

اثر تحریک تخمک گذاری القاء شده با هورمون های HCG و PMSG بر جمعیت سلول های دندریتیک رحمی در موش های ماده NMRI

سید محمد موذنی^{۱*}، مریم اسکندریان^۱، مژده صالح نیا^۲
۱. گروه ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
دریافت: ۱۵ دی ۹۰ پذیرش: ۲۴ خرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: روش تحریک تخمک گذاری با هدف تحریک فولیکولوژنز و افزایش تعداد تخمک های آزاد شده کاربرد وسیعی در کلینیک های IVF دارد. به دنبال تحریک هورمونی تخمک گذاری، میزان هورمون های مترشحه از تخمدان به ویژه استرادیول و پروژسترون از حد فیزیولوژیک فراتر می رود. سلول های سیستم ایمنی به ویژه سلول های دندریتیک واجد رسپتور برای هورمون های پروژسترون و استرادیول هستند. این سلولها در لانه گزینی مناسب و ایجاد یک حاملگی موفق نقش مهمی دارند. افزایش غلظت هورمونها به دنبال تحریک تخمک گذاری، می تواند بر فراخوانی و فراوانی سلول های ایمنی به ویژه سلول دندریتیک تاثیر بگذارد.

روش ها: از دو گروه موش های باردار شده طبیعی و موش های باردار شده پس از تحریک تخمک گذاری، در روز هفتم بارداری خون گیری به عمل آمد و میزان هورمون های استرادیول و پروژسترون سرم سنجش شد. همچنین با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی فراوانی و چگونگی پخش سلول های دندریتیک در دو بافت طحال و دسیدوا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که در گروه تحریک تخمک گذاری نسبت به گروه کنترل، میزان هورمون های استرادیول و پروژسترون سرم افزایش و فراوانی سلول های دندریتیک در دو بافت طحال و رحم کاهش یافته است.

نتیجه گیری: با توجه به افزایش غلظت هورمون های استروژن و پروژسترون بدنبال تحریک تخمک گذاری و وجود گیرنده جهت این هورمونها بر روی سلول های دندریتیک، تغییر فراوانی این سلولها پس از تحریک تخمک گذاری قابل توجیه می باشد و با توجه به نقش سلول های دندریتیک در پدیده لانه گزینی جنین و کنترل پاسخ های ایمنی مادر، بنظر می رسد که تغییرات این سلولها ممکن است منجر به کاهش موفقیت حاملگی پس از IVF شود.

واژه های کلیدی: سلول های دندریتیک، تحریک تخمک گذاری، استرادیول، پروژسترون

مقدمه

های حاصله در یک سیکل می باشد [۷، ۱۹] روش تحریک تخمک گذاری با مکانیسم فیزیولوژیک بدن انسان که تکامل یک تخمک در یک سیکل می باشد متفاوت است [۸] و باید کاملاً از پروسه طبیعی تخمک گذاری افتراق داده شده و اثرات و پیامد این روش به طور کامل مشخص شود [۹].

در تکنیک های مرسوم IVF در فاصله زمانی کوتاهی بعد از تحریک تخمک گذاری و به دست آوردن تخمک، انتقال جنین صورت می گیرد و جنین انتقال داده شده باید بتواند در

روش های تحریک تخمک گذاری یکی از روش های معمول و واجد کاربرد وسیع در کلینیک های IVF می باشند. هدف اصلی این روش تحریک فولیکولوژنز و افزایش تعداد تخمک -

Moazzeni@modares.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

که توانایی تحمل جنین را با خصوصیات آنتی ژنی متفاوت از خصوصیات آنتی ژنی مادر داشته باشد. از آنجا که سلول های ایمنی به ویژه سلول دندریتیک دارای رسپتور برای هورمون های پروژسترون و استروژن هستند [۱] و در لانه گزینی مناسب و ایجاد یک حاملگی موفق نقش مهمی دارند، افزایش هورمون های پروژسترون و استرادیول که به دنبال تحریک تخمک گذاری در تکنیک های باروری مثل IVF ایجاد می شود، می تواند بر فراخوانی و فراوانی سلول های ایمنی به ویژه سلول دندریتیک تأثیر بگذارد. احتمال دارد که تغییرات در فراوانی سلول دندریتیک یکی از عوامل کاهش موفقیت لانه گزینی در تکنیک IVF و نهایتاً سقط جنین باشد. در این مطالعه فراوانی سلولهای دندریتیک در رحم به عنوان محل اصلی لانه گزینی جنین و شکل گیری پاسخ ایمنی مادر بر علیه جنین و طحال به عنوان نماینده ای از تغییرات سیستمیک این سلولها متعاقب تحریک تخمک گذاری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تعدادی موش نر و ماده ۱۰-۶ هفته ای از نژاد NMRI از موسسه رازی تهیه شده و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای مناسب (۲۳-۱۸ °C) در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شد. جهت تطبیق موش های ماده با محیط جدید، آزمایشات حدود ۲-۱ هفته بعد از انتقال به حیوانخانه شروع شد. کلیه آزمایشات انجام شده روی حیوان آزمایشگاهی به تایید کمیته اخلاق زیستی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است. موشهای ماده جهت هم سیکل شدن در قفس جداگانه و دور از موشهای نر نگهداری می شدند. به منظور القاء تحریک تخمک گذاری به موش های ماده گروه آزمایش به میزان ۱۰-۵ واحد بین المللی هورمون (Pregnant mare serum gonadotropin) و ۱۵-۵ واحد بین المللی هورمون (Bionich, Australia) PMSG و ۴۸ ساعت بعد به میزان ۱۰-۵ واحد بین المللی هورمون (Exir, Iran) (Human chorionic gonadotropin) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. (به موش های گروه کنترل هیچ نوع هورمونی تزریق نگردید) و سپس موش های ماده از هر دو گروه به قفس موش های نر برای بارداری انتقال داده

آندومتر جایگزین شده و مراحل بعدی تکوین را سپری کند [۸]. جمعیت های سلولی موجود در آندومتر در زمان لانه گزینی جنین و چگونگی عملکرد آن ها نقش بسیار مهمی در موفقیت لانه گزینی و در نتیجه موفقیت IVF دارد [۲۸]. نقص در لانه گزینی با حاملگی های ناموفق و کاهش شانس باروری در تکنیک های مثل IVF همراه می باشد. تقریباً نیمی از موارد لانه گزینی جنین در انسان دچار شکست می شود و تعداد زیادی از حاملگی های ناموفق به دلیل عدم آمادگی مناسب بافت رحم در پذیرفتن جنین است [۲۱]. مطالعات نشان می دهد ارتشاح سلول های ایمنی قبل از لانه گزینی در آمادگی رحم برای پذیرفتن جنین نقش مهمی را ایفا می کند. مثلاً سلول های NK با ترشح فاکتورهای رگزا باعث رشد عروق خونی و پایداری سلول های دسیدوا می شوند [۳]. کاهش سلول های NK در محل لانه گزینی مانع تخریب شریان های ماریچی آندومتر و تشکیل دسیدوا می شود [۲۱]. علاوه بر این، سلول های دندریتیک نیز قبل از لانه گزینی در موضع رحم تجمع می یابند و نقش مهمی در شکل گیری و بلوغ رگ های خونی از طریق ترشح فاکتورهایی مثل FLT3 و TGF- β ایفا می کنند [۲۱]. مطالعات انجام گرفته نشان می دهند در زمان لانه گزینی تعداد سلول های دندریتیک به طور قابل توجهی افزایش می یابد، به همین دلیل محققین نقش مهمی برای سلول دندریتیک در طی پروسه لانه گزینی قائل هستند. مطالعات بیشتر در این زمینه نشان داد که در رحم فاقد سلول دندریتیک، رگزایی، افزایش نفوذپذیری عروق و بلوغ رگ های خونی به تأخیر می افتد. در اثر این تأخیر شکل گیری دسیدوا با مشکل روبه رو می شود. در نتیجه موش های ترانسژنیک فاقد سلول دندریتیک رحمی مبتلا به کاهش باروری، نقص در شکل گیری دسیدوا و لانه گزینی مناسب جنین هستند که نهایتاً منجر به سقط جنین می شود [۱۴، ۲۱]. به دنبال تحریک تخمک گذاری مقادیر هورمون های مترشحه از تخمدان به ویژه استرادیول و پروژسترون بیش از حد فیزیولوژیک است [۵، ۱۵، ۱۸] و در مطالعات مختلف نشان داده شده که افزایش هورمون های تخمدانی خود می تواند اثرات سوء مختلفی بر جایگزینی و تکامل جنین بگذارد [۶]. یکی از مهم ترین اندام های هدف این هورمونها، رحم و به خصوص آندومتر است که محل اصلی تماس جنین و مادر می باشد. رحم باید از لحاظ سیستم ایمنی و دفاعی دارای مکانیسم هایی باشد

شدند.

برای تعیین سن بارداری از تکنیک تشخیص پلاک واژینال استفاده شد. موش‌های ماده تا ۳ روز متوالی هر روز صبح از نظر تشکیل پلاک واژینال بررسی شدند. بدین ترتیب که با فشار دادن پی‌پت پاستور در دهانه واژن حالت سفتی و صدای خش‌دار احساس می‌شد. در تمام موش‌های ماده پلاک مثبت، وجود اسپرم در ترشحات واژن از طریق تهیه اسمیر واژینال بررسی گردید. روز رویت اسپرم در اسمیر واژینال به عنوان روز ۰/۵ حاملگی در نظر گرفته شد. سپس در روز هفتم بارداری هر دو گروه موش باردار شده با دی‌اتیل اتر بیهوش شده، از آنها خونگیری به عمل آمد و میزان استروژن و پروژسترون سرم با روش الیزا اندازه‌گیری شد. بعد از خونگیری موش‌های باردار شده با روش قطع نخاع کشته و با استفاده از قیچی و پنس ناحیه شکمی باز گردید به این صورت که هر دو بافت طحال و رحم قابل جداسازی باشند. شاخ‌های رحمی خارج شده و در زیر میکروسکوپ استریو نقاط کاشت جنین تعیین و نمونه‌برداری از نقاط کاشت جنین و همچنین از بافت طحال انجام شد. سپس قطعاتی از بافت طحال و رحم به ابعاد ۴×۴ میلی‌متر بریده شده و در قالب‌های جداگانه با جهت مناسب قرار داده شدند. قالب‌ها از چسب فروزن OCT (Jung, Germany) پر گردید و در فلاسک ازت فرو برده شدند. پس از یخ‌زدن چسب فروزن قالب‌ها خارج و در سرمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تهیه برش‌های انجمادی (Cryosection) بلوک‌های بافتی از فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد خارج و به مدت ۱ ساعت در دستگاه Cryosection (Shoudon, U.K) سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد و سپس برش‌های بافتی به قطر ۵ میکرومتر تهیه شده و پس از فیکس نمودن در استون سرد در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی بافت‌های طحال و رحم، اسلایدها از فریزر خارج و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه خشک شدند. دور برش‌های بافتی با Dako pen (Dako, Denmark) علامت‌گذاری شد. سپس برش‌های بافتی سه بار با بافر Tris buffered saline (TBS) و هر بار به مدت ۲ دقیقه شسته شدند. محلول Protein block (serum free) (Dako, Denmark) به مدت ۱۵ دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه شد. بعد از این مرحله بافر بلوک‌کننده (سرم بز)

با غلظت ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه گردید. برای خنثی نمودن بیوتین بافتی به اسلایدها اوبدین (Dako, Denmark) اضافه و برش‌های بافتی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. بعد از شستشو با TBS، محلول بیوتین (Dako, Denmark) اضافه و برش‌های بافتی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس اسلایدها شسته و آنتی-بادی (Hamster anti-mouse CD11c) (BD, USA) بادی غلظت ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی (antibody diluent) (BD, USA) بر روی برش‌های بافتی اضافه گردید. (در اسلاید کنترل منفی به جای آنتی‌بادی ضد CD11c یک قطره بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی اضافه شد). پس از ۷۵ دقیقه انکوباسیون در درجه حرارت آزمایشگاه، لام‌ها سه بار با TBS شسته شدند. پس از شستشو، آنتی‌بادی ضد IgG همستر کونژوگه با بیوتین (biotin conjugated goat anti hamster) (BD, USA) با رقت ۱:۵۰ در بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی به روی اسلایدها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه گردید. برش‌های بافتی سه بار با بافر TBS شسته و استرپتواویدین کونژوگه با آنزیم آلکالین فسفاتاز conjugated Streptavidin (AP) (Roch, Germany) به روی اسلایدها اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از شستشوی اسلایدها با TBS، سوپسترای آبی آلکالین فسفاتاز (alkaline phosphatase blue substrate) (Vector Laboratories, USA) به همراه لوامیزول به عنوان مهار کننده آنزیم آلکالین فسفاتاز بافتی اضافه شد و ظهور رنگ زیر میکروسکوپ بررسی گردید. پس از ۱۰ دقیقه، برش‌های بافتی با آب شسته و اسلایدها در رنگ Nuclear fast red (Sigma, USA) قرار داده شده و شسته شدند.

پس از انجام مراحل آبیگری با درجات فزاینده اتانول هر کدام به مدت ۱۵ ثانیه، اسلایدها توسط Histoclear (National diagnostics, USA) شفاف و سپس توسط Vecta mount (Vector Laboratories, USA) مانته شدند. پس از اتمام رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی دو سلول متفاوت از نظر رنگ در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید، سلول‌های قرمز که از نظر شاخص CD11c منفی بوده و رنگ زمینه Nuclear fast red) را به خود گرفته‌اند و سلول‌هایی که از نظر شاخص CD11c مثبت بوده، تحت تأثیر آنزیم آلکالین

متمرکز شده‌اند همچنین تعدادی سلول $CD11c^+$ نیز در پولپ قرمز مشاهده شد. سلول های DC بندرت در داخل فولیکول های لنفوای دیده می شدند. الگوی پراکندگی سلول های دندریتیک در هر دو گروه مشابه بود (شکل ۱). رنگ آمیزی بافت دسیدوا با آنتی بادی ضد $CD11c$ نشان داد که سلول های DC در گروه کنترل و تحریک تخمک گذاری با فراوانی متفاوت در سرتاسر بافت رحم پراکنده هستند. این سلول ها در اطراف میومتر و در بخش های مختلف دسیدوا از جمله غدد رحمی و اطراف لومن حضور دارند (شکل ۲ و شکل ۳).

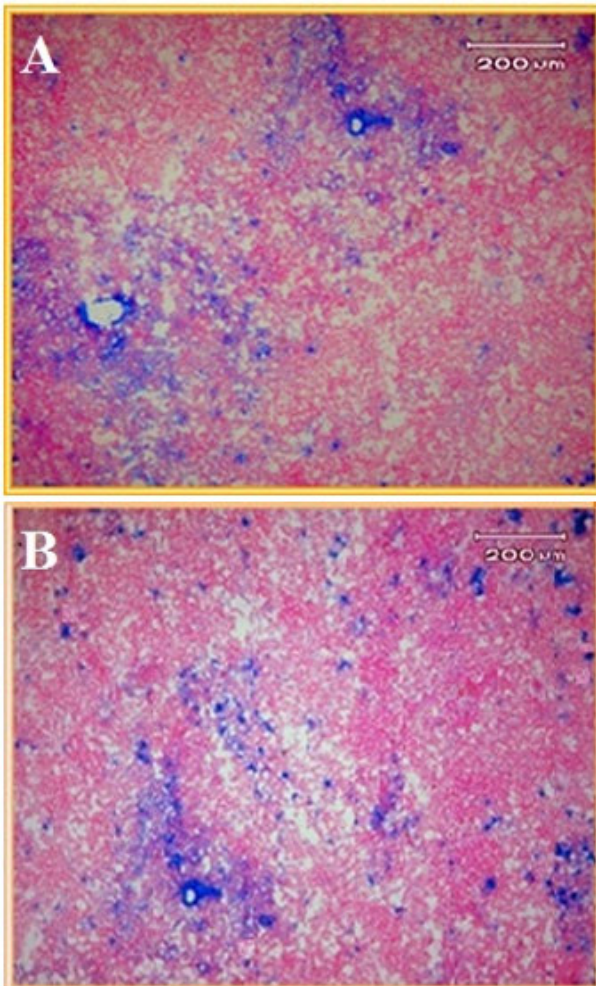
فراوانی سلول های دندریتیک بافت طحال در گروه کنترل نسبت به گروه تحریک تخمک گذاری شده بیشتر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ($P=0/3$). درصد سلول های

فسفاتاز و سوبسترا قرار گرفته به رنگ آبی مشاهده شدند [۲۹]. برای تعیین درصد سلول دندریتیک در بافت رحم، از سه منطقه بافت رحم شامل میومتر و دو بخش دسیدوا (اطراف لومن و غدد رحمی) از هر کدام به تفکیک پنج فیلد با بزرگ-نمایی ۴۰۰ انتخاب و تعداد کل سلول های $CD11c^+$ (سلول-های آبی) شمارش و به تعداد کل سلول های هسته دار در همان سطح تقسیم شد. برای به دست آوردن درصد سلول دندریتیک در بافت طحال نیز پنج فیلد با بزرگ-نمایی ۴۰۰ از اطراف پولپ سفید و پنج فیلد نیز از پولپ قرمز انتخاب گردید و درصد سلول های آبی رنگ نسبت به کل سلول ها تعیین گردید. سپس تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد. به منظور مقایسه درصد سلول های دندریتیک در دو گروه مورد مطالعه از تست غیر پارامتریک Mann-Whitney استفاده شد. حدود اطمینان در آزمون های آماری ۹۵٪ در نظر گرفته شده و $p < 0/05$ معنی دار تلقی گردید. لازم بذکر است کلیه نتایج در اینجا به صورت $Mean \pm SD$ حداقل پنج آزمایش مستقل ارائه گردیده است.

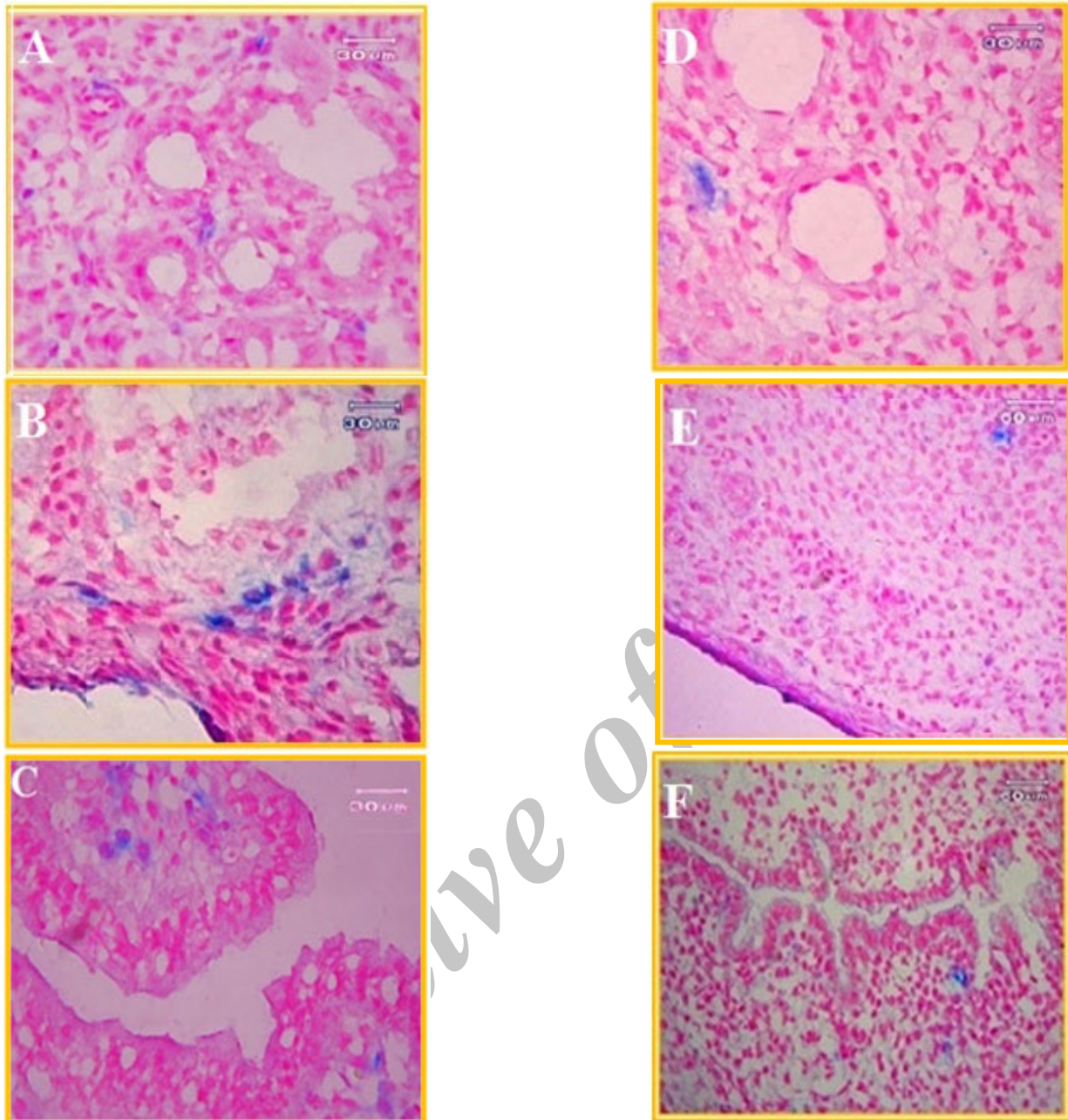
یافته ها

در این مطالعه فراوانی و چگونگی پخش (لوکالیزاسیون) سلول های DC در بافت طحال و رحم موش های باردار شده طبیعی (بدون تحریک تخمک گذاری) و موش های باردار شده پس از تحریک تخمک گذاری و همچنین سطح سرمی هورمون های استروژن و پروژسترون در روز هفتم حاملگی بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که میزان هورمون های پروژسترون و استروژن در گروه تحریک تخمک گذاری به صورت معنی دار ($P=0/008$) بیشتر از گروه کنترل است. میزان استروژن سرم در گروه کنترل و تحریک تخمک گذاری شده برحسب میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب $7/6 \pm 94/4$ و $8/6 \pm 163/4$ برآورد گردید و میزان پروژسترون سرم در گروه کنترل و تحریک تخمک گذاری شده برحسب نانوگرم بر میلی لیتر به ترتیب $1/5 \pm 28$ و $5/14 \pm 188$ به دست آمد.

رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی بافت طحال با آنتی بادی ضد $CD11c$ نشان داد که سلول های DC در هر دو گروه کنترل و تحریک تخمک گذاری عمدتاً در اطراف فولیکول های لنفوای



شکل ۱- پراکندگی سلول های دندریتیک بافت طحال در گروه تحریک شده (A) و کنترل (B). آنزیم مورد استفاده در این رنگ آمیزی آنزیم آلکالین فسفاتاز بوده که با تاثیر بر سوبسترا نهایتاً رنگ آبی ایجاد می کند. سلول های آبی سلول-های دندریتیک هستند و سلول های قرمز سلول هایی هستند که از نظر مارکر $CD11c$ منفی بوده و رنگ زمینه (قرمز) را به خود گرفته اند.



شکل ۲- مقایسه فراوانی و پراکندگی سلول‌های دندریتیک در بافت رحم در گروه کنترل و تحریک شده. شکل‌های سمت چپ شامل: A, B و C فراوانی سلول‌های دندریتیک را در مناطق اطراف غده، میومتر و اطراف لومن در گروه کنترل را نشان می‌دهد و شکل‌های سمت راست D, E و F فراوانی سلول‌های دندریتیک را در سه منطقه اطراف غده، میومتر و اطراف لومن در گروه تحریک شده نشان می‌دهد. سلول‌های آبی سلول‌های دندریتیک هستند.

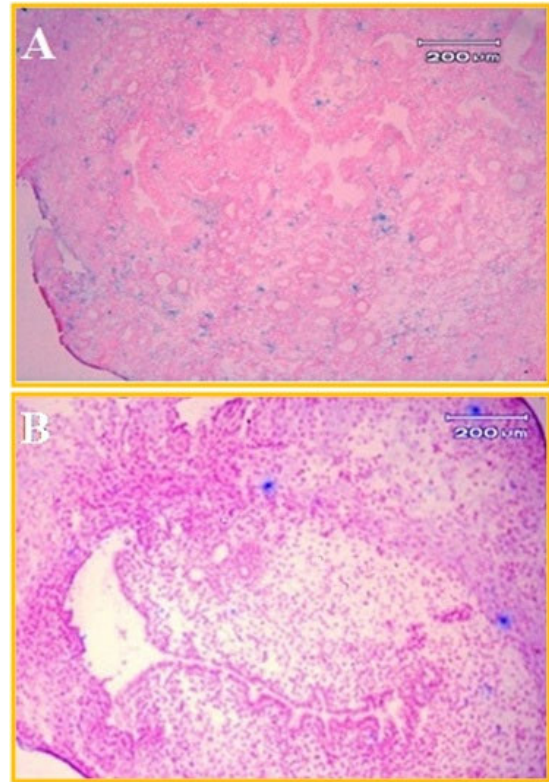
تحریک تخمک‌گذاری $0.3 \pm 0.1/5$ تعیین شد (شکل ۴).

دندریتیک در گروه کنترل $0.4 \pm 0.4/4$ و در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده $0.5 \pm 0.3/6$ تعیین شد (شکل ۴). مقایسه درصد سلول‌های دندریتیک در بافت رحم در دو گروه مورد مطالعه نشان داد که درصد سلول مذکور در گروه کنترل (بدون تزریق هورمون) بطور معنی‌داری از گروه تحریک تخمک‌گذاری بیشتر است ($P=0.008$). درصد سلول‌های $CD11c^+$ در گروه کنترل $0.2 \pm 0.1/1$ برآورد گردید. اما درصد این سلول در گروه

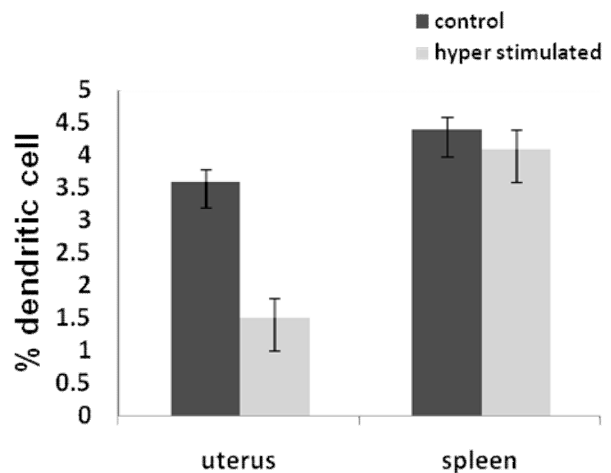
بحث

این مطالعه برای اولین بار تأثیر استفاده از هورمون و تحریک تخمک‌گذاری را بر فراوانی و چگونگی پخش سلول‌های دندریتیک در بافت طحال و رحم گزارش می‌کند.

های بافت رحم است. مطالعات نشان می دهد که بیشترین تعداد سلول های دندریتیک در اوایل حاملگی موش به ویژه زمان لانه گزینی و تا چند روز پس از آن است [۲۱]. به طوریکه این افزایش از روز ۵/۵ بارداری شروع و در روز ۸/۵ بارداری به حداکثر میزان خود می رسد و بعد از این دوره تعداد سلول های دندریتیک از روز ۹/۵ تا روز ۱۷/۵ در یک سطح پایدار باقی می ماند. در این فاصله زمانی سلول های دندریتیک ۱۰٪ سلول-های رحم را به خود اختصاص می دهند [۲]. علت افزایش سلول های دندریتیک در اوایل حاملگی می تواند به دلیل ارتشاح سلول های ایمنی به ویژه مونوسیت و سلول دندریتیک قبل از لانه گزینی به موضع رحم باشد. ارتشاح سلول های ایمنی قبل از لانه گزینی در آمادگی رحم برای پذیرفتن جنین نقش مهمی را ایفا می کنند. سلول های دندریتیک نیز قبل از لانه گزینی در موضع رحم تجمع می یابند و نقش مهمی در لانه گزینی جنین در موش ایفا می کنند. بطوریکه کاهش سلول های دندریتیک در ناحیه لانه گزینی باعث عدم جایگزینی مناسب و نهایتاً سقط جنین می شود. [۱۴،۲۱] علاوه بر این دانشمندان بیان کردند که سلول دندریتیک با ترشح کموکاین ها و سایتوکاین هایی باعث تجزیه لایه MUC-1 و نفوذ بلاستوسیست به جایگاه مناسب برای لانه گزینی می شود [۳]. یکی دیگر از دلایل افزایش سلول دندریتیک در اوایل حاملگی احتمالاً ناشی از پدیده التهابی القاء شده توسط اسپرم می باشد. پس از جفت گیری فاکتورهای موجود در مایع منی به ویژه $TGF-\beta$ سبب تولید طیف وسیعی از سایتوکاین های پیش التهابی نظیر GM-CSF، IL-6، TNF- α و کموکاین ها از سلول های اپیتلیال رحم می شوند. این عوامل به نوبه خود موجب مهاجرت طیف وسیعی از سلول ها به ناحیه می گردند. بنابراین به نظر می رسد افزایش قابل توجه سلول دندریتیک در اوایل حاملگی ناشی از استقرار پدیده التهابی و تولید سایتوکاین هایی نظیر GM-CSF در ناحیه باشد [۲۲]. [۲۳]. با توجه به نقش مهم سلول دندریتیک در اوایل بارداری به ویژه زمان لانه گزینی درصد بالای سلول دندریتیک در روز هفتم بارداری قابل توجه است. اما درصد کل سلول های دندریتیک در بافت رحم در گروه کنترل به طور معنی داری با گروه تحریک تخمک گذاری تفاوت داشت و سلول های دندریتیک در گروه تحریک تخمک گذاری نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری نشان داد. مطالعات نشان می دهند



شکل ۳- رنگ آمیزی سلول های دندریتیک بافت دسیدوا در گروه کنترل (A) و گروه تحریک تخمک گذاری (B) در محل لانه گزینی با آنتی بادی ضد CD11c در موش های باردار نژاد NMRI. برش های بافتی از بافت طحال و دسیدوا تهیه شده و با آنتی بادی ضد CD11c رنگ آمیزی شد. سلول های آبی سلول های دندریتیک هستند و سلول های قرمز سلول هایی هستند که از نظر مارکر CD11c منفی بوده و رنگ زمینه (قرمز) را به خود گرفته اند. کاهش سلول های دندریتیک در گروه تحریک تخمک گذاری مشهود است.



شکل ۴- درصد سلول های دندریتیک در دو بافت رحم و طحال در گروه های کنترل و تحریک تخمک گذاری شده

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد درصد سلول دندریتیک در بافت رحم در گروه کنترل ۴/۱ درصد کل سلول-

سلول‌های ایمنی شامل سلول‌های T، NK، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک در سرتاسر بارداری در دسیدوا حضور دارند [۱۲] اما نسبت این سلول‌ها در طول حاملگی تغییر می‌کند. تغییرات هورمون‌های استروئیدی در فازهای مختلف بارداری بر فراخوانی و حضور سلول‌های ایمنی در بافت رحم تأثیر می‌گذارد. در رت‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده است تعداد سلول‌های MHC-II⁺ اندومتر به شدت کاهش می‌یابد. تلقیح استرادیول به این رت‌ها سبب افزایش سلول‌های MHC-II⁺ در تمام اندومتر می‌شود. در رت‌هایی که به آن‌ها پروژسترون تلقیح شده بود، تعداد کمی سلول‌های MHC-II⁺ در اطراف غدد اپیتلیومی مشاهده شده ولی در پاسخ به تزریق توأم پروژسترون و استرادیول تعداد سلول‌های MHC-II⁺ رحم به شدت افزایش یافت. همچنین این مطالعه نشان می‌دهد که تلقیح استروژن به تنهایی سبب مهاجرت شدید سلول‌های OX-41⁺ (سلول‌های DC، ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها) به رحم می‌شود ولی در تلقیح پروژسترون به همراه استروژن تجمع سلول‌های OX-41⁺ کمتر از زمانی است که استروژن به تنهایی تلقیح شود [۲۷].

مطابق برخی از گزارشات احتمال دارد که پروژسترون از طریق کاهش تولید GM-CSF در ممانعت از مهاجرت سلول‌های DC به رحم نقش داشته باشد. تولید GM-CSF توسط سلول‌های اپیتلیال رحم در فاز استروس (که غلظت استروژن بالاست) بیش از سایر فازهای سیکل استروس است. در موش‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده تلقیح استروژن و نه پروژسترون سبب افزایش تولید GM-CSF توسط سلول‌های اپیتلیال رحم می‌شود. این افزایش با تلقیح همزمان پروژسترون مهار می‌شود. همچنین تلقیح آنتاگونیست پروژسترون به موش‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده و به آن‌ها استروژن تزریق شده است، تولید GM-CSF را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد [۲۴]. در نتیجه به نظر می‌رسد که استروژن موجب تولید و یا رهاسازی GM-CSF توسط سلول‌های اپیتلیال رحم می‌گردد، در حالی که پروژسترون مانع این عمل می‌شود. سایر مطالعات نشان داده‌اند که تزریق داخل جلدی rGM-CSF به افراد مبتلا به جذام [۱۶] و یا به موش‌ها سبب مهاجرت سلول‌های DC می‌شود همچنین در اثر مجاورت طحال با سایتوکاین GM-CSF افزایش قابل توجهی در تعداد سلول‌های دندریتیک مشاهده شده است [۲۰]. درصد سلول-

های طحال و دسیدوا موش‌های حامله در اواسط بارداری به کمترین حد خود می‌رسد و این دوره دقیقاً زمانی است که غلظت پروژسترون به بیشترین حد خود می‌رسد [۲۶] در تایید نقش هورمون‌های جنسی در فراخوانی و تعداد سلول‌های دندریتیک در بافت رحم مطالعه‌ای صورت گرفته که نشان می‌دهد بیشترین تراکم سلول DC در فاز استروس می‌باشد پس از آن و با شروع فاز متاستروس فراوانی این سلول‌ها به تدریج کاهش می‌یابد و در فاز پرواستروس به کمترین سطح خود می‌رسد. به نظر می‌رسد که کم بودن سلول‌های DC در فاز پرواستروس ناشی از غلظت بالای پروژسترون باشد و برعکس در فاز استروس که سطح استروژن بالا و سطح پروژسترون بسیار پایین است تعداد سلول‌های دندریتیک افزایش چشمگیری دارد [۱۰]. با توجه به توضیحات فوق به نظر می‌رسد که پروژسترون از طریق کاهش تولید GM-CSF از مهاجرت سلول‌های DC به رحم جلوگیری نماید. علاوه بر نقش هورمون‌ها در فراخوانی و یا مهار حضور سلول‌های دندریتیک به رحم، مطالعه‌ای صورت گرفته که نشان می‌دهد هورمون استروژن و رسپتور آن می‌توانند بقاء سلول‌ها را تنظیم نمایند. هورمون استروژن باعث افزایش ملکول Fas-L بر سطح سلول‌های مونوسیت و القاء آپتوزیس در این سلول‌ها می‌گردد. علاوه بر موارد ذکر شده مطالعه‌ای صورت گرفته که نشان می‌دهد تزریق مقادیر زیادی هورمون استرادیول منجر به کاهش سلول‌های دندریتیک ارگان‌های لنفاوی در مدل موشی انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی (EAE) می‌گردد [۱۷]. با توجه به اینکه در گروه تحریک تخمک‌گذاری مقادیر سرمی هورمون استرادیول و پروژسترون نسبت به گروه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای دارد. بنابراین کاهش سلول‌های دندریتیک در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده دور از انتظار نمی‌باشد. در این مطالعه همچنین تأثیر تحریک تخمک‌گذاری بر جمعیت سلول‌های دندریتیک طحال نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که اگرچه درصد سلول‌های دندریتیک (+CD11c) طحال در گروه تحریک تخمک‌گذاری نسبت به گروه کنترل (بدون تحریک تخمک‌گذاری) کاهش یافته است، لیکن این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. این امر احتمالاً به دلیل پاسخگویی ضعیف سلول‌های دندریتیک طحال و یا خون محیطی به تغییرات غلظت هورمون‌هاست. مطالعات

با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که افزایش هورمون‌های استرادیول و پروژسترون پس از تحریک تخمک‌گذاری بر جمعیت سلول‌های دندریتیک طحال اثرگذار نبوده اما موجب کاهش سلول‌های دندریتیک رحم می‌گردد. از آنجا که سلول‌های دندریتیک در پدیده لانه‌گزینی و شکل‌گیری دسیدوا نقش مهمی را ایفا می‌کنند کاهش فراوانی این سلولها در گروه تحریک‌تخمک‌گذاری نسبت به گروه کنترل می‌تواند مانع جایگزینی مناسب جنین و نهایتاً سقط جنین گردد و ممکن است یکی از عوامل کاهش موفقیت در کلینیک‌های IVF باشد. با توجه به اهمیت موضوع مطالعات بیشتری باید در زمینه تاثیر تحریک تخمک‌گذاری بر بخش‌های مختلف سیستم ایمنی و ارتباط این تغییرات با میزان سقط و کیفیت رشد و تکامل جنین صورت پذیرد.

سیاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد ایمنی‌شناسی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد لذا نگارندگان از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه و نیز پرسنل آزمایشگاه سلول‌های دندریتیک و گروه علوم تشریح که مساعدت‌های لازم را مبذول داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نشان می‌دهد تحریک تخمک‌گذاری با گنادوتروپین‌ها بر روی جمعیت سایر سلولهای خون محیطی مثل سلول‌های NK، سلول‌های TCD8+، TCD4+ و سلول‌های B تأثیری ندارد. همچنین سطح سرمی IL-1، IL-2، IL-4 و INF- γ تغییری نمی‌کند [۱۱]. در مطالعه‌ای دیگر در اثر مجاورت سلول‌های دندریتیک خون محیطی خانم‌های غیر باردار با غلظت‌های متفاوت هورمون پروژسترون، استرادیول و β -HCG هیچ گونه تغییری در بیان شاخص‌های سطحی مثل CD83، CD86، HLA-DR، CD40 و فنوتیپ سلول دندریتیک در محیط کشت مشاهده نشده است [۱۳]. همچنین مطالعه‌ای صورت گرفته که نشان می‌دهد هورمون استرادیول تأثیری بر تعداد، فنوتیپ و بلوغ سلول دندریتیک طحالی ندارد [۲۵]. علاوه بر این درصد سلول دندریتیک لنفوئیدی و میلوئیدی در فازهای مختلف سیکل جنسی موش‌های ماده در بافت طحال و همچنین درصد سلول دندریتیک خون محیطی خانم‌ها در دو فاز مختلف لوتال و فولیکولار تفاوت ندارد و این نشان می‌دهد جمعیت سلول‌های دندریتیک لنفوئیدی و میلوئیدی طحال از تغییرات غلظت هورمون‌های استروئیدی در طی سیکل ماهیانه خانم‌ها [۴] و یا فازهای سیکل استروس موش‌ها متأثر نمی‌شوند [۲۹].

References

- [1] Butts C, Shukair S, Duncan K, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol* 19 (2006) 287-296.
- [2] Blois S, Soto C, Tometten M, Klapp B, Margni R, Arck P, Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod* 70 (2004) 1018-1024.
- [3] Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G, Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol* 63 (2010) 17-21.
- [4] Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Leszczynska-Gorzela B, Buczkowski J, Wojas K, Oleszczuk J, Blood myeloid and lymphoid dendritic cells are stable during the menstrual cycle but deficient during mid-gestation. *J Reprod Immunol* 59 (2003) 193-203.
- [5] Ertzeid G, Storeng R, The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 16 (2001) 221-225.
- [6] Ertzeid G, Storeng R, Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and post implantation development in mice. *J Reprod Fertil* 96 (1992) 649-655.
- [7] Fuser B, Devroey P, Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends Endocrinol Metab* 14 (2003) 236-242.
- [8] Fauser B, Devroey P, Macklon N, Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet* 365 (2005) 1807-1816.
- [9] Fauser B, Heusden A, Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical

- consequences. *Endocr Rev* 18 (1997) 71-106.
- [10] Fata J, Chaudhary V, Khokha R, Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 β -estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod* 65 (2001) 680-688.
- [11] Ho H, Wu M, Chen H, Chao K, Yang Y, In vivo CD3+CD25+ lymphocyte subpopulation is down-regulated without increased serum-soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) by gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH). *AM J Reprod Immunol* 33 (1995) 134-139.
- [12] Hunt J, Immunologically relevant cells in the uterus. *Biol Reprod* 50 (1994) 461-466.
- [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 cells. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol* 122 (2005) 85-94.
- [14] Krey G, Frank P, Barrientos G, Cordo-Russo R, Ringel F, Moschansky P, Klapp B, Arck P, Blois S, In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice. *J Mol Med* 86 (2008) 999-1011.
- [15] Kramer B, Stein B, Lavd W, Exogenous gonadotropins - serum oestrogen and progesterone and the effect on endometrial morphology in the rat. *J Anat* 173 (1990) 177-186.
- [16] Kaplan G, Walsh G, Guido L, Meyn P, Burkhardt R, Abalos R, Barker J, Frindt P, Fajardo T, Celona R, Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *JEM* 175 (1992) 1717-1728.
- [17] Kovats S, Carrerasa E, Regulation of dendritic cell differentiation and function by estrogen receptor ligands. *Immunol Med Microbiol* 252 (2008) 81-90.
- [18] Nocia I, Borria P, Cocciaa M, Criscuolia L, Scarsellia G, Hormonal patterns, steroid receptors and morphological pictures of endometrium in hyper stimulated IVF cycles. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol* 75 (1997) 215-220.
- [19] Oehninger S, Hodgen G, Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. *Clin Obstet Gynaecol* 4 (1990) 541-573.
- [20] O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Pooley J, Evans R, Shortman K, Effects of administration of progenipoinetin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice. *Blood* 99 (2002) 2122-2130.
- [21] Plaks V, Brinberg T, Berkutzki T, Sela S, AYashar, Kalchenko V, Mor G, Keshet E, Dekel N, Neeman M, Uterine DCs are crucial for decidua formation during implantation in mice. *J Clin Invest* 118 (2008) 32-38.
- [22] Robertson A, Control of the immunological environment of the uterus. *Rev Reprod* 5(2000)164-174.
- [23] Robertson S, Sharkey D, The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy. *Semin Immunol* 13 (2001) 243-254.
- [24] Robertson S, Mayrhofer G, Seamark R, Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod* 54 (1996) 183-196.
- [25] Scott A, Klein S, Siracusa M, Overstreet M, Housseau F, 17 β -estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. *J Immunol* 180 (2008) 1423-1431.
- [26] Varga B, Patay E, Horváth E, Folly G, Ovarian venous outflow, progesterone and 17 beta-oestradiol secretion and peripheral blood level during pregnancy in the rat. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 58 (1981) 141-146.
- [27] Wira C.R., Kaushic C., Richardson J. Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the femal reproductive tract. In: *Mucosal Immunol*. Orga P. (Editors) Aca-demic Press. (1999) 1449-1461.
- [28] Yoshinaga K, Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. *Semin Cell Dev Biol* 19 (2008) 161-169.
- [29] Zarnani A, Moazzeni S, Shokri F, Salehnia M, Jeddi-Tehrani M, Kinetics of murine decidual dendritic cells. *Reprod* 133 (2007) 275-283.