بررسی پراکندگی سلول‌های ایمنی در بافت رحم و طحال موش‌های باردار نژاد NMRI

***مریم اسکندریان:** کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (*مولف مسئول).
maryamskandaryan@yahoo.com
امیر سالک فرخی: کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. salekamir63@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۷/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: حاملگی به عنوان یک پدیده ایمونولوژیک دارای خصوصیات منحصر به فردی است که میان‌کنش بین سلول‌های ایمنی مادر و جنین نه تنها موجب آسیب به جنین نمی‌شود بلکه لازمه رشد و تکامل جنین است. از آنجا که عملکرد سلول‌های ایمنی رحم در موفقیت بارداری از اهمیت بسزایی برخوردار است و بسیاری از سقط‌های خود به خودی با نقایص ایمونولوژیک ارتباط دارد. شناختن سلول‌های ایمنی، پراکندگی این سلول‌ها در بافت رحم و مکانیسم‌های ایمنی دخیل در ایجاد تحمل طبیعی به یک آلوگراف (جنین) ضروری به نظر می‌رسد.

روش کار: این مطالعه یک مطالعه توصیفی-تحلیلی می‌باشد. در این مطالعه پراکندگی سلول‌های مختلف ایمنی در دو بافت طحال و رحم در موش‌های باردار نژاد NMRI با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، آنزیم HRP، آنزیم آلکالین فسفاتاز و نهایتاً ظهور رنگ در سلول‌های دارای مارکرهای موردنظر در قالب رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. . از آزمون غیر پارامتریک Wilcoxon برای تجزیه وتحلیل داده‌ها استفاده شده است.

یافته ها: یافته‌های حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی‌های مختلف نشان داد که بین دو بافت طحال و رحم از نظر جمعیت سلول‌های CD11c+، CD11b+ ، CD86+ وMHC-II+ تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین پراکندگی سلول‌های ایمنی در نواحی مختلف بافت طحال و رحم متفاوت است.

نتیجه‌گیری: الگوی پراکندگی متفاوت سلول‌های ایمنی در بافت رحم نسبت به بافت طحال بیانگر اهمیت و نقش ایمنی مخاطی رحم در حفظ جنین و پیشبرد حاملگی موفق می‌باشد. همچنین حضور سلول‌های ایمنی در نواحی مشخص باعث ممانعت از پاسخ‌های مخرب سیستم ایمنی بر ضد جنین می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: حاملگی، پراکندگی سلول‌های ایمنی، طحال، رحم.

مقدمه

ایمونولوژی باروری یکی از موضوعاتی است که سال‌های متمادی توجه ایمونولوژیست‌ها را به خود جلب نموده و علت عمده آن این است که حاملگی در پستانداران مثال بارزی از القاء تحمل ایمنولوژیک طبیعی است که در آن جنین با توجه به این که نیمی از آنتی‌ژن‌هایش را از پدر دریافت می‌کند، توسط سیستم ایمنی مادر مورد تهاجم قرار نمی‌گیرد. این حقیقت که پیوند نیمه بیگانه جنین می‌تواند در کمال سلامت و به دور از خطر در رحم مادر رشد و تکامل یابد، نشان‌دهنده وجود مکانیسم‌های حفاظتی متعدد در سطح تماس مادر و جنین است. این مکانیسم‌های حفاظتی به قدری دقیق تنظیم شده‌اند که علاوه بر جلوگیری از رد ایمونولوژیک جنین توانایی مادر را در مقابله با عوامل عفونی مختل نمی‌کنند (۱و۲). مطالعات اخیر این تفکر را تقویت نموده است که تحمل ایمونولوژیک مادر نسبت به جنین ناشی از میان‌کنش (Interaction) مستقیم بین سلول‌های ایمنی مادر و سلول‌های جنین است؛ بدین معنی که شناسایی ایمونولوژیک آنتی‌ژن‌های جنینی از سوی سیستم ایمنی مادر نه تنها مضر وخطرناک نمی‌باشد بلکه لازمه بقاء حاملگی و رشد وتکامل جنین است (۳).

با توجه به این که عملکرد سلول‌های ایمنی رحم در موفقیت بارداری از اهمیت بسزایی برخوردار است و بسیاری از سقط‌های خودبه خودی با نقایص ایمونولوژیک ارتباط دارد، بنابراین هدف از این پژوهش بررسی پراکندگی سلول‌های ایمنی در محیط رحم می‌باشد تا با استفاده از این اطلاعات سلول‌های مهم دخیل در پیشبرد حاملگی، محل حضور و تجمع این سلول‌ها مورد شناسایی قرار

گیرد و بتوان این اطلاعات را با موارد سقط و بسیاری از اختلالات بارداری مقایسه نمود تا امکان علت‌یابی بسیاری از سقط‌های خودبه خودی به وجود آید. بنابراین پرواضح است که حاملگی به عنوان یک پدیده ایمونولوژیک، از قوانین منحصر به فردی برخوردار است که در آن ریز محیط کاملاً تنظیم شده‌ای وجود دارد. این شبکه منظم و ارتباط سلولی ملکولی حاکم، برای لانه‌گزینی رویان، تکامل آن و پیشرفت حاملگی، عملکردی متفاوت نسبت به حالت طبیعی دارد.این قسمت در انتهای پاراگراف اول قرار داده شود.

ایمونولوژی باروری یکی از موضوعاتی است که سال‌های متمادی توجه ایمونولوژیست‌ها را به خود جلب نموده و علت عمده آن این است که حاملگی در پستانداران مثال بارزی از القاء تحمل ایمنولوژیک طبیعی است که در آن جنین با توجه به این که نیمی از آنتی‌ژن‌هایش را از پدر دریافت می‌کند، توسط سیستم ایمنی مادر مورد تهاجم قرار نمی‌گیرد. این حقیقت که پیوند نیمه بیگانه جنین می‌تواند در کمال سلامت و به دور از خطر در رحم مادر رشد و تکامل یابد، نشان‌دهنده وجود مکانیسم‌های حفاظتی متعدد در سطح تماس مادر و جنین است. این مکانیسم‌های حفاظتی به قدری دقیق تنظیم شده‌اند که علاوه بر جلوگیری از رد ایمونولوژیک جنین توانایی مادر را در مقابله با عوامل عفونی مختل نمی‌کنند (۱و۲). مطالعات اخیر این تفکر را تقویت نموده است که تحمل ایمونولوژیک مادر نسبت به جنین ناشی از میان‌کنش (Interaction) مستقیم بین سلول‌های ایمنی مادر و سلول‌های جنین است؛ بدین معنی که شناسایی ایمونولوژیک آنتی‌ژن‌های جنینی از سوی سیستم ایمنی مادر نه تنها مضر وخطرناک نمی‌باشد بلکه لازمه بقاء حاملگی و رشد وتکامل جنین است (۳).

با توجه به این که عملکرد سلول‌های ایمنی رحم در موفقیت بارداری از اهمیت بسزایی برخوردار است و بسیاری از سقط‌های خودبه خودی با نقایص ایمونولوژیک ارتباط دارد، بنابراین هدف از این پژوهش بررسی پراکندگی سلول‌های ایمنی در محیط رحم می‌باشد تا با استفاده از این اطلاعات سلول‌های مهم دخیل در پیشبرد حاملگی، محل حضور و تجمع این سلول‌ها مورد شناسایی قرار گیرد و بتوان این اطلاعات را با موارد سقط و بسیاری از اختلالات بارداری مقایسه نمود تا امکان علت‌یابی بسیاری از سقط‌های خودبه خودی به وجود آید. بنابراین پرواضح است که حاملگی به عنوان یک پدیده ایمونولوژیک، از قوانین منحصر به فردی برخوردار است که در آن ریز محیط کاملاً تنظیم شده‌ای وجود دارد. این شبکه منظم و ارتباط سلولی ملکولی حاکم، برای لانه‌گزینی رویان، تکامل آن و پیشرفت حاملگی، عملکردی متفاوت نسبت به حالت طبیعی دارد.این قسمت در انتهای پاراگراف اول قرار داده شود.

روش کار

این مطالعه یک مطالعه توصیفی-تحلیلی می‌باشد. ۵ سر موش نر و ماده ۱۰-۶ هفته‌ای از نژاد NMRI از موسسه رازی تهیه شده و در شرایط ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی در دمای مناسب (۲۳-۱۸ سانتی گراد) در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند. جهت تطبیق موش‌های ماده با محیط جدید، آزمایش ها حدود ۲-۱ هفته بعد از انتقال به حیوانخانه شروع شد. کلیه آزمایش های 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 شدند. و سپس موش‌های ماده به قفس موش‌های نر برای بارداری انتقال داده 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 ۰/۵حاملگی در نظر گرفته شد. سپس در روز هفتم

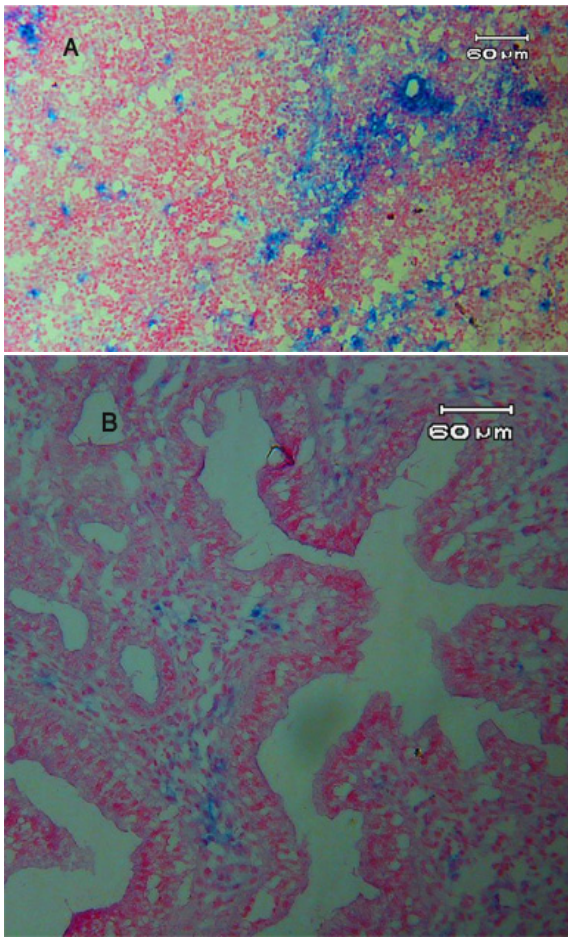
بارداری موش‌های باردار شده با روش قطع نخاع کشته و با استفاده از قیچی و پنس ناحیه شکمی کاملا" باز گردید؛ به این صورت که هر دو بافت طحال و رحم قابل جداسازی باشند. شاخ‌های رحمی خارج شده و در زیر میکروسکوپ استریو نقاط کاشت جنین تعیین و نمونه‌برداری از نقاط کاشت جنین و همچنین از بافت طحال انجام شد. سپس قطعاتی 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 ۱ساعت 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 فریزر۷۰- 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 TBS و هر بار به مدت ۲ دقیقه شسته شدند. محلول Protein block serum- free به مدت ۱۵دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه شد. بعد از این مرحله بافر بلوک‌کننده (سرم بز) با غلظت ٪۲ به مدت ۱۵دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه گردید. اسلایدها شسته و آنتی‌بادی ضد CD11b با غلظت ۲ میکرگرم در هر میلی لیتر یا ضد CD8α با غلظت ۲ میکرگرم در هر میلی لیتر یا ضد MHCII با غلظت ۲ میکرگرم در هر میلی لیتر و یا ضد CD86 با غلظت ۴ میکرگرم در هر میلی لیتر در بافر رقیق کننده آنتی‌بادی به تفکیک بر روی لام‌ها اضافه شد (در اسلاید کنترل منفی، به جای آنتی‌بادی، یک قطره محلول رقیق‌کننده آنتی‌بادی اضافه شد). پس از یک ساعت انکوباسیون در درجه حرارت آزمایشگاه، لام‌ها سه بار با TBS شسته شدند و پس از آن آنزیم پراکسیداز اندوژن، با اضافه کردن محلول H2O2 o.3% به مدت ۱۰ دقیقه خنثی شد. بعد از ۳ بار شستشو با TBS، آنتی‌بادی ضد IgG رت کونژوگه به بیوتین با رقت ۱:۵۰در بافر رقیق کننده آنتی‌بادی اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه گردید. برش‌های بافتی سه بار با بافر TBS شسته و با محلول استرپتواویدین کونژوگه با آنزیم HRP به مدت ۳۰دقیقه انکوبه شدند. سپس سوبسترای DAB به روی بافت‌ها اضافه و ظهور رنگ زیر میکروسکوپ بررسی شد. پس از ۱۵دقیقه، برش‌های بافتی با آب شسته و اسلایدها به مدت ۳ ثانیه در هماتوکسلین قرار داده شدند. پس از انجام مراحل آبگیری با درجات فزاینده اتانول هر کدام به مدت ۱۵ ثانیه، اسلایدها توسط گزیلول شفاف و سپس مانته شدند.

پس از اتمام رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی دو سلول متفاوت از نظر رنگ در سطح میکروسکوپ مشاهده گردید، سلول‌های آبی که از نظر مارکر مورد نظر منفی بوده و رنگ زمینه (هماتوکسیلین آبی) را به خود گرفته‌اند و سلول‌هایی که از نظر مارکر مورد نظر مثبت بوده، تحت تاثیر آنزیم HRP و سوبسترا قرار گرفته به رنگ قهوه‌ای درآمدند. البته در مورد مارکر CD11c آنزیم مورد استفاده آلکالین فسفاتاز بوده که با تاثیر بر سوبسترا رنگ آبی ایجاد می‌کند. سلول‌های مثبت از نظر مارکر CD11c به رنگ آبی درآمده و سلول‌های منفی به دلیل استفاده از رنگ زمینه Nuclear fast red به رنگ قرمز مشاهده شدند.

برای تعیین درصد سلول‌های مورد نظر 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 بزرگ‌نمایی ۴۰۰ انتخاب و تعداد کل سلول‌های مثبت شمارش و به تعداد کل سلول‌های هسته‌دار در همان سطح تقسیم شد. برای به دست آوردن درصد سلول‌های ایمنی در بافت طحال نیز پنج فیلد با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ از اطراف پولپ سفید و پنج فیلد نیز از پولپ



شکل ۱- رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی سلول‌های بافت طحال (a x100) و دسیدوا (b x400) با آنتی‌بادی ضد CD11c در موش‌های باردار نژاد NMRI. آنزیم مورد استفاده در این رنگ‌آمیزی آنزیم آلکالین فسفاتاز بوده که با تاثیر بر -*/سوبسترا نهایتاً رنگ آبی ایجاد می‌کند. سلول‌های آبی سلول‌های دندریتیک هستند و سلول‌های قرمز سلول‌هایی هستند که از نظر مارکر CD11c منفی بوده و رنگ زمینه (قرمز) را به خود گرفته‌اند

قرمز انتخاب گردید و درصد سلول‌های مثبت نسبت به کل سلول‌ها تعیین گردید. تمام آزمایش‌ها در گروه‌های ایمونولوژی و علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۱۳۸۹ انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. به منظور مقایسه درصد سلول‌های ایمنی در دو بافت مورد نظر از تست غیر پارامتریک Wilcoxon استفاده شد. حدود اطمینان در آزمون‌های آماری ۹۵٪ در نظر گرفته شده و p<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید. لازم به ذکر است کلیه نتایج در اینجا به صورت Mean± SD حداقل پنج آزمایش مستقل ارائه گردیده است.

یافته‌ها

پراکندگی سلول‌های +CD11c در بافت طحال و رحم

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی بافت طحال با آنتی‌بادی ضد CD11c نشان داد که ۴/۴ ±۰/۴ درصد از سلول‌های بافت طحال مارکر CD11c را بیان می‌کنند. سلول‌های DC عمدتاً در اطراف فولیکول‌های لنفاوی متمرکز شده‌اند. همچنین تعدادی سلول+CD11c نیز در پولپ قرمز مشاهده شد. سلول‌های DC بندرت در داخل فولیکول‌های لنفاوی دیده شدند (شکل۱) و (جدول ۱).

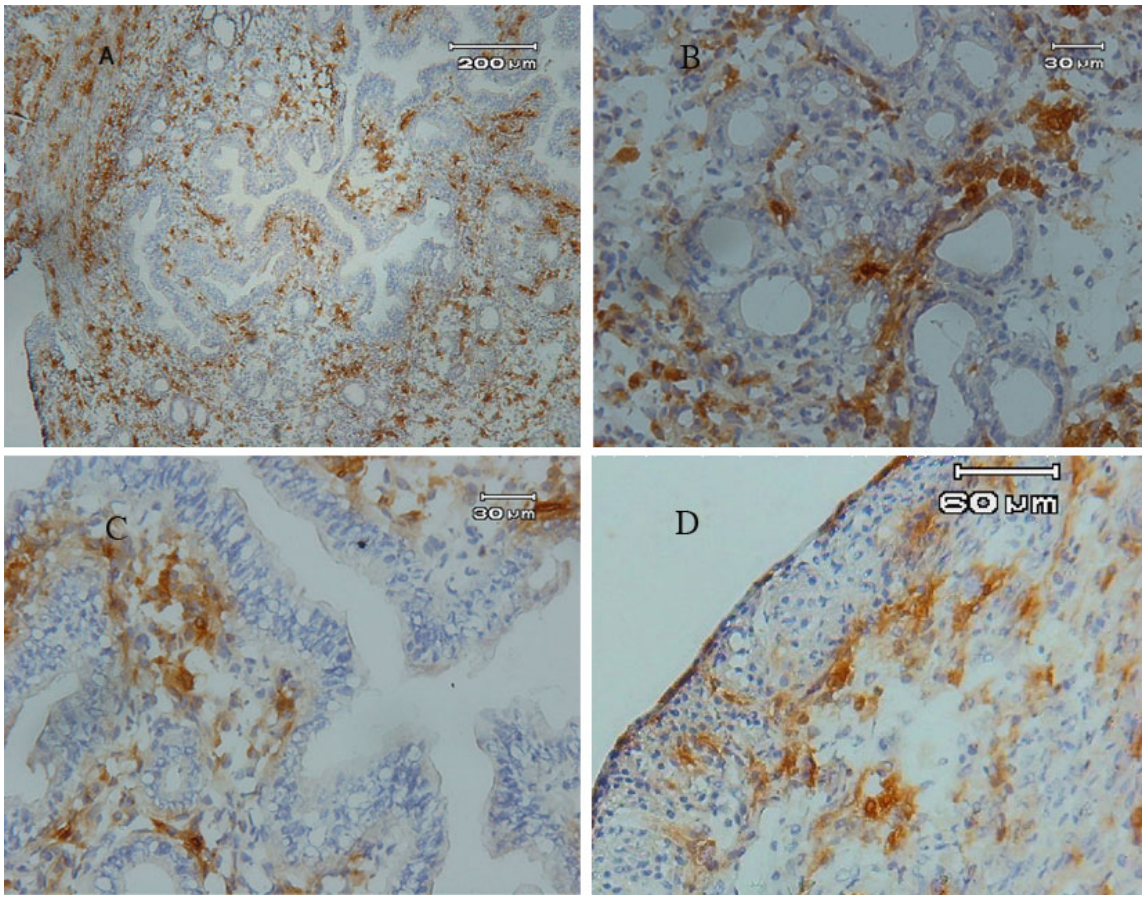
رنگ‌آمیزی بافت دسیدوا با آنتی‌بادی ضد CD11c نشان داد که سلول‌های DC در سرتاسر بافت رحم پراکنده هستند. این سلول‌ها ۳/۶±۰/۵ درصد از سلول‌های بافت رحم را تشکیل می‌دهند و در اطراف میومتر و در بخش‌های مختلف دسیدوا از جمله غدد رحمی و اطراف لومن حضور دارند. پراکندگی این سلول‌ها در اطراف لومن بیشتر از سایر مناطق است (شکل۱) و (جدول۱).

پراکندگی سلول‌های +MHC-II در بافت طحال و رحم

رنگ‌آمیزی بافت طحال با آنتی‌بادی ضد MHC-II نشان داد که میزان بیان MHC-II در بافت طحال به شدت بالاست و علی رغم استفاده از غلظت پایین

جدول ۱ : درصد سلول‌های $CD8\alpha^+$ ، $CD11b^+$، $CD86^+$، $MHC\text{-}II^+$ و $CD11c^+$ در روز هفتم بارداری موش‌های ماده در بافت طحال و رحم

بافت	درصد سلول‌های $CD11c^+$	درصد سلول‌های $CD11b^+$	درصد سلول‌های $CD8\alpha^+$	درصد سلول‌های $CD86^+$	درصد سلول‌های $MHC\text{-}II^+$
طحال	۴/۴±۰/۴	۲۴/۶±۲/۸	۳۵/۳±۳/۳	۵۵/۸±۳/۰۷	۹۱/۳±۲/۷
رحم	۳/۶±۰/۵	۱۰/۸±۱/۷	۰/۶±۰/۱۷	۲۲/۸±۲/۶	۳۷/۹±۵/۴
p-value	۰/۰۶۲۵	۰/۰۵۷۹	۰/۰۶۲۵	۰/۰۶۲۵	۰/۰۶۲۵



شکل ۲: رنگ‌آمیزی سلول‌های بافت رحم در نمای کلی (a x100) و در اطراف غدد رحمی (b x400)، اطراف لومن(c x400) و میومتر (d x200) با آنتی بادی ضد MHC-II در موش‌های باردار نژاد NMRI. آنزیم مورد استفاده در این رنگ‌آمیزی آنزیم HRP بوده که با تاثیر بر سوبسترا نهایتاً رنگ قهوه‌ای ایجاد می‌کند. سلول‌های قهوه‌ای سلول‌های $MHC\text{-}II^{+}$ هستند و سلول‌های آبی سلول‌هایی هستند که از نظر مارکرMHC-II منفی بوده و رنگ زمینه (هماتوکسیلین آبی) را به خود گرفته‌اند.

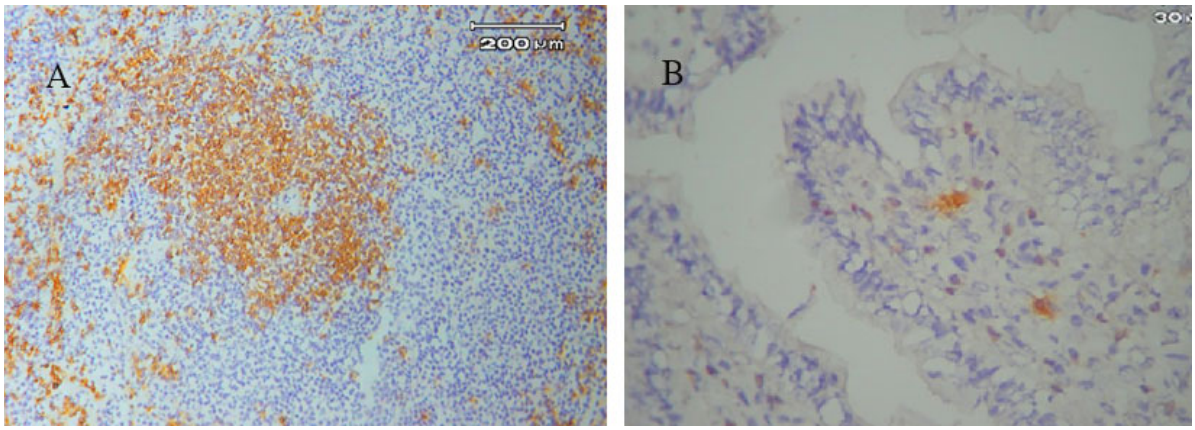
آنتی‌بادی، تقریباً لحظاتی پس از اضافه‌کردن DAB، رنگ قهوه‌ای در بافت ظاهر می‌شد. ۹۱/۳±۲/۷ درصد از سلول‌های بافت طحال مارکر MHC-II را بیان می‌کنند. سلول‌های MHC-II+ در تمام بافت طحال پراکنده بودند. شدت رنگ‌پذیری به ویژه در فولیکول‌های لنفاوی زیاد بود. این سلول‌ها نیز به تعداد زیاد در پولپ قرمز مشاهده شدند.

رنگ‌آمیزی بافت رحم با آنتی‌بادی ضد MHC نشان داد که سلول‌های MHC-II+ در سرتاسر بافت رحم پراکنده‌اند. این سلول‌ها ۳۷/۹±۵/۴ درصد از از سلول‌های بافت رحم را تشکیل می‌دهند و در میومتر و بخش‌های مختلف دسیدوا مثل غدد رحمی و اطراف لومن حضور دارند، در حالی که سلول‌های اپیتلیال اطراف لومن از نظر این مارکر منفی بودند (شکل۲) و (جدول ۱).

پراکندگی سلول‌های CD8α+ در بافت طحال و رحم

رنگ‌آمیزی بافت طحال با آنتی‌بادی ضد CD8α نشان داد که سلول‌های CD8α+ دراطراف و داخل فولیکول‌های لنفاوی و همچنین به تعداد قابل توجه در پولپ قرمز حضور دارند. این سلول‌ها ۳۵/۳±۳/۳درصد از سلول‌های بافت رحم را تشکیل می‌دهند (شکل۳) و (جدول۱).

نتایج رنگ‌آمیزی بافت رحم با آنتی‌بادی ضد CD8α نشان داد که سلول‌های CD8α+ در بخش‌های مختلف بافت رحم از جمله میومتر و دسیدوا به تعداد کم حضور دارند. این سلول‌ها ۰/۶±۰/۱۷ درصد از سلول‌های بافت رحم را تشکیل می‌دهند (شکل۳) و (جدول ۱).



شکل ۳: رنگ‌آمیزی سلول‌های بافت طحال (a x100) و دسیدوا (b x400) با آنتی‌بادی ضد CD8α در موش‌های باردار نژاد NMRI. برش‌های بافتی از بافت طحال و دسیدوا تهیه شده و با آنتی‌بادی ضد CD8α رنگ‌آمیزی شد. سلول‌های قهوه‌ای سلول‌های $CD8\alpha^+$ هستند و سلول‌های آبی سلول‌هایی هستند که از نظر مارکر CD8α منفی بوده و رنگ زمینه (آبی) را به خود گرفته‌اند.

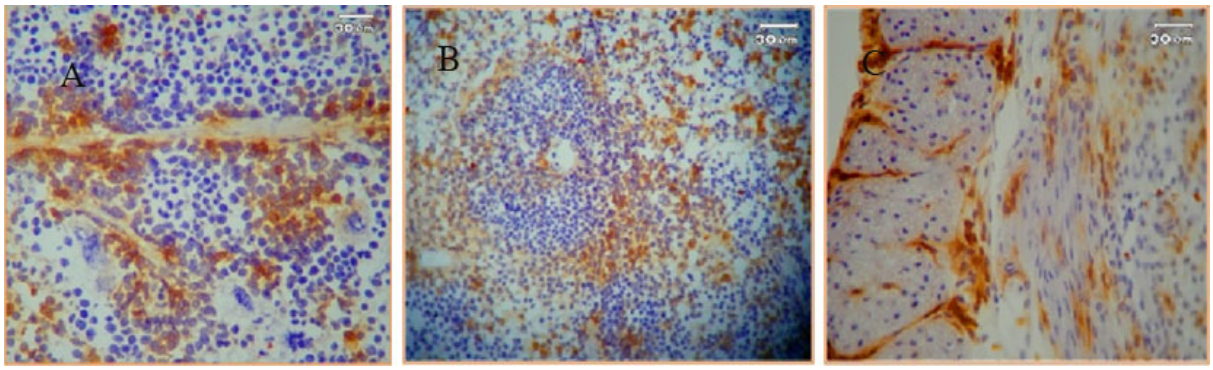
پراکندگی سلول‌های +CD11b در بافت طحال و رحم

رنگ‌آمیزی بافت طحال با آنتی‌بادی ضد CD11b نشان داد که ۲۴/۶±۲/۸ درصد از سلول‌های بافت طحال مارکر CD11b را بیان می‌کنند. سلول‌های +CD11b نیز همانند سلول‌های +CD8α در اطراف فولیکول‌های لنفاوی و همچنین پولپ قرمز حضور دارند. تقریباً هیچ سلول+CD11b در داخل فولیکول‌ها مشاهده نشد. همچنین سلول‌های +CD11b اطراف فولیکولی نسبت به سلول‌های +CD8α همین مناطق عمدتاً در نواحی خارجی‌تر و نزدیک‌تر به پولپ قرمز متمرکز بودند (شکل۴) و (جدول ۱).

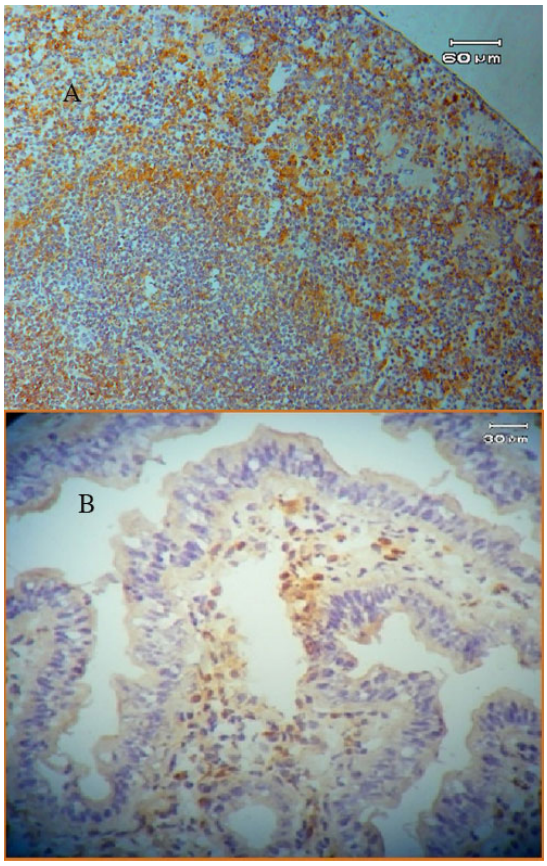
رنگ‌آمیزی بافت رحم با آنتی‌بادی ضد CD11b نشان داد سلول‌های +CD11b موجود در بافت رحم در ناحیه میومتر تجمع پیدا کرده‌اند و به میزان کمتری در سایر مناطق بافت رحم از جمله غدد رحمی و اطراف لومن حضور دارند. این سلول‌ها ۱۰/۸±۱/۷درصد از سلول‌های بافت رحم را شامل می‌شوند (شکل۴) و (جدول ۱).

پراکندگی سلول‌های +CD86 در بافت طحال و رحم

رنگ‌آمیزی بافت طحال با آنتی‌بادی ضد CD86 نشان داد که ۵۵/۸±۳/۰۷ درصد از سلول‌های بافت طحال مارکر CD86 را بیان می‌کنند. سلول‌های +CD86 در داخل و اطراف فولیکول‌ها مستقر هستند همچنین شدت رنگ‌پذیری در سلول‌های دور



شکل ۴: رنگ‌آمیزی سلول‌های بافت طحال (a,b x400) و دسیدوا (c x400) با آنتی‌بادی ضد CD11b در موش‌های باردار نژاد NMRI. برش‌های بافتی از بافت طحال و دسیدوا تهیه شده و با آنتی‌بادی ضد CD11b رنگ‌آمیزی شد. سلول‌های قهوه‌ای سلول‌های $CD11b^+$ هستند که در شریانچه‌های بافت طحال(a)، اطراف فولیکول‌های لنفاوی (b) و در میومتر (c) بافت رحم تمرکز یافته‌اند و سلول‌های آبی سلول‌هایی هستند که از نظرمارکر CD11b منفی بوده و رنگ زمینه (آبی) را به خود گرفته‌اند.



شکل ۵: رنگ‌آمیزی سلول‌های بافت طحال (a x200) و دسیدوا (b x400) با آنتی‌بادی ضد CD86 در موش‌های باردار نژاد NMRI. برش‌های بافتی از بافت طحال و دسیدوا تهیه شده و با آنتی‌بادی ضد CD86 رنگ‌آمیزی شد. سلول‌های قهوه‌ای سلول‌های $CD86^+$ هستند و سلول‌های آبی سلول‌هایی هستند که از نظر مارکر CD86 منفی بوده و رنگ زمینه (آبی) را به خود گرفته‌اند.

فولیکولی بیشتر بود (شکل ۵) و (جدول ۱).

نتایج رنگ‌آمیزی بافت رحم با آنتی بادی ضد CD86 نشان داد که سلول‌های +CD86 در سرتاسر بافت رحم از جمله میومتر و بخش‌های مختلف دسیدوا حضور دارند. این سلول ها۲/۶±۲۲/۴ درصد از سلول‌های بافت رحم را شامل می‌شوند (شکل۵) و (جدول ۱).

بحث و نتیجه گیری

حاملگی به عنوان یک پدیده ایمونولوژیک دارای خصوصیات منحصر به فردی است که در آن میان‌کنش بین سلول‌های ایمنی مادر و سلول‌های جنینی علی‌رغم بیان کردن آنتی‌ژن‌هایی با منشاء پدری نه تنها موجب آسیب به جنین نمی‌شود، بلکه لازمه رشد و تکامل جنین است (۱و۲). برای شناختن مکانیسم‌های ایمنی دخیل در ایجاد تحمل طبیعی به یک آلوگراف (جنین) ضروری است که سلول‌های ایمنی موجود در محیط رحم شناسایی شوند. حذف گردد. در این پژوهش پراکندگی سلول‌های مختلف ایمنی در بافت طحال و رحم موش‌های نژاد NMRI مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصله از این پژوهش نشان می‌دهد که سلول‌های +CD11c بیشتر در اطراف فولیکول‌های لنفاوی بافت طحال تجمع یافته‌اند. سلول‌های +CD11c سلول‌های دندریتیک هستند. سلول‌های دندریتیک جمعیتی هتروژن از سلول‌ها هستند که در لایه اپیدرم پوست، سطوح مخاطی، فضاهای بین بافتی اندام‌های جامد و بافت‌های لنفاوی یافت می‌شوند، یعنی جایگاه‌هایی که به‌عنوان نگهبانان سیستم ایمنی عمل می‌کنند (۴). این سلول‌ها مهم‌ترین سلول در عرضه آنتی‌ژن به سلول‌های T می‌باشند (۷-۵). پس از حمله پاتوژن‌ها، پیش‌سازهای سلول دندریتیک به وسیله کموکاین‌هایی چون MIP-1α/β به محل‌های التهاب جذب می‌شوند. بیان پذیرنده‌های کموکاینی چون CCR-1 و CCR-5 روی پیش‌سازهای سلول دندریتیک (DC)، ممکن است به فراخوانی این سلول‌ها به محل‌های التهاب کمک نماید (۴). سپس پیش‌سازهای سلول‌های دندریتیک تبدیل به DC های نابالغ می‌شوند که تخصص خاصی در برداشت و عرضه آنتی‌ژن دارند. با توجه به نقش سلول دندریتیک در عرضه آنتی‌ژن حضور این سلول‌ها در اطراف فولیکول‌های لنفاوی و در مجاورت با سلول‌های T منطقی به نظر می‌آید. مطالعه‌ای مشابه در این زمینه صورت گرفته که نتایج حاصل از این مطالعه را تایید می‌نماید. دکتر زرنانی وهمکارانش نشان دادند که سلول‌های دندریتیک در بافت طحال در اطراف فولیکول‌های لنفاوی حضور دارند و به ندرت در داخل فولیکول‌ها مشاهده می‌شوند. همچنین بیان مارکر MHC-11 بر سطح سلول‌های بافت طحال به شدت بالا می‌باشد. این یافته‌ها اهمیت بافت طحال را به عنوان یک بافت لنفاوی سیستمیک مشخص می‌نماید (۸).

در بافت رحم، سلول‌های دندریتیک در سه منطقه شامل: میومتر، اطراف لومن و در مجاورت غدد رحمی متجمع بودند که البته پراکندگی این سلول‌ها در اطراف لومن بیشتر از سایر نواحی به نظر می‌رسید. از آنجا که این مطالعه در روز هفتم بارداری اندکی پس از لانه‌گزینی جنین صورت پذیرفته است و مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های دندریتیک در زمان لانه‌گزینی افزایش و در ایجاد یک لانه‌گزینی مناسب و نهایتاً یک بارداری موفق نقش بسزایی دارند(۱۰-۸) و همچنین جنین در ناحیه لومن لانه‌گزینی می‌کند تجمع سلول‌های دندریتیک در این منطقه دور از انتظار نیست.

در این مطالعه پراکندگی سلول‌های CD11b+ در دو بافت رحم و طحال بررسی شد. سلول‌های CD11b+ می‌توانند سلول ماکروفاژ، مونوسیت، سلول‌های پیش‌ساز مونوسیتی و یا سلول گرانولوسیت باشند. در این بین، سلول ماکروفاژ در محیط رحم از اهمیت بسزایی برخوردار است. مطالعات نشان می‌دهد که رحم پستانداران دارای تعداد بسیار زیادی از ماکروفاژها می‌باشد. تعداد این سلول‌ها در اندومتر و میومتر رحم موش و انسان توسط هورمون‌های تخمدان تنظیم می‌شود (۱۱و۱۲). علاوه بر این سلول‌های اپی‌تلیال رحم موش با تولید طیف وسیعی از سایتوکین‌ها می‌توانند مهاجرت، بقاء، تمایز و یا فعالیت ماکروفاژها را تنظیم کنند. ماکروفاژهای جنینی در ویلوس‌های جفتی حضور داشته و آن‌ها نیز آنتی‌ژن‌های MHC-II را بیان می‌کنند. به نظر می‌رسد که ماکروفاژهای جنینی توانایی عرضه آنتی‌ژن را ندارند. نقش این سلول‌ها به درستی روشن نیست ولی پیشنهاد شده است که این سلول‌ها می‌توانند از طریق گیرنده‌های Fc، آنتی‌بادی‌های ضد جنینی مادر را به خود جذب کرده و از انتقال آن ها به سمت جنین جلوگیری نمایند(۱۳). در این مطالعه سلول‌های CD11b+ در بافت رحم در منطقه میومتر تجمع داشته و در سایر نواحی بافت رحم به تعداد کم حضور داشتند. سلول‌های CD11b+ در بافت طحال بیشتر در پولپ قرمز پراکنده بودند و این مسئله با توجه به نقش سلول ماکروفاژ در هضم و پاکسازی سلول‌های آسیب‌دیده و کمپلکس‌های ایمنی در گردش خون با مکانیسم فاگوسیتوز (۱۴) در بافت طحال کاملاً منطقی به نظر می‌رسد.

نتایج حاصله از این پژوهش نشان داد سلول‌های MHC-II+ در سرتاسر بافت رحم به طور یکنواختی پراکنده شده‌اند. این سلول‌ها می‌توانند ماکروفاژ، سلول‌های B، سلول دندریتیک بالغ و همچنین سلول‌های T فعال باشند. البته در بعضی از بافت‌ها مثل تیموس سلول‌های اپیتلیال مارکر MHC-II را بیان می‌کنند، اما در بافت رحم سلول‌های اپیتلیال فاقد این ملکول بر سطح خود بودند. وجود سلول‌های MHC-II+ نشان‌دهنده این است که سیستم ایمنی مادر به خصوص سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن در حالت فعال و هوشیار می‌باشند و این نظریه که سیستم ایمنی مادر در بارداری سرکوب می‌شود را نقض می‌کند. البته مشاهدات پزشکی درباره بررسی وضعیت ایمنی زنان حامله و پاسخ سلول‌های ایمنی آن ها به محرک‌های مختلف نیز تایید نموده است که پاسخ ایمنی زنان حامله در مقایسه با زنان غیرحامله کاهش معنی‌داری ندارد (۱۵). پراکندگی سلول‌های MHC-II+ در بافت طحال نسبت به سایر سلول‌ها الگویی متفاوت داشت. سلول‌های MHC-II+ به تعداد بسیار زیاد در داخل فولیکول‌ها پراکنده بودند و این الگو به دلیل وجود سلول‌های B در داخل فولیکول‌ها و مثبت بودن این سلول از نظر مارکر MHC-II منطقی به نظر می‌آید.

در این پژوهش نیز پراکندگی سلول‌های CD8α+ مورد بررسی قرار گرفت. ملکول CD8 هترودایمری شامل دو زیر واحد α و β است. سلول‌های بیان کننده ملکول CD8α شامل سلول T همراه با زیرواحد β و سلول دندریتیک بدون زیرواحد β می‌باشد. سلول‌های بیان‌کننده ملکول CD8α به تعداد بسیار کم در تمامی نقاط بافت رحم حضور داشتند. مطالعات اخیر نشان داده است که سلول‌های T CD8+ خونی در سه ماهه اول حاملگی انسان و سلول‌های TCD4+ در سه ماهه سوم، کاهش می‌یابند، در حالی که هر دو جمعیت،

۴ ماه پس از زایمان افزایش می‌یابند(۱۶).

از طرف دیگر مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های دندریتیک +CD8α در بافت رحم نسبت به فنوتیپ‌های دیگر سلول دندریتیک در اقلیت قرار دارد(۱۷) و این به دلیل خاصیت سلول‌های دندریتیک +CD8α در القاء پاسخ‌های Th1 می‌باشد(۲۰-۱۸) ۲۱-۱۸و از آنجا که پاسخ‌های Th1 برای سلامتی جنین مضر می‌باشد (۱۳)، این مسئله منطقی به نظر می‌آید. سلول‌های +CD86 در بافت رحم در سرتا سر آن به طور یکنواخت پراکنده‌اند. این سلول‌ها می‌توانند سلول دندریتیک، سلول T فعال‌شده، مونوسیت و یا ماکروفاژ باشند. مارکر CD86(B7-2) به عنوان شاخص بلوغ و فعالیت سلول دندریتیک در نظر گرفته می‌شود. سلول‌های +CD86 در بافت طحال در داخل فولیکول‌های لنفاوی، اطراف فولیکول‌ها و همچنین در پولپ قرمز طحال حضور دارند. همچنین پراکندگی سلول‌های +CD11c، +CD11b، +CD86 و +MHC-II در دو بافت طحال و رحم مقایسه گردید و نتایج نشان داد که جمیعت سلول‌های ایمنی در بافت رحم بسیار کمتر از بافت طحال می‌باشد و این نتایج نقش مهم ایمنی مخاطی را در جلوگیری از بروز آسیب‌های مخرب بر ضد جنین را مشخص می‌نماید.

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش لازم است که مطالعات تکمیلی دیگری صورت پذیرد تا تعداد، فنوتیپ، بلوغ و فعالیت سلول‌های مختلف ایمنی بافت رحم و همچنین مکانیسم‌های دخیل در ایجاد یک تحمل طبیعی به یک آلوگراف (جنین) در انسان در یک بارداری موفق شناسایی شود تا بتوان به راه‌کارهای جدیدی در درمان نازایی با منشاء ایمونولوژیک دست یافت.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد ایمنی‌شناسی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. نگارندگان بدین‌وسیله از حمایت‌های دانشگاه و نیز پرسنل آزمایشگاه که مساعدت‌های لازم را مبذول داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. Semin Fetal Neonat M. 2006;11: 279-95.

2. Hunt JS, RH Mcintire, MG Petroff. Immunology of human pregnancy. Reprod. 2006; 2759- 78.

3. Koch CA, JL Platt. T cell recognition and immunity in the fetus and mother. Cell Immunol. 2007; 248:12-7.

4. Dietl J, Honig A, Kammerer U, Rieger L. Natural killer cells and dendritic cells at the human feto-maternal interface: an effective cooperation. Placenta. 2006;27:341-7.

5. Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. Curr Opin Immunol. 2001;13:45-51.

6. SC Knight, Burke F, Bedford PA. Dendritic cells, antigen distribution and the initiation of primary immune responses to self and non-self antigens. Semin Cancer Biol. 2002;12:301-8.

7. Shoreman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtype. Immunol. 2002;2: 151-9.

8. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Bayat AA, Mahmoodi SA, et al. Morphological and cytochemical characteristics of purified murine splenic dendritic cells. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2003;2(3):139-44.

9. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. Am J Reprod Immunol. 2010;63:17-21.

10. Dekel N, Neeman M, Jung S. Uterine DCs are crucial for decidua formation during implantation in mice. J Clin Invest. 2008;118(12):3832.

11. Krey G, Frank P, Barrientos G, Cordo-Russo R, Ringel F, Moschansky P, et al. In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental

development in mice. J Mol Med. 2008;86:999-1011.

12. Hunt JS, Manning LS, Mitchell D, Selanders JR, Wood JW. Localization and characterization of macrophages murine uterus. J Leukocyte Biol. 1985;38:255-65.

13. Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. Clin Exp Immunol. 2003; 131:495-505.

14. Nariman M, Zarnani AH, Hasan ZM. Natural pregnancy immunology. 1st ed. Tehran: Shahid Beheshti Medical University Publication; 2003.

15. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999; 17:593-623.

16. 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. Current Opinion in Immunology Curr Opin Immunol. 2000;12:7317.

17. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. Am J Reprod Immunol. 1997;37:368.

18. Miyazaki S, Tesuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y. Predominance of Th2-promoting dendritic cell in early human pregnancy decidua. J Leuko Biol. 2003;74.

19. Moser M, Murphy K. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. Nat Immunol. 2000;1(3):199-205.

20. Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. J Exp Med. 1999;189(3):587-92.

21. Pulendran B, Smith J, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(3):1036-40.

Study of immune cells distribution in the uterus and spleen of NMRI pregnant mice

***Maryam Eskandaryan,** MSc. Department of Immunology, School of Medicine, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). maryamskandaryan@yahoo.com
Amir Salek Farrokhi, MSc. Department of Immunology, School of Medicine, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran. salekamir63@gmail.com

Abstract

Background: Pregnancy is a unique immunologic phenomenon in that despite expressing antigens with paternal origin of the embryos the interaction between maternal immune cells and fetal ones not only does not cause damage to the fetus, is necessary for fetal development. Since immune cell function is essential in the success of pregnancy and many of spontaneous abortions are associated with immunological defects. Understanding immune cells recognition, their distribution in the uterine tissue and the immune mechanisms involved in creating natural tolerance to an allograft (embryos), are necessary.
Methods: In this descriptive-analytic study distribution of various immune cells in the spleen and uterine tissue in pregnant mice was evaluated by immunohistochemical staining using monoclonal antibody, HRP enzyme, Alkaline phosphates and eventually the emergence of color on the cells was determined.
Results: The results of immunohistochemical staining with different antibodies showed that there are significant difference between the two tissues, spleen and uterus of the cell population CD11c+, CD11b+, CD86 + and MHC-II+ . The immune cells in different zones of the spleen and uterine tissue are different
Conclusions: Different distribution pattern of immune cells in the uterus and spleen tissue showed the importance and role of mucosal immune in protection of the fetus in the uterus and promotion of a successful pregnancy. Also, the presence of immune cells in certain areas prevents the destructive immune response against the fetus. And different dispersion pattern of immune cells is in proportion with function cells in pregnancy.

Keywords: Pregnancy, Immune cells distribution, Spleen, Uterus.