بررسی تاثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوآ بر القای آنزیم ایندول آمین۲ و ۳دی اکسیژناز(IDO) در سلول‌های دندریتیک، طی واکنش MLR آلوژنیک

مهدی مهدوی .M.Sc[۱]، سید محمد موذنی .Ph.D[۱*]، امیرحسن زرنانی .Ph.D[۲،۳]

۱. دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی
۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده ابن سینا ، گروه ایمونولوژی
۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: Moazzeni@dr.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۲/۳۱، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۷

هدف: بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بر سلول‌های دندریتیک از نظر القای پاسخ تکثیری آلوژنیک در سلول‌های T و نیز از نظر بیان آنزیم ایندول آمین ۲ و۳ دی‌اکسیژناز

مواد و روش‌ها: در ابتدا دسیدوای موش‌های C57BL/6 حامله آلوژنیک (C57BL/6xBalb/c) در اواسط حاملگی جدا و پس از هضم آنزیمی آن سوسپانسیون سلولی تهیه و کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت مایع رویی کشت سلول‌ها جمع‌آوری و در ۷۰- درجه منجمد شد. سلول‌های دندریتیک از طحال موش‌های C57BL/6 با روش هضم آنزیمی و استفاده از محیط گرادیان نایکودنز غنی‌سازی شدند. سلول‌های چسبنده‌ای که بعد از کشت دو ساعته سوسپانسیون سلولی به دست آمد در حضور غلظت‌های مختلف مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا به مدت ۱۲ تا ۱۵ساعت انکوبه شدند. طی این زمان سلول‌های دندریتیک بالغ شده کف پلیت جدا شدند. لنفوسیت‌های T از گره‌های لنفاوی براکیال و اگزیلاری موش‌های Balb/c با روش نایلون ول جدا شدند. سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بعد از اشعه دادن (۳۰۰۰ rad) با لنفوسیت‌های T آلوژن در محیط MLR مجاور شدند و میزان تکثیر سلولی با استفاده از روش جذب تایمیدین رادیواکتیو اندازه گیری شد. برای ردیابی اثر آنزیم IDO از L – متیل تریپتوفان که مهارکننده کاملا اختصاصی آنزیم است، استفاده شد.

یافته‌ها: در آنالیز فلوسیتومتری، خلوص سلول‌های دندریتیک ۲±۹۳درصد و میزان خلوص سلول‌های T به میزان ۲±۹۱ درصد بود. نتایج MLR حاکی از کاهش پاسخ تکثیری سلول‌های T مجاور شده با سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله بود، درحالی که تیمار سلول‌های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول‌های رحم غیرحامله چنین تاثیری را نشان نداد و این سرکوب شدن با اضافه شدن L– متیل تریپتوفان تعدیل می‌شد.

نتیجه‌گیری: مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا احتمالا از طریق القای بروز IDO در سلول‌های دندریتیک موجب سرکوب پاسخ لنفوسیت‌های T می‌شود.

کلیدواژگان: دسیدوا ، سلول‌های دندریتیک ، ایندول امین ۲ و۳ دی‌اکسیژناز (IDO)، MLR

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۷۹-۷۰

مقدمه

بقای جنین نیمه بیگانه در طی دوره حاملگی و رد نشدن آن از سوی سیستم ایمنی مادر، با توجه به یافته‌های علم ایمونولوژی پیوند، یک سوال اساسی فرا روی محققین قرار می‌دهد (۱، ۲، ۳، ۴). در حالی که نیمی از ژنوم جنین از مادر و نیمی دیگر از پدر است و قاعدتا جنین باید توسط سیستم ایمنی مادر دفع شود، ولی عموما چنین پدیده‌ای مشاهده نمی‌شود (۲، ۳).

در حاملگی‌های آلوژنیک آنتی‌ژنهای پدری به طور انتخابی روی سلول‌های تروفوبلاست جنینی بروز می‌یابند و مورد شناسایی سیستم ایمنی مادر نیز قرار می‌گیرند. در حال حاضر شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد فعال شدن سیستم ایمنی مادر برای به وجود آمدن یک حاملگی طبیعی ضروری است و عدم شناسایی جنین یا نقص در شناسایی آنتی‌ژنهای جنینی از سوی مادر حتی می‌تواند منجر به سقط جنین گردد (۴، ۵، ۶، ۷).

برای محافظت مادر از تهاجم تروفوبلاستی، سلول‌های استرومایی آندومتر به یک ساختمان سلولی متراکم تغییر شکل می‌یابد که به آن دسیدوا گویند. دسیدوا با ایجاد یک سد فیزیکی از حرکت تروفوبلاست جلوگیری کرده و هم چنین با ایجاد ریز محیط سایتوکاینی مناسب موجب رشد تروفوبلاست می‌شود. پیدایش دسیدوا با تمایز سلول‌های مزانشیمی شبه فیبروبلاستی در آندومتر به سلول‌های دسیدوا که از نظر

مورفولوژیک و بیوشیمیایی متفاوتند، صورت می‌گیرد (۸). از جمله سلول‌های مستقر در دسیدوا سلول‌های دندریتیک است (۹) که این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی مغز استخوان به وجود آمده‌اند و در آغاز و تداوم پاسخ ایمنی (۱۰) و القا و حفظ تحمل مرکزی و محیطی (Central and Pripheral Tolerance) نقش حیاتی دارند (۱۱). ازجمله ویژگی‌های سلول‌های دندریتیک بیان آنزیم IDO در شرایط خاص است، سلول‌های دندریتیک با استفاده از این مکانیسم و مکانیسم‌های متعدد دیگر به کنترل پاسخ‌های ایمنی مبادرت می‌ورزند (۱۲). آنزیم IDO تریپتوفان را متابولیزه می‌کند و تشکیل کینورنین می‌دهد. افزایش تجزیه تریپتوفان در بسیاری از بیماری‌ها، اختلالات ایمنی سلولی، بیماری‌های عفونی، خودایمنی، سرطان‌ها و خصوصا در حاملگی‌ها دیده می‌شود (۱۳).

بررسی‌های in vitro نشان داده است که در حضور IDO و تخریب تریپتوفان لنفوسیت T در مرحله G1 از چرخه سلولی متوقف می‌شود و طی چند روز بعد به سمت آپوپتوز می‌رود (۱۴).

اهمیت حضور و نقش IDO در بقای جنین، اولین بار با مطالعات مون و همکاران مشخص شد. او و همکارانش در تجربه‌ای جالب L-متیل تریپتوفان را، که مهار کننده کاملا اختصاصی آنزیم IDO است، به صورت کپسول زیر پوستی در موش‌های حامله جاسازی و مشاهده کردند درحاملگی‌های آلوژنیک مهارآنزیم IDO منجر به سقط جنین می‌شود. در حالی که این اتفاق در موش‌هایی که جنین هم‌ژن داشتند نمی‌افتد (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). این پدیده نشان می‌دهد سلول‌های بیان‌کننده IDO از آن دسته سلول‌های تنظیم کننده پاسخ ایمنی هستند که جنین آلوژن را درمقابل پاسخ‌های ایمنی سلولی محافظت می‌کنند (۱۲).

تحقیقات گذشته ما نشان داده است که سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله موجب سرکوب لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی‌ژن می‌شود (۱۹). لذا در این تحقیق به بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بر عملکرد سلول‌های دندریتیک طی واکنش MLR آلوژنیک و یافتن مکانیسم احتمالی اثر آن پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا

برای به دست آوردن موش حامله آلوژن موش‌های نر بالغ Balb/c با موش‌های ماده بالغ C57BL/6 آمیزش داده شدند. روز مشاهده پلاک واژینال و اسپرم در اسمیر واژینال به عنوان روز نیم حاملگی در نظر گرفته شد. ۱۰/۵ تا ۱۱/۵ روز پس از حاملگی موش‌ها با روش cervical dislocation نخاعی شدند و رحم حاوی جنین از بدن موش خارج و مستقیما داخل PBS استریل سرد قرار داده شد. با قیچی کردن منطقه آنتی‌مزومتریال لایه‌های اطراف جنین از دسیدوا جدا شد. سپس بافت سفید متمایل به کرم دسیدوا از پشت جفت به کمک پنس و قیچی بسیار ظریف جدا و با قیچی به قطعات ریز تقسیم شد.

مقدار ۱ میلی‌لیتر بافر هضم‌کننده شامل آنزیم کلاژناز (Roch، آلمان) به غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و DNase (Roch، آلمان) به غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به قطعات دسیدوا اضافه و به مدت پنج دقیقه انکوبه شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و مجددا ۵ میلی‌لیتر بافر هضم‌کننده بافت، اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. پس از چند بار پی‌پت کردن، سوسپانسیون سلولی حاصل، دو بار با PBS سرد در دور ۲۰۰xg و دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد و سلول‌های حاصل در ۸۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 (سیگما، آمریکا) حاوی ۲۰درصد سرم جنین گاو (FCS) (انگلستان، Gibco) به تعداد ۴۰۰۰۰۰ سلول در هرحفره پلیت ۲۴ خانه و به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. آن‌گاه مایع رویی سلول‌ها جمع آوری و تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. لازم به ذکر است کلیه آزمایشات انجام گرفته بر روی موش‌ها به تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

تخلیص سلول‌های دندریتیک از طحال موش

برای این کار از موش C57BL/6 استفاده شد. موش‌های نخاعی شده در الکل ۷۰ درجه قرار داده شدند. طحال موش‌ها از بدن آن‌ها خارج و در پلیت ۶۰ میلی‌متری شیشه‌ای استریل حاوی RPMI-1640 سرد قرار داده شد. پس از شستشوی سطحی طحال، با استفاده از سرنگ مقدار ۱میلی‌لیتر بافر هضم کننده از قسمت راس آن تزریق شد. با استفاده از پی‌پت پاستور، سوسپانسیون تک سلولی حاصل جدا شد و در یک لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتر جمع‌آوری و بلافاصله روی آن EDTA به غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار اضافه شد و به ۴درجه سانتی‌گراد منتقل شد. باقی‌مانده بافت طحال با قیچی جراحی تیز به قطعات حدود ۱میلی‌متر خرد و مقدار ۲میلی‌لیتر بافر هضم کننده به آن اضافه شد. قطعات طحالی چندین بار پی پتاژ و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. سوسپانسیون سلولی حاصل، از الک سلولی (Cell Mesh) عبور داده شد و باقی‌مانده بافتی طحال روی الک سلولی له شد. سوسپانسیون سلولی به دست آمده دوبار با محیط PRMI سرد حاوی ۵ میلی‌مولار EDTA به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰xg و دمای ۴ درجه شستشو داده شد و سپس روی محیط نایکودنز (نروژ، Pharma Axis - Shilal) با وزن حجمی ۱/۰۸۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۷۰۰xg و دمای ۴درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سلول‌های کم چگال که شامل سلول‌های دندریتیک و مقداری لنفوسیت و منوسیت بودند توسط پی‌پت پاستور به آرامی از حد فاصل بین محیط کشت و محیط گرادیان برداشت و دوبار با محیط RPMI به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰xg و دمای ۴درجه سانتی‌گراد شستشو داده شدند. از سلول‌های به دست آمده در RPMI-1640 حاوی ۱۰درصد FCS سوسپانسیونی با رقت 1×10^{7} سلول در میلی‌لیتر تهیه شد و در هر پلیت

کشت سلولی ۶۰ میلی‌متر، حدود ۲/۵-۲ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون ریخته شد. پلیت‌ها دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵درصد CO_2 قرار داده شدند. در این مرحله سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها و کمی هم لنفوسیت‌های B به کف پلیت متصل می‌شوند. جهت حذف سلول‌های شناور و غیرچسبنده پلیت کشت سلول با استفاده از پی‌پت پاستور و محیط کشت ۳۷ درجه به آرامی شستشو داده شد. در این مرحله سلول‌های دندریتیک کاملا تیره دیده می‌شوند و خلوص تقریبی آنها ۷۵ تا ۸۰ درصد است. این سلول‌ها با اضافه کردن ۲/۵-۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل به همراه غلظت‌های مختلف مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله به مدت ۱۲تا۱۵ ساعت (over night) در شرایط ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. از مایع رویی کشت سلول‌های رحم موش غیرحامله نیز استفاده شد. بعد از کشت شبانه، سلول‌های دندریتیک بالغ از کف پلیت جدا می‌شوند. این سلول‌ها جمع‌آوری و برای بررسی فلوسیتومتری و انجام آزمایش MLR مورد استفاده قرار گرفتند (۲۰).

تخلیص سلول‌های T گره لنفاوی توسط Nylon wool

غدد لنفاوی اینگوئینال و براکیال موش Balb/c تحت شرایط استریل جدا و در پلیت شیشه‌ای حاوی RPMI سرد قرار داده شدند. بافت جداشده با کمک پنس له و با پی پتاژ قطعات حاصله، سلول‌ها کاملا از بافت خارج شدند. مجموعه حاصل، از الک سلولی عبور داده شد تا قطعات بافت حذف شود. سلول‌های به دست آمده دو بار شستشو داده شد و نهایتا تعداد $۱۰^۶ \times ۲۰$-۱۵ سلول در حجم ۲۵۰ تا ۵۰۰ میکرولیتر در زیر هود روی ستون نایلون ول بارگذاری و برای ۴۵ دقیقه در انکوبانور ۳۷ درجه به حالت عمودی قرار داده شد. پس از طی مدت زمان مذکور، تحت شرایط استریل و در زیر هود با باز کردن سه راهی متصل به ستون سلول‌ها در لوله فالکون استریل جمع‌آوری شدند. از بالای ستون به طور آهسته مقداری محیط RPMI کامل اضافه شد تا تمامی سلول‌های غیرچسبان خارج شوند. سپس سلول‌ها دوبار در ۳۰۰xg به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و پس از تعیین درصد حیات و تعداد آن‌ها در آزمایش فلوسیتومتری و MLR آلوژنیک به کار گرفته شدند.

آنالیز فلوسیتومتری

از سلول‌های دندریتیک به دست آمده سوسپانسیون سلولی $۱۰^۶ \times ۱$ سلول در میلی‌لیتر تهیه و سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرم نرمال ۵درصد موش روی یخ انکوبه و سپس به دو لوله تقسیم شد. پس از دوبار شستشو در ۴۰۰xg به مدت ۵ دقیقه ودمای ۴ درجه به لوله تست ۱میکرولیتر آنتی‌بادی ضد CD11c (Hamster-mouse CD11c, Pharmingen, USA) و به لوله کنترل سرم نرمال ۵ درصد هامستر اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس از انکوباسیون، نمونه‌ها دوبار با بافر فلوسیتومتری به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰xg و دمای ۴ درجه شسته شدند و سپس آنتی‌بادی لایهٔ دوم که کنژوگه به فیکواریترین بود، (Phycoerythrin conjugated mouse anti-hamster IgG, Pharmingen, USA) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. پس از انکوباسیون سلول‌ها دوبار با بافر فلوسیتومتری شسته و توسط دستگاه فلوسیتومتری (Partech, Germany) آنالیز شدند.

از سلول‌های T به دست آمده از ستون نایلون وول نیز سوسپانسیون سلولی تهیه، سپس به دو لوله تقسیم و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرم ۵درصد رت مجاور شد. پس از دوبارشستشو در ۴۰۰xg به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه، به لوله تست ۱۰میکرولیتر آنتی‌بادی ضد CD3 نشان‌دار با(PE (PE conjugated Rat anti mouse CD3, Serotec, U.K و به لوله کنترل ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کنترل ایزوتیپ اضافه و ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد و پس از دوبار شستشو در ۴۰۰xg، برای آنالیز فلوسیتومتری استفاده شد.

واکنش MLR آلوژنیک و بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوآ بر سلول‌های دندریتیک در القای پرولیفراسیون سلول‌های T

به منظور بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوآ بر توان سلول‌های دندریتیک در القا پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T در محیط MLR آلوژنیک، در پروسه تخلیص سلول‌های دندریتیک پس از شستشوی دو ساعته سلول‌های تک‌هسته‌ای طحال موش C57BL/6 و حذف سلول‌های غیرچسبان، به سلول‌های چسبان در طول کشت شبانه، RPMI حاوی ۱۰درصد FCS به همراه غلظت‌های۲/۵درصد، ۵ درصد، ۱۰درصد، ۲۰درصد مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوآ موش حامله و همچنین مایع رویی کشت رحم موش غیر حامله به عنوان کنترل اضافه شد. پس از کشت شبانه DCs تیمار شده بالغ جمع‌آوری و پس از اشعه دادن (۳۰۰۰ rad) با لنفوسیت‌های T موش Balb/c در واکنش MLR آلوژنیک کشت داده شدند. سلول‌های T تنها و DC تنها به عنوان کنترل منفی و سلول‌های T تحت اثر PHA با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. تمامی کشت‌ها به صورت سه تایی انجام گرفت. پس از ۷۲ ساعت به هر حفره یک میکروکوری ^{3}H Thymidine (Amersham, U. K.) اضافه شده و ۱۸ ساعت بعد سلول‌ها جمع‌آوری شدند و میزان جذب تایمیدین نشان‌دار با استفاده از دستگاه β-Counter به صورت شمارش در دقیقه (cpm) اندازه‌گیری شد.

بررسی تاثیر آنزیم IDO القا شده در اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوآ بر واکنش MLR

به این منظور، با اضافه کردن غلظت‌های مختلف ۱- متیل D، L تریپتوفان (Sigma,USA) که مهارکننده اختصاصی آنزیم IDO است به محیط MLR آلوژنیک، حضور آنزیم مذکور و تاثیر آن بر سرکوب پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب

که در صورت دخالت آنزیم در کاهش پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T این آنزیم توسط ۱- متیل D، L تریپتوفان مهار می‌شوند و در نتیجه پاسخ تکثیری لنفوسیت افزایش می یابد.

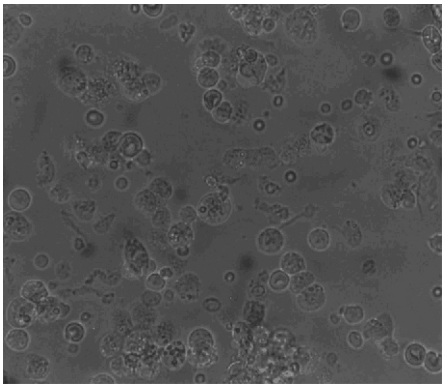
آزمون آماری

برای مقایسه میانگین نمونه‌ها از آزمون آماری Mann Whitney استفاده شد. حدود اطمینان ۹۵درصد در نظر گرفته شده است و $p<0/05$ معنی‌دار است.

یافته‌ها

کشت سلول‌های دسیدوا و تهیه مایع رویی کشت ۴۸ ساعته

در این مرحله مجموعا از هر موش حامله با توجه به اینکه تعداد جنین‌ها از ۱ تا ۶ عدد متغیر بود، بین $1/2-8/5\times10^6$ سلول دسیدوا با زیست‌پذیری ۹۴-۹۲درصد به دست آمد. تعداد ۴۰۰۰۰۰ سلول در ۸۰۰ میکرولیتر محیط RPMI با ۲۰درصد- FCS در هر حفره پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. نمای میکروسکوپی این سلول‌ها در روز اول کشت شامل سلول‌های دایره‌ای به همراه تعداد کمی سلول زایده‌دار بود (شکل ۱).



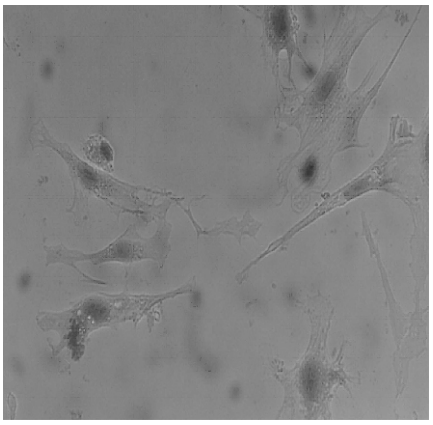
شکل ۱: سلولهای دسیدوا اندکی پس از جداسازی

پس از ۴۸ ساعت برخی سلول‌ها با زواید بلند کف پلیت را گرفته و برخی در حال میتوز بودند (شکل ۲).

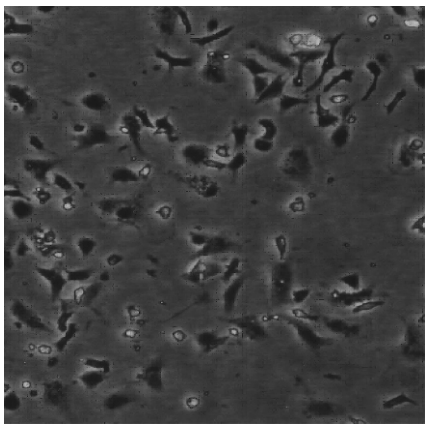
محیط کشت روی این سلول‌ها جمع‌آوری و در دور بالا سانتریفیوژ و پس از فیلتر کردن با ثبت مشخصات جهت استفاده در آزمایشات بعدی در ۷۰- درجه منجمد شد.

جداسازی سلول‌های دندریتیک و سلول‌های T

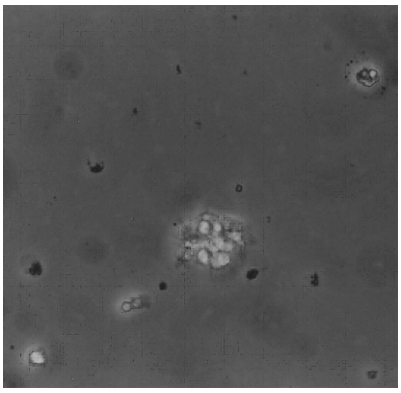
پس از هضم آنزیمی طحال موش C57BL/6 به منظور جداسازی سلول‌های کم چگال از نایکودنز استفاده شد. وزن حجمی مورد استفاده ۱/۰۸۰ بود وحدود ده تا بیست میلیون سلول تک‌هسته‌ای از هر طحال به دست آمد که در صد حیات آن‌ها بیشتر از ۹۶درصد بود. پس از کشت، شستشو و حذف سلول‌های غیرچسبان در پایان کشت دو ساعته خلوص سلول‌های دندریتیک به حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید. سلول‌های دندریتیک در زیر میکروسکوپ معکوس به صورت سلول‌های کاملا تیره و دارای زواید سیتوپلاسمی مشخص‌اند (شکل۳).



شکل۲: سلولهای دسیدوا پس از کشت ۴۸ ساعته

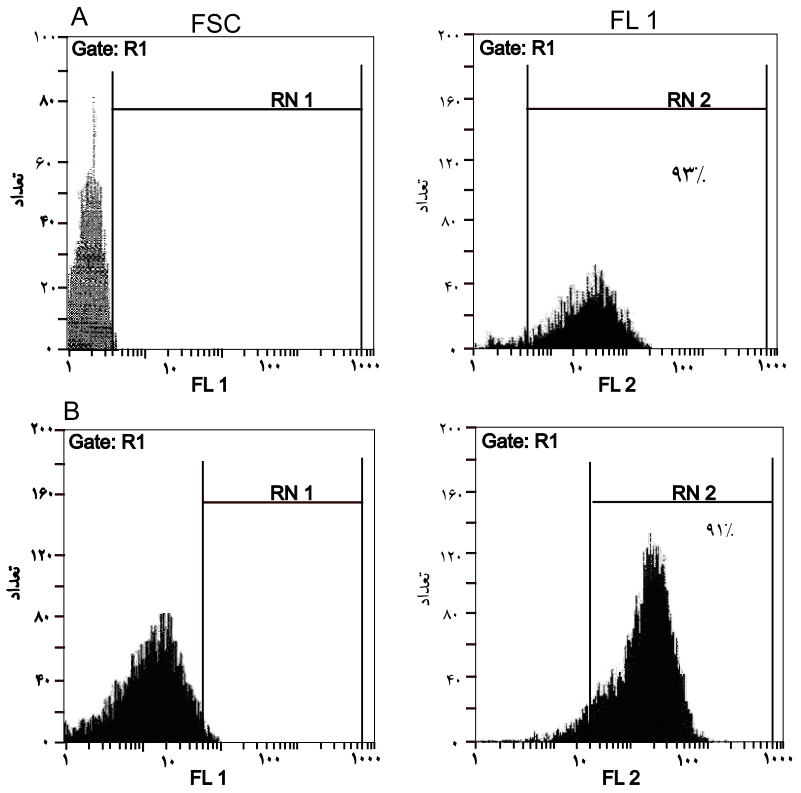


شکل۳: سلولهای DCs پس از کشت دو ساعته و حذف سلولهای غیرچسبان



شکل۴: سلولهای DCs بالغ پس از کشت شبانه

این سلول‌ها بعد از حدود ۱۲تا۱۵ ساعت کشت، بالغ و به صورت کلامپ‌های شناور مشاهده می‌شدند (شکل۴). در حالی که سلول‌های غیردندریتیک و ماکروفاژها همچنان به صورت چسبیده باقی می‌ماندند. از هر طحال موش به طور متوسط $2-4\times10^5$ سلول دندریتیک به دست آمد.



نمودار ۱: تعیین میزان خلوص سلولهای دندریتیک و لنفوسیت‌های Tبا استفاده از آنالیز فلوسیتومتری، A: نتیجه فلوسیتومتری DCs بر اساس وجود شاخص CD11c نمودار شمت چپ ایزوتیپ کنترل و نمودار سمت راست تست است. B : نتیجه فلوسیتومتری سلول‌های T بر اساس وجود شاخص CD3، نمودار سمت چپ ایزوتیپ شاخص CD3، نمودار سمت راست تست است.

نتایج فلوسیتومتری نشان داد که خلوص این سلول‌ها بر اساس وجود شاخص اختصاصی CD11c حدود ۲±۹۳ درصد بود (نمودار ۱ A). برای جداسازی لنفوسیت T از غدد لنفاوی موش‌های Balb/c استفاده شد. نتایج حاصل از جداسازی سلول‌های T با تکنیک نایلون وول نشان می‌دهد که میزان بازیافت سلولی پس ازعبور دادن سلول‌ها از ستون حدود ۴۰-۳۰ درصد سلول‌های اولیه بوده و درصد حیات آنها بالای ۹۷درصد بود.

میزان خلوص لنفوسیت‌های T توسط دستگاه فلوسیتومتری و با شاخص CD3 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های T، ۲±۹۱ درصد خالص‌اند (نمودار ۱ B).

واکنش MLR آلوژنیک و بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوآ

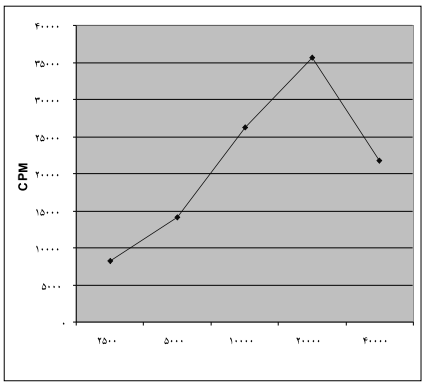
بررسی‌های اولیه نشان داد که هرگاه تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول دندریتیک در مقابل ۱×۱۰^{۵} سلول T قرار گیرد (۵:۱) بیشترین شدت تکثیر لنفوسیت‌های T مشاهده می‌شود (نمودار ۲).

بر این اساس در تمام آزمایش‌های بعدی از این نسبت استفاده شد. نتایج حاصل از پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T در مقابل DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای حامله و DCs بالغ شده در شرایط بدون مایع برحسب cpm نشان می‌دهد که مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله در تمامی غلظت‌ها سرکوب کننده است اما در غلظت ۱۰درصد بیشترین خاصیت سرکوبگری را دارد (نمودار ۳). بنابراین در آزمایش‌های بعدی جهت تیمار سلول‌های دندریتیک از غلظت ۱۰درصد مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله استفاده شده است. همچنین بین cpm آزمایشات MLR که در آن‌ها سلول‌های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا تیمار شده بودند و آزمایش‌هایی که سلول‌های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول‌های رحم غیرحامله تیمارشده بودند اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p=۰/۰۱۶). میانگین cpm آزمایش‌های MLR با DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله در مقابل DCs تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوآ (DC بالغ شده با FCS) نیز اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد (p=۰/۰۰۸). در حالی که این اختلاف بین تیمار DC با مایع رویی کشت سلول‌های رحم موش غیرحامله با DCهای تیمار نشده معنی‌دار نبوده است (p=۰/۴۱۳).

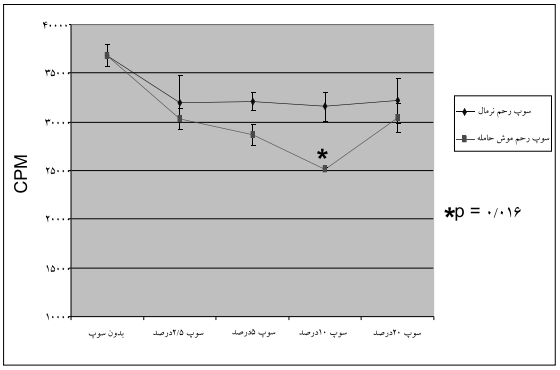
بررسی اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بر سلول‌های دندریتیک از نظر القا بیان IDO

نتایج به دست آمده نشان داد در حضور DCs تیمار شده با مایع

رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش‌های حامله، پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های T کاهش یافته است. به منظور بررسی تاثیر احتمالی IDO مترشحه از سلول‌های دندریتیک در این سرکوب، مهارکننده اختصاصی آنزیم، ۱- متیل D، L تریپتوفان، (Mt) در غلظت‌های ۲۵۰ میکرومولار، ۵۰۰ میکرومولار، ۱۰۰۰ میکرومولار و ۲۰۰۰ میکرومولار به کشت هم‌زمان DCهای تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا و لنفوسیت‌های T آلوژن، اضافه شد. در این سری آزمایش‌های افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها از غلظت ۲۵۰میکرومتر مشاهده شد و همچنان که غلظت متیل تریپتوفان زیاد می‌شد پاسخ‌های تکثیری نیز بیشتر می‌شد. این افزایش پاسخ تکثیری تا غلظت ۱۰۰۰میکرومول مشاهده شد و در غلظت بالاتر متیل تریپتوفان، پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها کاهش پیدا می‌کرد (نمودار ۴).

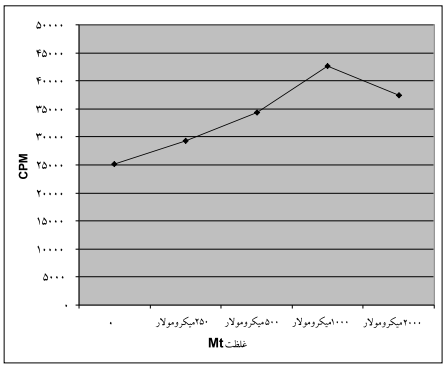


نمودار۲: بررسی نسبت‌های مختلف CDs بر القا پاسخ تکثیری سلول‌های T بر حسب CPM. در این آزمایش‌ها تعداد لنفوسیت T ۱۰۰۰۰۰ سلول ثابت نگه داشته شده است.

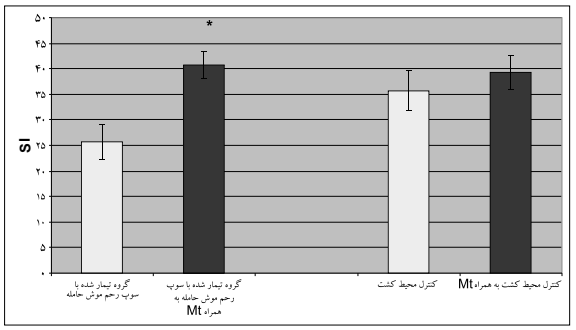


نمودار۳: مقایسه اثر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا در غلظت‌های مختلف روی سلول‌های دندریتیک بر القای پاسخ تکثیری سلول‌های T

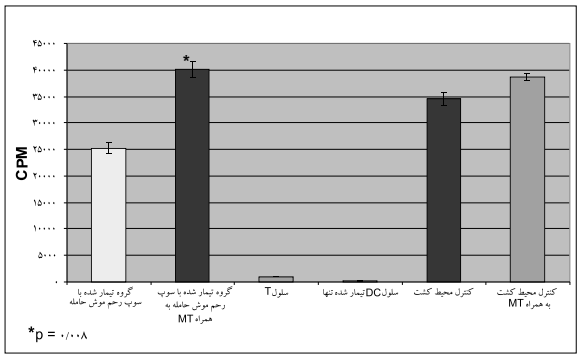
نتایج cpm به دست آمده از پنج آزمایش مجزا نشان می‌دهد که با اضافه کردن Mt به محیط MLR پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌ها افزایش می‌یابد و اگر چه این افزایش هم در گروه DCs تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای حامله و هم در DCs تیمار نشده مشاهده شده است، در گروه تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا، این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نیست (p=۰/۲۸۶) (نمودار ۵ و ۶). در حالی که در گروه تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا پس از افزودن Mt افزایش پاسخ تکثیری از نظر آماری معنی‌دار است (p=۰/۰۰۸).



نمودار۴: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف متیل تریپتوفان بر پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T مجاور شده با سلول‌های دندریتیک تیمار شده با ۱۰درصد سوپ دسیدوای موش حامله

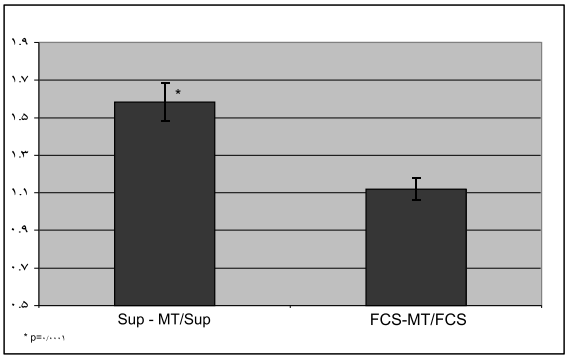


نمودار۵: مقایسه میزان تکثیر لنفوسیتی در دو گروه DCهای تیمار شده با ۱۰درصد مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله و پس از اضافه کردن Mt و گروه DCهای تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله (DC بالغ شده با FCS) و پس از اضافه کردن Mt بر حسب اندیکس تحریک.



نمودار۶: مقایسه میزان تکثیر لنفوسیتی در دو گروه DCهای تیمار شده با ۱۰درصد مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله و پس از اضافه کردن Mt و گروه DCهای تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله (DC بالغ شده با FCS) و پس از اضافه کردن Mt بر حسب CPM.

همچنین نسبت cpm در حالت پس از اضافه کردن Mt به قبل آن در گروه DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا در مقایسه با گروه DCs تیمار نشده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله نیز از نظر آماری کاملا معنی‌دار است (p=۰/۰۰۰۱) (نمودار ۷).



نمودار۷: مقایسه نسبت CPM در گروه سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سوپ دسیدوا با متیل تریپتوفان و بدون متیل تریپتوفان (sup-MT/sup) به گروه سلول‌های دندریتیک بالغ شده با FCS با متیل تریپتوفان و بدون متیل تریپتوفان (FCS-MT/FCS).

بحث

حاملگی پدیده‌ای است که قوانین ایمونولوژی را آشکارا زیر سوال برده است (۴). این که جنین نیمی از ژنوم خود را از پدر به ارث می‌برد و در طی حاملگی توسط سیستم ایمنی مادر مورد شناسایی نیز قرار می گیرد اما رد نمی‌شود، در بیولوژی حاملگی به عنوان یک پدیده بسیار مهم مورد توجه قرار گرفته است و تحقیقات گسترده‌ای در این راستا صورت گرفته که هر کدام توجیه کننده قسمتی از فرآیندهای حاملگی بوده است (۳).

در حاملگی پستانداران بین سیستم ایمنی مادر و آنتی‌ژن‌های پدری بروز یافته از سوی جنین، تماس مستقیم وجود دارد . بافت دسیدوای مادری از نظر استراتژیک در مکانی واقع شده است که با عمل تنظیم ایمنی (immunoregulatory) از جنین محافظت می کند (۲۱). مطالعات در مورد مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا نشان می‌دهد این مایع پاسخ‌های وابسته به آنتی ژن و پاسخ‌های تکثیری غیراختصاصی را سرکوب می کند. این مایع که منعکس کننده ریز محیط دسیدوا است، حاوی فاکتورهای سرکوب گر متعددی است و با مکانیزم‌های مختلف که کاملا شناخته نشده‌اند می توانند پاسخ‌های ایمنی را تعدیل کنند. این فاکتورها می توانند به صورت مستقیم باعث کنترل پاسخ‌های ایمنی شوند و یا با تاثیر بر مسیر تمایزی و بلوغ سلولی آنها را به سمت سلول‌های کنترل کننده پاسخ ایمنی سوق دهند (۲۱، ۲۲).

در مطالعاتی که توسط دیگران انجام شده است مکانیسم سرکوب گری مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا به علت حضور مستقیم آن در مدل تحریک‌های آلوژنیک مورد بررسی قرار گرفته است و عمده گزارش‌ها بر اساس حضور مستقیم این مایع در مدل مورد مطالعه بوده است (۲۲). نتایج تحقیقات قبلی ما که تنها گزارش موجود از تاثیر این مایع بر فرایند بلوغ سلول‌های دندریتیک است، نشان می‌دهد این سلول‌ها پس از بلوغ در ریز محیط حاوی مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا توان کمتری در القای پاسخ‌های اختصاصی آنتی‌ژن دارند و الگوی سایتوکاینی را به سمت Th_2 سوق می‌دهند (۱۹). مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر مایع رویی کشت کوتاه مدت سلول‌های دسیدوا بر توانایی سلول‌های دندریتیک در القا پاسخ‌های آلوژنیک در لنفوسیتهای T طی واکنش MLR انجام گرفت. همچنین در این مطالعه مکانیسم احتمالی مداخله‌کننده در واکنش بین سلول‌های دندریتیک تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا و لنفوسیت‌های T بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد سلول‌های DC تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای موش حامله نسبت به سلول‌های دندریتیک تیمار نشده و یا تیمار شده با مایع رویی کشت رحم غیرحامله توان کمتری در القای پاسخ‌های تکثیری در لنفوسیت‌های T مدل MLR آلوژنیک دارند و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار است (p=۰/۰۱۶).

همچنین در این تحقیق از مهارکننده اختصاصی آنزیم IDO برای اثبات نقش آن در مدل آزمایش استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد متیل تریپتوفان در گروهی که از DCهای تیمار شده با مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوای حامله به عنوان جمعیت محرک استفاده شده، موجب افزایش پاسخ تکثیری لنفوسیت‌های T شد و این افزایش کاملا معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۸).

نتایج بررسی‌های ما نشان می‌دهد دسیدوا علی‌رغم ترشح فاکتورهای سرکوبگر متنوع که موجب سرکوب مستقیم پاسخ‌های ایمنی به صورت موضعی می‌شود قادر است از طریق القا سنتز آنزیم IDO در سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، با روندی غیرمستقیم از بروز پاسخ‌های ایمنی ممانعت کند و این مکانیسم ارزشمند می‌تواند از جنین در مقابل پاسخ‌های آلوژن حمایت کند. روشن شدن نقش آنزیم IDO طی حاملگی یکی از بزرگترین موفقیت‌ها در بیولوژی باروری و ناباروری است. این آنزیم که با تخریب اسید آمینه ضروری تریپتوفان، شرایط را برای مرگ سلول‌های مهاجم پدید می‌آورد از مهم‌ترین مکانیسم‌های بقا جنین طی حاملگی است. در انسان بیشترین میزان بروز این آنزیم در جفت دیده می‌شود. اما در موش عمده سلول‌های بروز دهنده این آنزیم در دسیدوا مستقرند (۲۳) و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن از منابع اصلی آنزیم IDO هستند (۱۶).

مطالعات واسیلیادو و همکاران نشان داده است که مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا پاسخ‌های تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان به PHA را سرکوب می کند (۲۴).

لالا و همکاران نیز طی پژوهشی نشان داده‌اند کشت هم‌زمان سلول‌های دسیدوا و ماکروفاژهای مشتق از دسیدوای سه ماهه اول

حاملگی انسان در MLR آلوژنیک، خاصیت آلوراکتیویتی لنفوسیت‌های T را در in vitro سرکوب می‌کند. آنان دریافتند این سرکوب، روش غیرمحدود به MHC و علت آن تولید $PG\text{-}E_2$ از سوی این سلول‌ها بوده است (۲۱).

سوگاوا و همکاران با اضافه کردن مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا به محیط MLR ، در محیط MLR، ایندومتاسین اضافه کردند این دارو مهار کننده پروستاگلندینها است. در حضور این دارو سرکوب ایجاد شده در MLR کمی ضعیف‌تر شد. لذا معتقدند پروستاگلندین‌ها یکی از عوامل سرکوب‌گر در مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا هستند (۲۲).

ماتوسی و همکاران مشاهده کردند که مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا در MLR و در تحریک غیراختصاصی سلول‌های تک هسته‌ای خاصیت سرکوب‌گری دارد. آنان برای یافتن مکانیسم سرکوب‌گری مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا، تاثیر این مایع را روی لنفوسیت‌های خون محیطی بررسی و مشاهده کردند مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا بروز IL-2 و گیرنده IL-2 و INF- γ را در مقایسه با گروه کنترل سرکوب می‌کند. آنان همچنین مشاهده کردند مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا تولید IgM و IgG توسط لنفوسیت B تحریک شده با میتوژن pokeweed را سرکوب می‌کند. آنها نهایتا سلول‌های دسیدوا را در محیط فاقد سرم کشت دادند و دو مولکول ۴۳کیلودالتون و ۶۷ کیلودالتون از مایع رویی کشت سلول‌های کشت سلول‌ها دسیدوا جدا کردند که در محیط MLR خاصیت سرکوب‌گری داشت (۲۵).

دایا و همکاران مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا را با تکنیک HPLC مورد بررسی قرار دادند. آنها دو peak در وزن‌های مولکولی 43KD و 21KD مشاهده کردند و نشان دادند که این دو مولکول با عملکرد IL-2 تداخل دارند (۲۶).

ناکایاما و همکاران نیز نشان داده‌اند که خاصیت سرکوب‌گری مایع رویی کشت سلول‌های دسیدوا با سن حاملگی رابطه عکس دارد .آنها می‌گویند سلول‌های آندومتر (دسیدوا) در سه ماهه اول حاملگی ممکن است نقش مهمی در محافظت از جنین در مقابل رد شدن از سوی مادر داشته باشد و احتمال چنین نقشی در اوایل حاملگی بیشتر است (۲۷). یافته‌های محققان نشان می‌دهد از سلول‌های دسیدوا مولکول‌های متعددی به ریز محیط اطراف ترشح می‌شود تا سیستم ایمنی را در آن منطقه سرکوب کند (۲۸، ۲۹).

با توجه به فاکتورهای متعدد ناشی از سلول‌های دسیدوا شاید منطقی به نظر برسد که این فاکتورها در روند بلوغ و تمایز سلول‌های دندریتیک مداخله کند و باعث کنترل خاصیت دگر تحریکی (Allostimulatory) این سلول‌ها شوند (۲۲).

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت وجود فاکتورهای مترشحه از بافت دسیدوا در ریز محیط سلول‌های دندریتیک، توان این سلول‌ها را در القا پاسخ‌های ایمنی کاهش می‌دهد و از این طریق به کنترل پاسخ‌های ایمنی مادر بر علیه جنین می‌پردازد. یکی از مکانیزم‌های این کنترل القا آنزیم IDO در سلول‌های دندریتیک است که نقش حیاتی آن در بقای جنین آلوژنیک به اثبات رسیده است. این آنزیم می‌تواند با مصرف اسید آمینه ضروری تریپتوفان پاسخ‌های نامطلوب لنفوسیت T را که می‌تواند منجر به رد جنین شود کنترل کند.

References

1. Mellor AL, Munn DH. Immunology at the maternal-fetal interface: Lessons for T cell tolerance & suppression. Annual Review in Immunology, 2000; 18: 367-391

2. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A. Tolerance to the feto-pelacental graft: ten ways to support a child for nine monthes. Current Opinion in Immunology, 2000; 12: 731-737

3. Erlebacher A: Why isnt the fetus rejected. Current Opinion in Imunology, 2001; 13: 590-593

4. Arck PC, Ferrick DA, Norwold DS, Clark DA , Dietl J, Carding SR, Croitoru K, Egan PJ. Murine T cell determination of pregnancy outcome. Cellular Immunology, 1999; 196: 71-79

5. Zenclussen AC, Fest S, Sehmsdorf US, Arck PC, Klapp BF, Hagen E: Up regulation of Decidual P-selectin. Expression is associated with an increased number of T-helper-1 cell populations in patients suffering from spontaneous abortion. Cellular Immunology, 2001; 213: 94-103

6. Rango UV, Linke IC, Raven G, Beier HM, Bocken F.Cytokine microenvironments in human first trimester deciduas are dependent on trophoblast cells. Fertility and Sterlity, 2003; 79

7. Langevin CK, Caucheteu SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system :role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003; 1: 121

8. Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z: Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment. Placenta, 2004; 25: 26-31

9. Miazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori SH, Sasaki Y, Futatani T, Miyawaki T, Saito SH. Predominance of

Th-2 -promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. Journal of Leukocyte Biology, 2003; 74: 514-522

10. Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC, Morita A, Bergstresser PR, Yagita H, Okumura K, Takashima A. Dendritic cell undergo rapid apoptosis in vitro during antigen specific interaction with CD4+T cells. The Journal of Immunology, 1999; 162: 5287-5298

11. Castellano G, Woltman AM, Schena FP, Roos A, Daha MR, Kooten CV. Dendritic cells and complement: at the across road of innate and adaptive immunity. Molecular Immunology, 2004; 41: 133-140

12. Mellor AL, Chandler P, Lee GK, Munn DH. Indoleamin 2, 3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. Reproductive Immunology, 2002; 57: 143-150

13. Takikawa O, Ohkubo AH, Yoshida R. Inter feron- γ is the inducer of indoleamin 2, 3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. Immunology J, 1990; 4: 1246-1250

14. Miki T, Sun H, Lee YL, Tandin A,Valdivia LA, Fung JJ, Subbotin V, Kovscek AM. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontanous tolerogenicity of liver allografts. Transplantation Proceedings, 2001; 33: 129-130

15. uzuki S, Tone S, Takikawa O, Kubos T, Kohno I, Minatogawa Y. Expression of indoleamin 2, 3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti. Biochemical Society, 2001; 355: 425-429

16. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Opelz G, Simon H, Watzlik A. Iinhibition of allogenic Tcell proliferation by indoleamin 2, 3-dioxygenase-expressing dendritic cells:mediation of suppression by tryptophan metabolites. Journal of Experimental Medicine, 2002; 19: 447-457

17. Sedlmayr P, blaschitz A, wintersteiger R, semlitsch M, Dohr G, Takikawa O, Reich O, Walcher W, Mackenzie CR, Hammer A. Localization of indoleamin 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta. Molecular Human Reproduction, 2002; 4: 385-391

18. Kudo Y, Boyd R, Sargent IL, Redman C: Modulation of indoleamin 2, 3-dioxygenase by interferon- gama in human placental chorionic villi. Molecular Human Reproduction, 2000; 4: 369-374

19. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jedi-Tehrani M. Inhibitory effect of decidual culture supernatants on antigen presentation by dendritic cells. Reproduction And Fertility, 2004; 5(2): 115-128

20. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Dokouhaki P, Shojaeian J, Jeddi-tehrani M. The efficient isolation of murine splenic Dendritic cells and their cytochemical features. Histochemistry and Cell Biology, 2006

21. Lala PK, Kennedy TG, Parhar RS. Suppression of lymphocyte alloreactivity by early gestational human decidua. Cellular Immunology, 1988; 116: 411-422

22. Umesaki N, Kawabata M, Sugawa T. Immunosuppressive effect of culture supernatant derived from decidual cell rich fraction. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1988; 40: 841-846

23. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T cell tolerance: immunosuppression by starvation. Immunology Today, 1999; 10: 469-473

24. Vassiliadou N, Searle RF, Bulmer JN. Immunoregulatory activity of decidua in spontaneous early pregnancy loss. Human Reproduction, 1999; 14: 2252-2256

25. Matsui S, Yoshimura N, Oka T. Characterization and analysis of soluble suppressor factor from early human decidual cell. Transplantation, 1989; 47:678-683

26. Daya S, Rosenthal KL, Clark DA. Immunosuppressor factors produced by decidua-associated suppressor cells: a proposed mechanism for fetal allograft survival. American Journal of Obstet Gynecology, 1987; 156: 344-350

27. Nakayama E, Asano S, Kodo H, Miwa S. Suppression of mixed lymphocyte reaction by cells of human first trimester pregnancy endometrium. Journal of Reproduction Immunology, 1985; 8: 25-31

28. Tawfik OW, Hunt JS, Wood GW. Implication of prostaglandin E2 in soluble factor-mediated immune suppression by murine decidual cells. American

Journal of Reproduction Immunology and Microbiology, 1986; 12: 111-117
29. Merali FS, Arck PC, Beaman K, Clark DA. Transforming growth factor-Beta-2-related- decidual suppressor factor is not related to TJ6 protein. American Journal of Reproduction Immunology, 1996; 35: 342-347