مطالعه تأثیر سرم موش باردار بر القاء بیان آنزیم ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز (IDO) در سلول‌های دندریتیک

شهره نیکو (M.Sc.)[۱]، سید محمد مؤذنی (Ph.D.)[۱]، محمود بزرگمهر (M.Sc.)[۱]، امیرحسن زرنانی (Ph.D., D.M.T.)[۲،۳]

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

۲ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، تهران، ایران.

۳ـ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عوامل زیادی در القاء تحمل ایمونولوژیک مادر علیه جنین نقش دارند. یکی از این عوامل که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است، آنزیم ایندول آمین ۲و۳ دی اکسیژناز (IDO) است که باعث کاتابولیسم تریپتوفان می‌شود و نقش مهمی در ایجاد یک بارداری موفق دارد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سرم موش باردار بر القاء بیان آنزیم IDO در سلول‌های دندریتیک بود که می‌تواند به عنوان پایه‌ای در مطالعات کاربردی در خصوص علل ایمونولوژیک سقط جنین استفاده شود.

روش بررسی: سرم موش‌های باردار آلوژنیک در اواسط بارداری جمع‌آوری شد. سلول‌های دندریتیک از طحال موش‌های Balb/c طی روش سه مرحله‌ای شامل: هضم آنزیمی بافت طحال با کلاژناز، جداسازی سلول‌های کم چگال به کمک محیط گرادیان نایکودنز و سرانجام چسبندگی به پلاستیک جدا شدند. سلول‌های T نیز از غدد لنفاوی موش C57BL/6 با روش نایلون وول جداسازی شدند. سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار و غیرباردار به‌عنوان سلول‌های محرک، اشعه داده شده و با سلول‌های T خالص شده به‌صورت همزمان کشت داده شدند (Allogenic MLR). در بعضی از حفرات کشت نیز مهارکننده اختصاصی آنزیم IDO یعنی ۱ـ متیل تریپتوفان با غلظت‌های مختلف اضافه گردید و میزان تکثیر لنفوسیت‌های T با استفاده از تیمیدین نشاندار سنجیده شد. مایع رویی کشت MLR نیز از نظر وجود متابولیت‌های آنزیم IDO یعنی تریپتوفان و کینورنین به‌وسیله روش HPLC سنجیده شد. کلیه آزمایشات ۵ بار تکرار گردید. از آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney برای بررسی اختلاف بین گروهها استفاده گردید. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب گردید.

نتایج: نتایج حاصل نشان داد که سرم موش باردار در مقایسه با سرم موش غیرباردار باعث کاهش توان سلول‌های دندریتیک در القاء پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T می‌شود ولی این مهار با اضافه کردن ۱ـ متیل تریپتوفان به‌صورت معنی‌داری تغییر نمی‌کند. اندازه‌گیری متابولیت‌های آنزیم IDO به‌وسیله HPLC نیز تفاوت معنی‌داری را در دو حالت مورد بررسی نشان نداد.

نتیجه‌گیری: عوامل زیادی از قبیل استروژن، پروژسترون، IL-10، Vit D3 و... در سرم موش باردار وجود دارند که با تأثیر بر روی سلول‌های دندریتیک باعث مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T در واکنش MLR آلوژنیک می‌شوند. لیکن به نظر نمی‌رسد که مهار ایجاد شده از طریق القاء آنزیم IDO باشد و احتمالاً مکانیزم‌های دیگری در این پدیده دخالت دارند که شناخت آنها نیازمند مطالعات بیشتری می‌باشد.

کلید واژگان: بارداری، سلول‌های دندریتیک، ایندول آمین دی‌اکسیژناز، MLR آلوژنیک، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

مسؤل مکاتبه: دکتر سید محمد مؤذنی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: Moazzeni@dr.com

Archive of SID

www.SID.ir

زمینه و هدف

بارداری یک پروسه پیچیده است و نیاز به تغییرات فیزیولوژیک در کل بدن مادر و همچنین در سطوح مختلف سیستم ایمنی دارد. اخیراً مشخص شده است که در طی بارداری سلول‌های در گردش سیستم ایمنی مادر از نظر تعداد، فنوتیپ، عملکرد و توانایی تولید فاکتورهای محلول مانند سایتوکینها دچار تغییر می‌شوند. در بارداری یک حالت تحمل ایمنی انتخابی و یا تعدیل پاسخ‌های ایمنی همراه با پاسخ‌های قوی ضدمیکروبی وجود دارد. به هر حال شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد عملکرد سیستم ایمنی مادر می‌تواند توسط ریزمحیط‌های[1] هورمونی و سایتوکینی تغییر یابد. علاوه بر مهار ایمنی موضعی، وضعیتی از مهار ایمنی سیستمیک نیز وجود دارد که به‌دلیل وجود فاکتورهای تنظیمی در سرم فرد باردار است. فعالیت اصلی این فاکتورها مثل سایتوکینها، پروستاگلاندینها، هورمونها و ... بیشتر به‌صورت موضعی و در سطح تماس مادر و جنین است و هرگونه اثرات سیستمیک این فاکتورها می‌تواند به علت پدیده سرریز[2] باشد (۱).

اثرات بارداری بر روی عملکرد سلول‌های ایمنی مادر از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در این زمینه سلول‌های دندریتیک نیز که به‌عنوان مهمترین سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن فعالیت نموده و می‌توانند پاسخ سلول‌های T دست نخورده را القاء کنند، اهمیت به سزایی دارند (۲). از جمله ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک بیان آنزیم IDO در شرایط خاص است. سلول‌های دندریتیک با استفاده از این مکانیسم و مکانیسم‌های متعدد دیگر پاسخ‌های ایمنی را کنترل می‌کنند. آنزیم IDO تریپتوفان را تبدیل به کینورنین می‌کند که کمبود تریپتوفان و همچنین تولید متابولیت‌های سمی کینورنین باعث کاهش پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T می‌شوند (۳).

اهمیت آنزیم IDO در بارداری، اولین بار بوسیله Munn و همکاران مشخص شد. آنها نشان دادند که تلقیح مهار کننده اختصاصی آنزیم IDO یعنی ۱ـ متیل تریپتوفان به موش‌های باردار آلوژن، باعث سقط جنین در آنها می‌شود (٤). تحقیقات قبلی نشان دادند که سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار باعث مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T در محیط MLR[3] آلوژنیک می‌شوند (٥)؛ لذا هدف این تحقیق بررسی عملکرد آنزیم IDO و مکانیزم احتمالی مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T از طریق این آنزیم می‌باشد.

روش بررسی

۱ـ روش تهیه سرم موش در اواسط بارداری: از تکنیک تشخیص پلاک واژینال برای تعیین سن بارداری استفاده شد. برای ایجاد بارداری آلوژنیک، موش‌های ماده Balb/c با موش‌های نر (نژاد C57BL/6) جفت‌اندازی شدند. موش‌های ماده تا ۳ روز متوالی هر روز صبح از نظر تشکیل پلاک واژینال مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام موش‌های ماده پلاک مثبت، وجود اسپرم نیز در ترشحات واژن از طریق تهیه اسمیر واژینال بررسی گردید. روز مشاهده اسپرم در اسمیر واژینال به عنوان روز ۰/۵ بارداری در نظر گرفته شد. خونگیری از قلب موش‌های ماده Balb/c در اواسط بارداری (۱۱ـ۹ روزگی) انجام گرفت و سرم آن جدا گردید. سرم بدست آمده با فیلتر ۰/۲۲μ استریل و در فریز ۷۰- درجه تا زمان استفاده نگهداری گردید. از سرم موش ماده غیرباردار نیز به‌عنوان کنترل استفاده شد.

۲ـ تخلیص سلول‌های دندریتیک از طحال موش: در هر آزمایش بسته به تعداد سلول‌های دندریتیک مورد نیاز از ۲ تا ۳ موش استفاده شد. ابتدا موش‌های Balb/c

1- Microenvironment
2- Overflow
3- Mixed Lymphocyte Reaction

Archive of SID
www.SID.ir

نخاعی شده و با قیچی استریل پوست ناحیه شکم برش زده شده و طحال برداشته شد. بافر هضم‌کننده شامل آنزیم کلاژناز (Roche,Germany) به غلظت ۱*mg/ml* و DNase (Roche,Germany) به غلظت ۲۰*µg/ml* به طحال تزریق گردید. سوسپانسیون سلولی حاصل، در یک لوله فالکون جمع‌آوری و بر روی یخ قرار داده شد. باقیمانده بافت طحال توسط قیچی تیز به قطعات کاملاً ریز تبدیل شد و سپس ۳-۲ *ml* بافر هضم‌کننده روی آن اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ ℃ حاوی ۵٪ CO_2 گذاشته شد. پس از پایان انکوباسیون به قطعات بافتی ۵*mM* EDTA[1] اضافه گردید و سوسپانسیون سلولی بدست آمده از الک سلولی عبور داده شد و با سوسپانسیون سلولی حاصل از تزریق آنزیمی مخلوط گردید. مخلوط سلولی ۲ بار با ۵*mM* PBS-EDTA[2] شسته شده و تعداد سلول‌های حاصل و نیز میزان حیات آنها با استفاده از لام نئوبار و با روش تریپان بلو برآورد گردید. پس از دومین شستشو، محلول رویی به دقت خارج گردید و رسوب سلولی با محیط کشت حاوی ۲٪ FCS[3] (Gibco, England) و ۵ *mM* EDTA مخلوط گردید. مخلوط حاصل به آرامی روی نایکودنز (Axis-Shield, Norway) ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۰۰*g* و دمای ٤ ℃ سانتریفیوژ گردید. سلول‌های با دانسیته پایین که شامل سلول‌های دندریتیک و تعدادی لنفوسیت و مونوسیت بودند توسط پی‌پت پاستور به آرامی جمع‌آوری شدند و یک بار با ۵ *mM* PBS-EDTA سرد و ۲ بار با PBS سرد در دور ۳۳۰ *g* شسته شده، شمارش گردیده و میزان حیات آنها محاسبه گردید. رسوب سلولی حاصل با محیط PRMI-1640 (Gibco,England) حاوی ۱۰٪ FCS مخلوط گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ ℃ و ۵٪ CO_2 کشت داده شد. در این مرحله سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها به کف پلیت می‌چسبند. بعد از کشت دو ساعته، سلول‌های غیرچسبان با RPMI[4] گرم چندین بار به آرامی شسته شدند که با مشاهده کف پلیت توسط میکروسکوپ معکوس در صورت وجود ناخالصی عمل شستشو تکرار گردید. با توجه به شکل خاص سلول‌های دندریتیک، درصد خلوص در این مرحله به بیش از ۷۵٪ رسید. به سلول‌های باقی مانده در کف پلیت، محیط گرم حاوی ۱۰٪ FCS اضافه گردید و پلیت‌ها ۱۶-۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ ℃ و ۵٪ CO_2 قرار داده شدند. پس از کشت شبانه، سلول‌های دندریتیک از ته پلیت جدا شده و شناور می‌شدند که به آرامی جمع‌آوری شده و ۲ بار با PBS سرد شسته شدند و پس از شمارش به‌عنوان سلول‌های دندریتیک جهت بررسی فلوسایتومتری و آزمایش MLR مورد استفاده قرار گرفتند (٦).

۳- جداسازی گره لنفاوی و تخلیص سلول T به‌وسیله ستون نایلون وول[5]: ابتدا یک موش C57BL/6 نخاعی شد و تحت شرایط استریل غدد لنفاوی براکیال آن جدا شد. سپس گره‌های جدا شده له شد تا تمام سلول‌های آن خارج شود. سوسپانسیون سلولی بدست آمده از الک سلولی عبور داده شد و ۲ بار با PBS استریل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰*g* شستشو گردید. سلولها در این مرحله شمارش شده و تعداد و میزان حیات آنها بررسی شد. در مرحله بعد ۵۰۰ *µl* از سوسپانسیون سلولی آماده شده روی ستون نایلون وول استریل که قبلاً دمای آن به ۳۷ ℃ رسانده شده بود برده شد. ستون حاوی سلول به مدت ٤٥ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. پس از انکوباسیون، سلول‌های متصل نشده به ستون به آرامی خارج شده در یک لوله فالکون جمع‌آوری گردید. سلول‌های جمع‌آوری شده برای ۱۰ دقیقه در ۳۳۰*g* سانتریفیوژ و شستشو داده شده،

1- Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
2- Phosphate Buffer Saline
3- Fetal Calf Serum
4- Roswell Park Memorial Institute
5- Nylon wool

Archive of SID
www.SID.ir

شمارش شدند. پس از بررسی درصد خلوص سلول‌های بدست آمده با روش فلوسایتومتری، این سلولها در آزمایش MLR مورد استفاده قرار گرفتند.

۴ـ آنالیز فلوسایتومتری: از سلول‌های دندریتیک حاصل پس از کشت شبانه، سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱×۱۰^{۶} *cell/ml*، تهیه شد سپس ۱۰۰ *µl* از این سوسپانسیون در دو لوله ریخته شد و لوله‌ها در بشر حاوی یخ قرار داده شد. به لوله تست ۱ *µl* آنتی‌بادی ضد CD11c موش با منشاء هامستر کونژوگه با PE[1] (BD,U.S.A) و به لوله دیگر، کنترل ایزوتیپ مربوطه اضافه شد. لوله‌ها ۴۵ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. پس از انکوباسیون نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتری FACS (Partech, Germany) در سازمان انتقال خون تهران آنالیز گردید.

از سلول‌های T حاصل یک سوسپانسیون با غلظت ۱×۱۰^{۶} *cell/ml* در بافر فلوسایتومتری تهیه شد. ۱۰۰ *µl* از سوسپانسیون سلولی به ۲ لوله فلوسایتومتری منتقل گردید. به لوله تست ۵ *µl* آنتی‌بادی ضد CD3 موش با منشاء رت نشاندار با PE (Serotec, U.K) و به لوله دیگر، کنترل ایزوتیپ مربوطه اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس از انکوباسیون سلولها، نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتری آنالیز گردید.

۵ـ واکنش MLR آلوژنیک و بررسی اثر سرم موش باردار بر سلول‌های دندریتیک در القای پرولیفراسیون سلول‌های T: سلول‌های دندریتیک طبق روش گفته شده از موش Balb/c ماده جدا شدند و در کشت شبانه با سرم موش باردار و غیرباردار با غلظت ۲/۵٪ مجاور گردیدند و سپس ۳۰۰۰ rad اشعه داده شدند.

غلظت‌های ۱×۱۰^{۵} *cell/ml*، ۲×۱۰^{۵} *cell/ml*، ۵×۱۰^{۴} *cell/ml* و $۲/۵\times۱۰^{۴}$ *cell/ml* از سلول‌های دندریتیک مجاور شده با سرم موش باردار و غیرباردار در محیط کامل RPMI تهیه گردید. لنفوسیت T از غدد لنفاوی موش C57BL/6 جدا شد. غلظت ۱×۱۰^{۶} *cell/ml* از سلول‌های T در محیط کامل RPMI تهیه گردید. از تمامی غلظت‌های تهیه شده از سلول‌های دندریتیک، ۱۰۰ *µl* به حفره‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل به‌صورت ۳ تایی اضافه شد. از سوسپانسیون سلول‌های T تهیه شده نیز ۱۰۰ *µl* به حفره‌های حاوی سلول‌های دندریتیک با غلظت‌های مختلف اضافه گردید. به‌عنوان کنترل منفی، سلول‌های دندریتیک تنها و سلول‌های T تنها به‌صورت ۳ تایی در حفره‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند و به‌عنوان کنترل مثبت نیز PHA[2] (Gibco,England) با غلظت ۵ *µg/ml* به کشت لنفوسیت‌های T اضافه گردید. تمامی نمونه‌ها برای مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. پس از این مدت تایمیدین نشاندار (^{3}H-Thymidine) (Amersham, U.K.) با غلظت ۱ *µci/well* به هر حفره اضافه گردید. ۱۸-۱۶ ساعت بعد سلولها توسط دستگاه Cell harvester (Titertec, UK) جمع‌آوری شدند و تکثیر سلول‌های T برحسب شمارش در دقیقه (CPM)[3] با دستگاه بتا کانتر (Wallac, 14410, Germany) اندازه‌گیری شد.

۶ـ بررسی تأثیر سرم موش باردار روی القاء آنزیم IDO در سلول‌های دندریتیک در محیط MLR آلوژنیک: به منظور ردیابی آنزیم IDO در محیط کشت از دو روش استفاده شد:

الف ـ استفاده از مهارکننده اختصاصی آنزیم IDO: آزمایش MLR با استفاده از سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار در اواسط بارداری انجام شد. سپس به منظور بررسی حضور آنزیم IDO در محیط، مهارکننده اختصاصی این آنزیم یعنی ۱ـ متیل D- تریپتوفان (Sigma,USA) با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ *µM* به کشت همزمان لنفوسیت‌های T

1- Phycoerythrin

2- Phytohemagglutinin
3- Count Per Minute

Archive of SID
www.SID.ir

و سلول‌های دندریتیک اضافه شد. بعد از ۷۲ ساعت از کشت سلولها و اضافه نمودن تیمیدین ^{3}H، ۱۸ ساعت بعد سلولها جمع‌آوری شدند و نتایج با بتاکانتر خوانده شد.

ب- بررسی متابولیت‌های آنزیم IDO به روش HPLC: بعد از کشت ۷۲ ساعته مایع رویی (۱۵۰ *µl*) کشت MLR به دست آمد. از دو حالت مورد بررسی (سلول‌های دندریتیک مجاور شده با سرم غیرباردار و سرم باردار) جمع‌آوری گردید و پروتئین‌های اضافی آن با متانول (Merck, Germany) رسوب داده شد. الکل نمونه‌ها تحت تأثیر خلاء خشک شد و نمونه‌ها در ۱۰۰ *µl* آب دیونیزه[1] حل شدند و برای بررسی مقدار تریپتوفان و کینورنین موجود در آنها به‌وسیله دستگاه HPLC (Pharmacia, Seweden) (ACTA Purifier) آماده شدند. ستون مورد استفاده ستون C18 آنالیتیک فاز معکوس بود (C18 ion exchanger).

در ابتدا برای بدست آوردن زمان خروج[2] تریپتوفان و کینورنین از ستون، استانداردهای تریپتوفان و کینورنین (Sigma,U.S.A.) در غلظت‌های مختلف شامل ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ *µg/ml* در آب دیونیزه تهیه شد. سپس ۱۰۰ *µl* از هر استاندارد به ستون C18 فاز معکوس تزریق شد. فاز متحرک شامل آب و استونیتریل بود که از غلظت ۴۰-۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه روی ستون برده شد. جذب تریپتوفان و کینورنین در طول موج‌های ۲۲۵، ۲۵۴ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه HPLC خوانده شد. زمان خروج استاندارد کینورنین و تریپتوفان از ستون به ترتیب ۶/۵ و ۸ دقیقه پس از تزریق بود. سپس نمونه‌های آماده شده به مقدار ۱۰۰*µl* به داخل ستون C18 تزریق شد و با توجه به زمان خروج نمونه‌های استاندارد، حداکثر مقدار[3] تریپتوفان و کینورنین در نمونه‌های مورد نظر تشخیص داده شد و سطح زیر منحنی تریپتوفان و کینورنین در هر دو حالت بررسی گردید (۷).

۷- آنالیز آماری: آنالیز آماری توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱۱ انجام گرفت. در این مطالعه از آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney برای بررسی اختلاف بین گروهها استفاده گردید. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و $p<0/05$ معنی‌دار محسوب گردید. تمامی آزمایشات به صورت سه تایی بوده و هر آزمایش ۵ بار تکرار گردید. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار Mean±SD پنج آزمایش مستقل ارائه شده‌اند.

نتایج

جداسازی سلول‌های دندریتیک و سلول‌های T: در این مطالعه برای جداسازی سلول‌های کم چگال از نایکودنز فاقد سمیت برای سلولها استفاده شد.

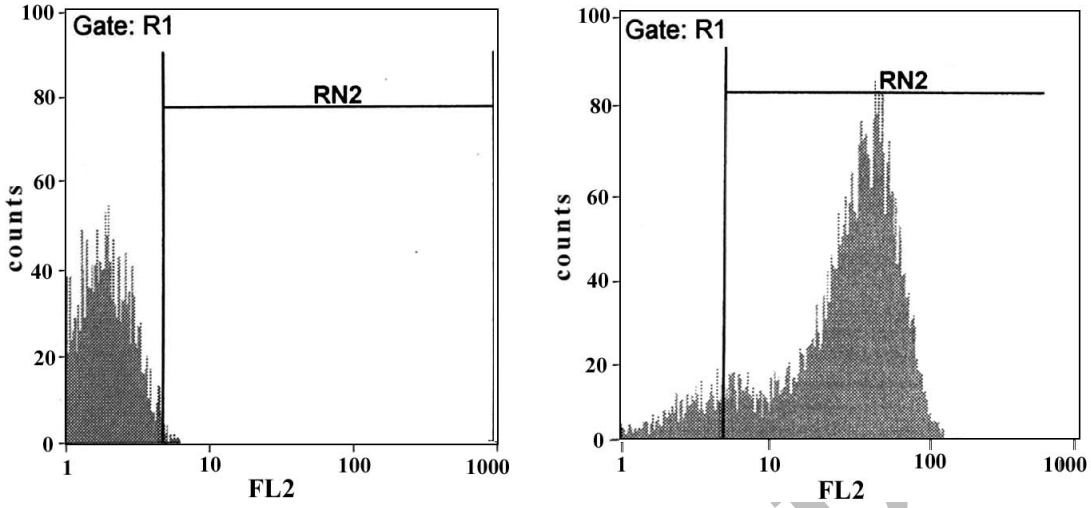
نایکودنز مورد استفاده ۱۲/۲٪ بوده و سوسپانسیون سلولی به آرامی روی آن برده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ ℃ با دور ۶۰۰ *g* سانتریفیوژ شد.

پس از سانتریفیوژ، سلول‌های دندریتیک به همراه مونوسیتها و مقداری لنفوسیت در حد فاصل نایکودنز و محیط کشت شناور می‌مانند.

نتایج حاصل نشان داد که از هر طحال حدود ۱۰ تا ۱۵ میلیون سلول تک هسته‌ای بدست می‌آید که در تمام موارد درصد حیات آنها بیشتر از ۹۵٪ بود. خلوص سلول‌های دندریتیک حاصل بعد از کشت ۲ ساعته با استفاده از میکروسکوپ معکوس حدود ۷۰٪ تخمین زده شد. بعد از کشت ۱۸ ساعته نیز سلول‌های دندریتیک شناور جمع‌آوری شدند و میزان خلوص آنها با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس توسط آنتی‌بادی اختصاصی سلول‌های دندریتیک موش (Anti-CD11c) و دستگاه فلوسایتومتر بیش از ۲±۸۵٪ تعیین شد (نمودار ۱).

1- Deionized water
2- Retention time
3- Peak

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۱- بررسی بروز شاخص CD11c توسط فلوسایتومتر بر سطح سلول‌های دندریتیک خالص شده. میزان خلوص سلول‌های دندریتیک ($CD11c^+$) در این نمونه۸۵٪ بود (نمودار سمت چپ مربوط به کنترل ایزوتیپ و نمودار سمت راست مربوط به لوله آزمون است).

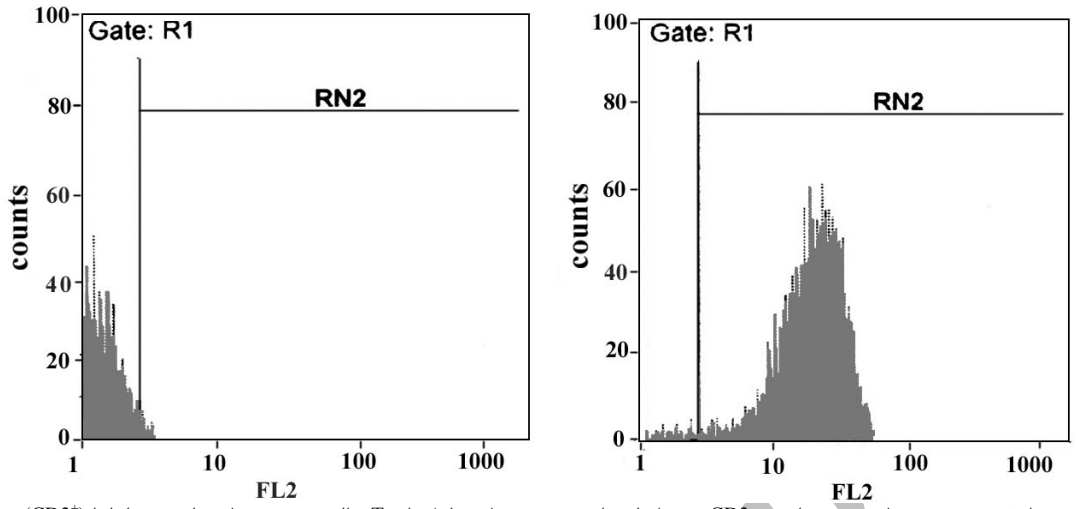
جداسازی و تخلیص سلول‌های T از غدد لنفاوی موش به‌وسیله تکنیک نایلون وول انجام گرفت. میزان خلوص سلول‌های T جدا شده با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر و Anti-CD3، ۲±۹۰٪ تعیین شد. درصد زنده بودن سلول‌های حاصل در تمام موارد بیش از ۹۵٪ بود. نمودار ۲ میزان خلوص سلول‌های T جدا شده را توسط دستگاه فلوسایتومتر نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از MLR آلوژنیک و سنجش پاسخ تکثیری: نتایج حاصل از میانگین CPM مقادیر متغیر سلول‌های دندریتیک نشان داد که وقتی نسبت سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم به لنفوسیت‌های T در MLR آلوژنیک یک دهم باشد، بیشترین اختلاف بین CPM نمونه‌های تیمار شده با سرم باردار و سرم غیرباردار مشاهده می‌گردد. بنابراین نسبت فوق‌الذکر، یعنی ۱×۱۰^{٤} سلول دندریتیک به ازای ۱×۱۰^{٥} عدد لنفوسیت T، به‌عنوان نسبت اپتیمم در تمامی آزمایشات MLR مورد استفاده قرار گرفت. نمودار ۳ میزان پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T را در برابر مقادیر متغیر سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم در واکنش MLR آلوژنیک برحسب CPM نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T در مقابل سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار و غیرباردار برحسب CPM نشان می‌دهد که سرم موش باردار باعث مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T، (۲۷۵٦±۲۳٦۰۹)، در مقایسه با سرم موش غیرباردار، (۳۰٦۱±٤۸٤۱٤)، می‌شود و تفاوت توزیع CPM نیز اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (p=۰/۰۰۰).

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف ۱- متیل D- تریپتوفان بر کشت همزمان سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار و غیرباردار و لنفوسیت‌های T آلوژن: به منظور بررسی غیرمستقیم عملکرد IDO در کشت سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار و غیرباردار، از مهارکننده اختصاصی آنزیم IDO یعنی ۱-متیل تریپتوفان استفاده شد. ۱-متیلD- تریپتوفان با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و $۵۰۰\mu M$ به کشت همزمان سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار و غیرباردار اضافه گردید و طبق نتایج بدست آمده غلظت $۳۰۰\mu M$ از ۱-متیل تریپتوفان به‌عنوان غلظت اپتیمم انتخاب شد و با توجه به اینکه در غلظت‌های بیشتر از آن پاسخ تکثیری کاهش نشان می‌داد، در سایر آزمایشات از غلظت $۳۰۰\mu M$ استفاده شد. نتایج CPM حاصل نشان داد که افزودن ۱-متیل تریپتوفان به کشت همزمان سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم باردار و لنفوسیت T،

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۲- بررسی میزان بروز شاخص CD3 توسط فلوسایتومتر بر سطح سلول‌های T خالص شده. میزان خلوص سلولها ($CD3^+$) در این آزمایش ۹۱٪ بود.

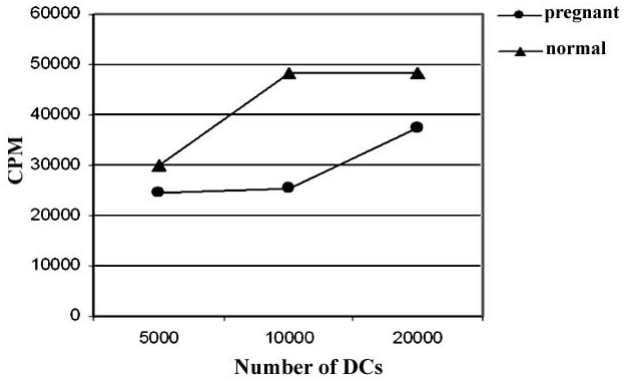
افـزایش پاسـخ تکثیـری معنـی‌داری را ایجـاد نمـی‌کنـد (p=۰/۲۲۰). نمودار ٤ مقایسه CPM در گروه سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم باردار در حضور ۱ـ متیل تریپتوفان و بدون ۱ـ متیل تریپتوفان را نشان می‌دهد.

نتایج بررسی متابولیت‌های آنزیم IDO بـه روش HPLC:

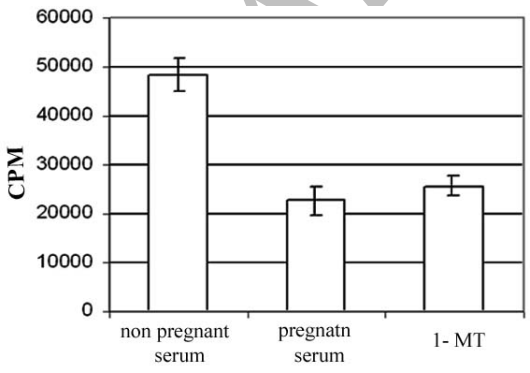
جذب اجزاء خروجی از ستون HPLC در طول موج‌های ۲۸۰، ۲٥٤ و ۲۲٥ نانومتر خوانـده شـد. از تریپتوفـان و کینـــورنین نیـــز غلظـــت‌هـــای ٥۰، ۲٥، ۱۲/٥، ٦/۲٥ و ۳/۱۲٥$\mu g/ml$ به‌عنوان استاندارد تهیه شد و زمان خروج هر نمونه از ستون بدسـت آمـد. در شـرایط بکـار بـرده شده توسط گـروه تحقیـق حاضـر کینـورنین تقریبـاً در دقیقه ٦/٥ و تریپتوفان در دقیقه ۸ از ستون خارج شد.

پـــس از عبـــور دادن مـــایع رویـــی کـــشت مخـــتلط لنفوسیت‌های T با سلول‌های دندریتیک مجاور شـده بـا سرم مـوش بـاردار و غیربـاردار، بررسـی سـطح زیـر منحنـی‌هـای تریپتوفـان و کینـورنین در ایـن دو حالـت اختلاف معنی‌داری را نشان نداد که می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً سرم موش باردار باعث القاء آنـزیم IDO در سلول‌های دندریتیک نشده است. زیرا متابولیت‌های ایـن آنزیم کـه تریپتوفـان و کینـورنین هـستند در دو حالـت مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند.

نمـودار٥ بـه ترتیـب نمونـه‌ای از منحنـی‌هـای خـروج کینورنین و تریپتوفان از سـتون C18 را در حالـت‌هـای مختلـــف اســـتاندارد، ســـرم غیربـــاردار و بـــاردار نشان می‌دهد.

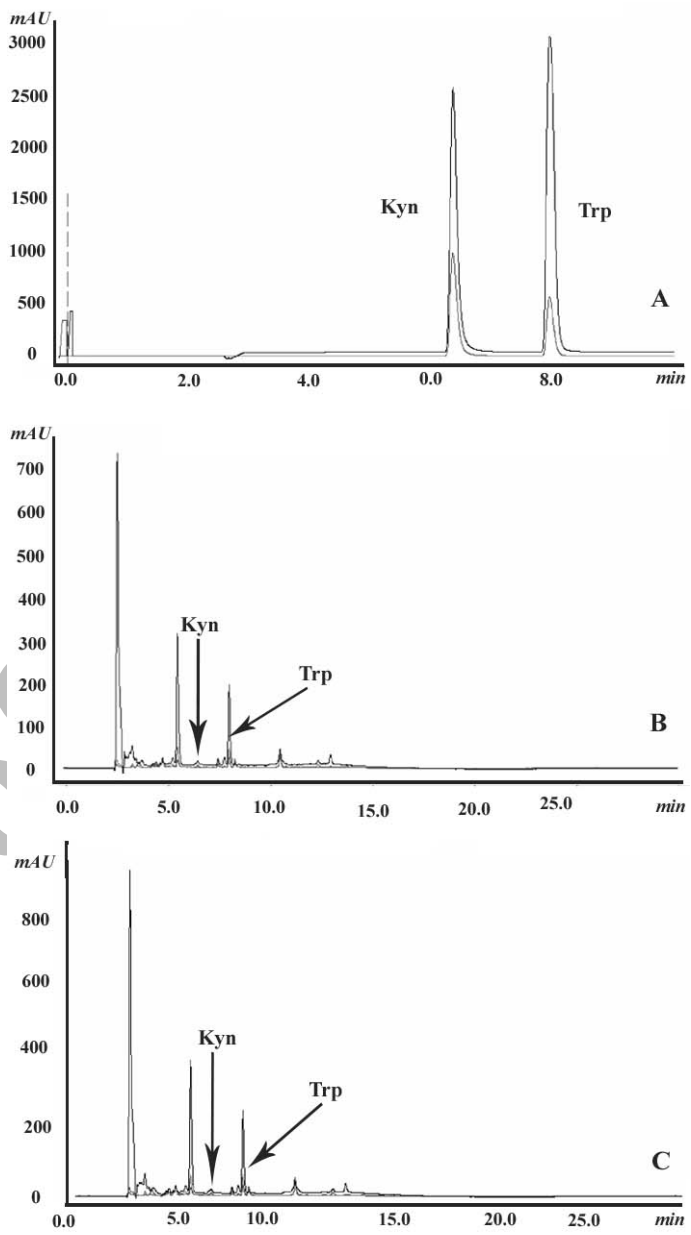


نمودار ۳- مقایسه میزان پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T در برابر فراوانی‌های متغیر سلول‌های دندریتیک مجاور شده با غلظت ۲/٥ درصد سرم موش غیرباردار و باردار در کشت مختلط لکوسیتی



نمودار ٤- مقایسه میزان پاسخ تکثیری القاء شده در لنفوسیت‌های T توسط سلول‌های دندریتیک مجاور شده با سرم موش غیرباردار، سرم موش باردار و همچنین سلول‌های دندریتیک مجاور شده با سرم موش باردار در حضور 1-MT در واکنش MLR آلوژنیک

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ٥- نمونه‌ای از منحنی‌های خروج کینورنین و تریپتوفان از ستون C18. A- منحنی مربوط به تزریق نمونه‌های استاندارد: همانطور که نشان داده شده است در شرایط آزمایش کینورنین تقریباً ٦/٥ دقیقه و تریپتوفان تقریباً ٨ دقیقه بعد از تزریق از ستون خارج می‌شود. میزان جذب در دو طول موج ٢٢٥*nm* و ٢٥٤*nm* اندازه‌گیری شده است. B- منحنی مربوط به تزریق مایع رویی کشت MLR سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش غیرباردار می‌باشد. میزان جذب در سه طول موج ٢٨٠*nm*، ٢٢٥*nm* و ٢٥٤*nm* اندازه‌گیری شده است. C- منحنی مربوط به تزریق مایع رویی کشت MLR سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش حامله می‌باشد. میزان جذب در سه طول موج ٢٨٠*nm*، ٢٢٥*nm* و ٢٥٤*nm* اندازه‌گیری شده است.

بحث

از نظر مبانی علم ایمونولوژی پدیده بارداری به سختی قابل تفسیر می‌باشد. با وجود آنتی‌ژن‌های پدری در سطح سلول‌های جفت و جنین و بیگانه بودن این آنتی‌ژنها برای سیستم ایمنی مادر، جنین توسط سیستم دفاعی مادر دفع نمی‌گردد. تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که در طی بارداری سلول‌های سیستم ایمنی مادر از نظر تعداد، فنوتیپ، عملکرد و توانایی تولید سایتوکینها دچار تغییر می‌شوند (٨) و پاسخ‌های ایمنی مادر به صورت موضعی و سیستمیک کنترل می‌گردد.

کنترل سیستمیک سیستم ایمنی مادر غالباً به‌دلیل وجود فاکتورهای تنظیمی در سرم فرد باردار است. اخیراً آنزیم IDO به‌عنوان یکی از عوامل مهارکننده پاسخ‌های ایمنی مادر در طی بارداری مطرح شده است که با کاهش تریپتوفان و تولید متابولیت‌های سمی کینورنین باعث مرگ و کنترل فعالیت سلول‌های B، T و NK می‌شود (٩). در این زمینه سلول‌های دندریتیک به‌عنوان یکی از مهمترین سلول‌های تولید کننده آنزیم IDO، نقش مهمی در ایجاد تحمل مادر نسبت به جنین ایفا می‌کنند.

در این مطالعه تأثیر سرم موش بر روی القاء آنزیم IDO به‌وسیله سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سرم موش باردار در اواسط بارداری توانایی سلول‌های دندریتیک را در القاء تحریک آلوژنیک لنفوسیت‌های T به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد ولی احتمالاً سرم موش باردار باعث القاء آنزیم IDO در سلول‌های دندریتیک نمی‌شود زیرا پاسخ تکثیری لنفوسیت T در واکنش MLR در حضور مهارکننده آنزیم IDO تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. بررسی متابولیت‌های IDO یعنی تریپتوفان و کینورنین در مایع رویی کشت MLR نیز تفاوت معنی‌داری را بین گروه باردار و غیرباردار نشان نداد.

Archive of SID
www.SID.ir

مکانیسم‌های تولرانس یا تحمل، دور از موضع بارداری و به‌صورت سیستمیک و یا به‌طور موضعی و در سطح تماس مادر- جنین اعمال می‌شوند. فاکتورهای مختلفی مانند هورمون‌های استروژن- پروژسترون، IL-10، TGF-β، PGE2، AFP، Annexin II، ویتامین D3و... در سطح تماس مادر- جنین تولید می‌شوند که قادر به سرکوب سیستم ایمنی مادر می‌باشند (۱۰). این فاکتورها با غلظت بالا در سطح تماس مادر- جنین یافت می‌شوند و سرریز آنها در گردش خون در مهار ایمنی سیستمیک مؤثر است. مطالعات انجام شده روی سرم خانم‌های باردار نشان داده است که سرم افراد باردار روی عملکرد سلول‌های T اثر مهاری دارد که ناشی از فاکتورهای مهاری موجود در سرم است. این اثر مهاری در هر دو سیستم MLR آلوژنیک و اتولوگ دیده شده است (۱۱). ویتامین D3 نیز یکی دیگر از فاکتورهایی است که مشخص شده مانع بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیتها شده و بیان MHC II، CD80، CD86، CD40 و CD83 را روی این سلولها کاهش می‌دهد. همچنین توانایی سلول‌های دندریتیک مجاور شده با ویتامین D3 برای برداشت آنتی‌ژن محلول و نیز تحریک آلوژنیک و اتولوگ سلول‌های T به نحو قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۱۲).

Huck و همکارانش در سال ۲۰۰۵ تأثیر هورمون‌های مرتبط با بارداری را روی فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک مشتق از PBMC بررسی کردند. آنها نشان دادند که سلول‌های دندریتیک بالغ و نابالغ تحت تأثیر پروژسترون و استرادیولها بیان بالایی از IL-10 داشته و سلول‌های دندریتیک بالغ تحت تأثیر پروژسترون و βhCG یا استرادیول کاهش معنی‌داری را در تولید IL-18 نشان می‌دهند. ولی تفاوت معنی‌داری در بیان شاخص‌های سطحی و همچنین توانایی تحریک سلول‌های T در آنها مشاهده نشد (۱۳). مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۶ نیز نشان داد، پروژسترون باعث کاهش بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شود و اندوسیتوز سلول‌های دندریتیک را نیز افزایش می‌دهد (۱۴).

مطالعات Polanczyk و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نیز نشان داده است که استروژن تولید سایتوکین‌های التهابی مانند IL-12 و IFN-γ را در سلول‌های عرضه‌کنندهٔ آنتی‌ژن کاهش، اما تولید IL-10 را افزایش می‌دهد. همچنین بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مغز استخوان در مجاورت استروژن باعث افزایش فعالیت سلول‌های Treg و مهار مستقیم پاسخ‌های لنفوسیت T می‌شود (۱۵).

اخیراً آنزیم IDO به‌عنوان یک عامل مهم در بقاء بارداری مورد توجه محققان قرار گرفته است. مطالعات Tatsumi و همکارانش نقش مهم آنزیم IDO را در مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت T در in vitro و همچنین مهار پاسخ لنفوسیت T به آلوآنتی‌ژن‌های جنین را در بارداری نشان داده‌اند (۱۶). آنزیم IDO در سطح تماس مادر- جنین به‌وسیله سلول‌های سنسیشیوتروفوبلاست تولید می‌شود ولی به‌طور کلی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن و مخصوصاً سلول‌های دندریتیک از مهمترین سلول‌های تولید کننده IDO هستند. هر دو زیر رده لنفوئیدی و میلوئیدی سلول‌های دندریتیک آنزیم IDO را بیان می‌کنند ولی فعالیت عملی کاتابولیسم تریپتوفان تنها به‌وسیله سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی صورت می‌گیرد (۱۷). سلول‌های تولید کننده IDO در جفت انسان در سطح تماس مادر- جنین و چند روز بعد از لانه‌گزینی در دسی‌دوای موش باردار تجمع می‌یابند.

به علاوه میزان تریپتوفان سرم فرد باردار به‌طور پیشرونده‌ای از سه ماهه اول تا سه ماهه سوم بارداری، همزمان با تکامل جفت کاهش می‌یابد (۱۸).

مهار تکثیر لنفوسیت‌های T در اثر آنزیم IDO را به دو علت نسبت می‌دهند یکی کاهش تریپتوفان محیط که یک اسیدآمینه ضروری برای حیات و تکامل سلول‌هاست و مهمتر از آن تولید متابولیت‌های سمی کینورنین مانند

Archive of SID
www.SID.ir

۳ـ هیدروکسی کینورنین و ۳ـ هیدروکسی آنترانیلیک است. این متابولیت‌های سمی باعث مرگ سلول‌هایB، T و NK می‌شوند. ولی روی سلول‌های دندریتیک تولیدکننده آنزیم IDO تأثیری ندارد (۹). با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه اینگونه استنباط می‌شود که کاهش پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T به واسطه سرم موش باردار به‌دلیل القاء آنزیم IDO در سلول‌های دندریتیک نباشد، زیرا مهارکننده اختصاصی آن یعنی ۱ـ متیل تریپتوفان قادر به از بین بردن سرکوب ایجاد شده نبود ونتایج HPLC نیز آن را تأیید می‌کرد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد سرم موش باردار باعث القاء آنزیم IDO در سلول‌های دندریتیک نمی‌شود و این آنزیم بیشتر به عنوان یک عامل مهاری در موضع بارداری عمل می‌کند و تأثیرات سیستمیک آن کمتر است. بنابراین برای درک بهتر مکانیزم سرکوب باید تأثیر عوامل موجود در سرم باردار را روی سایر خصوصیات سلول‌های دندریتیک از جمله شاخص‌های سطحی و بلوغ این سلولها و توانائی تولید سایتوکین‌هایی از قبیل IL-10 IL-12, IFN-γ, و IL-18 توسط سلول‌های دندریتیک را مورد مطالعه قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از سرکار خانم مهین نیکو گفتار و دیگر پرسنل بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران که ما را در اجراء این پروژه یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌شود.

References

1- Heybon K, Silver R. Immunology of postimplantation. In Reproductive immunology. Black Well Science 1996; Chapters 14 & 15.

2- Bhzrdwaj N. The modulation of immunity by dendritic cells. Clin. Applied Immunol. Rev 2003; 3: 173-182.

3- Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? Immunol Today 1999;20(10):469-73.

4- Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. Nat Immunol 2001; 2(1): 64-8.

۵- شجاعیان ژاله، مؤذنی سید محمد، زرنانی امیر حسن، بررسی تاثیر سرم موش باردار بر عملکرد سلولهای دندریتیک با استفاده از مدل MLR آلوژنیک، فصلنامه پزشکی باروری و ناباروری، سال ۱۳۸۳، شماره ۵(۳)، صفحات ۲۰۷-۲۰۰.

6- Zarnani A.H., Moazzeni S.M., Shokri F., Salehnia M., Dokouhaki P., Shojaeian J., Jeddi-Tehrani M. The efficient isolation of murine splenic dendritic cells and their cytochemical features. Histochem Cell Biol.2006; 126 (2): 275-82.

7- Munn D. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers Indoleamine 2,3- dioxygenase activity in dendritic cells. J Immunol 2004;172:4100-4110.

8- Luppi P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. Vaccine 2003;21:3352-3357.

9- Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. J Exp Med 2002; 196(4): 447-57.

10- Thellin O, Heinen E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. Toxicol 2003; 185:179-184.

11- Manak RC. Mitogenic responses of peripheral blood lymphocytes from pregnant and ovariectomized heifers and their modulation by serum. J Reprod Immunol 1982; 4: 263-276.

12- Penna G, Adorini L. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired allure-active T cell activation. J Immunol. 2000;164(5):2405-11.

13- Huck B, Steck T, Habersack M, Dietl J, Kammerer U. Pregnancy associated hormones modulate the cytokine production but not the phenotype of PBMC-derived human dendritic cell. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005;1:122.

14- Liang J, Sun L. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. Int Immunopharmacol. 2006;6:830-838.

Archive of SID
www.SID.ir

15- Polanczyk MJ, offner C. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. J Neurosci Res. 2006.

16- Tatsumi K, Higuchi T, Fujiwara H, Nakayama T, Egawa H, Itoh K, et al. Induction of tryptophan 2, 3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. Biochem Biophys Res Commun 2000;274(1): 166-70.

17- Kudo Y, Boyd CA. Human placental indoleamine 2, 3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. Biochim Biophys Acta. 2000;1500(1):119-24.

18- Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. Nat Immunol. 2001;2(1):64-8.

Archive of SID

www.SID.ir