بیان گیرنده داخل هسته‌ای ۱و۲۵- دی هیدروکسی ویتامین D3 در اندام های تولید مثل موش در طی سیکل استروس

مهدی شهبازی (B.Sc.)[۱]، امیر حسن زرنانی (D.M.T., Ph.D.)[۲،۳،۶]، علیرضا سالک مقدم (Ph.D.)[۱]، فروزان کریمی (Ph.D.)[۴]، جمیله قاسمی (B.Sc.)[۲]، گلناز انسیه کاظمی صفت (B.Sc.)[۲]، علی مروج (B.Sc.)[۱]، محمد مهدی آخوندی (Ph.D.)[۲]، محمود جدی تهرانی (Ph.D.)[۵]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران.

٤- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.

٥- مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

٦- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: فرم فعال ویتامین D (۱و۲۵ دی‌هیدروکسی ویتامین D3) دارای اثرات مهم بر سیستم‌های تولید مثل و ایمنی می‌باشد. فعالیت این هورمون از طریق گیرنده آن (VDR) اعمال می‌شود. هورمون‌های مختلف از جمله استروژن سنتز این گیرنده را کنترل می‌کنند. در این مطالعه بیان گیرنده ویتامین D3 در اندام‌های تولیدمثل موش‌های ماده طی فازهای مختلف سیکل استروس مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی: فازهای سیکل استروس موش‌های ماده Balb/c شامل پرواستروس، مت‌استروس، استروس و دی‌استروس از طریق بررسی سیتولوژی اسمیر واژینال تعیین گردید. در هر فاز پس از نخاعی کردن حیوان، بافت آندومتر جدا و بیان ژن VDR به روش RT-PCR نیمه کمی مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین بیان پروتئین VDR در آندومتر، تخمدان و لوله‌های فالوپ موش‌های مذکور به روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

نتایج: نتایج این پژوهش نشان داد که ژن VDR در تمام فازهای سیکل استروس موش در آندومتر بیان می‌شود. میزان بیان این ژن طی فاز استروس به طور معنی‌داری بیشتر از سایر فازها بود ($p<۰۰۱$). مطالعه ایمونوهیستوشیمی نشان داد که اکثر سلول‌های آندومتر شامل سلول‌های استرومایی و به‌ویژه سلول‌های اپی‌تلیال‌لومینال و غددی، سلول‌های اپی‌تلیال لوله فالوپ و همچنین سلول‌های Cumulus oophorus، Techa interna و Techa externa تخمدان پروتئین VDR را بیان می‌کنند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه در جوندگان، نظیر موش جفت‌گیری فقط در فاز استروس انجام می‌شود و همچنین با توجه به نقش ویتامین D3 در تعدیل سیستم ایمنی، افزایش بیان VDR در بافت آندومتر طی فاز سیکل استروس می‌تواند یکی از راه کارهای اصلی در جهت تعدیل پاسخ‌های ایمنی مادر برعلیه آنتی‌ژن‌های اسپرم باشد.

کلید واژگان: گیرنده ویتامین D3، آندومتر، رحم، تخمدان، لوله فالوپ، سیکل استروس، موش.

مسئول مکاتبه: دکتر محمود جدی‌تهرانی، گروه ایمونولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mahjed@avicenna.ac.ir

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

سالها پیش فرم فعال ویتامین D_3 ($1,25(OH)\ 2D_3$) به‌عنوان هورمون ضروری در هموستاز مواد معدنی و متابولیسم استخوان معرفی شد. این ویتامین در بعضی از غذاها مانند روغن ماهی یافت می‌شود؛ اما بخش عمده آن در پوست و تحت تأثیر اشعه فرا بنفش نور خورشید ساخته می‌شود (۱). بیشترین تأثیرات بیولوژیکی شناخته شده ویتامین D3 بوسیله گیرندهٔ آن (VDR) میانجیگری می‌شود. VDR یکی از گیرنده‌های هسته‌ای هورمونها می‌باشد. متصل شدن ویتامین D3 به VDR شکل فضایی آن را تغییر می‌دهد و باعث هتروداریمر شدن این گیرنده با گیرندهٔ رتینوئید X (RXR) می‌شود. اتصال این کمپلکس به پروموتر ژن‌های پاسخ‌دهنده ویتامین D3 موجب نسخه‌برداری RNA پلیمراز ۲ از ژن می‌گردد (۱). تنظیم بیان VDR یکی از مکانیزم‌های اصلی سلول‌های هدف برای پاسخگویی به ویتامین D3 می‌باشد. فعالیت بیولوژیک ویتامینD3 به طور مستقیم به میزان بیان VDR در بافت بستگی دارد (۲،۳). ساخته شدن VDR به نوبه خود توسط ویتامین D3 و چند هورمون دیگر شامل اسید رتینوئیک (٤)، گلوکوکورتیکوئیدها (۲،٦) و استروژن (۷) تنظیم می‌گردد. تعداد مولکول‌های VDR بافت همچنین تحت شرایط فیزیولوژیک مختلف نظیر حاملگی (۳،۸)، شیردهی (۹) و میزان کلسیم موجود در مواد غذایی (۱۰) تغییر می‌یابد.

هورمون‌های استروئیدی از تنظیم‌کننده‌های اصلی بیان VDR می‌باشند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که استروژن میزان بیان VDR را به نحو قابل توجهی افزایش می‌دهد. یائسگی (۱۱) و برداشتن تخمدان (۱۲) با کاهش استروژن و جذب کلسیم از روده‌ها همراه است. از طرف دیگر کاهش جذب کلسیم فقط ناشی از کاهش سطح سرمی ویتامین D3 نیست و به نظر می‌رسد که یائسگی و یا برداشتن تخمدان از طریق کاهش بیان VDR به مقاومت در برابر ویتامین D_3 منجر می‌گردد (۱۳،۱٤). علاوه بر کلیه‌ها و روده که بافت‌های هدف ویتامین D3 به شمار می‌روند، بسیاری از بافت‌های دیگر بدن بواسطه بیان VDR تحت تاثیر این هورمون قرار می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به سلول‌های جزیره‌ای پانکراس، کراتینوسیت‌های پوست، تخمدان، اپی‌تلیوم پستان، سلول‌های اپی‌دیدیم، بافت عصبی، تیموس، غده پاراتیروئید، سلول‌های اسپرماتوگونی، پروستات، آندومتر و سلول‌های ایمنی اشاره کرد (۲۰-۱،۱۵).

مطالعات اخیر نقش ویتامین D3 را در تولیدمثل نشان داده‌اند. یافته‌های Panda و همکاران نشان می‌دهد که فقدان ژن ۱- آلفا هیدروکسیلاز به عنوان تنها آنزیم مسئول سنتز فرم فعال ویتامین D3 با اختلالات متعدد تولید مثلی نظیر ناباروری، فقدان کورپوس لوتئوم و هیپر پلازی رحم همراه است (۲۱). فقدان VDR نیز سبب بروز مشکلات مشابه می‌گردد (۲۲). کمبود ویتامین D3 همچنین سبب کاهش تعداد جنینها در جوندگان می‌شود (۲۳،۲٤). جالب توجه این که کاهش باروری به طور اختصاصی ناشی از کاهش ویتامین D3 است و به کمبود سطح خونی کلسیم ارتباطی ندارد؛ چرا که تأمین کلسیم موش‌های دارای کمبود ویتامین D3 سبب رفع نقص تولید مثل نمی‌شود (۲٤). از طرف دیگر اختلالات باروری در موش‌های دچار کمبود ویتامین D3 براحتی با تجویز ویتامین D3 اصلاح می‌گردد (۲٤).

ویتامین D_3 همچنین دارای اثرات متعددی بر سیستم ایمنی بدن می‌باشد و گیرنده این هورمون در بسیاری از سلول‌های ایمنی شامل ماکروفاژ، سلول‌های دندریتیک، سلول‌های NK و لنفوسیت‌های T بیان می‌شود. سلول‌های دندریتیک هدف اصلی تنظیم ایمنی به وسیله ویتامین D3 می‌باشند؛ چنانچه این هورمون سبب اختلال در بلوغ و تمایز این سلولها شده و بیان

Downloaded from http://www.jri.ir

MHC-II، مولکول‌های کمک تحریکی و سایتوکاین‌های التهابی نظیر IL-12 را کاهش می‌دهد (۱۷). مهار تکثیر لنفوسیت‌های T (۲۵،۲۶)، شیفت پاسخ‌های سیتوکاینی به سمت Th2 (۲۵،۲۷) و سرکوب سلول‌های کشنده طبیعی (۲۸) از جمله اثرات تنظیم‌کنندگی ایمنی ویتامین D3 به شمار می‌روند. با توجه به نقش سلول‌های دندریتیک در استقرار تحمل ایمونولوژیک مادر علیه جنین (۲۹،۳۰) و همچنین افزایش فعالیت سلول‌های NK و پاسخ‌های سیتوکاینی Th1 در سقط جنین (۳۱،۳۲)، به نظر می‌رسد که ویتامین D3 می‌تواند از طریق تعدیل پاسخ‌های ایمنی به استقرار یک حاملگی موفق کمک کند. مطالعه اخیر توسط Bubanovic (۳۳) نشان می‌دهد که ویتامین D3 دارای اثرات درمانی موثر در زنان مبتلا به سقط مکرر می‌باشد.

با توجه به نقش غیر قابل انکار ویتامین D3 در باروری، تاثیرپذیری بیان VDR از هورمون‌های استروئیدی جنسی و همچنین عملکرد موثر آن در القاء تحمل ایمونولوژیک مادر بر علیه جنین، در این مطالعه بیان VDR در رحم، تخمدان و لوله‌های فالوپ موش‌های Balb/c در فازهای مختلف سیکل استروس مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

حیوانات مورد مطالعه: در این پژوهش از موش‌های همخون[1] ماده نژاد Balb/c با سن ۱۲-۸ هفته (انستیتوپاستور، ایران) استفاده شد و کلیه آزمایش‌های انجام شده روی این حیوانات توسط کمیته اخلاق در پژوهش پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا تأیید گردید.

تعیین فازهای سیکل استروس: از هر موش یک اسمیر مرطوب واژینال تهیه شد. برای این کار حدود ۲۰μl از PBS[2] استریل برای شستشوی واژن استفاده شد. با توجه به مورفولوژی سلولها و نسبت لوکوسیتها و سلول‌های اپی‌تلیال، موشها در یکی از چهار فاز پرواستروس، استروس، مت‌استروس و دی‌استروس طبقه‌بندی شدند.

استخراج RNA از نمونه های بافتی: پس از تعیین فاز سیکل استروس و نخاعی کردن موشها، شاخ‌های رحمی آنها در شرایط استریل جدا شدند. شاخ رحمی سمت چپ به‌دقت با PBS استریل شسته و از محور آنتی‌مزومتریال باز شد. بافت آندومتر توسط تیغ جراحی به آرامی و با دقت تراشیده و بافت به‌دست آمده بلافاصله وارد میکروتیوب‌های حاوی محلول RNA-Bee (Biosite, Sweden) شد و توسط Pellet Pestle (Sigma, USA) کاملاً یکنواخت گردید. همچنین به عنوان کنترل مثبت، کلیهٔ یکی از موشها جدا و در محلول RNA-Bee قرار داده و سپس کلروفرم (۱۰٪ حجمی) به آن اضافه و به شدت تکان داده شد. میکروتیوبها پس از ۵ دقیقه انکوبه شدن در مجاورت یخ، با دور ۱۸۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ $^{\circ}C$ سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به آرامی جمع آوری شد و با حجم مساوی از ایزوپروپانول مخلوط گردید. مخلوط حاصل حداقل به مدت یک ساعت در فریزر ۲۰- $^{\circ}C$ قرار داده شد و پس از آن با دور ۱۸۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ $^{\circ}C$ سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی خارج و ۱ml اتانل ۷۵٪ به هر میکروتیوب افزوده شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خارج و توده RNA خشک گردید. پس از اضافه کردن ۵۰-۲۰μl آب مقطر استریل، میکروتیوبها در دمای ۲۰- $^{\circ}C$ منجمد شدند. در هر مرحله کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز با ژل آگارز بررسی گردید.

تهیه cDNA[3]: ۱۰μl از RNA به مدت ۷ دقیقه در دمای ٦٥ $^{\circ}C$ حرارت داده شد و بلافاصله روی یخ منتقل گردید. سپس مخلوطی شامل Reaction Buffer (5x)

1- Inbred
2- Phosphate Buffered Saline
3- Complementary DNA

Downloaded from http://www.jri.ir

(Fermentase, Lithuania)، ۲*mM* از مخلوط dNTP (Roche,Germany)، ۲*mM* از Random-Hexamer (Cybergene, Sweden) و آنزیم رونویسی معکوس M-MuL (Fermentase, Lithuania) با غلظت نهایی ۲۰*U/µl* تهیه و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰µ*l*رسید و به RNA اضافه شد. میکروتیوبها با حجم نهایی ۲۰*µl* در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ٤٢ ℃ قرار داده شدند و در نهایت cDNA حاصل در فریزر در دمای ۲۰- ℃ نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[1]: مخلوطی شامل بافر (10x) PCR، $MgCl_2$ (۲/۵*mM*) برای GAPDH و ۲*mM* برای VDR)، ۰/٤*mM* از مخلوط dNTP و Taq DNA Polymerase (Roche, Germany) با غلظت نهایی ۰/۰٤*U/µl* تهیه گردید. سپس زوج پرایمر GAPDH با غلظت نهایی ۱۰*mM* یا زوج پرایمر VDR با غلظت نهایی ٥*mM* اضافه شد. پس از اضافه کردن ۱*µl* از cDNA، واکنش PCR در شرایط حرارتی زیر انجام گردید:

GAPDH: ٩٤ ℃ به مدت ۲ دقیقه سپس ۳۰ سیکل شامل: ٩٤ ℃ به مدت ۳۰ ثانیه، ٦٠ ℃به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ ℃ به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن ۷۲ ℃ به مدت ۷ دقیقه.

VDR: ٩٤ ℃ به مدت ۲ دقیقه سپس ۳٥ سیکل شامل: ٩٤ ℃ به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٩ ℃ به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ ℃ به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن ۷۲ ℃ به مدت ۷ دقیقه. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ آمده است.

پرایمرهای VDR یک قطعه ۱٥٥bp و پرایمرهای GAPDH یک قطعه ۳۰۹bp را تکثیر می‌دهند. آنزیم GAPDH که یکی از آنزیم‌های ضروری سیکل کربس است و در تمامی سلولها بیان می‌شود[2] به عنوان کنترل مثبت داخلی[3] استفاده شد. به عنوان کنترل مثبت بیان VDR از cDNA تهیه شده بافت کلیه موش استفاده شد. در نمونه‌های کنترل منفی، cDNA با آب غیر یونیزه جایگزین گردید.

الکتروفورز ژل آگارز و دانسیتومتری: محصول PCR ژن‌های GAPDH و VDR به‌طور همزمان به یک چاهک اضافه و الکتروفورز شد. باندهای حاصل توسط دستگاه U.V Trans illuminator (UVP, USA) مشاهده و عکسبرداری شدند. سپس توسط نرم افزار Alpha Ease، دانسیته باندها محاسبه و نسبت دانسیته VDR به GAPDH بدست آمد (جدول ۲).

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی: بافت‌های رحم، تخمدان و لوله‌های فالوپ ۲۰ موش (از هر یک از فازهای سیکل استروس ٥ موش) و کلیه موش (به عنوان کنترل مثبت) با چسب فروزن (Jung, Denmark) قالب‌گیری شد. پس از تهیه برش‌هایی به ضخامت ٥*µm* و انتقال بافتها بر روی لام، مراحل زیر به ترتیب انجام شد: خشک کردن (۱ ساعت در دمای اتاق)، ثابت کردن (۲ دقیقه در استون سرد)، مشخص کردن محدوده بافت با Wax Pen (Dako, Denmark)، سه بار شستشو با بافر ۰/۱٪ TBS-BSA[4] هر یک به مدت ۳ دقیقه، بلاکینگ با سرم بز (۱:۲۰ رقیق شده با TBS به مدت ۱۰ دقیقه)، بلاکینگ بیوتین درون‌زا با محلول‌های اویدین و بیوتین به مدت ۲۰ دقیقه (Dako, Denmark)، سه بار شستشو، آنتی‌بادی منوکلونال ضد گیرنده ویتامین D (Neomarkers, Sweden) با غلظت ۲/٥*µg/ml* به مدت ۹۰ دقیقه، سه بار شستشو، پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه، سه بار شستشو، آنتی‌بادی Goat Anti Rat- Biotin (BD pharmingen, USA) با رقت ٥*µg/ml* به مدت ٤٥ دقیقه، سه بار شستشو، اضافه کردن استرپ اویدین کونژوکه با HRP با رقت ۱/٥۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه، کروموژن DAB (3,3'-diaminobenzide

1- Polymerase Chain Reaction
2- House Keeping Gene
3- Internal Control Sequence
4- Tris Buffered Saline-bovine serum albumin

Downloaded from http://www.jri.ir

(tetrahydrochloride Germany, Roche)، توقف واکنش با آب، رنگ‌آمیزی زمینه با هماتوکسیلین هاریس، آبگیری با درجات فزاینده اتانل و مانته کردن با چسب Enthelan (Merck, Germany) به لام‌های کنترل منفی آنتی‌بادی اولیه اضافه نشد.

آزمون‌های آماری: در هر فاز سیکل استروس ٦-٤ موش مورد بررسی قرار گرفت. نسبت دانسیته باند VDR و GAPDH در هر فاز با استفاده از آزمون ANOVA مقایسه گردید. $p<۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار درنظر گرفته‌شد. میانگین نتایج به‌صورت Mean±SD گزارش گردید.

نتایج

تعیین فاز سیکل استروس: بر اساس سیتولوژی اسمیر واژینال، موشها در یکی از چهار فاز پرواستروس، استروس، مت‌استروس و دی استروس قرار گرفتند.

تکثیر رونوشت ژن‌های VDR و GAPDH به روش RT-PCR: آنزیم GAPDH یکی از آنزیم‌های ضروری سیکل کربس است که برای سلولها حیاتی است و در تمامی سلولها (بجز چند مورد استثناء) بیان می‌شود. به همین دلیل از آن به عنوان کنترل مثبت داخلی جهت بررسی صحت مراحل نمونه‌گیری، استخراج RNA، تهیه cDNA و واکنش RT-PCR و همچنین جهت مقایسه میزان بیان ژن VDR در فازهای مختلف سیکل استروس استفاده شد.

قطعه 309bp مربوط به mRNA آنزیم GAPDH و نیز قطعه ۱۵۵bp مربوط به VDR بجز کنترل منفی، در تمام نمونه‌های بافت آندومتر تکثیر یافت. به این ترتیب

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژنهای VDR و GAPDH

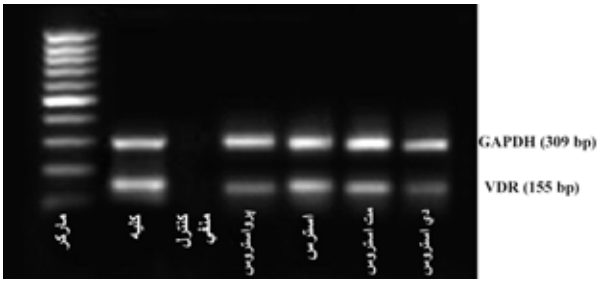
نام قطعه ژنی	نام پرایمر	توالی
VDR		
	F_1	5-GAG-GTG-TCT-GAA-GCC-TGG-AG-3′
	R_1	5′-ACC-TGC-TTT-CCT-GGG-TAG-GT-3′
GAPDH		
	F_2	5′-CAG-GAG-CGA-GAC-CCC-ACT-A-3′
	R_2	5′-GGC-ATG-GAC-TGT-GGT-CAT-GA-3′

جدول ۲- نسبت دانسیتی باند VDR به GAPDH در فاز های مختلف سیکل استروس موش ماده Balb/c

نام فاز	نسبت دانسیتهٔ VDR به GAPDH در موش های مختلف						میانگین± انحراف معیار
پرواسترس	۰/۵	۰/۵٦	۰/۲۵	۰/٤۳	۰/۳۷	--	۰/٤۲±۰/۰۱
استروس	۰/۷۲	۰/٦	۰/۷۰	۰/۹٦	۰/٦٥	۰/۷۷	۰/۷۳±۰/۰۱
مت‌استروس	۰/٤۳	۰/٤۹	۰/٤۷	۰/٥۳	--	--	٤۸±۰/۰٤
دی‌استروس	۰/۳٥	۰/۲٤	۰/۲۹	۰/۲٥	--	--	۰/۲۸±۰/۰٥

مشخص شد که ژن VDR در بافت آندومتر موش‌های ماده Balb/c در تمامی فازهای سیکل استروس بیان می‌شود (شکل ۱). دانسیتی باند VDR و GAPDH در هر موش اندازه‌گیری و میانگین نسبت دانسیتی باند VDR وGAPDH در هر فاز محاسبه گردید. نسبت دانسیتی باند VDR به GAPDH در فازهای پرواستروس، استروس، مت استروس و دی استروس به ترتیب ۰/٤۲±۰/۰۱، ۰/۷۳±۰/۰۱، ۰/٤۸±۰/۰٤ و۰/۲۸±۰/۰٥ بود. این نسبت در فاز استروس به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) نسبت به سایر فازها بیشتر بود.

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی: به منظور بررسی میزان بیان پروتئین VDR در قسمت‌های مختلف رحم، تخمدان و لوله‌های فال وپ در فازهای مختلف سیکل استروس، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد پروتئین VDR در تمامی بافت‌های تولید مثل موش‌های ماده Balb/c شامل رحم،

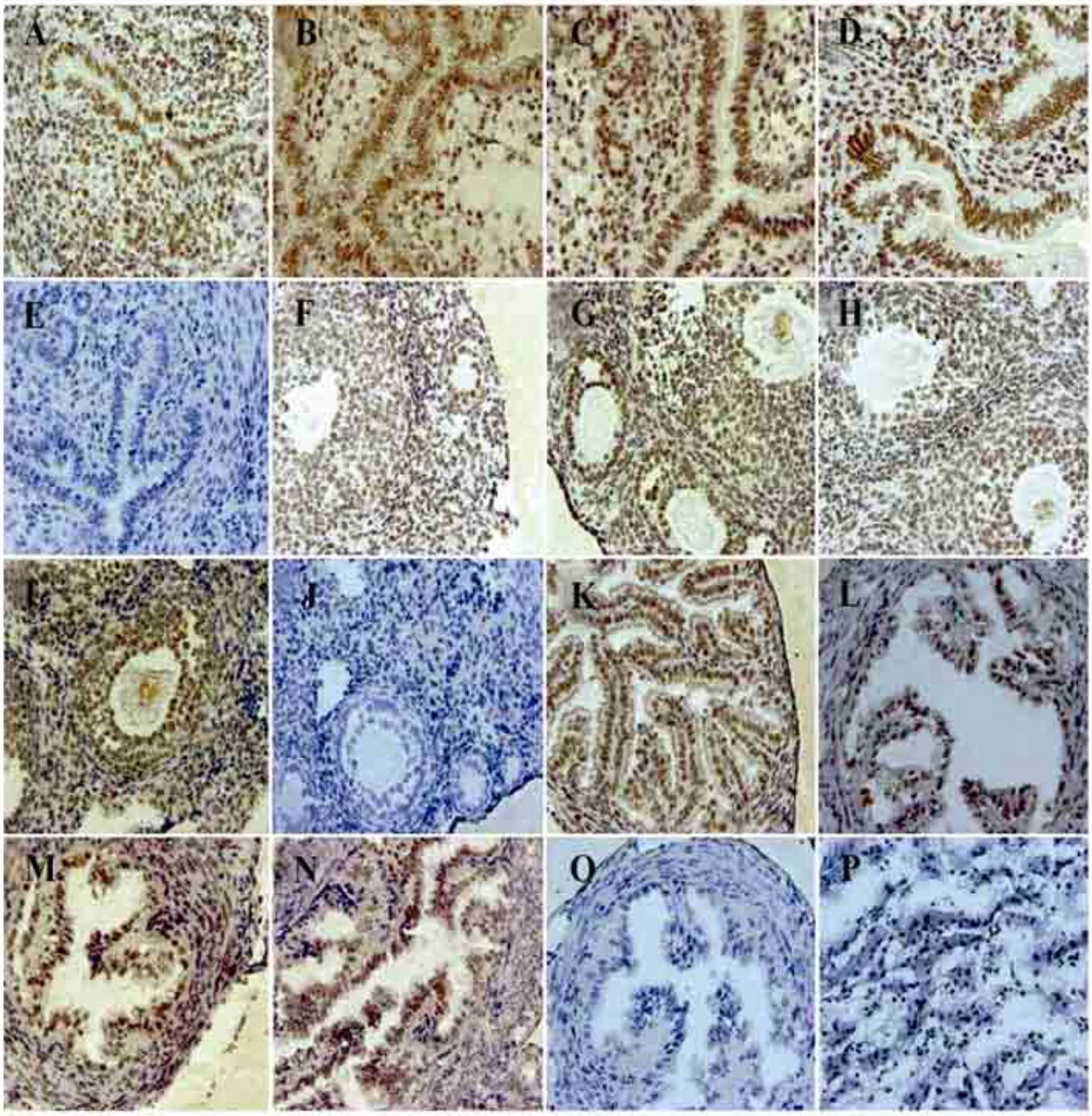


شکل ۱- بیان VDR و GAPDH در آندومتر موش‌های Balb/c طی فازهای مختلف سیکل استروس با استفاده از تکنیک RT-PCR. آندومتر موش‌های ماده Balb/c در فازهای مختاف سیکل استروس جدا و بیان نسبی گیرنده ویتامین D (VDR) به روش RT-PCR نیمه کمی و با استفاده از GAPDH به عنوان استاندارد داخلی بررسی شد. در نمونه کنترل منفی بجای cDNA آب غیریونیزه در واکنش PCR استفاده شد.

Downloaded from http://www.jri.ir

تخمدان و لوله‌های فالوپ طی فازهای مختلف سیکل استروس بیان می‌شود (شکل ۲).

در فازهای پرواستروس و دی استروس اکثر سلول‌های ناحیه پری‌متر منفی بودند؛ اما در فاز مت استروس تعداد سلول‌های مثبت افزایش یافت و در فاز استروس اکثر سلول‌های این ناحیه مثبت بودند. الگوی مشابهی



شکل ۲- بررسی بیان گیرنده ویتامین D3 در ارگانهای تولیدمثل موش‌های ماده به روش ایمونوهیستوشیمی. رحم، تخمدان و لوله‌های فالوپ موش‌های ماده Balb/c در فازهای مختلف سیکل استروس پس از برش فروزن با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد گیرنده ویتامین D3 به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. A-D: آندمتر به ترتیب در فازهای پرواستروس، استروس، مت استروس و دی استروس، E: کنترل منفی آندومتر، F-I: تخمدان به ترتیب در فازهای پرواستروس، استروس، مت استروس و دی استروس، J: کنترل منفی تخمدان، K-N لوله فالوپ به ترتیب در فازهای پرواستروس، استروس، مت استروس و دی استروس، O: کنترل منفی لوله فالوپ P:کنترل مثبت کلیه.

Downloaded from http://www.jri.ir

در میومتر رحم مشاهده گردید. اکثر سلول‌های استرومای رحم در فازهای سیکل استروس مثبت بودند؛ (شکل ۲:A-D) ولی میزان بیان VDR در فاز استروس (شکل ۲: B) نسبت به سایر فازها بیشتر بود. همچنین تعداد سلول‌های بیان کننده VDR نیز در استرومای رحم در فاز استروس بیشتر بود (شکل ۲: B). در تمام فازها، سلول‌های اپی‌تلیال لومینال و غددی VDR را به مقدار بالا بیان می‌کردند؛ ولی شدت بیان در فاز استروس بیش از سایر فازها بود. نکته جالب اینکه لنفوسیت‌های بین اپی‌تلیالی از نظر بیان VDR منفی بودند.

ایمونوهیستوشیمی تخمدان نشان داد که اکثرسلول‌های تخمدان شامل Cumulus oophorus، Techa interna، Techa externa و سلول‌های گرانولوزا و همچنین استرومای تخمدان و Corpus luteum در فازهای مختلف سیکل استروس VDR را بیان می‌کنند (شکل ۲: F-I). ولی شدت بیان در فاز استروس در تمامی سلول‌های مورد مطالعه بیش از سایر فازها بود. سلول‌های اپی‌تلیال لوله فالوپ VDRرا به شدت بیان می‌کردند (شکل ۲: K-N) و سلول‌های عضلانی لوله‌های فالوپ در فازهای مختلف سیکل استروس تا حدی VDR را بیان می‌کنند؛ ولی میزان بیان در فاز استروس بیشتر بود. در تمامی بافت‌های مورد مطالعه، میزان بیان VDR در سلول‌های اپی‌تلیال در مقایسه با سایر سلولها به نحو قابل توجهی بیشتر بود. الگوی بیان VDR در تمامی بافت‌های مورد مطالعه عمدتاً داخل هسته‌ای بود.

در مجموع، این یافته‌ها موید نتایج RT-PCR بود و نشان داد که میزان بیان VDR در رحم طی فاز استروس به مراتب بیش از سایر فازهای سیکل استروس می‌باشد.

بحث

ایمنی مخاطی در مجاری تناسلی ماده[1] (FRT) تحت کنترل هورمون‌های جنسی است. این هورمونها انتقال ایمونوگلوبولینها، توزیع سلول‌های ایمنی و عرضه آنتی‌ژن در مجرای تناسلی را طی سیکل ماهیانه تنظیم می‌کنند (۳۶-۳٤). علاوه بر محافظت در برابر عوامل عفونی، سیستم مخاطی مجرای تولیدمثل ماده مسئول باروری، لانه‌گزینی، حاملگی و زایمان نیز می‌باشد. تعادل ایمونولوژیک در این موضع جهت مبارزه با باکتریها، قارچها و ویروسها از یک سو و القاء تحمل ایمونولوژیک در برابر جنین نیمه بیگانه از سوی دیگر عمدتاً از طریق هورمون‌های جنسی انجام می‌شود. اختلاف عمده FRT با سایر سطوح مخاطی برخورد با باکتریها و ویروس‌های منتقل شونده از راه تماس جنسی، اسپرم آلوژن و همچنین جنین نیمه بیگانه است (۲۸-۳٦).

اگر چه سیتوکاینها، کموکاینها و هورمون‌های استروئیدی جنسی قسمت اعظم تنظیم کننده‌های سیستم ایمنی را در FRT تشکیل می‌دهند؛ ولی اخیراً نقش سایر هورمونها به‌ویژه ویتامین D3 در تنظیم ایمنی سیستم مخاطی تولید مثل مورد توجه محققین قرار گرفته است (۳۹). اثرات بیولوژیک ویتامین D3 پس از اتصال به گیرنده اختصاصی آن اعمال می‌شود.

ویتامین D3 به عنوان یک ایمونومدولاتور قوی هر دو سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱٦). علیرغم مهار و سرکوب سیستم ایمنی اکتسابی، ویتامین D3 ظرفیت کموتاکسی و فاگوسیتوز بیگانه‌خواری را به نحو قابل توجهی افزایش می‌دهد (٤۰). جالب توجه این که کمبود ویتامین D3 سبب افزایش خطر ابتلا به باکترهای درون سلولی نظیر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌شود (٤۱).

1- Female Reproductive Tract

Downloaded from http://www.jri.ir

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گیرنده ویتامین D3 در تمامی فازهای سیکل استروس در آندومتر، تخمدان و لوله فالوپ بیان می‌شود. بیان VDR در طی فازهای مختلف سیکل استروس نشان‌دهنده اهمیت فعالیت بیولوژیک ویتامین D3 در بافت‌های مذکور می‌باشد. بیان VDR در بافت‌های مذکور می‌تواند سبب تقویت ایمنی ذاتی موضع بارداری گردد. این امر در کنترل عفونت‌های موضعی رحم و انتقال عفونت از مادر به جنین جلوگیری می‌کند. عفونت‌های دستگاه تناسلی ماده از بیماری‌های شایع زنان است و تمام بافت‌های مرتبط شامل واژن، سرویکس، رحم، لوله‌های فالوپ و حتی تخمدانها را درگیر می‌کند.

از سوی دیگر ویتامینD3 و اثرات بیولوژیک ناشی از آن در فیزیولوژی بارداری نیز حائز اهمیت فراوان است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که موش‌های فاقد ویتامینD3 و یا VDR در اکثر موارد نقص در تولید مثل دارند (۲۴-۲۲). بنابراین بیان VDR در FRT زمینه را برای باروری مهیا می‌کند.

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که بیان VDR هم در سطح ژن و هم در سطح پروتئین در فاز استروس به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در جوندگان جفت‌گیری فقط در فاز استروس انجام می‌شود و بافت مخاطی واژن و رحم با طیف وسیعی از آنتی‌ژن‌های بیگانه اسپرم مواجه می‌شوند. افزایش بیان VDR در فاز استروس می‌تواند به واسطه اثرات مهاری ویتامین D3 بر سیستم ایمنی اکتسابی از القاء پاسخ ایمنی مادر بر علیه آنتی‌ژن‌های اسپرم جلوگیری نماید.

از طرف دیگر با توجه به اینکه حاملگی در فاز استروس اتفاق می‌افتد، بیان سطح بالای VDR در این فاز می‌تواند به تعدیل پاسخ‌های ایمنی مادر بر علیه آنتی‌ژن‌های جنین نیمه بیگانه کمک کند.

افزایش بیان VDR رحم و تخمدان احتمالاً ناشی از افزایش سطح استروژن در این فاز می‌باشد. سطح استروژن در فاز استروس به بالاترین حد خود می‌رسد و این در حالی است که سطح پروژسترون به شدت کاهش می‌یابد (۴۲). مطالعات انجام شده نتایج این پژوهش را تایید می‌کنند. مطالعه Liel و همکاران (۴۳) نشان می‌دهد که استروژن به طور مستقیم سبب افزایش بیان VDR در مخاط دئودنوم و افزایش پاسخگویی به ویتامین D3 می‌شود. مطالعه Gilad و همکاران (۴۵،۴۴) نیز نشان می‌دهد که استروژنها سبب افزایش بیان VDRدر سلول‌های سرطانی کولون می‌شود.

جالب توجه این که با افزایش سن جنس ماده تعداد مولکول‌های VDR کاهش می‌یابد (۴۷،۴۶) از طرف دیگر همان گونه که مطالعات پلی‌مورفیسم VDR در انسانها نشان می‌دهند، اثرات بیولوژیک ویتامین D3 به طور مستقیم به تعداد مولکول‌های VDR بستگی تام دارد (۴۹،۴۸).

استروژنها همچنین سبب افزایش بیان VDR در رحم (۵۰) می‌گردند. اگر چه افزایش سطح استروژن در طی فاز استروس به عنوان یکی از دلایل افزایش بیان VDR مطرح می‌شود؛ ولی کاهش سطح پروژسترون در این فاز می‌تواند یکی از دلایل احتمالی این فرایند باشد. بسیاری از اثرات استروژن و پروژسترون از جمله تاثیر آنها بر روی سطح سرمی ویتامین D3 عکس یکدیگر می‌باشند (۵۱). جالب توجه این که در طی فاز دی استروس که مطابق با یافته‌های این پژوهش بیان VDR به پایین‌ترین سطح خود می‌رسد، سطح خونی پروژسترون به بالاترین حد خود افزایش می‌یابد (۴۲).

مطالعات ایمونوهیستوشیمی نشان داد که تعداد سلول‌های بیان کننده VDR در فاز استروس افزایش می‌یابد. این امر احتمالاً به‌دلیل مهاجرت تعداد زیادی از سلول‌های دندریتیک (۵۲) و ماکروفاژ (۵۳) به آندومتر می‌باشد. سلول‌های مذکور سطح بالایی از VDR را بیان می‌کنند (۱۶). از طرف دیگر مطالعات مرفومتری نشان داد که در تمام فازهای مورد مطالعه بیان VDR

Downloaded from http://www.jri.ir

در سلول‌های اپی‌تلیال به‌مراتب بیش از سایر سلولها می‌باشد. یافته‌های سایر محققین نتایج این پژوهش را تایید می‌کند. مطالعه Johnson و همکاران نشان داد که سلول‌های اپی‌تلیال و غددی آندومتر بیش از سایر سلول‌های رحم VDR را بیان می‌کنند (۱۵). اگرچه وی سلول‌های استرومایی رحم را از نظر بیان VDR منفی گزارش کرد؛ ولی یافته‌های این پژوهش آن را تاییدنکرد. سلول‌های اپی‌تلیال نقش گسترده‌تری در سیستم ایمنی دارند. سلول‌های اپی‌تلیال FRT نه تنها به‌صورت فیزیکی از تهاجم عوامل میکروبی به بافت‌های زیرین جلوگیری می‌کنند؛ بلکه از طرق مختلف نظیر عرضه آنتی‌ژن، تولید پپتیدهای ضد میکروبی، کمک به ترشح IgA مخاطی، تولید سایتوکاینها و کموکاین‌های مختلف و شناسایی عوامل بیگانه توسط مولکول‌های TLR (۵۴،۵۵) در استقرار ریز محیط ایمونولوژیک FRT ایفای نقش می‌کنند. بیان سطح بالای VDR، با توجه به نقش تعدیل کنندگی ایمنی ویتامین D3، نیز یکی دیگر از مصادیق نقش سلول‌های اپی‌تلیال در کنترل ایمنی مخاطی دستگاه تناسلی ماده است.

تخمدان به عنوان منبع تولید تخمک نقش مهمی در باروری ایفا می‌کند. در این مطالعه نشان داده شد که اکثر سلول‌های تخمدان شامل سلول‌های Techa، سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های استرومای تخمدان در فازهای مختلف سیکل استروس VDR را بیان می‌کنند. نقش VDR در تخمدان بدرستی روشن نیست؛ ولی ممکن است در تنظیم برخی از فعالیت‌های فیزیولوژیک تخمدان نقش داشته باشد. ویتامین D3 در مایع فولیکولی انسان وجود دارد (۵۶) و ممکن است از طریق میان‌کنش با VDRسلول‌های گرانولوزا در تنظیم فعالیت آنها نقش داشته باشد.

در فیبروبلاست‌های پوست انسان، ویتامین D3 از طریق افزایش فعالیت آروماتاز موجب افزایش سرعت تبدیل آندرستندیون به استروژن می‌شود (۵۷). ویتامین D3 در تخمدان نیز ممکن است بواسطه میان کنش با VDR نقش مشابهی در سلول‌های گرانولوزای فولیکول ایفا کند. سلول‌های گرانولوزا دارای فعالیت آروماتاز هستند (۵۸) و از طریق تولید استروژن نقش مهمی در فولیکول‌زایی و تخمک‌گذاری دارند (۵۹). بیان VDR در سلول‌های اپی‌تلیال لوله فالوپ نظیر آنچه که در اپی تلیوم روده وجود دارد ممکن است در تنظیم انتقال کلسیم از این سلولها نقش داشته باشد (۶۰،۶۱). جالب توجه اینکه لقاح تخمک در درون لوله فالوپ تنها در محدوده باریکی از غلظت کلسیم خارج سلولی امکان‌پذیر است (۶۲). علاوه بر نقش‌های فیزیولوژیک، ممکن است ویتامین D3 از طریق میان کنش با VDR و القاء تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی در سرکوب ایمنی و حفاظت ایمونولوژیک تخم لقاح یافته نقش داشته باشد.

نتیجه گیری

در مجموع با توجه به یافته‌های این پژوهش مبنی بر بیان گیرنده ویتامین D3 در تمام بافت‌های مرتبط با حاملگی طی فازهای سیکل استروس به‌نظر می‌رسد که ویتامین D3 نقش کلیدی در فرایند تولید مثل ایفا می‌کند. مطالعه بیان VDR و همچنین آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم ویتامین D3 از جمله ۱-آلفا هیدروکسیلاز در طی باروری می‌تواند نقش این هورمون را در بارداری روشن کند.

تشکر وقدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا انجام گردید.

Downloaded from http://www.jri.ir

References

1- Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. Physiol Rev. 1998;78(4):1193-231.

2- Chen TL, Feldman D. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures: receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses. Endocrinology. 1986;118:250-9.

3- Halloran BP, DeLuca HF. Appearance of the intestinal cytosolic receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3 during neonatal development in the rat. J Biol Chem. 1981;256(14):7338-42.

4- Chen TL, Feldman D. Retinoic acid modulation of 1,25 (OH) 2 vitamin D3 receptors and bioresponse in bone cells: species differences between rat and mouse. Biochem-Biophys-Res-Commun. 1985;132(1):74-80.

5- PM Petkovich, JN Heersche, DO Tinker and G Jones. Retinoic acid stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D3 binding in rat osteosarcoma cells. J Biol Chem. 1984; 259(13):8274-80.

6- Hirst M, Feldman D. Glucocorticoid regulation of 1,25 (OH) 2vitamin D3 receptors: divergent effects on mouse and rat intestine. Endocrinology. 1982;111(4): 1400-2.

7- Walters MR. An estrogen-stimulated 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat uterus. Biochem Biophys Res Commun. 1981;103(2):721-6.

8- Horst RL, Reinhardt TA. Changes in intestinal 1,25 dihydroxyvitamin D receptor during aging, gestation and pregnancy in rats. Seventh Workshop on Vitamin D, Rancho Mirage, CA. In: Norman AW, Schaefer K, Grigoleit HG, Herrath DV (Editors) Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology. de Gruyter, Berlin. 1988;p:299.

9- Goff JP, Horst RL, Reinhardt TA. Duodenum and colon 1,25-dihydroxyvitamin D receptor concentration is increased during lactation in the rat. Seventh Workshop on Vitamin D, Rancho Mirage, CA. In: Norman AW, Shaefer K, Grigoleit HG, Herrath DV (Editors) Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology. de Gruyter, Berlin.1988;p:246.

10- Favus MJ, Mangelsdorf DJ, Tembe V, Coe BJ, Haussler MR. Evidence for in vivo upregulation of the intestinal vitamin D receptor during dietary calcium restriction in the rat. J Clin Invest. 1988;82(1):218-24.

11- Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, Hamstra A, Arnaud SB, DeLuca HF. Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium. J Clin Invest. 1979;64(3):729-36.

12- Russell JE, Morimoto S, Birge SJ, Fausto A, Avioli LV. Effects of age and estrogen on calcium absorption in the rat. J Bone Miner Res. 1986;1(2):185-9.

13- Francis RM, Peacock M, Taylor GA, Storer JH, Nordin BE. Calcium malabsorption in elderly women with vertebral fractures: evidence for resistance to the action of vitamin D metabolites on the bowel. Clin Sci. 1984;66(1):103-7.

14- Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R. Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in oophorectomized women. J Clin Endocrinol Metab. 1990;71(5):1288-93.

15- Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. Histochem Cell Biol. 1996;105(1):7-15.

16- Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;97(1-2):93-101.

17- Adorini L, Penna G, Giarratana N, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Uskokovic M. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004; 89-90(1-5):437-41.

18- Corbett ST, Hill O, Nangia AK. Vitamin D receptor found in human sperm. Urology. 2006;68 (6):1345-9.

19- Viganò P, Lattuada D, Mangioni S, Ermellino L, Vignali M, Caporizzo E, Panina-Bordignon P, Besozzi M, Di Blasio AM. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. J Mol Endocrinol. 2006;36(3):415-24.

20- Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Smyczek S, Romu S, Tribble E, Welsh JC, Byrne B, Narvaez CJ. Impact of the Vitamin D3 receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2002;83(1-5):85-92.

21- Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, Goltzman D. Targeted ablation of the 25- hydroxyvitamin D1a-hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(13):7498-503.

22- Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning .Nat Genet. 1997;16(4):391-6.

23- Halloran BP, DeLuca HF. Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. J Nutr. 1980;110(8):1573-80.

Downloaded from http://www.jri.ir

36- Kutteh WH, Mestecky J, Wira CR. Mucosal immunity in the human female reproductive tract. In: Mestecky J, Bienenstock J, Lamm ME, Mayer L, McGhee JR, Strober W (Editors). Mucosal Immunology. New York: Academic Press. 2005;1631-46.

37- Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. Science. 1985;227:257-61.

38- Wira CR, Richardson J, Prabhala R. Endocrine regulation of mucosal immunity: effect of sex hormones and cytokines on the afferent and efferent arms of the immune system in the female reproductive tract. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, eds. Handbook of Mucosal Immunology. New York: Academic Press. 1994;p:705-18.

39- Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. J Soc Gynecol Investig. 2004;11(5):263-71.

40- Kankova M, Luini W, Pedrazzoni M, Riganti F, Sironi M, Bottazzi B, et al. Impairment of cytokine production in mice fed a Vitamin D3-deficient diet, Immunology. 1991;73(4):466-71.

41- Chan TY. Vitamin D deficiency and susceptibility to tuberculosis. Calcif Tissue Int. 2000;66(6):476-8.

42- Fata JE, Chaudhary V, Khokha R. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. Biol Reprod. 2001;65(3):680-8.

43- Liel Y, Shany S, Smirnoff P, Schwartz B. Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. Endocrinology. 1999;140(1):280-5.

44- Gilad LA, Bresler T, Gnainsky J, Smirnoff P, Schwartz B. Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. J Endocrinol. 2005;185(3):577-92.

45- Gilad LA, Tirosh O, Schwartz B. Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells. J Endocrinol. 2006;191 (2):387-98.

46- Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. Endocrinology. 1990;126(2): 1053-7.

47- Takamoto S, Seino Y, Sacktor B, Liang CT. Effect of age on duodenal 1,25-dihydroxyvitamin D-3 receptors in Wistar rats. Biochim Biophys Acta. 1990;1034(1): 22-8.

48- Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. J Bone Miner Res. 1997;12(7):1043-8.

24- Kwiecinksi GG, Petrie GI, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 restores fertility of vitamin D-deficient female rats. Am J Physiol. 1989;256(4 Pt 1):E483-7.

25- Penna G, Adorini L. 1a,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. J Immunol. 2000; 164:2405-11.

26- Nunn JD, Katz DR, Barker S, Fraher LJ, Hewison M, Hendy GN, O'Riordan JL. Regulation of human tonsillar T-cell proliferation by the active metabolite of vitamin D3. Immunology. 1986;59(4):479-84.

27- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. J Immunol. 2001;167(9): 4974-80.

28- Merino F, Alvarez-Mon M, de la Hera A, Alés JE, Bonilla F, Durantez A. Regulation of natural killer cytotoxicity by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Cell Immunol. 1989;118(2):328-36.

29- Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Dokouhaki P, Ghods R, Mahmoodi AR, Jeddi-Tehrani M. Microenvironment of the feto-maternal interface protects the semiallogenic fetus through its immunomodulatory activity on dendritic cells. Fertil Steril. 2007.

30- Juretic K, Strbo N, Crncic TB, Laskarin G, Rukavina D. An insight into the dendritic cells at the maternal-fetal interface. Am J Reprod Immunol. 2004;52(6): 350-5.

31- Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. Semin Immunol. 2001;13 (4):219-27.

32- Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. Hum Reprod Update. 2001;7(2):113-34.

33- Bubanovic I. 1alpha, 25-dihydroxy-vitamin-D3 as new immunotherapy in treatment of recurrent spontaneous abortion. Med Hypotheses. 2004;63(2): 250-3.

34- Wira CR, Fahey JV, White HD, Yeaman GR, Givan AL, Howell AL. The Mucosal Immune System in the Human Female Reproductive Tract: Influence of Stage of the Menstrual Cycle and Menopause on Mucosal Immunity in the Uterus. In: Endometrium. Glasser S, Aplin J, Giudice L, Tabibzadeh S (Editors) Chapter 26. 2002;p:371-404.

35- Wira CR, Crane-Godreau M, Grant K. Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the female reproductive tract. In: Mucosal Immunology. Mestecky J, Bienenstock J, Lamm ME, Mayer L, McGhee JR, Strober W (Editors). Academic Press, NY, In Press, 2004.

Downloaded from http://www.jri.ir

49- Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in post-menopausal Mexican-American women. J Bone Miner Res. 1996;11(12):1850-5.

50- Levy J, Zuili I, Yankowitz N, Shany S. Induction of cytosolic receptors for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in the immature rat uterus by oestradiol. J Endocrinol. 1984;100(3):265-9.

51- Bikle DD, Halloran BP, Harris ST, Portale AA. Progestin antagonism of estrogen stimulated 1,25-dihydroxyvitamin D levels. J Clin Endocrinol Metab. 1992; 75(2):519-2.

52- 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.

53- Robertson SA. Control of the immunological environment of the uterus. Rev Reprod. 2000;5(3):164-74.

54- Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. Am J Reprod Immunol. 2005;53(2):65-76.

55- Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev. 2005;206:306-35.

56- Potashnik G, Lunenfeld E, Levitas E, Itskovitz J, Albutiano S, Yankowitz N, Sonin Y, Levy J, Glezerman M, Shany S. The relationship between endogenous oestradiol and vitamin D3 metabolites in serum and follicular fluid during ovarian stimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod. 1992;7(10):1357-60.

57- Hodgins MB, Murad S. 1, 25-Dihydroxycholecalciferol stimulates conversion of androstenedione into oestrone by human skin fibroblasts in culture. J Endocrinol. 1986;110(1):R1-4.

58- Erickson GF, Magoffin DA, Cragun JR, Chang RJ. The effects of insulin and insulin-like growth factors-I and -II on estradiol production by granulosa cells of polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab. 1990;70 (4):894-902.

59- Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. Reprod Biol Endocrinol. 2006;10:4-16.

60- Johnson JA, Kumar R. Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins. Semin Nephrol. 1994;14 (2):119-28.

61- Audran M, Gross M, Kumar R.. The physiology of the vitamin D endocrine system. Semin Nephrol. 1986;6 (1):4-20.

62- Fujimoto G, Tsuchiya H, Kobayashi K, Saga M, Rothman CM, Ogawa S. Calcium concentration and fertilization by subzonal insemination of a single spermatozoon in mouse oocytes. Mol Reprod Dev. 1994; 38(1):54-60.

Downloaded from http://www.jri.ir