

بررسی تاثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بر القای آنزیم ایندول آمین ۲ و ۳ دی اکسیژناز (IDO) در سلول‌های دندریتیک، طی واکنش MLR آلوتنیک

مهدی مهدوی M.Sc.^۱، سید محمد مودنی Ph.D.^{۱*}، امیرحسین زرنانی Ph.D.^۲

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده ابن سینا، گروه ایمنولوژی
۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی

پست الکترونیک: [Email: Moazzeni@dr.com](mailto:Moazzeni@dr.com)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۲/۳۱، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۷

هدف: بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بر سلول‌های دندریتیک از نظر القای پاسخ تکثیری آلوتنیک در سلول‌های T و نیز از نظر بیان آنزیم ایندول آمین ۲ و ۳ دی اکسیژناز

مواد و روش‌ها: در ابتدا دسیدوای موش‌های C57BL/6 حامله آلوتنیک (C57BL/6xBalb/c) در اواسط حاملگی جدا و پس از هضم آنزیمی آن سوسپانسیون سلولی تهیه و کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت مایع رویی کشت سلول‌ها جمع‌آوری و در ۷۰- درجه منجمد شد. سلول‌های دندریتیک از طحال موش‌های C57BL/6 با روش هضم آنزیمی و استفاده از محیط گرادیان نایکودنز غنی‌سازی شدند. سلول‌های چسبنده‌ای که بعد از کشت دو ساعته سوسپانسیون سلولی به دست آمد در حضور غلظت‌های مختلف مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا به مدت ۱۲ تا ۱۵ ساعت انکوبه شدند. طی این زمان سلول‌های دندریتیک بالغ شده کف پلیت جدا شدند. لئوسیت‌های T از گره‌های لنفاوی براکیال و از گریلاری موش‌های Balb/c با روش نایلون ول جدا شدند. سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بعد از اشعه دادن (۳۰۰۰ rad) با لئوسیت‌های T آلوتن در محیط MLR مجاور شدند و میزان تکثیر سلولی با استفاده از روش جذب تایمیدین رادیواکتیو اندازه‌گیری شد. برای ردیابی اثر آنزیم IDO از L- متیل تریپتوفان که مهارکننده کاملاً اختصاصی آنزیم است، استفاده شد.

یافته‌ها: در آنالیز فلوسیتومتری، خلوص سلول‌های دندریتیک ۹۳±۲ درصد و میزان خلوص سلول‌های T به میزان ۹۱±۲ درصد بود. نتایج MLR حاکی از کاهش پاسخ تکثیری سلول‌های T مجاور شده با سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله بود، درحالی که تیمار سلول‌های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول‌های رحم غیرحامله چنین تاثیری را نشان نداد و این سرکوب شدن با اضافه شدن L- متیل تریپتوفان تعدیل می‌شد.

نتیجه‌گیری: مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا احتمالاً از طریق القای بروز IDO در سلول‌های دندریتیک موجب سرکوب پاسخ لئوسیت‌های T می‌شود.

کلیدواژگان: دسیدوا، سلول‌های دندریتیک، ایندول آمین ۲ و ۳ دی اکسیژناز (IDO)، MLR

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۷۹-۷۰

مقدمه

نشان می‌دهد فعال شدن سیستم ایمنی مادر برای به وجود آمدن یک حاملگی طبیعی ضروری است و عدم شناسایی جنین یا نقص در شناسایی آنتی‌ژن‌های جنینی از سوی مادر حتی می‌تواند منجر به سقط جنین گردد (۴، ۵، ۶، ۷).

برای محافظت مادر از تهاجم تروفوبلاستی، سلول‌های استرومایی آندومتر به یک ساختمان سلولی متراکم تغییر شکل می‌یابد که به آن دسیدوا گویند. دسیدوا با ایجاد یک سد فیزیکی از حرکت تروفوبلاست جلوگیری کرده و هم چنین با ایجاد ریز محیط سایتوکاینی مناسب موجب رشد تروفوبلاست می‌شود. پیدایش دسیدوا با تمایز سلول‌های مزانشیمی شبه فیبروبلاستی در آندومتر به سلول‌های دسیدوا که از نظر

بقای جنین نیمه بیگانه در طی دوره حاملگی و رد نشدن آن از سوی سیستم ایمنی مادر، با توجه به یافته‌های علم ایمنولوژی پیوند، یک سوال اساسی فرا روی محققین قرار می‌دهد (۱، ۲، ۳، ۴). در حالی که نیمی از ژنوم جنین از مادر و نیمی دیگر از پدر است و قاعدتاً جنین باید توسط سیستم ایمنی مادر دفع شود، ولی عموماً جنین پدیده‌ای مشاهده نمی‌شود (۲، ۳).

در حاملگی‌های آلوتنیک آنتی‌ژن‌های پدری به طور انتخابی روی سلول‌های تروفوبلاست جنینی بروز می‌یابند و مورد شناسایی سیستم ایمنی مادر نیز قرار می‌گیرند. در حال حاضر شواهدی وجود دارد که

پنس و قیچی بسیار ظریف جدا و با قیچی به قطعات ریز تقسیم شد. مقدار ۱ میلی لیتر بافر هضم کننده شامل آنزیم کلاژناز (Roch، آلمان) به غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر و DNase (Roch، آلمان) به غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر به قطعات دسیدوا اضافه و به مدت پنج دقیقه انکوبه شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و مجدداً ۵ میلی لیتر بافر هضم کننده بافت، اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه شد. پس از چند بار پی پت کردن، سوسپانسیون سلولی حاصل، دو بار با PBS سرد در دور ۲۰۰Xg و دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد و سلول‌های حاصل در ۸۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 (سیگما، آمریکا) حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FCS) (انگلستان، Gibco) به تعداد ۴۰۰۰۰۰ سلول در هر حفره پلیت ۲۴ خانه و به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. آن گاه مایع رویی سلول‌ها جمع آوری و تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. لازم به ذکر است کلیه آزمایشات انجام گرفته بر روی موش‌ها به تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

تخلیص سلول‌های دندریتیک از طحال موش

برای این کار از موش C57BL/6 استفاده شد. موش‌های نخاعی شده در الکل ۷۰ درجه قرار داده شدند. طحال موش‌ها از بدن آن‌ها خارج و در پلیت ۶۰ میلی متری شیشه‌ای استریل حاوی RPMI-1640 سرد قرار داده شد. پس از شستشوی سطحی طحال، با استفاده از سرنگ مقدار ۱ میلی لیتر بافر هضم کننده از قسمت راس آن تزریق شد. با استفاده از پی پت پاستور، سوسپانسیون تک سلولی حاصل جدا شد و در یک لوله فالتکون ۵۰ میلی لیتر جمع آوری و بلافاصله روی آن EDTA به غلظت نهایی ۵ میلی مولار اضافه شد و به ۴ درجه سانتی گراد منتقل شد. باقی مانده بافت طحال با قیچی جراحی تیز به قطعات حدود ۱ میلی متر خرد و مقدار ۲ میلی لیتر بافر هضم کننده به آن اضافه شد. قطعات طحالی چندین بار پی پتاژ و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه شد. سوسپانسیون سلولی حاصل، از الک سلولی (Cell Mesh) عبور داده شد و باقی مانده بافتی طحال روی الک سلولی له شد. سوسپانسیون سلولی به دست آمده دوبار با محیط PRMI سرد حاوی ۵ میلی مولار EDTA به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰Xg و دمای ۴ درجه شستشو داده شد و سپس روی محیط نایکودنز (نروژ، Pharma Axis - Shilal) با وزن حجمی ۱/۰۸۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۷۰۰Xg و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سلول‌های کم چگال که شامل سلول‌های دندریتیک و مقداری لنفوسیت و منوسیت بودند توسط پی پت پاستور به آرامی از حد فاصل بین محیط کشت و محیط گرادیان برداشت و دوبار با محیط RPMI به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰Xg و دمای ۴ درجه سانتی گراد شستشو داده شدند. از سلول‌های به دست آمده در RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS سوسپانسیونی با رقت ۱×۱۰^۷ سلول در میلی لیتر تهیه شد و در هر پلیت

مورفولوژیک و بیوشیمیایی متفاوتند، صورت می گیرد (۸). از جمله سلول‌های مستقر در دسیدوا سلول‌های دندریتیک است (۹) که این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی مغز استخوان به وجود آمده‌اند و در آغاز و تداوم پاسخ ایمنی (۱۰) و القا و حفظ تحمل مرکزی و محیطی (Central and Pripheral Tolerance) نقش حیاتی دارند (۱۱). از جمله ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک بیان آنزیم IDO در شرایط خاص است، سلول‌های دندریتیک با استفاده از این مکانیسم و مکانیسم‌های متعدد دیگر به کنترل پاسخ‌های ایمنی مبادرت می‌ورزند (۱۲). آنزیم IDO تریپتوفان را متابولیزه می‌کند و تشکیل کینورینین می‌دهد. افزایش تجزیه تریپتوفان در بسیاری از بیماری‌ها، اختلالات ایمنی سلولی، بیماری‌های عفونی، خودایمنی، سرطان‌ها و خصوصاً در حاملگی‌ها دیده می‌شود (۱۳).

بررسی‌های *in vitro* نشان داده است که در حضور IDO و تخریب تریپتوفان لنفوسیت T در مرحله G1 از چرخه سلولی متوقف می‌شود و طی چند روز بعد به سمت آپوپتوز می‌رود (۱۴).

اهمیت حضور و نقش IDO در بقای جنین، اولین بار با مطالعات مون و همکاران مشخص شد. او و همکارانش در تجربه‌ای جالب L- متیل تریپتوفان را، که مهار کننده کاملاً اختصاصی آنزیم IDO است، به صورت کیسول زیر پوستی در موش‌های حامله جاسازی و مشاهده کردند در حاملگی‌های آلورژیک مهار آنزیم IDO منجر به سقط جنین می‌شود. در حالی که این اتفاق در موش‌هایی که جنین هم‌ژن داشتند نمی‌افتد (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). این پدیده نشان می‌دهد سلول‌های بیان کننده IDO از آن دسته سلول‌های تنظیم کننده پاسخ ایمنی هستند که جنین آلورژن را در مقابل پاسخ‌های ایمنی سلولی محافظت می‌کنند (۱۲).

تحقیقات گذشته ما نشان داده است که سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله موجب سرکوب لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی‌ژن می‌شود (۱۹). لذا در این تحقیق به بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بر عملکرد سلول‌های دندریتیک طی واکنش MLR آلورژیک و یافتن مکانیسم احتمالی اثر آن پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا

برای به دست آوردن موش حامله آلورژن موش‌های نر بالغ Balb/c با موش‌های ماده بالغ C57BL/6 آمیزش داده شدند. روز مشاهده پلاک واژینال و اسپرم در اسپرم واژینال به عنوان روز نیم حاملگی در نظر گرفته شد. ۱۰/۵ تا ۱۱/۵ روز پس از حاملگی موش‌ها با روش cervical dislocation نخاعی شدند و رحم حاوی جنین از بدن موش خارج و مستقیماً داخل PBS استریل سرد قرار داده شد. با قیچی کردن منطقه آنتی‌مزومتربال لایه‌های اطراف جنین از دسیدوا جدا شد. سپس بافت سفید متمایل به کرم دسیدوا از پشت جفت به کمک

تاثیر ریز محیط دسیدوا روی سلول های دندریتیک

و سپس آنتی بادی لایه دوم که کنژوگه به فیکواریترین بود، (Phycoerythrin conjugated mouse anti-hamster IgG, Pharmingen, USA) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. پس از انکوباسیون سلول ها دوبار با بافر فلوسیتومتری شسته و توسط دستگاه فلوسیتومتری (Partech, Germany) آنالیز شدند.

از سلول های T به دست آمده از ستون نایلون وول نیز سوسپانسیون سلولی تهیه، سپس به دو لوله تقسیم و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرم ۵ درصد رت مجاور شد. پس از دوبار شستشو در ۴۰۰XG به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه، به لوله تست ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد CD3 نشان دار با (PE conjugated Rat anti mouse CD3, Serotec, U.K) و به لوله کنترل ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی کنترل ایزوتیپ اضافه و ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد و پس از دوبار شستشو در ۴۰۰XG، برای آنالیز فلوسیتومتری استفاده شد.

واکنش MLR آلورژنیک و بررسی اثر مایع رویی کشت سلول های دسیدوا بر سلول های دندریتیک در القای پرولیفراسیون سلول های T

به منظور بررسی اثر مایع رویی کشت سلول های دسیدوا بر توان سلول های دندریتیک در القا پاسخ تکثیر لئوسیت های T در محیط MLR آلورژنیک، در پروسه تخلیص سلول های دندریتیک پس از شستشوی دو ساعته سلول های تک هسته ای طحال موش C57BL/6 و حذف سلول های غیر چسبان، به سلول های چسبان در طول کشت شبانه، RPMI حاوی ۱۰ درصد FCS به همراه غلظت های ۲/۵ درصد، ۵ درصد، ۱۰ درصد، ۲۰ درصد مایع رویی کشت سلول های دسیدوا موش حامله و همچنین مایع رویی کشت رحم موش غیر حامله به عنوان کنترل اضافه شد. پس از کشت شبانه DCs تیمار شده بالغ جمع آوری و پس از اشعه دادن (۳۰۰۰ rad) با لئوسیت های T موش Balb/c در واکنش MLR آلورژنیک کشت داده شدند. سلول های T تنها و DC تنها به عنوان کنترل منفی و سلول های T تحت اثر PHA با غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. تمامی کشت ها به صورت سه تایی انجام گرفت. پس از ۷۲ ساعت به هر حفره یک میکروکوری ^3H Thymidine (Amersham, U. K.)³ اضافه شده و ۱۸ ساعت بعد سلول ها جمع آوری شدند و میزان جذب تایمیدین نشان دار با استفاده از دستگاه β -Counter به صورت شمارش در دقیقه (cpm) اندازه گیری شد.

بررسی تاثیر آنزیمIDO القا شده در اثر مایع رویی کشت سلول های دسیدوا بر واکنش MLR

به این منظور، با اضافه کردن غلظت های مختلف ۱- متیل D, L تریتوفان (Sigma, USA) که مهارکننده اختصاصی آنزیمIDO است به محیط MLR آلورژنیک، حضور آنزیم مذکور و تاثیر آن بر سرکوب پاسخ تکثیر لئوسیت های T مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب

کشت سلولی ۶۰ میلی متر، حدود ۲-۲/۵ میلی لیتر از این سوسپانسیون ریخته شد. پلیت ها دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. در این مرحله سلول های دندریتیک و ماکروفاژها و کمی هم لئوسیت های B به کف پلیت متصل می شوند. جهت حذف سلول های شناور و غیر چسبنده پلیت کشت سلول با استفاده از پی پت پاستور و محیط کشت ۳۷ درجه به آرامی شستشو داده شد. در این مرحله سلول های دندریتیک کاملاً تیره دیده می شوند و خلوص تقریبی آنها ۷۵ تا ۸۰ درصد است. این سلول ها با اضافه کردن ۲-۲/۵ میلی لیتر محیط کشت کامل به همراه غلظت های مختلف مایع رویی کشت سلول های دسیدوا موش حامله به مدت ۱۲ تا ۱۵ ساعت (over night) در شرایط ۳۷ درجه و ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. از مایع رویی کشت سلول های رحم موش غیر حامله نیز استفاده شد. بعد از کشت شبانه، سلول های دندریتیک بالغ از کف پلیت جدا می شوند. این سلول ها جمع آوری و برای بررسی فلوسیتومتری و انجام آزمایش MLR مورد استفاده قرار گرفتند (۲۰).

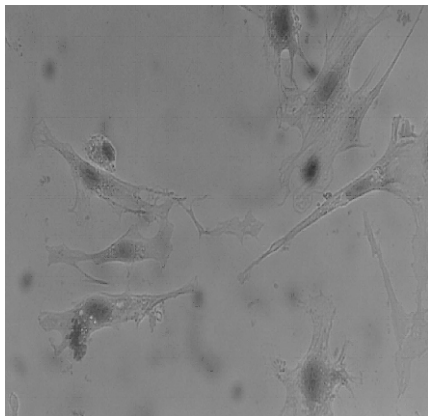
تخلیص سلول های T گره لئوفاوی توسط Nylon wool

غدد لئوفاوی اینگوینال و براکیال موش Balb/c تحت شرایط استریل جدا و در پلیت شیشه ای حاوی RPMI سرد قرار داده شدند. بافت جدا شده با کمک پنس له و با پی پتاژ قطعات حاصله، سلول ها کاملاً از بافت خارج شدند. مجموعه حاصل، از الک سلولی عبور داده شد تا قطعات بافت حذف شود. سلول های به دست آمده دو بار شستشو داده شد و نهایتاً تعداد $10^6 \times 20-15$ سلول در حجم ۲۵۰ تا ۵۰۰ میکرولیتر در زیر هود روی ستون نایلون ول بارگذاری و برای ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه به حالت عمودی قرار داده شد. پس از طی مدت زمان مذکور، تحت شرایط استریل و در زیر هود با باز کردن سه راهی متصل به ستون سلول ها در لوله فالدکون استریل جمع آوری شدند. از بالای ستون به طور آهسته مقداری محیط RPMI کامل اضافه شد تا تمامی سلول های غیر چسبان خارج شوند. سپس سلول ها دوبار در ۳۰۰XG به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و پس از تعیین درصد حیات و تعداد آن ها در آزمایش فلوسیتومتری و MLR آلورژنیک به کار گرفته شدند.

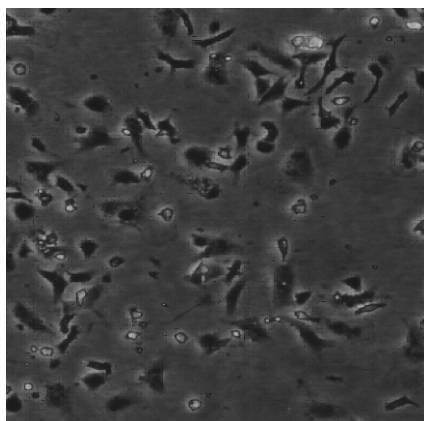
آنالیز فلوسیتومتری

از سلول های دندریتیک به دست آمده سوسپانسیون سلولی $10^6 \times 1$ سلول در میلی لیتر تهیه و سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرم نرمال ۵ درصد موش روی یخ انکوبه و سپس به دو لوله تقسیم شد. پس از دوبار شستشو در ۴۰۰XG به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه به لوله تست ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد CD11c (Hamster-mouse CD11c, Pharmingen, USA) و به لوله کنترل سرم نرمال ۵ درصد هامستر اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس از انکوباسیون، نمونه ها دوبار با بافر فلوسیتومتری به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰XG و دمای ۴ درجه شسته شدند

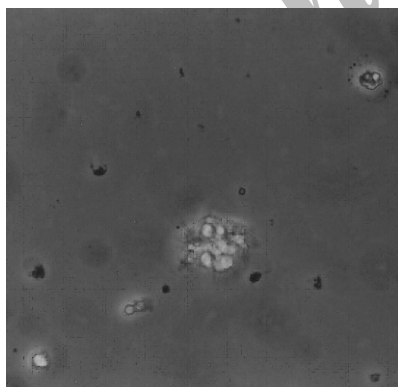
دندریتیک در زیر میکروسکوپ معکوس به صورت سلول‌های کاملاً تیره و دارای زواید سیتوپلاسمی مشخص‌اند (شکل ۳).



شکل ۲: سلولهای دسیدوا پس از کشت ۴۸ ساعته



شکل ۳: سلولهای DCs پس از کشت دو ساعته و حذف سلولهای غیرچسبان



شکل ۴: سلولهای DCs بالغ پس از کشت شبانه

این سلول‌ها بعد از حدود ۱۲ تا ۱۵ ساعت کشت، بالغ و به صورت کلامپ‌های شناور مشاهده می‌شدند (شکل ۴). در حالی که سلول‌های غیردندریتیک و ماکروفاژها همچنان به صورت چسبیده باقی می‌ماندند. از هر طحال موش به طور متوسط 2×10^5 سلول دندریتیک به دست آمد.

که در صورت دخالت آنزیم در کاهش پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T این آنزیم توسط ۱- متیل D، L تریتوفان مهار می‌شوند و در نتیجه پاسخ تکثیری لنفوسیت افزایش می‌یابد.

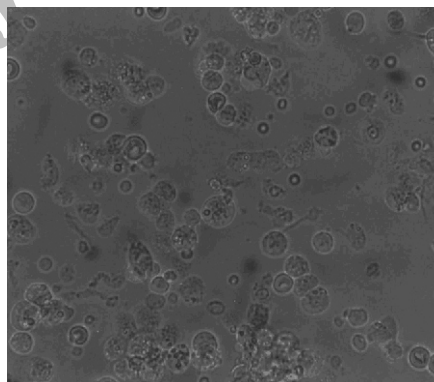
آزمون آماری

برای مقایسه میانگین نمونه‌ها از آزمون آماری Mann Whitney استفاده شد. حدود اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شده است و $p < 0/05$ معنی دار است.

یافته‌ها

کشت سلول‌های دسیدوا و تهیه مایع رویی کشت ۴۸ ساعته

در این مرحله مجموعاً از هر موش حامله با توجه به اینکه تعداد جنین‌ها از ۱ تا ۶ عدد متغیر بود، بین $10^5 \times 1/2 - 8/5$ سلول دسیدوا با زیست‌پذیری ۹۴-۹۲ درصد به دست آمد. تعداد 400000 سلول در 800 میکرولیتر محیط RPMI با ۲۰ درصد FCS در هر حفره پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. نمای میکروسکوپی این سلول‌ها در روز اول کشت شامل سلول‌های دایره‌ای به همراه تعداد کمی سلول زایده‌دار بود (شکل ۱).



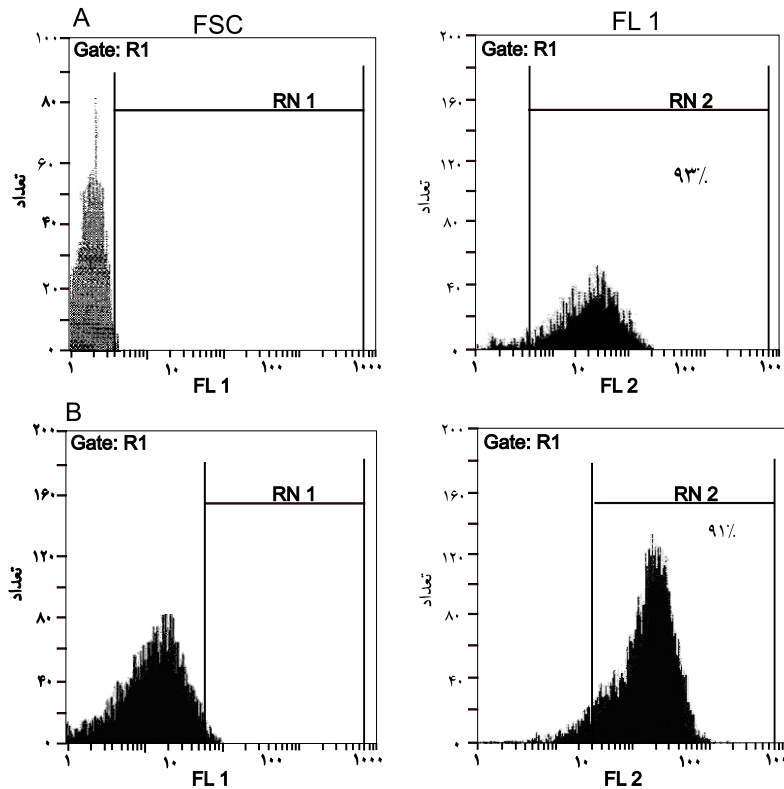
شکل ۱: سلولهای دسیدوا انگی پس از جداسازی

پس از ۴۸ ساعت برخی سلول‌ها با زواید بلند کف پلیت را گرفته و برخی در حال میتوز بودند (شکل ۲).

محیط کشت روی این سلول‌ها جمع‌آوری و در دور بالا سانتریفیوژ و پس از فیلتر کردن با ثبت مشخصات جهت استفاده در آزمایشات بعدی در ۷۰- درجه منجمد شد.

جداسازی سلول‌های دندریتیک و سلول‌های T

پس از هضم آنزیمی طحال موش C57BL/6 به منظور جداسازی سلول‌های کم چگال از نایکودنز استفاده شد. وزن حجمی مورد استفاده $1/080$ بود و حدود ده تا بیست میلیون سلول تک‌هسته‌ای از هر طحال به دست آمد که در صد حیات آن‌ها بیشتر از ۹۶ درصد بود. پس از کشت، شستشو و حذف سلول‌های غیرچسبان در پایان کشت دو ساعته خلوص سلول‌های دندریتیک به حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید. سلول‌های



نمودار ۱: تعیین میزان خلوص سلولهای دندریتیک و لنفوسیت های T با استفاده از آنالیز فلوسیتومتری. A: نتیجه فلوسیتومتری DCS بر اساس وجود شاخص CD11c نمودار شمت چپ ایزوتیپ کنترل و نمودار سمت راست تست است. B: نتیجه فلوسیتومتری سلول های T بر اساس وجود شاخص CD3. نمودار سمت چپ ایزوتیپ شاخص CD3. نمودار سمت راست تست است.

شرایط بدون مایع برحسب cpm نشان می دهد که مایع رویی کشت سلول های دسیدوای موش حامله در تمامی غلظت ها سرکوب کننده است اما در غلظت ۱۰ درصد بیشترین خاصیت سرکوبگری را دارد (نمودار ۳). بنابراین در آزمایش های بعدی جهت تیمار سلول های دندریتیک از غلظت ۱۰ درصد مایع رویی کشت سلول های دسیدوای موش حامله استفاده شده است. همچنین بین cpm آزمایشات MLR که در آن ها سلول های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول های دسیدوا تیمار شده بودند و آزمایش هایی که سلول های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول های رحم غیرحامله تیمار شده بودند اختلاف معنی داری وجود دارد ($p=0/016$). میانگین cpm آزمایش های MLR با DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوای موش حامله در مقابل DCS تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوآ (DC) بالغ شده با FCS نیز اختلاف معنی داری نشان می دهد ($p=0/008$). در حالی که این اختلاف بین تیمار DC با مایع رویی کشت سلول های رحم موش غیرحامله با DC های تیمار نشده معنی دار نبوده است ($p=0/413$).

بررسی اثر مایع رویی کشت سلول های دسیدوا بر سلول های دندریتیک از نظر القا بیانIDO
نتایج به دست آمده نشان داد در حضور DCS تیمار شده با مایع

نتایج فلوسیتومتری نشان داد که خلوص این سلول ها بر اساس وجود شاخص اختصاصی CD11c حدود 93 ± 2 درصد بود (نمودار ۱ A). برای جداسازی لنفوسیت T از غدد لنفاوی موش های Balb/c استفاده شد. نتایج حاصل از جداسازی سلول های T با تکنیک نایلون وول نشان می دهد که میزان بازیافت سلولی پس از عبور دادن سلول ها از ستون حدود ۳۰-۴۰ درصد سلول های اولیه بوده و درصد حیات آنها بالای ۹۷ درصد بود.

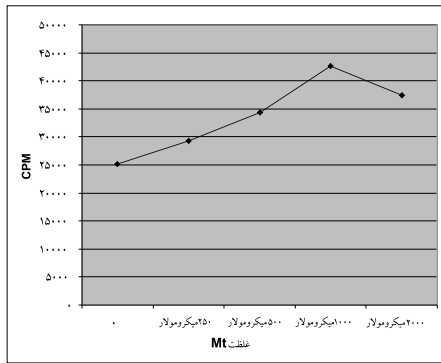
میزان خلوص لنفوسیت های T توسط دستگاه فلوسیتومتری و با شاخص CD3 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که سلول های T، 91 ± 2 درصد خالص اند (نمودار ۱ B).

واکنش MLR آلونژیک و بررسی اثر مایع رویی کشت سلول های دسیدوآ

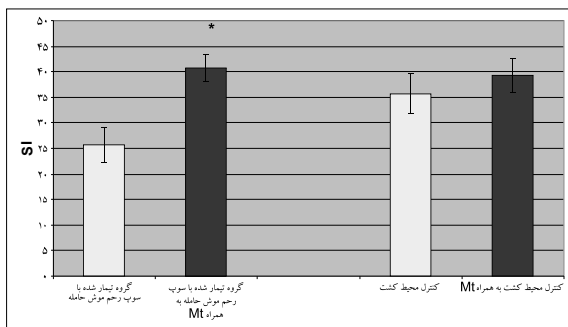
بررسی های اولیه نشان داد که هرگاه تعداد 2×10^4 سلول دندریتیک در مقابل 1×10^5 سلول T قرار گیرد (۵:۱) بیشترین شدت تکثیر لنفوسیت های T مشاهده می شود (نمودار ۲).

بر این اساس در تمام آزمایش های بعدی از این نسبت استفاده شد. نتایج حاصل از پاسخ تکثیری لنفوسیت های T در مقابل DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوای حامله و DCS بالغ شده در

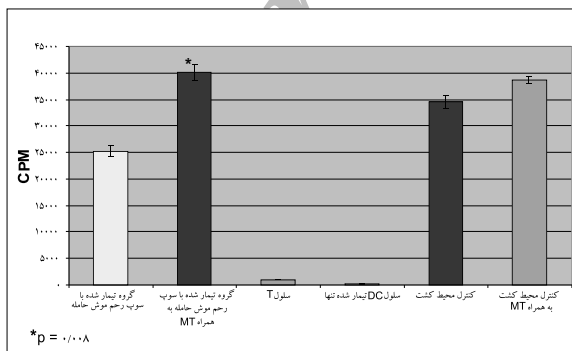
۵ و ۶). در حالی که در گروه تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا پس از افزودن Mt افزایش پاسخ تکثیری از نظر آماری معنی دار است ($p=0/008$).



نمودار ۴: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف متیل تریپتوفان بر پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T مجاور شده با سلول‌های دندریتیک تیمار شده با ۱۰ درصد سوپ دسیدوای موش حامله

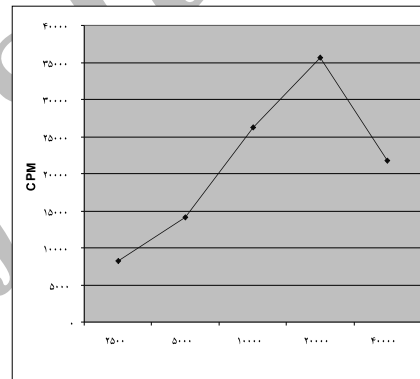


نمودار ۵: مقایسه میزان تکثیر لنفوسیتی در دو گروه DC‌های تیمار شده با ۱۰ درصد مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله و پس از اضافه کردن Mt و گروه DC‌های تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله (DC بالغ شده با FCS) و پس از اضافه کردن Mt بر حسب اندیکس تحریک.

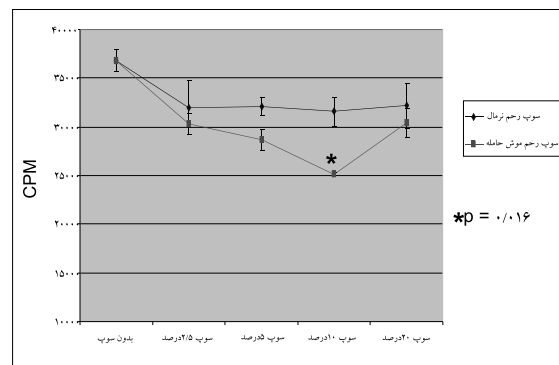


نمودار ۶: مقایسه میزان تکثیر لنفوسیتی در دو گروه DC‌های تیمار شده با ۱۰ درصد مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله و پس از اضافه کردن Mt و گروه DC‌های تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله (DC بالغ شده با FCS) و پس از اضافه کردن Mt بر حسب CPM.

رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش‌های حامله، پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های T کاهش یافته است. به منظور بررسی تاثیر احتمالی IDO مترشحه از سلول‌های دندریتیک در این سرکوب، مهارکننده اختصاصی آنزیم، ۱-متیل D، L-تریپتوفان، (Mt) در غلظت‌های ۲۵۰ میکرومولار، ۵۰۰ میکرومولار، ۱۰۰۰ میکرومولار و ۲۰۰۰ میکرومولار به کشت هم‌زمان DC‌های تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا و لنفوسیت‌های T آلورن، اضافه شد. در این سری آزمایش‌های افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها از غلظت ۲۵۰ میکرومولار مشاهده شد و همچنان که غلظت متیل تریپتوفان زیاد می‌شد پاسخ‌های تکثیری نیز بیشتر می‌شد. این افزایش پاسخ تکثیری تا غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار مشاهده شد و در غلظت بالاتر متیل تریپتوفان، پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها کاهش پیدا می‌کرد (نمودار ۴).



نمودار ۲: بررسی نسبت‌های مختلف CDS بر القا پاسخ تکثیری سلول‌های T بر حسب CPM. در این آزمایش‌ها تعداد لنفوسیت T ۱۰۰۰۰۰ سلول ثابت نگه داشته شده است.



نمودار ۳: مقایسه اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا در غلظت‌های مختلف روی سلول‌های دندریتیک بر القای پاسخ تکثیری سلول‌های T

نتایج cpm به دست آمده از پنج آزمایش مجزا نشان می‌دهد که با اضافه کردن Mt به محیط MLR پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها افزایش می‌یابد و اگر چه این افزایش هم در گروه DCs تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای حامله و هم در DCs تیمار نشده مشاهده شده است، در گروه تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا، این افزایش از نظر آماری معنی دار نیست ($p=0/286$) (نمودار ۳).

مستقیم آن در مدل تحریک های آلوزنیک مورد بررسی قرار گرفته است و عمده گزارش ها بر اساس حضور مستقیم این مایع در مدل مورد مطالعه بوده است (۲۲). نتایج تحقیقات قبلی ما که تنها گزارش موجود از تاثیر این مایع بر فرایند بلوغ سلول های دندریتیک است، نشان می دهد این سلول ها پس از بلوغ در ریز محیط حاوی مایع رویی کشت سلول های دسیدوا توان کمتری در القای پاسخ های اختصاصی آنتی ژن دارند و الگوی سایتوکاینی را به سمت Th_2 سوق می دهند (۱۹). مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر مایع رویی کشت کوتاه مدت سلول های دسیدوا بر توانایی سلول های دندریتیک در القا پاسخ های آلوزنیک در لنفوسیت های T طی واکنش MLR انجام گرفت. همچنین در این مطالعه مکانیسم احتمالی مداخله کننده در واکنش بین سلول های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوا و لنفوسیت های T بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد سلول های DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوای موش حامله نسبت به سلول های دندریتیک تیمار نشده و یا تیمار شده با مایع رویی کشت رحم غیرحامله توان کمتری در القای پاسخ های تکثیری در لنفوسیت های T مدل MLR آلوزنیک دارند و این تفاوت از نظر آماری معنی دار است ($p=0/016$).

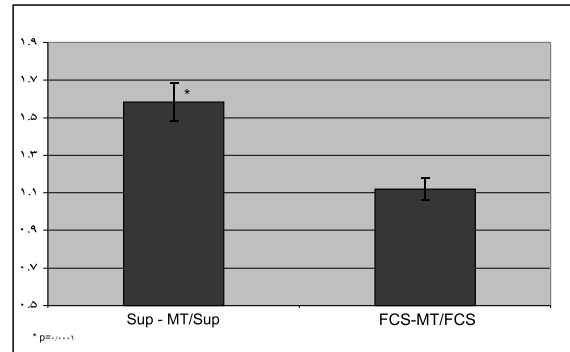
همچنین در این تحقیق از مهارکننده اختصاصی آنزیم IDO برای اثبات نقش آن در مدل آزمایش استفاده شد. نتایج نشان می دهد متیل تریپتوفان در گروهی که از DC های تیمار شده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوای حامله به عنوان جمعیت محرک استفاده شده، موجب افزایش پاسخ تکثیری لنفوسیت های T شد و این افزایش کاملاً معنی دار بود ($p=0/008$).

نتایج بررسی های ما نشان می دهد دسیدوا علی رغم ترشح فاکتورهای سرکوبگر متنوع که موجب سرکوب مستقیم پاسخ های ایمنی به صورت موضعی می شود قادر است از طریق القا سنتز آنزیم IDO در سلول های عرضه کننده آنتی ژن، با روندی غیرمستقیم از بروز پاسخ های ایمنی ممانعت کند و این مکانیسم ارزشمند می تواند از جنین در مقابل پاسخ های آلوزن حمایت کند. روشن شدن نقش آنزیم IDO طی حاملگی یکی از بزرگترین موفقیت ها در بیولوژی باروری و ناباروری است. این آنزیم که با تخریب اسید آمینه ضروری تریپتوفان، شرایط را برای مرگ سلول های مهاجم پدید می آورد از مهم ترین مکانیسم های بقا جنین طی حاملگی است. در انسان بیشترین میزان بروز این آنزیم در جفت دیده می شود. اما در موش عمده سلول های بروز دهنده این آنزیم در دسیدوا مستقرند (۲۳) و سلول های عرضه کننده آنتی ژن از منابع اصلی آنزیم IDO هستند (۱۶).

مطالعات واسیلیادو و همکاران نشان داده است که مایع رویی کشت سلول های دسیدوا پاسخ های تکثیری سلول های تک هسته ای خون محیطی انسان به PHA را سرکوب می کند (۲۴).

لالا و همکاران نیز طی پژوهشی نشان داده اند کشت هم زمان سلول های دسیدوا و ماکروفاژهای مشتق از دسیدوای سه ماهه اول

همچنین نسبت cpm در حالت پس از اضافه کردن Mt به قبل آن در گروه DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوا در مقایسه با گروه DCs تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول های دسیدوای موش حامله نیز از نظر آماری کاملاً معنی دار است ($p=0/001$) (نمودار ۷).



نمودار ۷: مقایسه نسبت CPM در گروه سلول های دندریتیک تیمار شده با سوپ دسیدوا با متیل تریپتوفان و بدون متیل تریپتوفان (sup-MT/sup) به گروه سلول های دندریتیک بالغ شده با FCS با متیل تریپتوفان و بدون متیل تریپتوفان (FCS-MT/FCS).

بحث

حاملگی پدیده ای است که قوانین ایمنولوژی را آشکارا زیر سوال برده است (۴). این که جنین نیمی از ژنوم خود را از پدر به ارث می برد و در طی حاملگی توسط سیستم ایمنی مادر مورد شناسایی نیز قرار می گیرد اما رد نمی شود، در بیولوژی حاملگی به عنوان یک پدیده بسیار مهم مورد توجه قرار گرفته است و تحقیقات گسترده ای در این راستا صورت گرفته که هر کدام توجه کننده قسمتی از فرآیندهای حاملگی بوده است (۳).

در حاملگی پستانداران بین سیستم ایمنی مادر و آنتی ژن های پدیری بروز یافته از سوی جنین، تماس مستقیم وجود دارد. بافت دسیدوای مادری از نظر استراتژیک در مکانی واقع شده است که با عمل تنظیم ایمنی (immunoregulatory) از جنین محافظت می کند (۲۱). مطالعات در مورد مایع رویی کشت سلول های دسیدوا نشان می دهد این مایع پاسخ های وابسته به آنتی ژن و پاسخ های تکثیری غیراختصاصی را سرکوب می کند. این مایع که منعکس کننده ریز محیط دسیدوا است، حاوی فاکتورهای سرکوب گر متعددی است و با مکانیسم های مختلف که کاملاً شناخته نشده اند می تواند پاسخ های ایمنی را تعدیل کند. این فاکتورها می توانند به صورت مستقیم باعث کنترل پاسخ های ایمنی شوند و یا با تاثیر بر مسیر تمایزی و بلوغ سلولی آنها را به سمت سلول های کنترل کننده پاسخ ایمنی سوق دهند (۲۱، ۲۲).

در مطالعاتی که توسط دیگران انجام شده است مکانیسم سرکوب گری مایع رویی کشت سلول های دسیدوا به علت حضور

مولکولی 43KD و 21KD مشاهده کردند و نشان دادند که این دو مولکول با عملکرد IL-2 تداخل دارند (۲۶).

ناکایاما و همکاران نیز نشان داده‌اند که خاصیت سرکوب‌گری مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا با سن حاملگی رابطه عکس دارد. آنها می‌گویند سلول‌های آندومتر (دسیدوا) در سه ماهه اول حاملگی ممکن است نقش مهمی در محافظت از جنین در مقابل رد شدن از سوی مادر داشته باشد و احتمال چنین نقشی در اوایل حاملگی بیشتر است (۲۷). یافته‌های محققان نشان می‌دهد از سلول‌های دسیدوا مولکول‌های متعددی به ریز محیط اطراف ترشح می‌شود تا سیستم ایمنی را در آن منطقه سرکوب کند (۲۸، ۲۹).

با توجه به فاکتورهای متعدد ناشی از سلول‌های دسیدوا شاید منطقی به نظر برسد که این فاکتورها در روند بلوغ و تمایز سلول‌های دندریتیک مداخله کند و باعث کنترل خاصیت دگر تحریری (Allostimulatory) این سلول‌ها شوند (۲۲).

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت وجود فاکتورهای مترشحه از بافت دسیدوا در ریز محیط سلول‌های دندریتیک، توان این سلول‌ها را در القا پاسخ‌های ایمنی کاهش می‌دهد و از این طریق به کنترل پاسخ‌های ایمنی مادر بر علیه جنین می‌پردازد. یکی از مکانیزم‌های این کنترل القا آنزیمIDO در سلول‌های دندریتیک است که نقش حیاتی آن در بقای جنین آلورژنیک به اثبات رسیده است. این آنزیم می‌تواند با مصرف اسید آمینه ضروری تریتوفان پاسخ‌های نامطلوب لنفوسیت T را که می‌تواند منجر به رد جنین شود کنترل کند.

References

- Mellor AL, Munn DH. Immunology at the maternal-fetal interface: Lessons for T cell tolerance & suppression. Annual Review in Immunology, 2000; 18: 367-391
- Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A. Tolerance to the fetopelvic graft: ten ways to support a child for nine months. Current Opinion in Immunology, 2000; 12: 731-737
- Erlebacher A: Why isn't the fetus rejected. Current Opinion in Immunology, 2001; 13: 590-593
- Arck PC, Ferrick DA, Norwold DS, Clark DA, Dietl J, Carding SR, Croitoru K, Egan PJ. Murine T cell determination of pregnancy outcome. Cellular Immunology, 1999; 196: 71-79
- Zenclussen AC, Fest S, Sehmsdorf US, Arck PC, Klapp BF, Hagen E: Up regulation of Decidual P-selectin. Expression is associated with an increased

حاملگی انسان در MLR آلورژنیک، خاصیت آلوراکتیویته لنفوسیت‌های T را در *in vitro* سرکوب می‌کند. آنان دریافتند این سرکوب، روش غیرمحدود به MHC و علت آن تولید $PG-E_2$ از سوی این سلول‌ها بوده است (۲۱).

سوهاوا و همکاران با اضافه کردن مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا به محیط MLR، در محیط MLR، ایندومتاسین اضافه کردند این دارو مهار کننده پروستاگلندینها است. در حضور این دارو سرکوب ایجاد شده در MLR کمی ضعیف‌تر شد. لذا معتقدند پروستاگلندین‌ها یکی از عوامل سرکوب‌گر در مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا هستند (۲۲).

ماتوسی و همکاران مشاهده کردند که مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا در MLR و در تحریک غیراختصاصی سلول‌های تک هسته‌ای خاصیت سرکوب‌گری دارد. آنان برای یافتن مکانیسم سرکوب‌گری مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا، تاثیر این مایع را روی لنفوسیت‌های خون محیطی بررسی و مشاهده کردند مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بروز IL-2 و گیرنده IL-2 و $INF-\gamma$ را در مقایسه با گروه کنترل سرکوب می‌کند. آنان همچنین مشاهده کردند مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا تولید IgM و IgG توسط لنفوسیت B تحریک شده با میتوژن pokeweed را سرکوب می‌کند. آنها نهایتاً سلول‌های دسیدوا را در محیط فاقد سرم کشت دادند و دو مولکول ۴۳ کیلودالتون و ۶۷ کیلودالتون از مایع رویی کشت سلول‌های کشت سلول‌ها جدا کردند که در محیط MLR خاصیت سرکوب‌گری داشت (۲۵).

دایا و همکاران مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا را با تکنیک HPLC مورد بررسی قرار دادند. آنها دو peak در وزن‌های

- number of T-helper-1 cell populations in patients suffering from spontaneous abortion. Cellular Immunology, 2001; 213: 94-103
- Rango UV, Linke IC, Raven G, Beier HM, Bocken F. Cytokine microenvironments in human first trimester deciduas are dependent on trophoblast cells. Fertility and Sterility, 2003; 79
- Langevin CK, Caucheteu SM, Verbeke P, Ocius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003; 1: 121
- Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z: Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment. Placenta, 2004; 25: 26-31
- Miazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori SH, Sasaki Y, Futatani T, Miyawaki T, Saito SH. Predominance of

- Th-2 -promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003; 74: 514-522
10. Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC, Morita A, Bergstresser PR, Yagita H, Okumura K, Takashima A. Dendritic cell undergo rapid apoptosis in vitro during antigen specific interaction with CD4+T cells. *The Journal of Immunology*, 1999; 162: 5287-5298
11. Castellano G, Woltman AM, Schena FP, Roos A, Daha MR, Kooten CV. Dendritic cells and complement: at the across road of innate and adaptive immunity. *Molecular Immunology*, 2004; 41: 133-140
12. Mellor AL, Chandler P, Lee GK, Munn DH. Indoleamin 2, 3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. *Reproductive Immunology*, 2002; 57: 143-150
13. Takikawa O, Ohkubo AH, Yoshida R. Interferon- γ is the inducer of indoleamin 2, 3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. *Immunology J*, 1990; 4: 1246-1250
14. Miki T, Sun H, Lee YL, Tandin A, Valdivia LA, Fung JJ, Subbotin V, Kovscek AM. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplantation Proceedings*, 2001; 33: 129-130
15. uzuki S, Tone S, Takikawa O, Kubos T, Kohno I, Minatogawa Y. Expression of indoleamin 2, 3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti. *Biochemical Society*, 2001; 355: 425-429
16. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Opelz G, Simon H, Watzlik A. Inhibition of allogenic Tcell proliferation by indoleamin 2, 3-dioxygenase-expressing dendritic cells:mediation of suppression by tryptophan metabolites. *Journal of Experimental Medicine*, 2002; 19: 447-457
17. Sedlmayr P, blaschitz A, wintersteiger R, semlitsch M, Dohr G, Takikawa O, Reich O, Walcher W, Mackenzie CR, Hammer A. Localization of indoleamin 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta. *Molecular Human Reproduction*, 2002; 4: 385-391
18. Kudo Y, Boyd R, Sargent IL, Redman C: Modulation of indoleamin 2, 3-dioxygenase by interferon- γ in human placental chorionic villi. *Molecular Human Reproduction*, 2000; 4: 369-374
19. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jedi-Tehrani M. Inhibitory effect of decidual culture supernatants on antigen presentation by dendritic cells. *Reproduction And Fertility*, 2004; 5(2): 115-128
20. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Dokouhaki P, Shojaeian J, Jeddi-tehrani M. The efficient isolation of murine splenic Dendritic cells and their cytochemical features. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006
21. Lala PK, Kennedy TG, Parhar RS. Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. *Cellular Immunology*, 1988; 116: 411-422
22. Umesaki N, Kawabata M, Sugawa T. Immunosuppressive effect of culture supernatant derived from decidual cell rich fraction. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1988; 40: 841-846
23. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T cell tolerance: immunosuppression by starvation. *Immunology Today*, 1999; 10: 469-473
24. Vassiliadou N, Searle RF, Bulmer JN. Immunoregulatory activity of decidua in spontaneous early pregnancy loss. *Human Reproduction*, 1999; 14: 2252-2256
25. Matsui S, Yoshimura N, Oka T. Characterization and analysis of soluble suppressor factor from early human decidual cell. *Transplantation*, 1989; 47:678-683
26. Daya S, Rosenthal KL, Clark DA. Immunosuppressor factors produced by decidua-associated suppressor cells: a proposed mechanism for fetal allograft survival. *American Journal of Obstet Gynecology*, 1987; 156: 344-350
27. Nakayama E, Asano S, Kodo H, Miwa S. Suppression of mixed lymphocyte reaction by cells of human first trimester pregnancy endometrium. *Journal of Reproduction Immunology*, 1985; 8: 25-31
28. Tawfik OW, Hunt JS, Wood GW. Implication of prostaglandin E2 in soluble factor-mediated immune suppression by murine decidual cells. *American*

Journal of Reproduction Immunology and
Microbiology, 1986; 12: 111-117

29. Merali FS, Arck PC, Beaman K, Clark DA.
Transforming growth factor-Beta-2-related- decidual

suppressor factor is not related to TJ6 protein.
American Journal of Reproduction Immunology,
1996; 35: 342-347

Archive of SID