریپتوفان می‌باشد مهار می‌شود. از طرف دیگر متابولیت‌های تریپتوفان نیز در مهار تکثیر لنفوسیت‌های T نقش دارند (۶). نشان داده شده است که در حضور IDO لنفوسیت‌های T قادر به گذر از ابتدایی‌ترین فاز سیکل تقسیم سلولی نمی‌باشند (۷). علاوه بر آن میزان آپوپتوز سلول‌های T نیز در حضور IDO افزایش می‌یابد (۸).

اینترفرون گاما (IFN γ)^۳ قوی‌ترین محرک شناخته شده برای القا بیان IDO می‌باشد (۹). شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن نظیر ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک از طریق تولید IDO تکثیر لنفوسیت‌های T را مهار می‌کنند (۱۰). مهار IDO توسط ۱- متیل تریپتوفان از اثرات مهار سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن بر روی لنفوسیت‌های T ممانعت می‌کند (۱۱). ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک منبع اصلی بیان IDO هستند (۱۱، ۱۲). سلول‌های دندریتیک طحال موش IDO را بیان می‌کنند. اگرچه هر دو زیررده لنفوئیدی و میلوئیدی سلول‌های دندریتیک آنزیم IDO را بیان می‌کنند؛ ولی فقط شکل فعال این آنزیم در رده لنفوئیدی (CD11c⁺CD8 α ⁺) بیان می‌شود (۱۳).

سلول‌های بیان‌کننده IDO در بسیاری از مکان‌های امن سیستم ایمنی نظیر تیموس، اپیدیم، جفت و اتاقت قدامی چشم وجود دارند (۱۷-۱۴). بنابراین به نظر می‌رسد که این سلولها مسئول القاء تحمل ایمنولوژیک در مکان‌های فوق‌الذکر باشند. مطالعات Munn و Mellor راه‌گشای اولیه نقش IDO در ایمنولوژی بارداری بود. آنها نشان دادند که IDO در موش‌های باردار آلونیک از روز ۷/۵ تا ۹/۵ بارداری در سطح تماس مادر و جنین بیان شده و تزریق مهارکننده IDO یعنی ۱- متیل تریپتوفان به موش‌های باردار سبب سقط تمام جنینها می‌شود (۱). بنابراین به نظر می‌رسد که IDO یکی از مکانیزم‌های اصلی بقاء جنین نیمه بیگانه باشد. اساس بارداری در جوندگانی نظیر موش، سیکل استروس می‌باشد؛ چرا که جفت‌گیری و بارداری متعاقب آن فقط در فاز استروس (و نه سایر فازها) اتفاق می‌افتد. با توجه به این مهم و نقش مهارکنندگی ایمنی آنزیم IDO، این انتظار وجود دارد که بیان IDO در فازهای مختلف سیکل استروس متفاوت باشد. به همین منظور در این پژوهش بیان آنزیم IDO در فازهای مختلف سیکل استروس به روش RT-PCR^۴ نیمه کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

۱- حیوانات مورد مطالعه: موش‌های همخون^۵ ماده نژاد BALB/C با سن ۱۲-۸ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری و در شرایط بهداشتی مناسب و شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بدون محدودیت غذایی نگهداری شدند. کلیه آزمایشات تجربی انجام شده در این پژوهش توسط کمیته اخلاق پزشکی در پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا تأیید گردید.

1- Indoleamine 2,3- Dioxygenase

2- N- Formylkynurenin

3- Gamma Interferon

4- Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction

5- Inbred

درون فریزر قرار داده شد و بعد از گذشت این زمان مجدداً با همان شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید. محلول رویی با واژگون نمودن سریع میکروتیوب خارج شد و توده RNA در کف میکروتیوب باقی ماند. برای شستشوی RNA و خارج شدن کامل ایزوپروپانل، ۱ ml اتانل ۷۵٪ به آن افزوده شد و با دور ۱۸۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. اتانل باقیمانده نیز خارج شد و پس از خشک شدن توده RNA، به آن ۵۰-۲۰ μl (با توجه به اندازه توده RNA) آب مقطر استریل اضافه شد تا RNA در آن حل شود. سپس RNA استخراج شده تا زمان استفاده بعدی منجمد گردید.

۵- تهیه cDNA از RNA استخراج شده: مخلوطی شامل ۴ μl از Reaction buffer (۵x) (Fermentas, Lithuania)، ۲ μl از dNTP mix (۵mM) (Roche, Switzerland)، ۱ μl از Random-Hexamer (۲۰ M) (GE, Sweden) و از آنزیم رونویسی معکوس (Fermentas, M-MuLV (Lithuania) تهیه گردید و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۱۰ μl رسید. ۱۰ μl از نمونه RNA در دمای ۶۵ °C به مدت ۷ دقیقه حرارت داده شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. ۱۰ μl از محلول فوق الذکر به میکروتیوب دارای نمونه RNA اضافه گردید و بعد از سانتریفیوژ، در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ °C قرار داده شد. سپس cDNA بدست آمده با آب مقطر استریل به میزان ۲ به ۷ رقیق و در فریزر در دمای ۲۰- °C قرار داده شد.

۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): ابتدا در دو میکروتیوب به صورت جداگانه مخلوطی از ۲/۵ μl بافر PCR ۱۰x (Roche, Switzerland)، ۲ μl از (۲۵ mM) dNTP mix (۱۰mM)، ۱ μl (Roche, Switzerland) MgCl₂ و ۰/۲ μl آنزیم Taq DNA

۲- تعیین فازهای سیکل استروس: مراحل سیکل استروس برای هر موش با بررسی اسمیر واژینال تعیین شد. برای این کار حدود ۲۰ μl از PBS^۱ برای شستشوی آرام واژن با بکارگیری یک سمپلر مورد استفاده قرار گرفت و یک اسمیر مرطوب تهیه گردید. مراحل سیکل استروس با توجه به نسبتها و مورفولوژی لوکوسیتها و سلولهای اپی تلیال موجود در اسمیر با بزرگنمایی ۴۰۰× میکروسکوپ نوری تعیین شد. هر حیوان براساس سیتولوژی اسمیر واژینال در یکی از چهار فاز پرواستروس، استروس، مت استروس و دی استروس طبقه بندی شد. برخی از اسمیرها نیز با روش پاپانیکلا رنگ آمیزی گردید. موش‌هایی که دارای دو سیکل متوالی بودند، جهت بررسی‌های بعدی انتخاب شدند.

۳- تهیه نمونه بافت آندومتر: پس از تعیین فاز استروس، موشها کشته شدند و شاخ‌های رحمی آنها در شرایط استریل خارج گردید. سپس رحم با حجم زیاد بافر PBS شسته شد و توسط پنس و قیچی ریز از محور آنتی مزومتریال^۲ باز گردید. بافت آندومتر توسط تیغ اسکالپل به آرامی و با دقت تراشیده شد و قطعات بدست آمده بلافاصله در محلول RNA-Bee (Biosite, Sweden) جهت استخراج RNA منجمد گردید.

۴- استخراج RNA از نمونه‌های بافت آندومتر: بافت موردنظر در محلول RNA-Bee توسط Pellet Pestel (Sigma, USA) یکنواخت گردید. سپس کلروفرم (Sigma, USA) با غلظت نهایی ۱۰٪ (حجمی) به آن اضافه و به شدت تکان داده شد. میکروتیوب بعد از ۵ دقیقه انکوبه شدن درون ظرف یخ، با دور ۱۸۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای صفر درجه سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی به آرامی با سمپلر جمع‌آوری شد و با حجم مساوی از ایزوپروپانل (Merck, Germany) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت حداقل یک ساعت

3- Complementary DNA

4- Deoxy Nucleotid Three Phosphate

1-Phosphate Buffered Saline

2- Antimesometrial

گردیدند. خلوص سلول‌های ماکروفاژ با توجه به مرفولوژی آنها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی و حدود ۸۰٪ برآورد گردید. سپس به یکی از پلیت‌های RPMI کامل و به پلیت دیگر RPMI کامل حاوی U/ml ۱۰۰۰ اینترفرون گاما اضافه شد. بعد از گذشت زمان ۴۸ ساعت، سلول‌ها توسط خراشگر^۳ جمع‌آوری و پس از شستشو، RNA از سلول‌ها تهیه گردید و سپس cDNA از آنها تهیه شد و در پایان بیان ژن IDO با تکنیک PCR بررسی گردید.

۱- تخلیص سلول‌های دندریتیک و القای بیان IDO در آنها: سلول‌های دندریتیک طحال موش به عنوان کنترل مثبت دوم بیان IDO مورد استفاده قرار گرفتند. به همین منظور سلول‌های دندریتیک طحال موش با روشی که قبلاً توسط محققین مقاله حاضر منتشر شده است (۱۷)، تخلیص گردید. به‌طور خلاصه، پس از نخاعی نمودن موشها، طحال آنها در شرایط استریل خارج شد. طحال با محلول کلاژناز D با غلظت $0.5 mg/ml$ (Roche, Germany) و DNaseI با غلظت $30 \mu g/ml$ (Roche, Germany) پرفیوز شدند. سوسپانسیون حاصل جمع‌آوری و در مجاورت یخ قرار داده شد. سپس طحال با قیچی به قطعات ریز خرد شد. هضم آنزیمی با محلول کلاژناز D با غلظت $1/2 mg/ml$ و DNase با غلظت $30 \mu g/ml$ در انکوباتور CO_2 به مدت ۳۵-۴۵ دقیقه انجام شد. بافت هضم شده از غربال فلزی عبور داده شد و سوسپانسیون سلولی حاصل با سلول‌های بدست آمده از مرحله قبل مخلوط گردید. مخلوط سلولی بدست آمده دوباره با PBS شسته شد و رسوب سلول با اپتی پریپ^۴ (Axis-Shield, Oslo, Norway) 10% ($d=1/0.85 gr/ml$) مخلوط گردید. روی مخلوط حاصل محلول اپتی پریپ 12% و سپس محلول CMF-HBSS^۵ به آرامی اضافه

پلی‌مراز (Roche, Switzerland) تهیه گردید و به یکی از میکروتیوبها $1 \mu l$ از هر کدام از پرایمرهای Reverse و Forward ویژه آنزیم IDO (با غلظت $5 \mu M$) و به میکروتیوب دیگر $1 \mu l$ از پرایمرهای آنزیم $mGAPDH$ (با غلظت $5 \mu M$) اضافه گردید و با آب مقطر استریل به حجم نهایی $24 \mu l$ رسانده شد. سپس $1 \mu l$ cDNA رقیق شده به هر یک از میکروتیوبها افزوده گردید. PCR در شرایط حرارتی $94^\circ C$ به مدت ۲ دقیقه و سپس در $40^\circ C$ سیکل $94^\circ C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $57^\circ C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72^\circ C$ به مدت ۷ دقیقه برای پرایمر IDO انجام گردید. جهت انجام PCR برای $mGAPDH$ به صورت زیر عمل شد: $94^\circ C$ به مدت ۳ دقیقه، سپس در $94^\circ C$ به مدت ۳۰ ثانیه، $60^\circ C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72^\circ C$ به مدت ۷ دقیقه. ترادف پرایمرهای مورد استفاده برای IDO (ندای فن راه، ایران) و برای $mGAPDH$ (CyberGene, Sweden) به شرح زیر بود:

ترادف	پرایمر
F: 5'- GGG- ATG- ACG- ATG- TTC- GAA- AG- 3' R: 5'- AAA- AAC- GTG- TCT- GGG- TCC- AC- 3'	IDO
F: 5'- CAG- GAG- CGA- GAC- CCC- ACT- A- 3' R: 5'- GGC- ATG- GAC- TGT- GGT- CAT- GA- 3'	mGAPDH

۷- القاء بیان ژن IDO در ماکروفاژهای صفاقی موش: به عنوان کنترل مثبت بیان ژن IDO، از ماکروفاژهای صفاقی موش و تیمار آنها با اینترفرون گاما ($IFN\gamma$) (Sigma, USA) استفاده شد. برای این کار پس از نخاعی کردن حیوان، $0.1 ml$ از PBS استریل به ناحیه صفاقی تزریق و سلول‌های ناحیه جمع‌آوری گردید. سلول‌های بدست آمده در دو پلیت 15×60 در محیط کشت RPMI-1640 (Sigma, England) حاوی 10% سرم جنین گاوی (FCS)^۶ (Invitrogen, England) کشت داده شدند. بعد از دو ساعت سلول‌های غیرچسبان، با محیط RPMI گرم ($37^\circ C$) شستشو

3- Scraper

4- Optiprep

5- Ca^{++} , Mg^{++} Free Hanks Balanced Salt Solution

1- Mouse-Glycer Aldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

2- Fetal Calf Serum

مقدار $8 \mu l$ به طور همزمان به همراه $2 \mu l$ بافر لودینگ^۵ ($6 \times$) به هر چاهک^۶ اضافه و الکتروفورز با آمپر حداکثر و ولتاژ 80 ولت به مدت 1 ساعت انجام شد. باندهای حاصل تحت اشعه UV مشاهده و از آنها عکسبرداری شد. سپس، بوسیله نرم افزار Lab works (UVP, USA) دانسیته باندها و نسبت دانسیته باندهای IDO به mGAPDH بدست آمد.

۱۰- **هضم آنزیمی محصولات PCR ژن IDO** به منظور بررسی ویژگی واکنش PCR، هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته با استفاده از آنزیم PspOMI (SibEnzym, Russia) انجام شد. به این منظور مخلوطی از $3 \mu l$ $10 \times$ SE Buffer Y (SibEnzyme, Russia) و $0.3 \mu l$ آنزیم فوق با آب مقطر استریل به حجم نهایی $10 \mu l$ رسانیده شد. $20 \mu l$ از محصول PCR ژن IDO به این مخلوط اضافه گردید و حجم نهایی به $30 \mu l$ رسید و در دمای $37^\circ C$ به مدت دو ساعت قرار داده شد. سپس محصولات هضم شده روی ژل آگارز 2.5% الکتروفورز شد و عکسبرداری گردید (شکل ۲).

آزمون‌های آماری: نسبت دانسیته باند IDO به mGAPDH برای هر موش تعیین شد و سپس نسبت‌های بدست آمده از فازهای مختلف سیکل استروس با استفاده از آزمون غیر پارامتری -Kruscall-Wallis مقایسه گردید. $p < 0.05$ اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تهیه نمونه بافت اندومتر در فازهای مختلف سیکل استروس: براساس سیتولوژی اسمیر واژینال، موش‌های مورد مطالعه در یکی از چهار فاز استروس، پرواستروس، متاستروس و دی‌استروس قرار گرفتند. در فاز پرواستروس سلول‌های گرد بازال، به تعداد قابل توجه و تعداد محدودی از سلول‌های

گردید. لوله‌ها به مدت 15 دقیقه با دور $600g$ سانتریفیوژ شدند و سلول‌های کم‌چگال از حد فاصل محلول CMF-HBSS و اپتی‌پرپ 12% جمع‌آوری و دو بار با PBS حاوی $5 mM$ EDTA (Merck, Germany) در شرایط سرد شستشو و سلول‌های کم‌چگال در RPMI کامل حاوی 5% سرم جنین گاوی به مدت 2 ساعت کشت شدند. سپس سلول‌های غیرچسبان از طریق شستشو با RPMI گرم حذف گردیدند. به سلول‌های باقیمانده محیط RPMI گرم حاوی 10% سرم جنین گاوی اضافه گردید و انکوبه کردن به مدت 16 ساعت دیگر ادامه یافت. به برخی از پلیتها در طی کشت شبانه $1000 U/ml$ از IFN γ اضافه گردید. پس از پایان زمان کشت، سلول‌های غیرچسبان به آرامی جمع‌آوری و با PBS سرد شسته شدند. خلوص سلول‌های دنریتیک به روش فلوسیتومتری مطابق با روش گروه محققین حاضر و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد CD11c (17) ارزیابی گردید. در تمام آزمون‌های انجام شده، خلوص سلول‌های فوق‌الذکر بالاتر از 90% بود (شکل ۴). استخراج RNA، سنتز cDNA و PCR روی سلول‌های فوق به روش مندرج در قسمت‌های قبلی انجام گردید.

۹- **الکتروفورز ژل آگارز، اسکن ژلها و دانسیتومتری:** پودر آگارز (USB, USA) براساس درصد ژل که 2.5% بود توزین شد و در بافر الکتروفورز (TAE)^۲ مخلوط و بوسیله حرارت دادن، کاملاً حل گردید. پس از اضافه کردن محلول اتیدیوم بروماید^۳ (Roche, Germany) با غلظت $1-5 mg/ml$ ، با ریختن ژل در سینی قالب‌گیری^۴ ژل آگارز در زمان 15 دقیقه به صورت جامد درآمد و درون تانک الکتروفورز حاوی بافر قرار داده شد. از هر نمونه محصول PCR ژن‌های mGAPDH و IDO به

- 1- Agarose
- 2- Tris-Acetate-EDTA
- 3- Etidium bromide
- 4- Casting tray

- 5- Loading buffer
- 6- Well

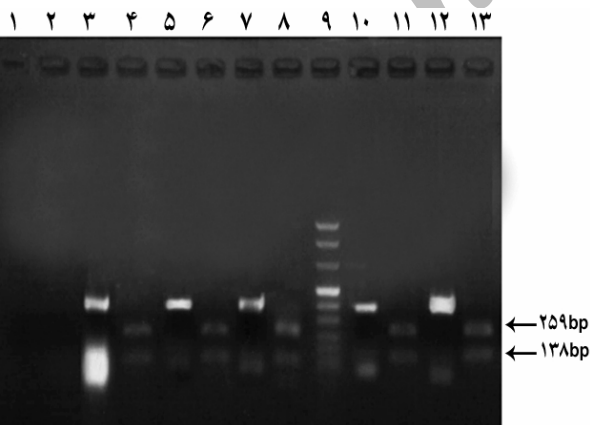
جدول ۱- نتایج حاصل از دانسیتومتری IDO و mGAPDH و نسبت آنها به هم در ۲۵ موش ماده BALB/C

نام فاز	نسبت دانسیته IDO به mGAPDH							میانگین (M±SD)
	۰/۰۹۵	۰/۱۲۵	۰/۱۲۹	۰/۱۹۷	۰/۱۱۱	۰/۱	۰/۱	
پرو استروس	۰/۰۹۵	۰/۱۲۵	۰/۱۲۹	۰/۱۹۷	۰/۱۱۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱۲۲±۰/۰۳۵
استروس	۰/۰۷۵	۰/۰۶۵	۰/۰۵۲	۰/۰۵۴	۰/۰۵۸	۰/۰۷۹	-	۰/۶۳۸±۰/۱۱۲
مت استروس	۰/۰۲۶۳	۰/۰۱۲۴	۰/۰۱۷۳	۰/۰۱۶۶	۰/۰۱۶۹	-	-	۰/۱۸۱±۰/۰۴۸
دی استروس	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۶۱±۰/۰۱۶

به IDO انجام گرفت و سپس محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲/۵٪ الکتروفورز گردید. با هضم آنزیمی روی IDO، دو قطعه ۲۵۹ جفت‌باز و ۱۳۸ جفت‌باز بدست آمد که مؤید ویژگی واکنش می‌باشد (شکل ۲).

بیان IDO در ماکروفاژهای صفاقی و سلول‌های دندریتیک طحال موش: به عنوان کنترل مثبت، ماکروفاژهای صفاقی و سلول‌های دندریتیک طحال موش در طی کشت شبانه با IFN γ به میزان ۱۰۰۰ U/ml تیمار شد. نتایج RT-PCR نشان داد که سلول‌های مذکور پس از تیمار با IFN γ سطح بالایی از IDO را بیان می‌کنند؛ در حالی که سلول‌های دست‌نخورده آنزیم IDO را بیان نمی‌کردند (شکل ۳).

بیان IDO در فازهای مختلف سیکل استروس: جهت بررسی بیان نسبی IDO در آندومتر موش، روی



شکل ۲- هضم آنزیمی محصولات PCR فازهای سیکل استروس و کنترل مثبت با پرایمر IDO و هضم آنزیمی با PspOMI (۱- کنترل منفی، ۲- digest کنترل منفی، ۳- پرواستروس، ۴- digest پرو استروس، ۵- استروس، ۶- digest استروس، ۷- مت استروس، ۸- digest مت استروس، ۹- مارکر ۱۰۰، ۱۰- دی استروس، ۱۱- digest دی استروس، ۱۲- کنترل مثبت (ماکروفاژهای تیمار شده با IFN γ).

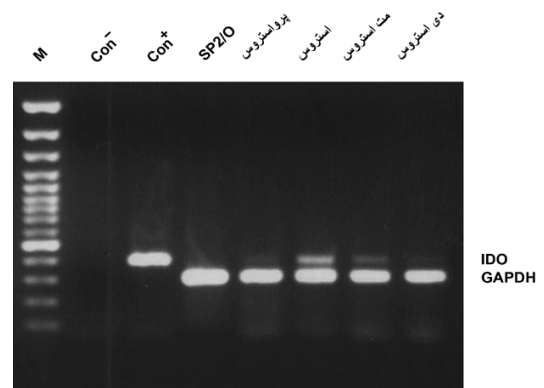
۱۳- digest کنترل مثبت IFN γ .

اپیتلیال چند وجهی و لکوسیت دیده شد. تمام سلول‌های موجود در فاز استروس سلول‌های اپیتلیال چند وجهی شاخی بودند. در فاز مت استروس علاوه بر سلول‌های مذکور، لکوسیتها نیز قابل مشاهده بودند. لکوسیتها عمده سلول‌های فاز دی استروس را تشکیل می‌دادند. در این فاز همچنین تعداد معدودی از سلول‌های اپیتلیال شاخی و یا سلول‌های گرد بازال قابل ردیابی بودند.

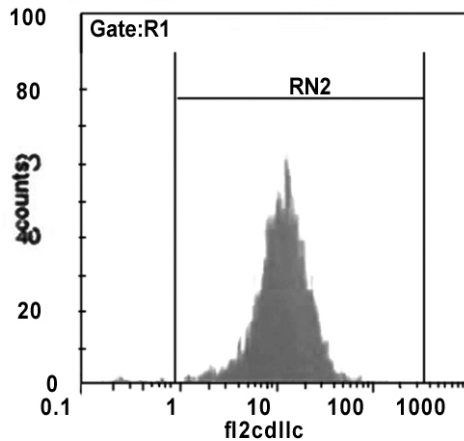
مجموعاً ۲۵ نمونه آندومتر موش‌های ماده BALB/C در فازهای مختلف سیکل استروس شامل ۷ نمونه در فاز پرواستروس، ۶ نمونه در فاز استروس، ۵ نمونه در فاز مت استروس و ۷ نمونه در فاز دی استروس از نظر بیان ژن IDO به روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

تکنیژن‌های IDO و mGAPDH با استفاده از PCR: انجام PCR با پرایمرهای ویژه IDO و mGAPDH به ترتیب منجر به تکثیر قطعات ۳۹۷ و ۳۰۹ جفت‌بازی شد (شکل ۱).

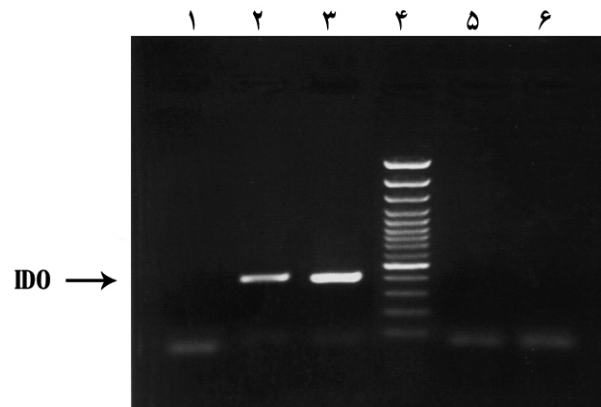
جهت تأیید اینکه قطعه تکثیر یافته مربوط به IDO می‌باشد، هضم آنزیمی روی محصولات PCR مربوط



شکل ۱- بیان IDO و mGAPDH در نمونه‌های آندومتر فازهای مختلف سیکل استروس با استفاده از تکنیک PCR با پرایمرهای اختصاصی (از ماکروفاژهای تیمار شده با IFN γ به عنوان کنترل مثبت (con⁺) استفاده شده است).



شکل ۴- بررسی بیان مارکر CD11c در سطح سلول‌های دندریتیک تخلیص شده از طحال موش به روش فلوسایتومتری.



شکل ۳- بیان IDO در سلول‌های دندریتیک طحال و ماکروفاژهای صفاقی تیمار شده با IFN γ به عنوان کنترل مثبت (۱- کنترل منفی، ۲- سلول‌های دندریتیک تیمار شده با IFN γ ، ۳- ماکروفاژهای تیمار شده با IFN γ ، ۴- مارکر ۵۰۱۰۰ bp سلول‌های دندریتیک دست نخورده، ۵- ماکروفاژهای دست نخورده) ۶- ماکروفاژهای دست نخورده)

صحت این نظریه را تأیید کرده‌اند (۲۰-۱۸). مطالعات انجام شده در مورد چگونگی تعدیل یا سرکوب سیستم ایمنی مادر در طی بارداری نشان می‌دهد که مکانیزم‌های مختلفی در انجام این امر نقش دارند. یکی از مهمترین مکانیزم‌های عدم رد جنین، تولید فاکتورهای سرکوبگر ایمنی در موضع بارداری می‌باشد (۲۱). با توجه به نقش IDO در مهار پاسخ سلول‌های T (۱۲) و بیان IDO بوسیله سن‌سیشیوتروفوبلاستها (۳، ۴) این امکان وجود دارد که بیان IDO در فصل مشترک مادری- جنینی در سرکوب پاسخ‌های ایمنی و نهایتاً بقای جنین نیمه بیگانه دخالت داشته باشد. Mellor و Munn نشان دادند که mRNA ژن IDO در دوره بارداری موش از روز ۷/۵ تا ۹/۵ بیان شده، اما بیان این آنزیم در روز ۱۰/۵ تا ۱۳/۵ بارداری به جفت محدود شد و در دسیدوا و یا جنین وجود ندارد (۱). از آنجا که اساساً آنتی‌ژن‌های بیگانه پدیری بوسیله سلول‌های T مادری شناسایی می‌شوند یک رخداد مهم در حفظ جنین نیمه بیگانه، مهار عملکرد سلول‌های T مادری بوسیله IDO خواهد بود (۲۲). Mellor و Munn نشان داده‌اند که تیمار کردن موش‌های باردار آلوزن در روز ۴ بارداری با ۱- متیل‌تریپتوفان که مهارکننده اختصاصی آنزیم IDO می‌باشد، سبب سقط تمام جنینها می‌شود. در صورتی که مهار IDO در موش‌های باردار

هر نمونه از cDNA بافت آندومتر مربوط به فازهای مختلف سیکل استروس با دو پرایمر IDO و mGAPDH بطور جداگانه PCR انجام گرفت. سپس محصولات PCR هر دو ژن همزمان با هم و به مقدار مساوی الکتروفورز گردید و با استفاده از نرم افزار Lab Works بیان نسبی IDO در فازهای مختلف سیکل استروس از طریق مقایسه نسبت دانسیته IDO به mGAPDH بررسی شد. بررسی بیان نسبی ژن IDO در فازهای مختلف سیکل استروس نشان داد که اولاً آنزیم IDO در تمام فازها بیان می‌شود. ثانیاً بیان این آنزیم در فاز استروس به‌طور معنی داری نسبت به سایر فازها بیشتر است ($p < 0.001$) (شکل ۱).

میانگین بیان ژن IDO در فازهای مختلف سیکل استروس موش در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق داده‌ها، بیشترین بیان نسبی IDO در فاز استروس (0.638 ± 0.112) و کمترین مقدار آن مربوط به فاز دی استروس (0.061 ± 0.016) بود.

بحث

با توجه به اینکه جنین یک پیوند نیمه بیگانه است، سرکوب پاسخ‌های ایمنی مادر علیه آنتی‌ژن‌های جنین دور از ذهن نیست. بسیاری از مطالعات انجام شده

سینژنیک^۱ تأثیر سویی بر روند بارداری ندارد (۱). این یافته‌ها بخوبی نشان می‌دهد که آنزیم IDO در مهار پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های T مادر علیه آنتی‌ژن‌های بیگانه پدري نقش اساسی دارد. این فرضیه در مطالعات بعدی Munn و با استفاده از موش‌های دارای نقص در ژن‌های RAG1 و RAG2 و موش‌های ترانس‌ژن مورد تأیید قرار گرفت. استفاده از موش‌هایی که دارای هاپلو تیپ MHC^۲ یا کمپلکس اصلی سازگاری بافتی یکسان ولی آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی مینور متفاوت بودند، نشان داد که IDO نه تنها در مهار پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های T مادر علیه آنتی‌ژن‌های اصلی سازگاری بافتی بلکه در مهار پاسخ علیه آنتی‌ژن‌های مینور نقش دارد (۲۴).

سیکل استروس در جوندگان رخدادی فیزیولوژی است که توسط عوامل مختلف و بویژه سطح تولید هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون کنترل می‌شود. این سیکل در جوندگان تعیین کننده زمان جفت‌گیری است. برخلاف بسیاری از پستانداران که در آنها جفت‌گیری مستقل از سیکل ماهیانه می‌باشد، در جوندگانی نظیر موش و رت جفت‌گیری فقط در فاز استروس انجام می‌شود و در سایر فازهای سیکل معمولاً جفت‌گیری به وقوع نمی‌پیوندد. با توجه به اینکه جفت‌گیری در فاز مذکور با انزال اسپرم و مواجهه سیستم ایمنی مادر با تعداد زیادی از آنتی‌ژن‌های بیگانه همراه است، منطقی است که تنظیم ایمنی در این فاز با مکانیزم‌های متفاوتی نسبت به سایر فازهای سیکل استروس انجام پذیرد. با توجه به نقش اساسی آنزیم IDO در مهار پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های T، در این مطالعه بیان ژن این آنزیم در آندومتر موش‌های BALB/C در فازهای مختلف سیکل استروس به روش RT-PCR نیمه کمی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که آنزیم IDO در تمام فازهای

القاء پاسخ‌های مخرب سیستم ایمنی مادر علیه آنتی‌ژن‌های اسپرم می‌تواند با ناباروری و یا سقط جنین همراه باشد. از این رو تنظیم ایمنی در موضع بارداری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار خواهد بود. از وقایع ایمونولوژیک فاز استروس، مهاجرت ترجیحی جمعیت خاصی از سلول‌های سیستم ایمنی به موضع آندومتر می‌باشد. مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داده است که در فاز استروس تعداد ماکروفاژها در آندومتر موش به شدت افزایش می‌یابد. برعکس در فاز دی‌استروس، هنگامی که غلظت استروژن کاهش و پروژسترون افزایش پیدا می‌کند، فراوانی این سلولها بسیار کم شده و در طی فاز پرواستروس در سطح پایینی باقی می‌ماند (۲۳).

مهاجرت ماکروفاژها به آندومتر در فاز استروس احتمالاً ناشی از تأثیر استروژن در آزاد شدن طیف وسیعی از فاکتورهای کموتاکتیک توسط سلول‌های اپی‌تلیال و استرومایی آندومتر می‌باشد (۲۳). جالب توجه اینکه پس از شروع بارداری و به هنگام لانه‌گزینی تعداد ماکروفاژهای آندومتر باز هم افزایش می‌یابد. مطالعات انجام شده توسط زرنانی و همکاران (۲۷) نشان داد که سلول‌های دندریتیک در تمام فازهای

1- Syngenic

2- Major Histocompatibility Complex

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به یافته‌های این پژوهش به نظر می‌رسد آنزیم ایندول آمین ۲ و ۳ دی اکسیژناز در اندومتر موش طی فازهای مختلف سیکل استروس کاملاً کنترل شده بیان می‌شود و بیان بالای آن در فاز استروس مؤید نقش حفاظتی این آنزیم در جلوگیری از القاء واکنش‌های ایمنولوژیک مضر علیه آنتی‌ژن‌های اسپرم می‌باشد. با توجه به توضیحات فوق به نظر می‌رسد که بر خلاف یافته Munn و Mellor (۲۴) آنزیم IDO در روزهای بعد از جفت‌گیری نیز در دسیدوای موش‌های باردار بیان شود. نظریه اخیر در حال حاضر توسط این گروه تحت بررسی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با اعتبار تخصیص یافته از سوی مرکز ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور طی قرارداد شماره ۳۳۵۶/ت/م و حمایت‌های مالی پژوهشگاه فناوری‌آوری‌های علوم پزشکی- ابن‌سینا انجام گرفته است. بدین وسیله از زحمات جناب آقای محمدرضا پازوکی که تایپ این مقاله را بر عهده گرفتند تشکر و قدردانی می‌گردد.

سیکل استروس موش حضور دارند و فراوانی نسبی این سلولها در فاز استروس به طور معنی‌داری بالاتر از سایر فازهای سیکل استروس می‌باشد.

در مورد سلول‌هایی که آنزیم IDO را در اندومتر بیان می‌کنند، اطلاعات جامعی در دسترس نیست.

در انسان نشان داده شده است که سلول‌های سن‌سی‌شیوتروفوبلاست و سلول‌های تروفوبلاست خارج ویلوسی این آنزیم را بیان می‌کنند (۳). ولی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن شامل ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک مهمترین کاندیدای بیان IDO در سطح تماس مادر- جنین می‌باشند. مطالعات انجام شده نشان داده است که ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک IDO را به مقدار زیاد بیان می‌کنند (۱۱،۱۲). در این مطالعه نیز نشان داده شد که ماکروفاژهای حنفاقی و سلول‌های دندریتیک طحالی موش پس از تحریک با IFN γ سطح بالایی از IDO را بیان می‌کنند. بنابراین به نظر می‌رسد که بالا بودن بیان نسبی IDO در فاز استروس نسبت به سایر فازها مربوط به مهاجرت ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک به اندومتر باشد. این سلولها می‌توانند آنتی‌ژن‌های اسپرم و یا سایر آنتی‌ژن‌های بیگانه پدري را به لنفوسیت‌های T مادر عرضه کرده و پس از تحریک آنها، بواسطه بیان IDO سبب القاء انرژي در این سلولها شوند.

References

- 1- Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998;281(5380):1191-3.
- 2- Suzuki S., Tone S., Takikawa O., Kubo T., Kohno I., Minatogawa Y. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early conception. *Biochem J*. 2001;355(Pt 2):425-9.
- 3- Sedlmayr P., Blaschitz A., Wintersteiger R., Semlitsch M., Hammer A., MacKenzie C.R., et al. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(4):385-91.
- 4- Kudo Y., Boyd C.A. Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1500(1):119-24.
- 5- Taylor M.W., Feng G.S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J*. 1991;5(11):2516-22. Review.
- 6- Mellor A.L., Munn D.H. Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Semin Immunol*. 2001;13(4):213-8.

- 7- Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Ferrara G.B. T cell proliferation is blocked by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Transplant Proc.* 2001;33(1-2):428-30.
- 8- Takikawa O., Habara-Ohkubo A., Yoshida R. IFN-gamma is the inducer of indoleamine 2,3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. *J Immunol.* 1990;145(4):1246-50.
- 9- Werner-Felmayer G., Werner E.R., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wachter H. Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1012 (2):140-7.
- 10- Fuchs D., Malkovsky M., Reibnegger G., Werner E.R., Forni G., Wachter H. Endogenous release of interferon gamma and diminished response of peripheral blood mononuclear cells to antigenic stimulation. *Immunol Lett.* 1989;23(2):103-8. Review.
- 11- Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A.L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999;189(9):1363-72.
- 12- Hwu P., Du M.X., Lapointe R., Do M., Taylor M.W., Young H.A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol.* 2000; 164(7):3596-9.
- 13- Fallarino F., Vacca C., Orabona C., Belladonna M.L., Bianchi R., Marshall B., et al. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha (+) dendritic cells. *Int Immunol.* 2002;14(1):65-8.
- 14- Yoshida R., Urade Y., Nakata K., Watanabe Y., Hayashi O. Specific induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by bacterial lipopolysaccharide in the mouse lung. *Arch Biochem Biophys.* 1981;212(2):629-37.
- 15- Malina H.Z., Martin X.D. Indoleamine 2,3-dioxygenase: antioxidant enzyme in the human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996;234(7):457-62.
- 16- Yamazaki F., Kuroiwa T., Takikawa O., Kido R. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem J.* 1985;230(3):635-8.
- 17- Zarnani A.H., Moazzeni S.M., 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): 275-82.
- 18- Thellin O., Heinen E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology.* 2003;185(3):179-84. Review.
- ۱۹- مصفا نریمان، زرنانی امیر حسن، حسن زهیر محمد. ایمونولوژی حاملگی طبیعی. چاپ اول، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی (۱۳۸۲)، فصل ۶، صفحات: ۱۸۱-۱۶۴.
- 20- Erlebacher A. Why isn't the fetus rejected? *Curr Opin Immunol.* 2001;13(5):590-3.
- 21- Heyborne K., Silver R.M. Immunology of postimplantation pregnancy, In: *Reproductive Immunology*, Bronson R. (Editors), Blakwell scientific publications Ltd. 1996;pp:383-417.
- 22- Mellor A.L., Munn D.H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. *J Reprod Immunol.* 2001;52(1-2): 5-13. Review.
- 23- Hunt J.S., Robertson S.A. Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. *J Reprod Immunol.* 1996;32(1):1-25. Review.
- 24- Mellor A.L., Sivakumar J., Chandler P., Smith K., Molina H., Mao D., et al. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol.* 2001;2(1):64-8.
- 25- Zarnani A.H., Dokouhaki P., Tehrani M.J., Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Immunological Tolerance during Pregnancy. *Iranian J Immunol.* 2004;1:143-153. Review.
- ۲۶- مصفا نریمان، زرنانی امیر حسن، حسن زهیر محمد، ایمونولوژی حاملگی طبیعی. چاپ اول، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی (۱۳۸۲)، فصل ۵، صفحات: ۱۰۶-۱۳۵.
- 27- Zarnani A.H., Moazzeni S.M., Shokri F., Salehnia M., Dokouhaki P., Shojaeian J., et al. Analysis of endometrial myeloid and lymphoid dendritic cells during mouse estrus cycle. *J Reprod Immunol.* 2006;71(1):28-40.