بررسی تأثیر سرم موش حامله بر روی سلولهای دندریتیک در القاء تحریک لنفوسیت‌های T و تولید سیتوکین‌های IL-10 و IFN-γ

محمود بزرگمهر I
*دکتر سیدمحمد مؤذنی II
شهره نیکو I
دکتر امیرحسن زرنانی III

چکیده

زمینه و هدف: رد نشدن جنین نیمه آلوژن به وسیله سیستم ایمنی مادر، موضوعی است که مدت نیم قرن، مورد توجه محققین بوده است و در مورد چگونگی این پدیده، پیشنهادات متعددی ارائه گردیده است. تئوری غلبه پاسخ ایمنی Th2(T helper 2) در سطح تماس مادر- جنین طی حاملگی موفق، جزء فرضیه‌هائی است که از جوانب مختلف مورد تأیید قرار گرفته است، ولی در مورد اثرات سیستمیک حاملگی بر سیستم ایمنی، نظریه‌های ضد و نقیض زیادی وجود دارند. سلولهای دندریتیک، به عنوان تواناترین فعال کننده لنفوسیت‌های T دست نخورده، قابلیت القاء پاسخ ایمنی و همچنین القاء تحمل ایمنی را به صورت همزمان دارا می‌باشند. این سلولها همچنین می‌توانند باعث جهت‌گیری سلولهای Th به سمت Th1 یا Th2 شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که سلولهای دندریتیک به عنوان یکی از عوامل مؤثر، در تنظیم پاسخ ایمنی طی حاملگی نقش مهمی را بعهده داشته باشند. این مطالعه با هدف بررسی اثر سرم موش حامله بر توانایی سلولهای دندریتیک در تحریک پاسخ اختصاصی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌های T و همچنین القاء پروفایل سیتوکینی در آنها انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، سرم موشهای حامله آلوژنیک(Balb/c×C57BL/6) بین روزهای ۱۱-۹ (اواسط) حاملگی جمع‌آوری شد. سلولهای دندریتیک، طی روشی سه مرحله‌ای شامل هضم آنزیمی بافت طحال با کلاژناز، جداسازی سلولهای کم چگال به کمک محیط گرادیان غلظت نایکودنز و سرانجام چسبندگی به پلاستیک، از طحال موشهای Balb/c جدا شدند. میزان خلوص سلولهای دندریتیک جدا شده، با کمک آنتی‌بادی ضد شاخص CD11c و روش فلوسیتومتری تعیین گردید. سلولهای دندریتیک با Conalbumin ، به‌عنوان آنتی‌ژن خارجی، طی کشت شبانه بارگذاری شدند. به تعدادی از کشت‌ها، سرم موش حامله با غلظت نهایی ۲/۵٪ اضافه گردید. دو گروه دیگر از سلولهای دندریتیک طی بارگذاری با آنتی‌ژن، به ترتیب با سرم موشهای ماده غیرحامله و FBS(Fetal bovine serum)، مجاور شدند. سلولهای دندریتیک بارگذاری شده، به کف دست موشها تزریق گردیدند. گره‌های لنفاوی براکیال(ناحیه‌ای) موشهای ایمن شده، برداشته شد و سلولهای آن در حضور Conalbumin کشت داده شدند. میزان تکثیر لنفوسیت‌ها پس از ۵ روز با استفاده از تایمیدین رادیواکتیو اندازه‌گیری شد. تولید IFN-γ(Interferon-γ) و IL-10(Interleukin-10) به وسیله سلولهای T تحریک شده، با استفاده از تکنیک Sandwich ELISA (Sandwich Enzyme-Linked Immunoadsorbent assay)، در سوپ رویی حاصل از کشت لنفوسیت‌های T، تعیین گردید. نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون غیر پارامتری Mann-whitney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده نشان دادند که سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با آنتی‌ژن، در مجاورت سرم غیرحامله، باعث القاء پاسخ تکثیری قوی در سلولهای T شدند و همچنین تولید مقادیر زیادی از IFN-γ و IL-10 را درآنها القاء نمودند، ولی مجاورسازی سلولهای دندریتیک با سرم موش حامله، توانایی آنها را در القاء پاسخ تکثیری اختصاصی آنتی‌ژن در لنفوسیت‌های T ، به میزان قابل ملاحظه‌ای مهار نمود. همچنین میزان تولید IFN-γ و IL-10 به‌وسیله سلولهای غدد لنفاوی گروه مجاور شده با سرم حامله، به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که سرم موش حامله بر توانایی سلولهای دندریتیک در القاء پاسخ تکثیری اختصاصی به آنتی‌ژن و همچنین ترشح سیتوکین به‌وسیله سلولهای T، اثر مهاری دارد. اثرات مهاری را می‌توان به تاثیر فاکتورهایی از قبیل HLA-G(Human leucocyte antigen-G)، IL-10، PGE2(Prostaglandin E2)، پروژسترون و تعدادی از عوامل دیگر که به‌طور عمده در سطح تماس مادر ـ جنین ترشح می‌شوند ولی به علت بروز پدیده سرریز، در سرم حامله نیز موجود می‌باشند، نسبت داد، ولی تعیین دقیق مکانیسم‌های دخیل در این پدیده نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – سلولهای دندریتیک ۲ – سرم حامله ۳ – تکثیر سلولی ۴ – سیتوکین

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲۵، تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۲۹

مقدمه

محتوای ژنتیکی جنین، دارای دو منشاء پدری و مادری می‌باشد. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که سیستم ایمنی مادر همان‌گونه که پیوند با منشاء پدری را رد می‌کند، جنین حاوی آنتی‌ژن‌های پدری را نیز رد نماید، ولی عملاً چنین

I) دانشجوی دکترای ایمنی‌شناسی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
II) استاد و PhD ایمنی‌شناسی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، بزرگراه جلال‌آل‌احمد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).
III) استادیار گروه ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران و استادیار گروه ایمنی‌شناسی تولیدمثل، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری‌های علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

اتفاقی نمی‌افتد و مادر، جنین نیمه بیگانه را ۹ ماه در بدن خود نگهداری می‌نماید.[۱] تحمل ایجاد شده در بدن مادر نسبت به جنین نیمه آلوژن، یکی از مسائل مهم علم پزشکی است که محققین علم ایمونولوژی در مورد آن بررسی‌های فراوانی انجام داده‌اند. اولین بار آقای مداوار موضوع حاملگی را به صورت جدی و از دیدگاه ایمونولوژیک مورد بررسی قرار داد و در مورد عدم رد جنین نیمه آلوژن به وسیله سیستم ایمنی مادر، چندین نظریه را مطرح کرد که امروزه فقط یکی از آنها به شکلی متفاوت پذیرفته شده است.[۲] نظریه وجود سد ایمونولوژیک بین مادر و جنین توسط مداوار بدرستی مطرح شده، لیکن این سد بر خلاف تصور او، سدی غیر فعال یا خنثی نمی‌باشد، چرا که پس از مداوار، Petraglia[۳] و همکاران نشان دادند که جفت به عنوان سد بین مادر و جنین، جایگاه یک نوع تحمل فعال می‌باشد. در تایید این موضوع، Hoskin و Murgita[٤] نشان دادند که سلولهای طحال موشهایی که یک بار زایمان موفق داشته‌اند به دنبال مواجه با سلولهای نوزاد، تکثیر می‌شوند، در حالی که چنین اتفاقی در مورد موشهای باکره مشاهده نمی‌گردد. این موضوع نشان می‌دهد که سیستم ایمنی مادر به صورت بالقوه توانایی شناخت و واکنش بر ضد آنتی‌ژن‌های جنینی را دارد ولی طی حاملگی طبیعی، این توانایی پاسخ، عواقب منفی بدنبال ندارد.

کنترل پاسخ‌های ایمنی در دوره حاملگی از دو جنبه مختلف قابل بررسی است؛ جنبه اول، کنترل پاسخ‌های ایمنی در موضع بارداری است که طی تماس مستقیم سلولهای مادر و جنین ایجاد می‌شوند و جنبه دیگر، کنترل پاسخ‌های ایمنی در سطح سیستمیک می‌باشد که احتمالا به طور عمده با واسطه فاکتورهای اندوکرین محلول انجام می‌گیرند.

سلولهای دندریتیک به عنوان مهم‌ترین سلولهای عرضه کننده آنتی‌ژن و تنها سلولهایی که توانایی جهت‌دهی سلولهای T دست نخورده به سمت TH1 یا TH2(T Helper) را دارا می‌باشند، همواره در پدیده‌های مختلف ایمونولوژیک از جمله حاملگی مطرح بوده‌اند. در مورد نقش این سلولها در موضع بارداری و تاثیر حاملگی بر فنوتیپ و عملکرد آنها، مطالعات اندکی انجام گرفته است.[۵-۷] اخیراً ما طی دو مطالعه چگونگی مهاجرت و جایگزینی سلولهای دندریتیک در بافت دسیدوآ طی حاملگی و تاثیر ریز محیط حاملگی روی این سلولها را گزارش نموده‌ایم.[۸ و ۹]

سلولهای دندریتیک در موش، به دو زیر رده اصلی لنفوییدی با شاخص CD8α و میلوئیدی با شاخص سطحیCD11b تقسیم می‌شوند که زیر رده لنفوییدی توانایی جهت دهی پاسخ‌ها به سمت TH1 و زیر رده میلویید به سمت TH2 را دارا می‌باشند؛ علاوه بر این، برای زیر رده لنفوئیدی نقش تولروژنیک نیز پیشنهاد گردیده است.[۱۰]

چنانچه می‌دانیم سرم حامله شامل عوامل سرکوبگر متعددی از جمله HLA-G(Human leucocyte antigen-G)، PGE2(Prostaglandin E2)، IL-10(Interleukin-10)، VitD3 (Vitamin D3)، پروژسترون و استروژن می‌باشد[۲] که هر کدام از آنها می‌توانند بر فنوتیپ، عملکرد، بلوغ و فراوانی سلولهای دندریتیک و در نتیجه نوع پاسخی که آنها جهت‌دهی می کنند، تاثیر گذار باشند. مطالعات قبلی ما نشان داد که سرم تهیه شده از موش در اواسط دوره حاملگی، قدرت سلولهای دندریتیک را در القاء پاسخ تکثیری در لنفوسیت‌های T، طی واکنش MLR(Mixed leukocyte reaction) آلوژنیک، کاهش می‌دهد.[۱۱] مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر سرم اواسط بارداری موش بر قدرت سلولهای دندریتیک در القاء پاسخ اختصاصی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌های T و همچنین بررسی پروفایل سیتوکینی آنها صورت گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، موشهای ماده Balb/c(۱۰-۸ هفته‌ای) دو به دو در قفس‌های مختلف توزیع شدند و در هر قفس یک موش نر C57BL/6 قرار داده شد. هر روز صبح، موشها از نظر وجود پلاک واژینال بررسی شدند. در موشهای پلاک مثبت، وجود اسپرم در واژن بررسی شد؛ بدین ترتیب که توسط سمپلر، حدود ۲۰ میکرولیتر PBS(Phosphate buffer saline) در دهانه واژن، تلقیح و بلافاصله مایع دهانه واژن جمع‌آوری گردید، وجود اسپرم در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

مایع مذکور توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد ودر نهایت، روز مشاهده اسپرم و پلاک واژینال، روز ۰/۵ حاملگی در نظر گرفته شد.

خونگیری از قلب موشهای ماده Balb/c، در اواسط حاملگی(۱۱-۹ روزگی) انجام گرفت. خون گرفته شده پس از انکوباسیون ۱ تا ۲ ساعت در دمای اتاق، میکروفیوژ شد و سرم حاصل، از لخته تشکیل شده جدا شد. سرم بدست آمده با فیلتر ۰/۲۲ میکرون، استریل شد و تا زمان استفاده در فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

طحال موشهای Balb/c پس از نخاعی کردن حیوان در شرایط استریل، خارج و در پلیت حاوی PBS قرار داده شد. به هر طحال ۱ میلی‌لیتر از محلول کلاژناز D ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(Roche, Germany) حاوی سرم جنین گاوی ۲٪ (Gibco, U.K.) و ۳۰ میکروگرم DNase I در میلی‌لیتر (Roche, Germany)، تزریق و سوسپانسیون سلولی حاصله در یک لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری، جمع‌آوری و در مجاورت یخ قرار داده شد، سپس طحال‌ها با قیچی به قطعات ریز با ابعاد ۱ میلی‌متر مکعب تقسیم شدند. به ازای هر طحال، یک میلی‌لیتر کلاژناز ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محلول هانکس(Hanks balanced salt solution=HBSS)(بهار افشان، ایران) حاوی ۲٪ سرم جنین گاوی و ۳۰ میکروگرم DNase در میلی‌لیتر اضافه گردید. قطعات بافتی به‌وسیله پیپت پاستور چندین بار با کوکتل آنزیمی، مخلوط و به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO2 ۵٪ انکوبه شدند.

در زمان انکوباسیون، هر ۱۰ دقیقه یکبار قطعات بافتی با حرکت دورانی پلیت کشت، هم زده شدند. پس از پایان انکوباسیون، به قطعات بافتی و نیز سوسپانسیون سلولی حاصل از تزریق بافتی کلاژناز، EDTA(Ethylene diamine tetra acetic acid)(Merk,Germany) با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار، اضافه و مخلوط بافتی چندین بار پیپت شد. سوسپانسیون سلولی بدست آمده، از الک سلولی عبور داده شد و با سوسپانسیون سلولی حاصل از تزریق کلاژناز مخلوط گردید.

سوسپانسیون سلولی بدست آمده از مرحله قبل، دوبار با محیط RPMI-1640 شستشو داده شد. پس از دومین مرحله شستشو، رسوب سلولی با ۳ میلی‌لیتر محلول RPMI-1640 حاوی(2mM) EDTA و 5% FBS، مخلوط گردید. این مخلوط به آرامی به روی ۳ میلی‌لیتر محلول نایکودنز ۱۲٪ (Axis-Shield, Norway)در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری، منتقل گردید. لوله به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۰۰×g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس سلولهای کم چگال از حد فاصل محلول RPMI-1640 و نایکودنز ۱۲٪ به آرامی جمع‌آوری شدند و یکبار با PBS -EDTA ۵ میلی‌مولار و ۲ بار دیگر با PBS سرد، شسته شدند. تعداد سلول حاصل و نیز میزان حیات(Viability) آنها با استفاده از لام هموسیتومتر و روش تریپان بلو برآورد گردید. از سلولهای بدست آمده، سوسپانسیون سلولی تهیه شد و سلولها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ۵٪ کشت داده شدند. در مدت کشت ۲ ساعته، سلولهای دندریتیک نابالغ و مونوسیت‌ها به همراه تعداد بسیار کمتری لنفوسیت B به کف پلیت متصل شدند. پس از کشت ۲ ساعته، سلولهای غیر چسبان به آرامی با RPMI-1640 شسته شدند، بطوری که زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، تقریباً ۸۰٪ سلولهای چسبان باقیمانده را سلولهای تیره(که عمدتا شامل سلولهای دندریتیک نابالغ و ماکروفاژها می‌باشند) تشکیل می‌دادند. سلولهای چسبان باقیمانده به مدت ۱۶-۱٤ ساعت دیگر در چهار گروه مختلف کشت داده شدند. در گروه اول، FBS با غلظت ۱۰٪، در گروه دوم، سرم موش غیر حامله با غلظت ۲/۵ ٪ و درگروه سوم و چهارم، سرم حامله با غلظت ۲/۵٪ به محیط اضافه شد. در گروه اول تا سوم، آنتی ژن Conalbumin(Sigma, USA) نیز با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد. طی ۱۶-۱٤ ساعت کشت، سلولهای دندریتیک، بالغ شده و از کف پلیت جدا شدند. این سلولها، جمع‌آوری شده و به منظور تزریق به کف دست موشها، مورد استفاده قرار گرفتند. میزان خلوص سلولهای دندریتیک بدست آمده، با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری تعیین گردید.[۱۲]

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

پس از جمع‌آوری سوسپانسیون سلولهای شناور شده طی کشت شبانه، غلظت این سوسپانسیون روی 1×10^{6} سلول در میلی‌لیتر تنظیم شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن در دو لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. لوله‌ها در بشر حاوی یخ قرار داده شدند و به لوله آزمون، ۱ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد CD11c متصل به فایکواریترین PE –conjugated anti-mouse CD11c (BD,USA) و به لوله کنترل، کنترل ایزوتیپ مربوطه اضافه شد. لوله‌ها به مدت ٤٥ دقیقه روی یخ انکوبه شدند و سپس با بافر فلوسیتومتری دو بار به مدت ۱۰ دقیقه و در دور g×۳۰۰ شسته شدند. رسوب سلولی حاصل در ۱ سی‌سی بافر فلوسیتومتری به صورت سوسپانسیون درآمد و پس از انتقال به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری، به منظور آنالیز به وسیله دستگاه فلوسیتومتری(Partech, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. سلولهای دندریتیک جمع‌آوری شده پس از کشت ١٦-١٤ ساعته، یکبار با PBS-EDTA ٥ میلی‌مولار و دو بار با PBS در دمای ٤ درجه سانتی گراد و در دور g ×٣٤٠ شسته شدند. پس از آخرین سانتریفوژ، محلول رویی بدقت و بطور کامل خارج شد و غلظت سلولهای دندریتیک، روی 10^{7} سلول درهر میلی‌لیتر PBS تنظیم شد. ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی(3×10^{5} سلول) به صورت زیر پوستی به کف دست موشها تزریق گردید. سه گروه از سلولهای دندریتیک با آنتی ژن مواجه شده بودند و یک گروه نیز به عنوان کنترل منفی، با آنتی ژن مواجه نشده بود.

به منظور بررسی توانایی سلولهای دندریتیک پالس شده با آنتی‌ژن در تحریک لنفوسیت‌های T اختصاصی، مطابق روش Inaba[13]، ٥ روز پس از تزریق سلولهای دندریتیک به کف دست موشها، غدد لنفاوی Brachial خارج شدند و با آنتی‌ژن Conalbumin کشت داده شدند، به این ترتیب که غدد لنفاوی پس از خارج شدن در شرایط استریل، در پلیت‌های حاوی PBS-EDTA ٥ میلی‌مولار در چهار گروه جداگانه قرار داده شدند. به منظور خارج کردن سلولها و تهیه سوسپانسیون تک سلولی، غدد لنفاوی، له شدند و سوسپانسیون سلولی بدست آمده از الک سلولی عبور داده شد. سلولهای حاصل، در PBS-EDTA ٥ میلی‌مولار به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ×٣٤٠ و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد شسته شدند. سلولها مجدداً ۲ بار با PBS شسته شدند. سلولها، شمارش شده و میزان حیات آنها تعیین گردید. پس از آخرین مرحله شستشو، مایع رویی به دقت خارج شد و پس از اضافه کردن محیط کشت Click(Sigma, USA) حاوی سرم، غلظت سلولها در هر یک از ٤ گروه، روی 3×10^{6} سلول در هر میلی لیتر تنظیم گردید. به هر حفره میکروپلیت ٩٦ خانه(ته صاف)، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (معادل 3×10^{5} سلول) اضافه شد. آنتی‌ژن مورد نظر با غلظت نهایی ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با محیط کشت Click کامل، مخلوط و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به حفره‌های میکروپلیت اضافه شد.

تمام کشت‌ها به‌صورت سه‌گانه(Triplicate) انجام شدند و در حفره‌های کنترل منفی، به جای آنتی‌ژن، فقط محیط کشت کامل Click اضافه گردید. برای بررسی صحت سیستم کشت، به سه حفره، PHA(phytohemagglutinin)(Gibco, England) با غلظت ٥ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۸۰ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ٥٪ CO2 انکوبه شدند و پس از مدت مذکور، به هر حفره ۱ میکروکوری تیمیدین رادیواکتیو (^{3}H-Thymidine)(Amersham,U.K)، اضافه و پلیت‌های کشت سلول به مدت ١٨-١٦ ساعت دیگر در انکوباتور CO2، انکوبه شدند. سپس سلولها جمع‌آوری شده و میزان جذب تیمیدین نشاندار به وسیله دستگاه β–Counter(Wallac 1410) به صورت شمارش در دقیقه(CPM= Count per minute) اندازه‌گیری شد.

ابتدا تیتر مناسب آنتی بادی‌ها با انجام آزمایشات اولیه تیتراسیون تعیین گردید، سپس آنتی‌بادی Capture (آنتی‌بادی منوکلونال ضد IFN-γ موشی) (Pharmigen, USA) در بافر Coating(بافر فسفات) به نسبت ۱:۲۵۰ رقیق شد و حفره‌های میکروپلیت با ۱۰۰ میکرولیتر از آن در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به صورت Overnight پوشیده شدند. سپس حفره‌های میکروپلیت خالی شدند و با بافر شستشو(-PBS

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

Tween 20)، ۵ بار شستشو داده شدند. بعد از شستشوی آخر، مایع باقیمانده در حفره‌ها توسط دستمال کاغذی جذب شد.

به منظور blocking، به هر حفره ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده(PBS-FCS %10) اضافه شد و میکروپلیت یک ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شد، سپس حفره‌های میکروپلیت خالی شدند و مطابق روش بالا شستشو شدند. استانداردها شامل غلظت‌های ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر، از IFN-γ در بافر رقیق کننده تهیه شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد به‌صورت دوتایی در حفره‌های مربوطه اضافه گردید.

همچنین نمونه‌ها(مایع رویی کشت لنفوسیت‌ها) در حفره‌های مربوطه به‌صورت ۲ تایی اضافه شدند. در حفره‌های بلانک فقط ۱۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شدند سپس همه حفره‌ها، تخلیه و شسته شدند. آنگاه آنتی‌بادی Detection(آنتی‌بادی منوکلونال ضد IFN-γ موشی کونژوگه با بیوتین)(Pharmigen , USA) و اویدین کونژوگه با HRP(Horse reddish peroxydase) توأماً به نسبت ۱:۲۵۰ در بافر رقیق کننده رقیق شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصله به تمام حفره‌ها اضافه گردید.

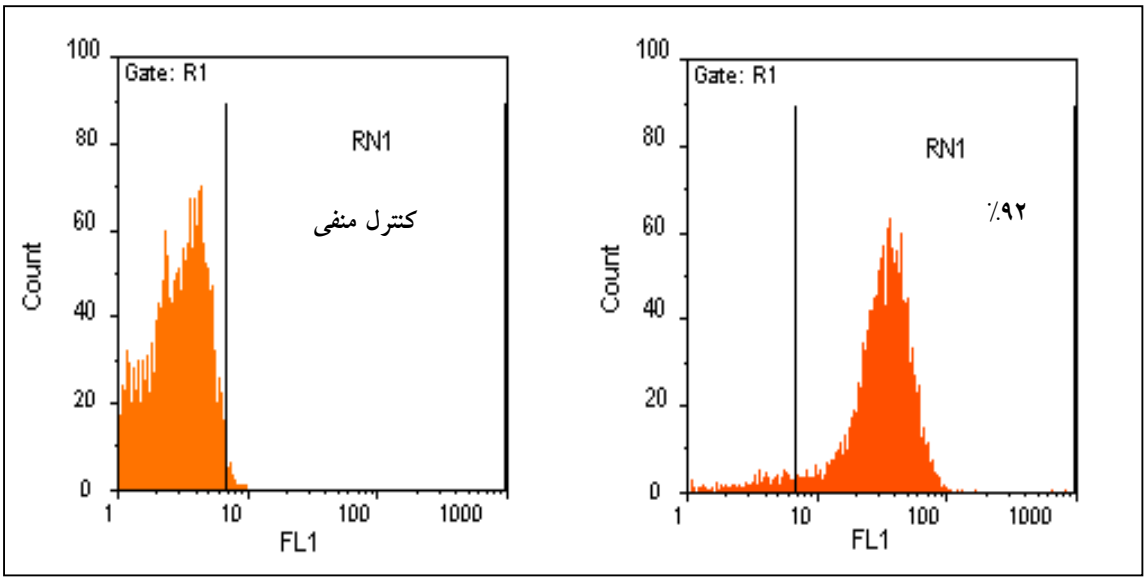
میکروپلیت‌ها به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شدند، سپس حفره‌ها، تخلیه و ۷ بار با بافر شستشو شسته شدند. ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا [Tetramethyl benzidine(TMB) و Hydrogen Peroxide (Pharmingen, USA)] به تمام حفره‌ها، اضافه و میکروپلیت‌ها به مدت نیم ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه و در تاریکی انکوبه شدند. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش(اسید سولفوریک ۲ نرمال) اضافه گردید و جذب نوری حفره‌ها در دو طول موج ۴۵۰ و ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. اندازه‌گیری IL-10، دقیقاً مشابه با اندازه‌گیری IFN-γ انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و Excel انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها در این مطالعه از روشهای غیرپارامتریک (Mann-whitney test) استفاده شد. حدود اطمینان در تمامی آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

همانطور که ذکر شد، سلولهای حاصل از هضم آنزیمی طحال موشهای Balb/c ، با هدف جداسازی سلولهای تک هسته ای کم چگال، روی محیط گرادیان غلظت نایکودنز با چگالی ۱۲/۲٪ منتقل شدند. به طور متوسط ۶-۳٪ کل لکوسیت‌های طحال پس از بردن روی محیط گرادیان، جدا شدند که میزان حیات آنها ۹۵-۹۲٪ بود. پس از کشت ۲ ساعته و حذف سلولهای غیر چسبان، خلوص سلولهای دندریتیک به حدود ۸۰ ٪ رسید. پس از کشت ۱۶-۱۴ ساعته، سلولهای دندریتیک بالغ شده به حالت شناور درآمده و جمع‌آوری شدند. از هر طحال بطور متوسط حدود $۳-۵ \times ۱۰^{۵}$ سلول دندریتیک بدست آمد. بررسی خلوص این سلولها با استفاده از فلوسیتومتری نشان داد که خلوص آنها با توجه به بیان شاخص سلولهای دندریتیک در موش یعنی CD11c، حدود ۲ ± ۹۲٪ بود(نمودار شماره ۱).

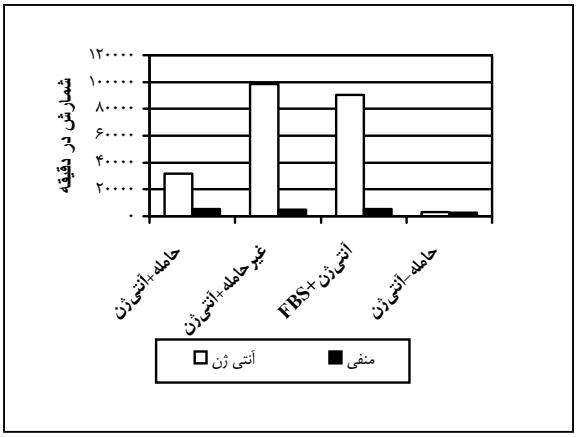
سلولهای دندریتیک که درشرایط مختلف بالغ شده بودند [در حضور سرم موش حامله، در حضور سرم موش غیر حامله و در حضور FCS(Fetal calf serum)]، پس از بارگذاری با آنتی‌ژن، به سه گروه متفاوت از موشها تزریق شدند. به یک گروه از موشها نیز، سلولهای دندریتیک که در حضور سرم موش حامله بالغ شده بودند، بدون بار گذاری با آنتی‌ژن، تزریق گردید. ۵ روز پس از تزریق سلولهای دندریتیک، غدد لنفاوی ناحیه ای خارج شدند و سلولهای غدد لنفاوی با آنتی ژن تحریک شدند و میزان تکثیر سلولها اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصله از ۵ آزمون مجزا نشان داد که مجاور کردن سلولهای دندریتیک با سرم موشهای حامله آلوژن در غلظت ۲/۵٪، موجب سرکوب توان این سلولها در القاء پاسخ تکثیری اختصاصی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌های T می‌گردد(P=۰/۰۰۰)(نمودار شماره ۲).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]



نمودار شماره ۱- بررسی بروز شاخص CD11c بر سطح سلولهای دندریتیک خالص شده از طحال.

ـ به منظور تأیید میزان خلوص سلولهای دندریتیک، این سلولها با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی CD11c کونژوگه شده با فایکواریترین(PE)، رنگ‌آمیزی شدند و درصد سلولهای رنگ گرفته با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر مورد شمارش قرار گرفتند. شکل فوق نمونه‌ای از نمودارهای حاصل از آنالیز فلوسیتومتری است. در این نمودار میزان خلوص سلولهای دندریتیک ۹۲٪ می‌باشد.



نمودار شماره ۲- مقایسه میزان تکثیر سلولهای غدد لنفاوی چهار گروه موش ایمن شده با سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با آنتی‌ژن، طی آزمایش LTT(Lymphocyte transformation test)

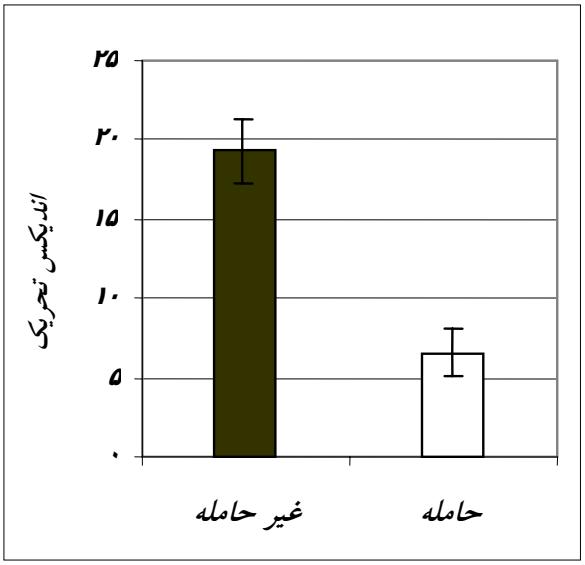
ـ سلولهای دندریتیک در چهار گروه جداگانه مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به ترتیب از سمت چپ به راست سلولهای دندریتیک در گروه اول(حامله + آنتی‌ژن) به هنگام بارگذاری با آنتی‌ژن با سرم حامله و در گروه دوم(غیرحامله + آنتی‌ژن) با سرم غیرحامله مجاور شدند. در گروه سوم(FBS+آنتی‌ژن) این سلولها به هنگام بارگذاری با آنتی‌ژن، با FBS مجاور شدند. همچنین در گروه چهارم(حامله ـ آنتی‌ژن) سلولهای دندریتیک بدون بارگذاری با آنتی‌ژن، با سرم حامله مجاور شدند. سلولهای مذکور به کف دست موشها تزریق شده، پس از ۵ روز غدد لنفاوی ناحیه‌ای، خارج و در حضور یا غیاب آنتی‌ژن(منفی) کشت داده شدند. میزان تکثیر سلولها با استفاده از تیمیدین رادیواکتیو اندازه‌گیری گردید. نتایج(انحراف معیار±میانگین)، از ۵ آزمایش مستقل بدست آمده‌اند.

ـ تیمار سلولهای دندریتیک با سرم موش حامله موجب سرکوب شدید توان این سلولها در القاء پاسخ اختصاصی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌های T در مقایسه با سرم موش غیر حامله گردید(p=۰/۰۰۰).

میزان CPM و SI گروه‌های کنترل یعنی گروه غیرحامله(موشهایی که به آنها سلولهای دندریتیک پالس شده با آنتی‌ژن در مجاورت سرم موش غیرحامله، تزریق شده بود) و گروه FBS(موشهایی که به آنها سلولهای دندریتیک پالس شده با آنتی‌ژن در مجاورت FBS، تزریق شده بود) به ترتیب ۲۹۲۳/۳۸±۹۸۵۵۲/۲ و ۲/۲۰± ۲۰/۷۸ برای گروه غیرحامله و ۱۸۹۲/۸۱± ۹۰۴۳۷ و ۱/۶۲±۱۶/۲۵ برای گروه FBS بود، در حالی که پس از اضافه کرن سرم حامله با غلظت ۲/۵٪ ، میزان CPM و SI به ترتیب به ۲۱۵۶/۸۳± ۳۲۰۰۲/۲ و ۵۰/۵۸±۶/۰۴ کاهش پیدا کرد(نمودار شماره ۲).

مجاورسازی سلولهای دندریتیک با سرم حامله بدون آنتی‌ژن، تأثیری بر تکثیر سلولهای غدد لنفاوی نداشت(نمودار شماره ۲). مقایسه اندکس تحریک(SI) لنفوسیت‌های اختصاصی به آنتی‌ژن پس از حساس شدن با سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با آنتی‌ژن و مجاور شده با غلظت ۲/۵٪ سرم حامله و غیرحامله نیز اختلاف آماری معنی داری را نشان داد(P=۰/۰۰۰). نمودار شماره ۳ اختلاف SI را بین دو گروه حامله و غیرحامله نشان می‌دهد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

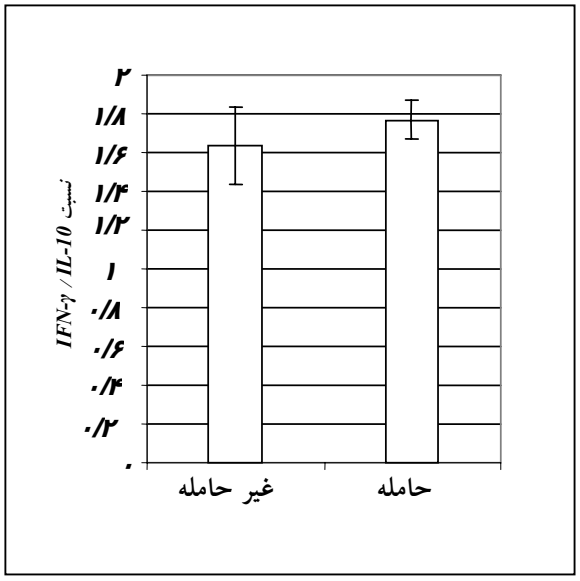


نمودار شماره ۳- اندکس تحریک(SI) لنفوسیت‌های اختصاصی به آنتی‌ژن پس از حساس شدن با سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با آنتی‌ژن و مجاور شده با غلظت ۲/۵٪ سرم حامله و غیرحامله

ـ سلولهای دندریتیک به هنگام بارگذاری با آنتی‌ژن، با غلظت ۲/۵٪ سرم موش حامله و غیرحامله تیمار شده و سپس به کف دست موشها تزریق شدند. پس از ۵ روز غدد لنفاوی ناحیه‌ای، خارج و در حضور آنتی‌ژن کشت داده شدند. میزان تکثیر با استفاده از تیمیدن رادیواکتیو اندازه‌گیری گردید. نتایج(انحراف معیار±میانگین) از ۵ آزمایش مستقل بدست آمده‌اند(P=۰/۰۰۰).

سلولهای دندریتیک که درشرایط مختلف بالغ شده بودند، پس از بار گذاری با آنتی ژن به سه گروه متفاوت از موشها تزریق شدند، سپس غدد لنفاوی Brachial، خارج و سلولهای آنها در مجاورت آنتی‌ژن(Conalbumin) در چهار گروه مجزا کشت داده شدند. مایع رویی کشت سلولهای غدد لنفاوی پس از ۹۶ ساعت جمع‌آوری شد و برای اندازه‌گیری سیتوکین‌های IFN-γ و IL-10 مورد استفاده قرار گرفت. سیتوکین‌های مذکور به روش Sandwich ELISA اندازه‌گیری شدند.

نتایج حاصل از ۵ آزمون مجزا نشان داد که مجاورسازی سلولهای دندریتیک در حضور آنتی‌ژن با سرم حامله در مقایسه با گروه غیرحامله، سبب کاهش قابل توجه تولید هر دو سیتوکین IFN-γ و IL-10 شده بود. میزان تولید IFN-γ و IL-10 در گروه غیرحامله (غدد لنفاوی موشهایی که به آنها سلولهای دندریتیک پالس شده با آنتی‌ژن در مجاورت سرم موش غیرحامله، تزریق شده بود) به ترتیب ۷۷/۱۸±۳۴۴۷/۸ و ۱۳۱/۲۸±۲۱۲۰/۴ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که پس از اضافه کردن سرم حامله به کشت سلولهای دندریتیک به همراه آنتی‌ژن، تولید IFN-γ و IL-10 توسط سلولهای غدد لنفاوی حساس شده با سلولهای دندریتیک مذکور به ترتیب به ۲/۸۳±۶۹ و ۰/۷۱±۳۸/۹۱ پیکوگرم در میلی‌لیتر تقلیل پیدا کرد(P=۰/۰۰۰). بررسی نسبت IFN-γ/IL-10 نشان داد که این نسبت در گروه حامله در مقایسه با گروه غیرحامله افزایش داشت و این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود(P=۰/۰۰۴)(نمودار شماره ٤).



نمودار شماره ۴- مقایسه نسبت IFN-γ/IL-10 بین دو گروه حامله و غیرحامله

ـ سلولهای دندریتیک به هنگام بارگذاری با آنتی‌ژن، با سرم حامله و غیرحامله(با غلظت ۲/۵٪) مجاور شده و سپس به کف دست موشها تزریق شدند. پس از ۵ روز غدد لنفاوی ناحیه‌ای، خارج و در حضور آنتی‌ژن کشت داده شدند و غلظت IL-10 و IFN-γ در مایع رویی کشت به روش ELISA اندازه‌گیری شد. نسبت IFN-γ/IL-10، محاسبه شده و بین دو گروه حامله و غیرحامله مقایسه گردید. نتایج(انحراف معیار±میانگین) از ۵ آزمایش مستقل بدست آمده‌اند(P=۰/۰۰٤).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که توانایی سلولهای دندریتیک تیمار شده با سرم موش حامله (اوسط بارداری) در القاء پاسخ تکثیری اختصاصی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌های T، در مقایسه با گروه غیر حامله، کاهش یافته بود. بررسی مایع رویی کشت سلولهای غدد لنفاوی موشهائی که به آنها سلولهای دندریتیک پالس شده با Conalbumin وتیمار شده با سرم حامله تزریق شده بود، در مقایسه با تزریق سلولهای دندریتیک تیمار شده با سرم غیر حامله، نشان داد که میزان هر دو سیتوکین IFN-γ و IL-10 در گروه غیر حامله نسبت به گروه حامله افزایش داشت و این در حالی بود که نسبت IFN-γ/IL-10 در گروه حامله، از غیر حامله بیش‌تر بود.

تحقیقات مختلف نشان داده‌اند، فاکتورهایی که در دوره بارداری تولید می‌شوند، می‌توانند اثرات سرکوبی یا تعدیل‌کنندگی بر اجزاء مختلف سیستم ایمنی داشته باشند.[۲] سرکوب سیستم ایمنی مادر در دوره حاملگی که منجر به تحمل و نگهداری جنین نیمه آلوژن در بدن او می‌گردد، از دو جنبه اثرات موضعی و سیستمیک قابل بررسی می‌باشد.

چگونگی تعدیل پاسخ‌های ایمنی در موضع بارداری تا حدودی شناخته شده است اما اثرات بارداری بر کل سیستم ایمنی مادر به طور قطع روشن نگردیده و گزارشات ضد و نقیضی در مورد آن وجود دارد.[۱۴و ۱۵] به نظر منطقی می‌رسد که تنظیم پاسخ‌های ایمنی مادر در سطح سیستمیک با تنظیم در موضع بارداری دقیقا همخوانی نداشته باشد چون مادران طی دوره بارداری مشکل عمده ای از نظر مقابله با بیماری‌های عفونی ندارند[۱۶] و چنانچه قرار باشد سرکوب پاسخ‌ها با شدتی که در موضع بارداری اعمال می‌گردد، به صورت سیستمیک نیز صورت گیرد، انتظار آسیب‌پذیری زیاد سیستم ایمنی مادران را طی دوره بارداری خواهیم داشت؛ از طرفی بهتر شدن عوارض برخی بیماری‌های خودایمن که با واسطه پاسخ‌های TH1 و از نوع التهابی می‌باشند طی دوره بارداری[۱۷]، نشان می دهد که تنظیمات اعمال شده بر پاسخ‌های ایمنی مادر طی بارداری بسیار پیچیده و در عین حال دقیق می‌باشند.

فاکتورهای تولید شده دوره بارداری می توانند با تاثیری که بر لنفوسیت‌های T، به عنوان یکی از مهم‌ترین اجزاء ایمنی اختصاصی، می‌گذارند باعث جهت گیری پاسخ‌ها به سمت TH1یا TH2 بشوند. مطالعات انجام شده در این زمینه به طور عمده حاکی از غلبه پاسخ‌های TH2 و سرکوب پاسخ‌های التهابی در بیش‌تر مراحل حاملگی و بخصوص در موضع بارداری می‌باشند[۱۸]، اما حضور فعال پاسخ‌های TH1 طی حاملگی نیز به وسیله محققین نشان داده شده[۱۹] و غلبه مطلق پاسخ‌های TH2 حتی در موضع بارداری نیز به تازگی به وسیله گروهی از محققین مورد سوال قرار گرفته است، به طوری که Chaouat که یکی از افراد صاحب نظر در این زمینه می‌باشد، در ۵ سال اخیر، ۵ مقاله مروری در ضدیت با غلبه مطلق پاسخ‌های TH2 و سیتوکین‌های مربوطه طی حاملگی موفق به چاپ رسانده است.[۱۶و ۲۲-۱۹]

حضور IFN-γ به عنوان سیتوکین شاخص پاسخ‌های TH1 و همچنین سلولهای NK(Natural killer) به عنوان سلولهای مهم التهابی در ابتدای حاملگی یعنی مرحله لانه گزینی، اثبات شده است و افرادی چون Chaouat معتقدند باید بحث مطلق بودن پاسخ‌های TH2 یا TH1 در دوره بارداری را کنار گذاشت و به بررسی سیتوکین‌ها بدون توجه به پروفایل پاسخ پرداخت[۲۰] چرا که به نظر می‌رسد بیش‌تر از آنکه غلبه مطلق یک پاسخ موثر باشد، همکاری در پاسخ و تنظیم دقیق عملکرد آنها در حاملگی موفق، موثر است.

کاهش پاسخ تکثیری اختصاصی به آنتی ژن Conalbumin، که در این مطالعه در گروه حامله نسبت به گروه غیر حامله مشاهده گردید، با توجه به حضور فاکتورهای سرکوبگر متعدد در سرم حامله، به نظر منطقی می باشد، چون این فاکتورها می توانند قدرت عرضه آنتی‌ژن به وسیله سلولهای دندریتیک را از طریق تاثیر بر بلوغ، مهاجرت و یا حتی تحمل زا کردن این سلولها تغییر دهند. تولید بیش‌تر هر دو سیتوکین IFN-γ و IL-10 در گروه غیرحامله نسبت به گروه حامله نیز با توجه به اختلاف تکثیر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

مشاهده شد. حضور تعداد بیش‌تری لنفوسیت T در کشت سلولهای گروه غیر حامله، به نظر منطقی می رسد، اما بیش‌تر بودن نسبت IFN-γ/IL-10 در گروه حامله نسبت به گروه غیر حامله با غلبه مطلق پاسخ‌های TH2 طی حاملگی موفق، در تضاد می باشد. همانطور که ذکر شد، در سالهای اخیر تعداد مقالاتی که نظریه کلاسیک مداوار[۲۳] در مورد غلبه و حکمرانی مطلق پاسخ‌های TH2 را طی حاملگی مورد سوال قرار داده اند، به سرعت در حال افزایش است[۱۵، ۲۴و ۲۵]؛ از آن جمله، Sacks و همکاران نشان دادند، مونوسیت‌ها طی حاملگی طبیعی انسان، سیتوکین IL-12 از گروه سیتوکین‌های TH1 را ترشح می کنند.[۲۴] Svensson و همکارانش نیز نشان دادند که جفت گذاری بین موشهایی که نقص در ژن IL-10 و IL-4 دارند، منجر به حاملگی موفق می گردد.[۲۶] Boney و همکارانش گزارش کردند که تعداد بچه‌های موشهای ماده با نقص در تولید IL-10، تفاوتی با بچه‌های موشهای طبیعی ندارد.[۱۵] در مورد IFN-γ نیز نتایج ضد و نقیض بسیاری وجود دارند، چرا که بسیاری از مطالعات، افزایش میزان آن را در موارد سقط مکرر نشان داده‌اند[۲۷] اما در عین حال نقش ضروری این سیتوکین در پدیده لانه گزینی و رگزایی طی آن نیز نشان داده شده است.[۲۱] Matthiesen و همکارانش در مطالعه ای که با روش ISH(In situ hybridization) صورت گرفت، نشان دادند که تعداد سلولهای بیان کننده هر دو سیتوکین IL-4 و IFN-γ در خون زنان حامله در مقایسه با زنان غیرحامله، افزایش دارد[۲۸]؛ اگرچه این نتیجه تا حدودی با نتیجه مطالعه حاضر تفاوت دارد، ولی افزایش برابر در مقدار IL-4 و IFN-γ نشان می دهد که طی حاملگی، حداقل در سطح سیستمیک، انحراف عمده ای در بالانس TH1/TH2 وجود ندارد که این مورد نیز مؤید عدم آسیب پذیری زنان به عفونت در دوره بارداری می‌باشد و به نظر می رسد که جهت گیری پاسخ‌های ایمنی در طی حاملگی به سمت TH1 یا TH2 از آنچه در گذشته تصور می گردید، پیچیده تر باشد. در واقع جهت گیری انتخابی به سمت TH2 بر ضد آنتی‌ژن‌های سطح تماس مادر- جنین در انسان و حیوان نشان داده شده است[۲۹] و لازم نیست این تغییر حتما به صورت سیستمیک و غیر اختصاصی بر علیه همه آنتی ژن‌ها باشد.

همان‌طور که گفته شد، سلولهای دندریتیک در موش، دو زیر رده اصلی میلوییدی و لنفوییدی دارند که پاسخ‌ها را به ترتیب به سمت TH2 و TH1 سوق می دهند.[۱۰] یکی از عواملی که می تواند روی نوع پاسخ القایی به وسیله این سلولها تاثیر گذار باشد و حتی جهت عملکرد آنها را بدون توجه به زیر رده عوض کند، ریز محیط حاکم بر بلوغ و عملکرد آنهاست؛ چنانکه دیده شده بسته به نوع ریز محیط، این سلولها بدون توجه به زیر رده، عملکردهایی کاملا متضاد با آنچه به صورت متعارف از آنها انتظار می‌رفته از خود نشان داده اند.[۳۰و ۳۱]

مسأله دیگر، فراوانی سلولهای دندریتیک در طحال طی دوره حاملگی است. دکتر زرنانی و همکاران نشان دادند که در اواسط بارداری تعداد سلولهای دندریتیک میلویید طحال در موشهای حامله نسبت به موشهای غیر حامله کم می‌شود ولی تغییری در تعداد سلولهای لنفویید بین دو گروه مشاهده نگردید.[۹] در مطالعه حاضر، سلولهای دندریتیک از طحال موشهای نرمال جدا شدند و در طی بلوغ تحت تاثیرسرم حامله قرار گرفتند، به نظر نمی‌رسد در این مدت سرم حامله باعث تغییر در زیر رده‌های سلولهای دندریتیک جدا شده از طحال شده باشد، اما این احتمال وجود دارد که باعث بیان افتراقی بعضی مولکولهای کمک محرک و مؤثر در عرضه آنتی‌ژن روی این دو زیر رده شده باشد. نشان داده شده است که سلولهای دندریتیک لنفوئید در موش علاوه بر القاء تحمل، توانایی جهت‌دهی پاسخ‌ها به سمت TH1 را هم دارا می‌باشند.[۱۰] به نظر می‌رسد که سرم حامله باعث افزایش کارائی زیر گروه لنفوییدی سلولهای دندریتیک نسبت به زیرگروه میلوئیدی شده است که ضمن مهار پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T، سبب جهت دهی پاسخ‌ها به سمت TH1 و در نتیجه افزایش نسبت IFN-γ/IL-10 گردیده است. این تغییر کارایی می‌تواند نتیجه بیان افتراقی مولکولهای کمک تحریکی بر سطح این گروه از سلولهای دندریتیک باشد. تاثیر متفاوت فاکتورهای موجود در ریز محیط از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

جمله هورمون‌ها و سایر سیتوکین‌ها روی زیر گروه‌های سلولهای دندریتیک، قبلا نیز گزارش گردیده است.[۷، ۳۲و ۳۳] الگوی مهاجرت سلولهای دندریتیک لنفوییـد و میلوییـد نیز با توجه به اینکه به کموکین‌های متفاوتی پاسخ می‌دهند، متفاوت است[۳٤] و ممکن است همین الگوی متفاوت در مهاجرت در کنار اثر سرم حامله به عنوان ریز محیط حاکم نیز یکی از عوامل موثر در جهت گیری پاسخ‌ها بوده باشد.

احتمالاً اندازه‌گیری تولید سیتوکین‌ها به صورت درون سلولی در سلولهای T دو گروه حامله و غیر حامله، نتایج مربوط به پروفایل سیتوکینی را روشن تر خواهد ساخت. با توجه به نکاتی چون تاثیر گذاری ریز محیط حاکم بر بلوغ وعملکرد سلولهای دندریتیک، تفاوت در زیر رده‌های سلولهای دندریتیک و عکس العمل‌های متفاوتی که ممکن است در ریز محیط‌های مختلف از نظر میزان بلوغ و بیان مولکول‌های مهم در عرضه آنتی ژن نشان دهند، نیاز به بررسی‌های بیش‌تر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که سرم حامله باعث کاهش توان سلولهای دندریتیک در القاء پاسخ اختصاصی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌های T می‌گردد و در ضمن باعث جهت دادن پاسخ این سلولها به سمت سیتوکین‌های تیپ یک(Th1) می‌شود. البته قضاوت در مورد TH1 یا TH2 بودن مطلق پاسخ‌ها در سطح سیستمیک در دوره بارداری، منطقی به نظر نمی‌رسد. آنچه مسلم است سرم حامله در شرایط مورد مطالعه توانسته است توانایی سلولهای دندریتیک را در عرضه آنتی ژن به لنفوسیت‌های T اختصاصی تغییر دهد، اما تحلیل پاسخ‌های سیتوکینی مشاهده شده نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقای فلک کارشناس محترم گروه ایمنی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران به جهت همکاری در انجام آزمایشات الیزا، ابراز می‌دارند.

فهرست منابع

1- Bouma GJ, van Caubergh P, van Bree SP, Castelli-Visser RM, Witvliet MD, van der Meer-Prins EM, et al. Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation. Transplantation 1996; 62(5): 672-8.

2- Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. Curr Opin Immunol 2000; 12(6): 731-7.

3- Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. Endocr Rev 1996; 17(2): 156-86.

4- Hoskin DW, Murgita RA. Specific maternal anti-fetal lymphoproliferative responses and their regulation by natural immunosuppressive factors. Clin Exp Immunol 1989; 76(2): 262-7.

5- Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, et al. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. J Leukoc Biol 2003; 74(4): 514-22.

6- Kammerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kämpgen E, et al. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. Am J Pathol 2000; 157(1): 159-69.

7- Yoshimura T, Inaba M, Sugiura K, Nakajima T, Ito T, Nakamura K, et al. Analysis of dendritic cell subsets in pregnancy. Am J Reprod Immunol 2003; 50(2): 137-45.

8- Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jeddi Tehrani M. Analysis of endometrial myeloid and lymphoid dendritic cells during mouse estrous cycle. J Reprod Immunol 2006; 71(1): 28-40.

9- Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jeddi-Tehrani M. Kinetics of murine decidual dendritic cells. J Reprod 2006; 20(18): 1-10.

10- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol 2002; 2(3): 151-61.

۱۱- شجاعیان ژاله، مؤذنی سید محمد، زرنانی امیرحسن، بررسی تأثیر سرم موش حامله بر سلولهای دندریتیک با استفاده از مدل آلوژنیک، فصلنامه پزشکی باروری و ناباروری. ۱۳۸۳؛(۲): ۲۰۷-۲۰۰.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

12- Zarnani AH, Moazzeni SM, 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.

13- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. J Exp Med 1990; 172(2): 631-40.

14- Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. Jama 1995; 273(24): 1933-6.

15- Bonney EA, Onyekwuluje J. Maternal tolerance to H-Y is independent of IL-10. Immunol Invest 2004; 33(4): 385-95.

16- Chaouat G, Ledée-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. Int Arch Allergy Immunol 2004; 134(2): 93-119.

17- Ostensen M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Ann N Y Acad Sci 1999; 876: 131-43.

18- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. J Immunol 1993; 151(9): 4562-73.

19- Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, et al. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. J Reprod Immunol 2002; 53(1-2): 241-56.

20- Chaouat G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. Clin Exp Immunol 2003; 131(3): 393-5.

21- Chaouat G, Lédée-Bataille N, Zourbas S, Ostojic S, Dubanchet S, Martal J, et al. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. Am J Reprod Immunol 2003; 50(3): 177-86.

22- Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? Immunol Lett 2004; 92(3): 207-14.

23- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature 1953; 172(4379): 603-6.

24- Sacks GP, Clover LM, Bainbridge DR, Redman CW, Sargent IL. Flow cytometric measurement of intracellular Th1 and Th2 cytokine production by human villous and extravillous cytotrophoblast. Placenta 2001; 22(6): 550-9.

25- Zenclussen AC, Fest S, Busse P, Joachim R, Klapp BF, Arck PC. Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients. Am J Reprod Immunol 2002; 48(4): 245-51.

26- Svensson L, Arvola M, Sällström MA, Holmdahl R, Mattsson R. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. J Reprod Immunol 2001; 51(1): 3-7.

27- Daher S, Arruda Geraldes Denardi K, Blotta MH, Mamoni RL, Reck AP, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol 2004; 62(1-2): 151-7.

28- Matthiesen L, Khademi M, Ekerfelt C, Berg G, Sharma S, Olsson T, et al. In-situ detection of both inflammatory and anti-inflammatory cytokines in resting peripheral blood mononuclear cells during pregnancy. J Reprod Immunol 2003; 58(1): 49-59.

29- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science 1998; 281 (5380): 1191-3.

30- Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, et al. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. J Exp Med 1998; 188(11): 2019-31.

31- Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. J Exp Med 1999; 190(2): 229-39.

32- Del Gobbo V, Giganti MG, Zenobi R, Villani V, Premrov MG. The immunosuppressive cytokines influence the fetal survival in patients with pregnancy-induced hypertension. Am J Reprod Immunol 2000; 44(4): 214-21.

33- Leenen PJ, Radosević K, Voerman JS, Salomon B, van Rooijen N, Klatzmann D, et al. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. J Immunol 1998; 160(5): 2166-73.

34- Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. J Leukoc Biol 1999; 66: 1-9.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

Dendritic Cells and Antigen Specific T Cell Responses: Effect of Pregnant Mouse Serum

M. Bozorgmehr, MSc [I] ***S.M. Moazzeni, PhD** [II] **S. Nikoo, MSc** [I]
A.H. Zarnani, PhD, DMT [III]

Abstract

Background & Aim: Tolerance to the semi-allogenic fetal graft by the maternal immune system is a medical enigma that has stimulated investigations for a half of century. Several hypotheses have been proposed to explain the tolerance of mother to the fetus. The successful pregnancy is proposed and proved by many scientists to be a Th2 dominant phenomenon. This hypothesis is proved in most aspects of feto-maternal interface, but systemic effects of pregnancy on immune system, are controversial. Dendritic cells (DCs) are the most potent activators of naïve T lymphocytes capable of tolerance induction as well as immunity. These cells can influence Th cell differentiation, by inducing Th1 or Th2 responses as well. Therefore DCs are one of the probable candidates which mediate immune regulation during pregnancy. The aim of this study was to determine if pregnant mouse serum has any effect on DCs' functional capacity to stimulate antigen specific proliferation of T lymphocytes and their cytokine profile.

Material and Methods: In this experimental study, mid-gestational sera were obtained from allogenic pregnant Balb/c mice (Balb/c × C57BL/6) on days 9-11 of gestation. DCs were purified from Balb/c mice spleens through a three steps method including collagenase digestion of spleen tissues, selection of low-density cells by Nycodenz density gradient medium and plastic adherence. The purity of DCs was determined by flowcytometry, using anti CD11c antibody. DCs were pulsed with Conalbumin as a foreign antigen during overnight culture. In some cultures pregnant mouse sera were added at 2.5% final concentration. Two other groups of DCs were treated with normal mice sera and FBS, respectively. Antigen pulsed DCs were injected in to mice palms. Draining lymph node cells of immunized mice were cultured in presence of Conalbumin after 5 days and their proliferation was measured by ^{3}H-thymidin incorporation method. IFN-γ and IL-10 production by stimulated T cells was also measured in their culture supernatant using sandwich ELISA. The results were analyzed using non-parametric Mann-Whitney test.

Results: Our results showed that normal serum-treated, antigen-pulsed DCs induced a strong proliferative response of T cells and high levels of IFN-γ and IL-10 production. However, treatment of DCs with pregnant mouse serum markedly blocked their ability to induce antigen-specific lymphocyte proliferation. IFN-γ and IL-10 productions were also decreased by lymph node cells of mice injected with pregnant serum treated DCs.

Conclusion: Our results demonstrate that pregnant mouse serum has suppressive effect on DCs capacity to induce antigen specific proliferation and cytokine secretion by T cells. The suppressive effects of pregnant serum can be induced through HLA-G, IL-10, PGE2, progesterone and several other factors, existing mostly at the feto-maternal interface but because of their overflow can be found in the serum as well. However, determination of the exact mechanism underlying this phenomenon needs more investigation.

Key Words: 1) Dendritic Cells 2) Pregnant Serum 3) Cell Proliferation 4) Cytokine

*I) PhD Student of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (*Corresponding Author)*
*II) Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Jalal Al-Ahmad Expressway, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
III) Assistant Professor of Immunology, Immunology Research Center, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, and Assistant Professor of Reproductive Immunology, Research Center for Reproductive Biotechnology, Jehad Daneshgahi Ibn-Sina Medical Technological Research Institute, Tehran, Iran.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]