

# مقایسه توانائی سلول‌های دندریتیک طحال موش‌های حامله و غیر حامله در تحریک آلورژیک لنفوسیت‌های T

ژاله شجاعیان (B.Sc.)<sup>۱</sup>، سیدمحمد مؤذنی (Ph.D.)<sup>۲</sup>، امیرحسین زرنانی (Ph.D.)<sup>۳،۴</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۳- دانشجوی دکترا، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
- ۴- دکترای علوم آزمایشگاهی، گروه ایمنی‌شناسی تولیدمثل، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

## چکیده

**مقدمه:** تولیدمثل پستانداران یک تناقض ایمنولوژیکی است؛ زیرا انتظار می‌رود آنتی‌ژن‌های بیگانه جنینی که از طریق پدر به ارث می‌رسند سیستم ایمنی مادر را تحریک کنند و منجر به سقط جنین شوند. در طی بارداری سیستم ایمنی مادر علاوه بر تغییرات موضعی به صورت سیستمیک هم تعدیل می‌شود. سلول‌های دندریتیک به عنوان سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن، در آغاز و کنترل پاسخ ایمنی نقش کلیدی دارند و به نظر می‌رسد که تغییرات عملکردی این سلول‌ها در طی حاملگی در تحمل ایمنولوژیک سیستمیک مؤثر باشد. برای این منظور در مطالعه حاضر سلول‌های دندریتیک موش حامله جداسازی و تخلیص گردید و میزان فعالیت آنها در تحریک تکثیری سلول‌های T آلورژن با استفاده از واکنش مختلط لوکوسیتی (MLR) آلورژیک یک طرفه ارزیابی شد.

**مواد و روشها:** با هضم بافت طحال توسط آنزیم کلاژناز و استفاده از محیط گرادیان نایکودنز (Nycodenz) ۱۳٪ و با استفاده از خاصیت چسبندگی سلول‌های دندریتیک به کف پلیت کشت، حدود  $7 \times 10^6$  سلول دندریتیک با خلوص بیش از ۹۵٪ از هر طحال جدا شد. سلول‌های T آلورژن نیز به وسیله ستون نایلون (Nylon wool) و با استفاده از خاصیت عدم چسبندگی سلول‌های T به نایلون ول جدا گردید. سلول‌های دندریتیک جدا شده از موش Balb/c حامله و غیر حامله پس از اشعه‌دادن در کشت مختلط لوکوسیتی با لنفوسیت‌های T جدا شده از موش C57BL/6 مورد استفاده قرار گرفت و میزان تکثیر لنفوسیت‌های T پس از ۷۲ ساعت به وسیله تایمیدین رادیواکتیو اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** از هر طحال حدود  $7 \times 10^6$  سلول دندریتیک با خلوص بیش از ۹۵٪ به دست آمد. همچنین میزان بازده لنفوسیت‌های T از غدد لنفاوی اینگوئینال و براکیال حدود  $3-5 \times 10^6$  عدد با خلوص ۹۰-۸۵٪ بود. نتایج حاصله نشان داد توانایی سلول‌های دندریتیک موش‌های حامله ( $cpm=33000$ ) و غیر حامله ( $cpm=30000$ ) از نظر القای پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T آلورژن تفاوت معنی‌داری ندارد.

**نتیجه‌گیری:** این یافته می‌تواند ناشی از کم بودن غلظت فاکتورهای سرکوبگر ایمنی در گردش خون موش‌های حامله و یا به دلیل جدا کردن سلول‌های دندریتیک از ریزمحیط حاملگی و بلوغ آنها در شرایط In Vitro بدون حضور فاکتورهای سرکوبگر ایمنی باشد.

**کل واژگان:** سلول‌های دندریتیک، طحال، حاملگی، کشت مختلط لوکوسیتی، و پاسخ آلورژیک.

**آدرس مکاتبه:** دکتر سیدمحمد مؤذنی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: Moazzeni@dr.com

## مقدمه

تولید مثل پستانداران یک تناقض ایمنولوژیکی است؛ زیرا انتظار می‌رود آنتی‌ژن‌های بیگانه جنینی که از طریق پدر به ارث می‌رسند، سیستم ایمنی مادر را تحریک و منجر به سقط جنین شوند (۱،۲). تحقیقات زیادی در زمینه فاکتورهای موجود در ریزمحیط موضع بارداری نظیر سایتوکینها، پروستاگلاندینها، هورمونها و غیره و تأثیر آنها بر روی عملکرد سیستم ایمنی صورت گرفته است و به نظر می‌رسد که فعالیت اصلی فاکتورهای مذکور بر روی سیستم ایمنی مادر به صورت موضعی و در سطح تماس مادر- جنین اعمال شود. زیرا بیشترین غلظت این فاکتورها در محل مذکور متمرکز می‌باشد (۳). از طرفی سیستم ایمنی سیستمیک مادر را نمی‌توان از سیستم ایمنی موضع بارداری کاملاً متمایز فرض کرد. در هر حال تغییرات موجود در یک سیستم می‌تواند به واسطه پدیده سرریز<sup>۱</sup>، سیستم دیگر را تحت تأثیر قرار دهد. با این وجود این تأثیر در آن حد نیست که بتوان وقایع سایتوکینی موضع بارداری را به طور کامل به ایمنی سیستمیک مادر تعمیم داد (۴). در هر حال آنچه که مسلم است این است که در طی بارداری سیستم ایمنی مادر علاوه بر تغییرات موضعی به صورت سیستمیک هم دچار تعدیل می‌شود. اما این تعدیل در حدی نیست که اختلال جدی در پاسخ‌های ایمنی سلولی مادر ایجاد شود. تغییرات مهم کلینیکی در ایمنی سیستمیک مادر عمدتاً در ارتباط با بیماری‌های عفونی و خودایمن مورد مطالعه قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که خانم‌های حامله به بعضی عفونت‌ها مستعدتر هستند. همچنین در طی بارداری سیر بالینی بعضی از بیماری‌های خودایمن بهتر شده و برخی بدون تغییر مانده و یا بدتر می‌شود. به طور کلی در طی حاملگی سیر بالینی بیماری‌های خودایمن با واسطه آنتی‌بادی بدتر و سیر بالینی بیماری‌های خودایمن با

واسطه سلولی بهتر می‌شود (۳). لذا تعدیل در سیستم ایمنی سیستمیک مادر در طی بارداری، در دو سطح هومورال و سلولی مطرح است (۱). گزارشات مربوط به عملکرد سلول‌های T و NK<sup>۲</sup> در طی حاملگی یکسان نیستند. گرچه شواهدی وجود دارد که کاهش توانایی عملکرد این سلول‌ها را در دوران بارداری نشان می‌دهد (۳). سلول‌های دندریتیک به عنوان سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن، در آغاز و کنترل پاسخ ایمنی نقش کلیدی دارند (۵) و به نظر می‌رسد که تغییرات عملکردی این سلولها در طی حاملگی ممکن است در تولرانس ایمنولوژیک سیستمیک مؤثر باشد (۶،۷). از آنجا که بررسی دقیق مکانیزم‌های تعدیل پاسخ‌های ایمنی در مدیریت پزشکی خانم‌های باردار حائز اهمیت و دارای ضرورت می‌باشد، در مطالعه حاضر به منظور بررسی تغییرات احتمالی در عملکرد سیستمیک سلول‌های دندریتیک در طی بارداری، سلول‌های دندریتیک طحال موش حامله جداسازی و تخلیص گردید و میزان فعالیت آنها در تحریک تکثیری سلول‌های T آلورژن با استفاده از MLR<sup>۳</sup> آلورژنیک یک طرفه ارزیابی و با سلول‌های دندریتیک طحال موش غیرحامله مقایسه شد.

## مواد و روشها

*الف) حیوانات مورد مطالعه:* موش‌های هم‌خون<sup>۴</sup> نژاد Balb/c ماده با سن ۱۲-۸ هفته و موش‌های هم‌خون نژاد C57BL/6 نر با سن ۱۲-۸ هفته از مرکز تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد. موش‌ها در شرایط مناسب بهداشتی و غذایی نگهداری شدند. شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در نگهداری موش‌ها اعمال گردید.

*ب) تعیین سن بارداری موش:* از تکنیک تشخیص پلاک واژینال برای تعیین سن بارداری استفاده شد. قبل از

2-Natural killer

3- Mixed Leukocyte Reaction

4- Inbred

1- Overflow

مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. توده سلولی<sup>۱</sup> در ۳ml- محیط RPMI به صورت سوسپانسیون درآمده و به آرامی بر روی ۳-۲ml محیط گرایان ۱۳٪ نایکودنز<sup>۷</sup> با دانسیته معادل ۱/۰۶۸ g/ml (Axis-Shield, Norway) اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۰۰g و دمای ۴°C سانتریفوژ شد. سلول‌های ناحیه حد واسط با دقت توسط پیپت پاستور برداشته شد و دو بار مثل مرحله قبل شستشو و سانتریفوژ گردیدند.

توده سلولی در محیط کشت کامل RPMI حاوی ۱۰٪ FCS به مدت ۱۲۰ دقیقه کشت داده شد. پس از مدت مذکور با شستشوی آرام پلیت کشت توسط محیط RPMI گرم (۳۷°C) سلول‌های غیرچسبان حذف شدند. سلول‌های چسبان به مدت ۱۸ ساعت در محیط کشت کامل RPMI وانکوباتور ۳۷°C حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. پس از آن سلول‌های شناور که عمدتاً شامل سلول‌های دندریتیک بالغ بودند، جمع‌آوری و بعد از تعیین میزان خلوص، در MLR آلونژنیک استفاده شدند.

د) *جداسازی سلولهای T از غدد لنفاوی*: برای این منظور از تکنیک نایلون ول<sup>۸</sup> استفاده گردید (۹). ابتدا ستون حاوی نایلون ول استریل و به زیر هود منتقل شد. بعد از چند بار شستشو، ستون با محیط RPMI کامل اشباع و سپس حباب‌گیری شد. سپس ستون به مدت حداقل ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. در هر بار آزمایش غدد لنفاوی اینگوینال<sup>۹</sup> و براکیال<sup>۱۰</sup> یک موش C57BL/6 خارج و در یک پلیت حاوی PBS قرار داده شد. سپس غدد مذکور به پلیت حاوی RPMI کامل منتقل و توسط قیچی و پنس خرد گردیدند. برای حذف تکه‌های بافتی، سوسپانسیون سلولی از الک سلولی عبور داده شد. به منظور حذف سلول‌های چسبان سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱۰<sup>۷</sup> cell/ml در

جفت‌گزاری موش‌های ماده Balb/c به مدت ۱۰ روز در یک قفس نگهداری و سپس با موش‌های نر C57BL/6 جفت‌اندازی شدند. موش‌های ماده تا سه روز متوالی هر روز صبح از نظر تشکیل پلاک واژینال مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام موش‌های ماده پلاک مثبت، وجود اسپرم در ترشحات واژن از طریق تهیه اسمیر واژینال بررسی گردید. روز رؤیت اسپرم در اسمیر واژینال به عنوان روز ۰/۵ حاملگی در نظر گرفته شد. حاملگی حاصل از این جفتگیری، آلونژنیک بوده و جنین حاصل برای مادر یک پیوند نیمه بیگانه محسوب می‌شود.

ج) *جداسازی سلولهای دندریتیک از طحال موشهای حامله و غیرحامله*: برای جداسازی DC<sup>۱</sup> از روش Vermec و همکاران با کمی تغییرات استفاده شد (۸). به طور خلاصه بعد از نخاعی کردن موش‌های Balb/c حامله اواسط بارداری و غیر باردار، طحال آنها در شرایط استریل برداشته شد (در هر بار آزمایش از ۴ تا ۵ طحال استفاده گردید). بافت‌های طحالی در ۱۰-۵ml محیط کشت RPMI-1640<sup>۲</sup> (GIBCO, England) حاوی ۲٪ FCS<sup>۳</sup> (GIBCO, England)، ۱mg/ml آنزیم کلاژناز (Roche, Germany) و ۲۰μg/ml آنزیم DNase (Roche, Germany) با قیچی جراحی کاملاً خرد گردیده و به مدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. برای جداسازی قطعات بافتی هضم نشده سوسپانسیون سلولی بدست آمده، از الک سلولی عبور داده شد. به منظور جلوگیری از تشکیل تجمعات سلولی، EDTA<sup>۴</sup> (Merck, Germany) با غلظت نهایی ۵ mM به سوسپانسیون تک‌سلولی اضافه گردید. سوسپانسیون سلولی دو بار با بافر فسفات‌سالین (PBS)<sup>۵</sup> سرد حاوی EDTA ۵mM شستشو و در دمای ۴°C و دور ۳۰۰g به

6-Plet

7- Nycodenz

8-Nylon wool

9- Inguinal

10-Brachial

1- Dendritic Cell

2- Roswell Park Memorial Institute

3- Fetal Calf Serum

4-Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

5- Phosphate Buffer Saline

RPMI کامل به مدت ۲ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  حاوی ۵٪  $\text{CO}_2$  کشت داده شد. سلول‌هایی که در مدت انکوباسیون به پلیت کشت نچسبیده بودند جمع‌آوری و یک بار در دور  $300\text{g}$  برای ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند.  $250\ \mu\text{l}$  از سوسپانسیون سلولی حاوی  $10^6 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  به ستون نایلون‌ول منتقل و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. پس از این مدت ستون با RPMI کامل گرم ( $37^{\circ}\text{C}$ ) پر شد و سلول‌های غیرچسبان در حجم یک میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید. سلول‌های جمع‌آوری شده برای ۱۰ دقیقه در  $300\text{g}$  شستشو داده شد و در MLR مورد استفاده قرار گرفت.

**هـ) تعیین میزان خلوص سلول‌های دندریتیک و جدا شده:** برای تعیین میزان خلوص این سلولها از روش فلوسیتومتری استفاده شد (۱۰). از هر دو نوع سلول یک سوسپانسیون سلولی ( $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ ) در PBS حاوی ۲٪ FCS تهیه شد. سپس برای بلوک کردن گیرنده‌های ناحیه Fc آنتی‌بادی محلول ۱٪ سرم موش طبیعی به مدت چند دقیقه به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سپس  $1\ \mu\text{l}$  آنتی‌بادی ضد CD11c (Pharmingen, U.S.A) به سلول‌های دندریتیک و آنتی‌بادی ضد CD3<sup>۲</sup> کونژوگه با RPE (Serotec, England) به سلول‌های T اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ انکوبه گردید. از کنترل ایزوتیپ مناسب به عنوان کنترل استفاده شد. بعد از دو بار شستشو با PBS سرد و سانتریفوژ در دور  $400\text{g}$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) به مدت ۵ دقیقه سلول‌های T با پارافرمالدئید ۱٪ ثابت و به سلول‌های دندریتیک آنتی‌بادی برعلیه ایمونوگلوبولین هامستر نشاندار شده با RPE (Pharmingen, U.S.A) اضافه گردید. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون روی یخ مجدداً سلول‌ها با PBS سرد شستشو داده شد و نهایتاً

با پارافرمالدئید ۱٪ ثابت شدند. نتایج با استفاده از دستگاه FACS (Partec, Germany) آنالیز گردید. **و) MLR آلوزنیک:** سلول‌های دندریتیک به دست آمده از موش‌های Balb/c باردار و غیرباردار  $3000\text{ Rad}$  اشعه داده شده و به عنوان سلول‌های محرک در MLR یک طرفه استفاده گردید.  $2 \times 10^4$  عدد از این سلول‌ها و  $10^6$  عدد سلول T آلوزن بدست آمده از موش C57BL/6 در هر حفره میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (U شکل) به صورت سه تایی و در حجم نهایی  $200\ \mu\text{l}$  کشت داده شدند. از سلول‌های دندریتیک تنها و سلول‌های T تنها به عنوان کنترل در هر بار آزمایش MLR استفاده گردید. بعد از گذشت ۷۲ ساعت  $1\ \mu\text{Ci}$  تایمیدین نشاندار  $^3\text{H}$ - thymidine (Amersham, England) به هر حفره اضافه گردید و ۱۸ ساعت بعد سلول‌ها توسط دستگاه cell harvester (Titertek, Denmark) بر روی فیلتر مخصوص برداشت شدند. میزان جذب تیمیدین نشاندار با دستگاه بتاکانتر مدل wallac 1410 (Pharmacia, Finland) اندازه‌گیری گردید. آزمایشات MLR به صورت سه تایی<sup>۵</sup> و در هر مورد (باردار و غیر باردار) بر روی هفت نمونه مستقل تکرار گردید. **ز) آنالیز آماری:** برای مقایسه CPM<sup>۶</sup> کشت آلوزنیک سلول‌های دندریتیک موش‌های باردار و غیرباردار از تست آماری Mann Whitney, U-test استفاده شد.

### نتایج

**الف) جداسازی سلول‌های دندریتیک از طحال:** از هر طحال موش باردار و غیرباردار حدود  $2 \times 10^7$  -  $10^8$  (تقریباً ۱۰٪ کل سلول‌های طحالی) سلول تک‌هسته‌ای با دانسیته کم به دست آمد. بعد از کشت ۲ ساعته و شستشو و حذف سلول‌های غیرچسبان حدود ۸۰٪ سلول‌های باقیمانده، مرفولوژی سلول‌های دندریتیک را نشان می‌دادند (شکل

4- Harvesting

5- Triplicate

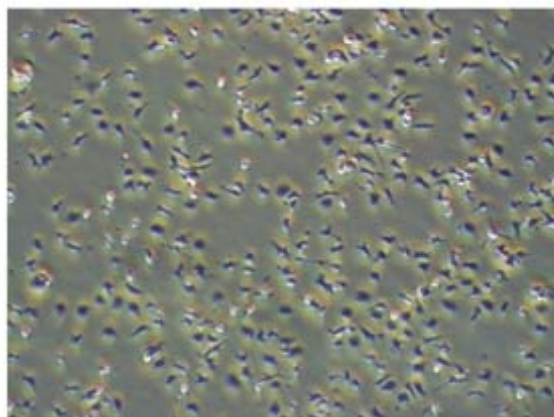
6 - Count Per Minute

1-Hamster Anti-mouse CD11c

2-Rat Anti-mouse CD3:RPE

3-Red Phycoerythrin

شماره ۱). مطالعه مرفولوژی سلول‌های دندریتیک بامیکروسکوپ فازکنتراست نشان داد که این سلول‌ها دارای نمای تاریک و زوائد متعدد سیتوپلاسمی



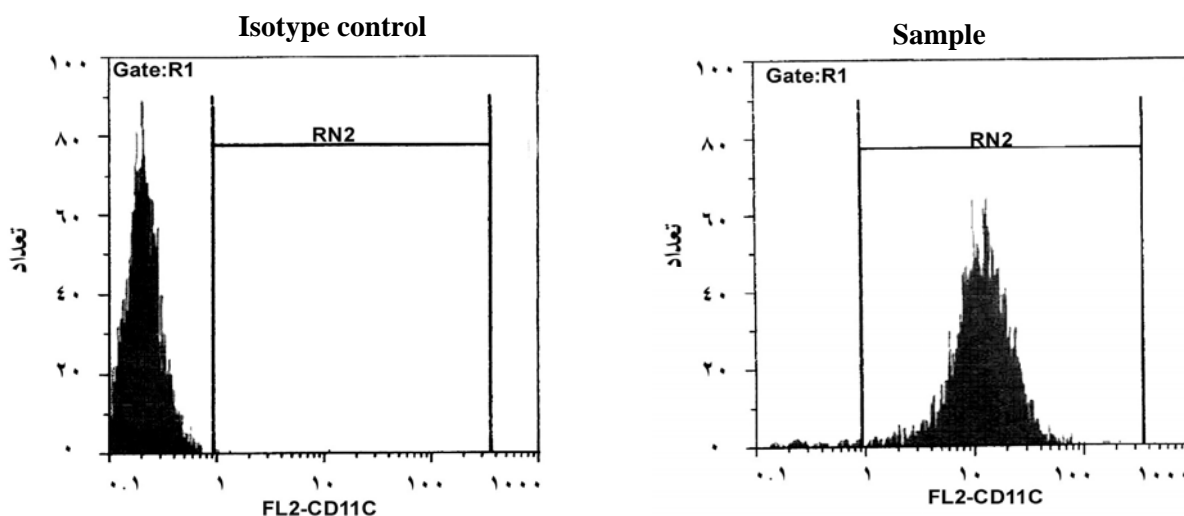
شکل ۱- سلول‌های دندریتیک طحال موش پس از کشت ۲ ساعته و شستشوی سلول‌های غیرچسبان

می‌باشند. بعد از انکوباسیون سلول‌های چسبیده باقیمانده به مدت ۱۸ ساعت، سلول‌های دندریتیک بالغ شده و چسبندگی خود را از دست می‌دهند و در محیط کشت شناور می‌گردند؛ در حالی‌که ماکروفاژها همچنان به سطح پلیت چسبیده باقی ماندند. سلول‌های شناور شده به آرامی جمع آوری شده و به عنوان سلول‌های دندریتیک مورد استفاده قرار گرفتند. میزان بازده سلول‌های دندریتیک حدود  $7 \times 10^6$  سلول به ازای هر طحال بود. بررسی خلوص سلول‌های دندریتیک

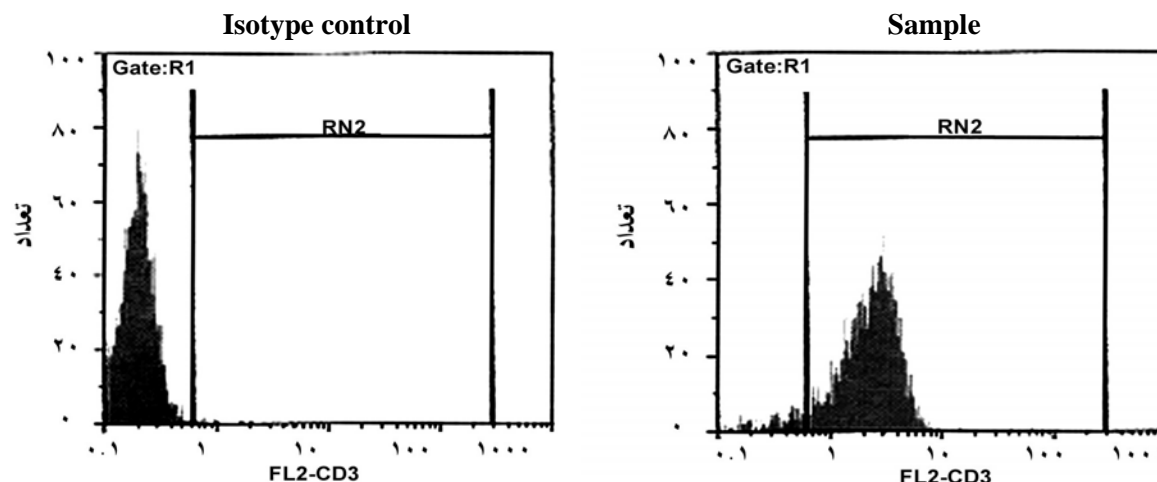
با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD11c نشان داد که خلوص نهایی سلول‌های دندریتیک بیش از ۹۵٪ می‌باشد (نمودار شماره ۱).

ب) جداسازی سلول‌های T از غدد لنفاوی: از غدد لنفاوی اینگوئینال و براکیال حدود  $10^6 \times 20-15$  سلول جدا گردید. بعد از طی مراحل جداسازی لنفوسیت‌های T حدود  $10^6 \times 3-5$  سلول باقی ماند. بررسی فلوسایتمتری این سلول‌ها با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD3 نشان داد که خلوص نهایی لنفوسیت‌های T ۹۰٪-۸۵٪ است (نمودار شماره ۲).

ج) سنجش تکثیر سلولی: به منظور بررسی توانایی سلول‌های دندریتیک موش‌های حامله در القای پاسخ تکثیری سلول‌های T آلورژن، سلول‌های دندریتیک موش‌های مذکور در روز ۱۲ حاملگی تخلیص و در آزمون MLR یکسویه آلورژنیک به کار گرفته شد. همچنین به عنوان گروه کنترل، سلول‌های دندریتیک موش‌های ماده غیرحامله با سن مشابه تخلیص و در آزمون مذکور استفاده گردید. نتایج حاصل نشان داد که توانایی سلول‌های دندریتیک موش‌های حامله (cpm=۳۳۰۰۰) و غیرحامله (cpm=۳۵۰۰۰) از نظر القای پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T آلورژن تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (نمودار شماره ۳).



نمودار ۱- نتایج حاصل از بررسی بروز شاخص CD11c بر سطح سلول‌های دندریتیک خالص شده توسط فلوسایتمتر. میزان خلوص این سلول‌ها ( $CD11c^+$ ) بیشتر از ۹۵٪ می‌باشد.

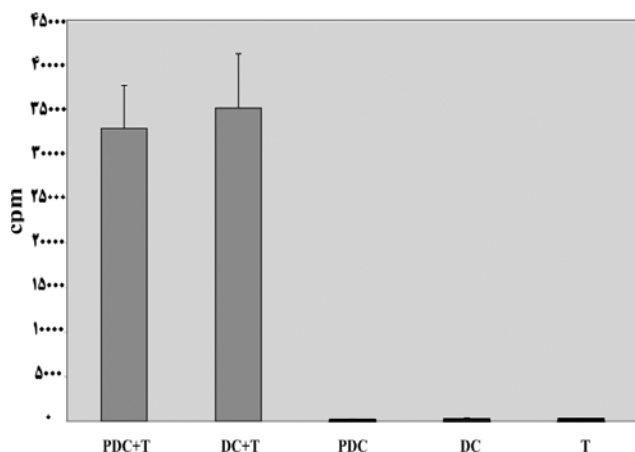


نمودار ۲- نتایج حاصل از بررسی برون شاخص CD3 بر سطح لنفوسیت‌های T خالص شده. میزان خلوص این سلول‌ها ( $CD3^+$ ) بیشتر از ۸۵٪ می‌باشد.

### بحث

پدیده سرکوب ایمنی در طی حاملگی برای سال‌های متمادی محور توجه محققین بوده است (۱۱). جنین یک پیوند نیمه بیگانه است و از این رو انتظار می‌رود که توسط سیستم ایمنی مادر دفع شود (۱۲). علیرغم مطالعات وسیعی که در مورد چگونگی تعدیل ایمنی در طی بارداری جهت جلوگیری از القای پاسخ‌های زیان بار بر علیه جنین صورت گرفته است، هنوز توضیح جامع و کاملی در مورد چگونگی بقا جنین در یک محیط بیگانه ارائه نشده است (۱۳). در سال ۱۹۵۳ Medawar چهار نظریه را در مورد چگونگی پذیرش جنین نیمه بیگانه توسط سیستم ایمنی مادر ارائه داد. در حال حاضر از بین این نظریه‌ها تنها نظریه مربوط به سرکوب سیستم ایمنی مادر در طی حاملگی مورد قبول محققین می‌باشد (۱۴). جنین دارای اجزاء آنتی‌ژنیک متعددی نظیر آنتی‌ژن‌های تروفوبلاست و MHC می‌باشد که می‌توانند به طور بالقوه پاسخ ایمنی مادر را برانگیزند. علاوه بر این مطالعات انجام شده حاکی از آن است که جفت یک سد غیرقابل نفوذ نیست و سلول‌های جنینی می‌توانند وارد گردش خون مادر شوند. بنابراین لازم است که سیستم ایمنی مادر سرکوب و یا تعدیل شود

(۶). در مورد تأثیر حاملگی بر روی عملکرد سلول‌های T، B، NK و سطح سرمی فاکتورهای محلول نظیر کمپلمان یا ایمونوگلوبولین‌ها مطالعات وسیعی صورت گرفته است. در حالی که بسیاری از مطالعات حاکی از کاهش سلول‌های T، B، ایمونوگلوبولین‌ها، اجزاء سیستم کمپلمان و همچنین اختلاف در فعالیت لنفوسیت‌ها می‌باشد، مطالعات متعدد دیگری نیز وجود دارند که تغییرات معنی‌داری را در تعداد و عملکرد این



نمودار ۳- مقایسه قدرت تحریکی سلول‌های دندریتیک موش‌های باردار و غیرباردار در MLR آلوژنیک PDC+T: هم‌کشتی سلول‌های دندریتیک موش‌های باردار و سلول‌های T آلوژن DC+T: هم‌کشتی سلول‌های دندریتیک موش‌های غیرباردار و سلول‌های T آلوژن PDC: سلول‌های دندریتیک موش‌های باردار به تنهایی DC: سلول‌های دندریتیک موش‌های غیرباردار به تنهایی T: سلول‌های T به تنهایی

سلول‌ها گزارش نکرده اند (۱۹-۱۵).

در سطح تماس مادر- جنین فاکتورهای متعددی تولید می‌شوند که بسیاری از آنها دارای اثرات سرکوبگر ایمنی می‌باشند. از آن جمله می‌توان به  $TGF\beta^1$ ،  $IL-10$ ،  $PGE2$ ،  $AFP$  (۳)،  $Tj6$  (۲۰)، اسپرمین (مکابت‌ه شخصی با Beer A)،  $TNF$  (۲۱)، Annexin II (۲۲)،  $DHA$  (۲۳)،  $EPF$  (۲۴) و  $PIBF$  (۲۵) اشاره کرد. علیرغم اینکه این فاکتورها می‌توانند جنبه‌های مختلف سیستم ایمنی را سرکوب کنند ولی بیشترین غلظت آنها در موضع بارداری می‌باشد. بنابراین هرگونه اثرات سیستمیک این فاکتورها احتمالاً ناشی از یک پدیده سرریز است (۳). در هر حال اثرات سیستمیک نه تنها ناشی از تاثیر عوامل مهاری موجود در موضع بارداری است بلکه به دلیل وجود آنتی‌ژنهای جنینی در گردش خون مادر نیز است (۲۶) و تمامی این عوامل در دوره‌های مختلف تکامل جنینی به صورت وابسته به هم عمل می‌کنند و اینگونه نیست که تنها یک عامل به تنهایی این تولرانس را موجب شود (۲۷).

در مورد تأثیر حاملگی بر عملکرد سلول‌های دندریتیک هیچ مطالعه‌ای صورت نگرفته است و از نظر ما این مطالعه اولین گزارش در مورد تأثیر حاملگی بر عملکرد سلول‌های دندریتیک می‌باشد. سلول‌های دندریتیک، سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن می‌باشند. این سلول‌ها تنها سلول‌هایی هستند که می‌توانند پاسخ سلول‌های T دست نخورده را القا نمایند (۲۸، ۲۹). علاوه بر توانایی بسیار بالا در تحریک پاسخ‌های اختصاصی و غیراختصاصی به آنتی‌ژن، زیر گروه‌های مختلف سلول‌های دندریتیک می‌توانند پاسخ لنفوسیت‌های T

- 1- Transforming Growth Factor  $\beta$
- 2- Interlukin 10
- 3- Prostaglandin E2
- 4- Alpha Feto Protein
- 5- Tumor Necrotic Factor
- 6- Docosahexaenoic Acid
- 7- Early Pregnancy Factor
- 8- Progesteron- Induced Blocking Factor

کمک‌کننده را به سمت  $Th_1$  یا  $Th_2$  هدایت کنند. بنابراین به نظر می‌رسد که این سلول‌ها به عنوان مهمترین سلول‌های ایمنی ذاتی، نقش مهمی در ایمونولوژی حاملگی ایفا نمایند (۳۰). در این مطالعه توانایی سلول‌های دندریتیک موشهای حامله و غیرحامله از نظر تحریک تکثیر سلول‌های T آلوژن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که سلول‌های دندریتیک طحال موش‌های حامله و غیرحامله از این نظر تفاوتی با یکدیگر ندارند. این یافته می‌تواند ناشی از کم بودن غلظت فاکتورهای سرکوبگر ایمنی در گردش خون موش‌های حامله باشد؛ ولی محتمل‌تر آن است که جدا کردن سلول‌های دندریتیک از ریزمحیط حاملگی و بلوغ آنها در شرایط *in vitro* بدون حضور فاکتورهای سرکوبگر، عامل اصلی عدم اختلاف در قدرت تحریکی سلول‌های دندریتیک موش‌های حامله و غیرحامله باشد. در طی حاملگی فاکتورهای تولید می‌شوند که می‌توانند بطور بالقوه توانایی عرضه آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک را مختل نمایند. از آن جمله می‌توان به HLA-G محلول (۳۱)،  $IL-10$  و  $PGE2$  اشاره کرد. نکته جالب توجه اینکه این فاکتورها و به ویژه  $IL-10$  و  $PGE2$  عمدتاً بر روی سلول‌های دندریتیک نابالغ تأثیر دارند و پس از بلوغ، این سلول‌ها از فاکتورهای نامبرده متأثر نمی‌شوند (۳۲، ۳۳). با توجه به اینکه سلول‌های دندریتیک تازه جدا شده از طحال نابالغ می‌باشند و کشت در شرایط *in vitro* سبب القا بلوغ این سلول‌ها می‌شود، این احتمال وجود دارد که عدم حضور عوامل سرکوبگر موجود در گردش خون موش‌های حامله، در طی فرایند بلوغ سلول‌های دندریتیک موش‌های حامله در شرایط *in vitro* عامل اصلی عدم اختلاف بدست آمده در این مطالعه باشد. جهت روشنتر شدن مکانیسم این روند انجام تحقیقات تکمیلی از جمله کشت سلول‌های دندریتیک در حضور و عدم حضور سرم موش باردار و بررسی عملکرد

سیستم ایمنی پس از خاتمه دوران بارداری گردند.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس بخاطر تامین بخشی از هزینه انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سرم موش باردار و موش غیر باردار در القاء پاسخ تکثیری در لنفوسیت‌های T ضروری به نظر می‌رسد. در هر حال بنظر نمی‌رسد که عوامل سرکوب کننده دوران بارداری بتوانند باعث ایجاد تغییرات عملکردی بنیادی در سلول‌های دندریتیک طحال و در نتیجه کاهش فعالیت

## References

- 1- Levin R.W., Aoki K., Azuma T., Yagami Y., Okada H. Human pregnancy serum suppresses the proliferative response of lymphocytes to outo- logous PHA-activated T lymphoblasts. *Am J Reprod Immunol.*1996;35:63-69.
- 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;12:731-737.
- 3- Heyborn K., Silver R. Immunology of post-implantation Pregnancy: In *Reproductive immunology.* Bronson R.(Editor),1996.
- ۴- مصفا نریمان، زرنانی امیرحسن، زهیرمحمد حسن. ایمونوبیولوژی حاملگی طبیعی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی(۱۳۸۲)، فصل ششم، صفحات: ۱۸۱-۱۶۴.
- 5- Darmochwal- Kolarz D., Rolinski J., Tabarkiewicz J., Leszczynska- Goyzelak B., Buczkowski J., Wojas K., Oleszczuk J. Blood myeloid and lymphoid dendritic cells are stable during the menstrual cycle but dificient during mid-gestation. *J Reprod Immunol.*2003;59: 193-203.
- 6- Luppi P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine.*2003;21: 3352-3357.
- 7- Sacks G., Sargent I., Redman Ch. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today.* 1999;20:114-118.
- 8- Vermec D., Zorbas M., Scollay R., Saunders D. J., Ardavin C.F., Wu L., Shortman K. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen, Investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med.*1992;176:47-58.
- 9- Litvin D., Rosenstreich D. Separation of lymphoid cells on nylon wool columns. *Meth Enzymol.*1984;108:298-302.
- 10- Crowley M.T., Inaba K., Witmer-Pack M.D., Gezelter S., Steinman R.M. Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen. *J Immunol Meth.*1990;133:55-66.
- 11- Matthiesen L., Berg G., Ernerudh J., Hakansson L. Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol.*1996;35:70-79.
- 12- Erlebacher A. Why isn't the fetus rejected. *Curr Opin Immunol.*2001;13:590-593.
- 13- Yokoyama W.M. The mother-child union: The case of missing- self and protection of the fetus. *Proc Acad Sci USA.*1997;94:5998-6000.
- 14- Mellor A.L., Munn D.H. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:367-391.
- 15- Sridama V., Pacini F., Yang S.L. Decreased levels of T helper cells: a possible cause of immunodeficiency in normal pregnancy. *N Engl J Med.*1982;307:365-367.
- 16- Moore M.P., Carter N.P., Redman C.W. Lymphocyte subsets in normal and pre- eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.*1983;90:326-331.
- 17- Tallon D.F., Corcoran D.J., Odwyer E.M., Grealley J F. Circulating lymphocyte subpopula- tion in pregnancy, a longitudial study. *J Immunol.* 1984;132:1784-1787.
- 18- Gonik B., Loo L.S., West S. Natural killer cell cytotoxicity and antibody-dependent cellular cyto- toxicity to herpes simplex virus-infected cells in human pregnancy. *Am J Reprod Immunol Microbiol.*1997;13:23-26.
- 19- Kovar I.Z., Riches P.G. C3 and C4 comple- ment components and acute phase proteins in late pregnancy and parturition. *J Clin Pathol.*1988;41:



650-652.

20- Kang J.A., McBey B.A., Angkachatchai V., Croy B.A., Beaman K.D. Expression of Tj6 during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1997;38:183-187.

21- Amtzen K.J., Liabakk N.B., Jacobsen G., Espevik T., Austgulen R. Soluble tumor necrosis factor receptor in serum and urine throughout normal pregnancy and at delivery. *Am J Reprod Immunol.* 1995;34:163-169.

22- Aari A., Kristofferson E.K., Jensen T.S., Ulvested E., Matre R. Suppressive effect on lymphoproliferation in vitro by soluble annexin II released from isolated placental membranes. *Am J Reprod Immunol.* 1997;38:313-319.

23- Khair-el-din T.A., Sicher S.C., Vazquez M.A., Lu C.Y. Inhibition of macrophage nitric-oxide production and Ia- expression by docosahexaenoic acid, a constituent of fetal and neonatal serum. *Am J Reprod Immunol.* 1996;36:1-10.

24- Morton H. Early pregnancy factor: An extracellular chaperonin 10 homologue. *Immunol Cell Biol.* 1998;76:483-496.

25- Kelemen K., Paldi A., Tinneberg H., Torok A., Szekeres-Bartho J. Early recognition of pregnancy by the maternal immune system. *Am J Reprod Immunol.* 1998;39:351-355.

26- Invernizzi P., Battezzati P.M., Podda M., Simoni G. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy: further comments. *Hum Genet.* 2002;110(6):587-91.

27- Thellin O., Heinen E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicol.* 2003;185(3):179-84.

28- Banchereau J., Briere F., Caux Ch., Davoust J., Lebecque S., Liu Y., Pulendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.

29- Gad M., Claesson M.H., Pedersen A.E. Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. *APMIS.* 2003;111(7-8):766-75.

30- Yoshimura T., Inaba M., Sugiura K., Nakajima T., Ito T., Nakamura K., Kanzaki H., Ikehara S. Analysis of dendritic cell subsets in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50:137-145.

31- Le Friec G., Laupeze B., Fardel O., Sebti Y., Pangault C., Guilloux V., Beauplet A., Fauchet R., Amiot L. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell- triggered allogeneic T- cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol.* 2003;64:752-61.

32- Steinbrink K., Wolf M., Jonuleit H., Knop J., Enk A.H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:4772-80.

33- Kalinski P., Schuitemaker J.H., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998;161:2804-9.