Physiology and Pharmacology, 16 (2), 136-145
Summer 2012 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of Ovarian Induction Using PMSG and HCG hormones on Uterus Dendritic Cells Population in NMRI mice

seyed mohammad moazzeni[1*], maryam eskandaryan[1], mojdeh salehnia[2]

1. Dept. Immunology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Dept. Histology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 5 Jan 2012 **Accepted: 13 June 2012**

Abstract

Introduction: Ovarian hyper-stimulation is widely used in IVF clinics. The main purpose of this method is to stimulate folliculogenesis and increase the number of oocytes in one cycle. Following ovarian hyper-stimulation, hormonal secretion of the ovary, particularly estradiol and progesterone dramatically increases. Immune cells especially dendritic cells have receptors for the estradiol and progesterone and play an important role in appropriate implantation and successful pregnancy. Increase in estradiol and progesterone concentrations following ovarian stimulation can affect the recruitment and frequency of immune cells particularly dendritic cells.

Methods: To explore this issue, blood was collected from two groups of pregnant mice (with and without ovarian stimulation) on the seventh day of pregnancy. The amounts of estradiol and progesterone were measured in the sera. The frequency and localization of dendritic cells in spleen and decidua were also investigated by immunohistochemistry.

Results: The results of this study showed an increase of progesterone and estradiol concentrations and a decrease of frequency of dendritic cells in hyper-stimulated group compared to the control group.

Conclusion: Considering the increase in progesterone and estrogen concentrations after ovarian induction and the presence of receptors for these hormones on dendritic cells, the changes in frequency of dendritic cells could be explained. Regarding the role of dendritic cells in embryo implantation and regulation of maternal immune response, it seems that their changes may decrease the rate of pregnancy success after IVF.

Key words: Dendritic cell, Ovarian induction, Estradiol, Progesterone

[*] Corresponding author e-mail: Moazzeni@modares.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۶ (۲)، ۱۳۶ – ۱۴۵
تابستان ۱۳۹۱

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثر تحریک تخمک‌گذاری القاء شده با هورمون‌های HCG و PMSG بر جمعیت سلول‌های دندریتیک رحمی در موش‌های ماده NMRI

سید محمد موذنی[1*]، مریم اسکندریان[1]، مژده صالح‌نیا[2]
۱. گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: ۱۵ دی ۹۰ پذیرش: ۲۴ خرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: روش تحریک تخمک‌گذاری با هدف تحریک فولیکولوژنز و افزایش تعداد تخمک‌های آزاد شده کاربرد وسیعی در کلینیک‌های IVF دارد. به دنبال تحریک هورمونی تخمک‌گذاری، میزان هورمون‌های مترشحه از تخمدان به ویژه استرادیول و پروژسترون از حد فیزیولوژیک فراتر می‌رود. سلول‌های سیستم ایمنی به ویژه سلولهای دندریتیک واجد رسپتور برای هورمونهای پروژسترون و استرادیول هستند. این سلولها در لانه‌گزینی مناسب و ایجاد یک حاملگی موفق نقش مهمی دارند. افزایش غلظت هورمونها به دنبال تحریک تخمک‌گذاری، می‌تواند بر فراخوانی و فراوانی سلول‌های ایمنی به ویژه سلول دندریتیک تاثیر بگذارد.

روش ها: از دو گروه موش‌های باردارشده طبیعی و موش‌های باردارشده پس از تحریک تخمک‌گذاری، در روز هفتم بارداری خون‌گیری به عمل آمد و میزان هورمون‌های استرادیول و پروژسترون سرم سنجش شد. همچنین با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی فراوانی و چگونگی پخش سلول‌های دندریتیک در دو بافت طحال و دسیدوا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که در گروه تحریک تخمک‌گذاری نسبت به گروه کنترل، میزان هورمون‌های استرادیول و پروژسترون سرم افزایش و فراوانی سلول‌های دندریتیک در دو بافت طحال و رحم کاهش یافته است.

نتیجه گیری: با توجه به افزایش غلظت هورمونهای استروژن و پروژسترون بدنبال تحریک تخمک گذاری و وجود گیرنده جهت این هورمونها بر روی سلولهای دندریتیک، تغییر فراوانی این سلولها پس از تحریک تخمک گذاری قابل توجیه می‌باشد و با توجه به نقش سلولهای دندریتیک در پدیده لانه گزینی جنین و کنترل پاسخ‌های ایمنی مادر، بنظر می‌رسد که تغییرات این سلولها ممکن است منجر به کاهش موفقیت حاملگی پس از IVF شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های دندریتیک، تحریک تخمک‌گذاری، استرادیول، پروژسترون

مقدمه

روش‌های تحریک تخمک‌گذاری یکی از روش‌های معمول و واجد کاربرد وسیع در کلینیک‌های IVF می‌باشند. هدف اصلی این روش تحریک فولیکولوژنز و افزایش تعداد تخمک‌های حاصله در یک سیکل می‌باشد [۷، ۱۹] روش تحریک تخمک‌گذاری با مکانیسم فیزیولوژیک بدن انسان که تکامل یک تخمک در یک سیکل می‌باشد متفاوت است [۸] و باید کاملاً از پروسه طبیعی تخمک‌گذاری افتراق داده شده و اثرات و پیامد این روش به طور کامل مشخص شود [۹].

در تکنیک‌های مرسوم IVF در فاصله زمانی کوتاهی بعد از تحریک تخمک‌گذاری و به دست آوردن تخمک، انتقال جنین صورت می‌گیرد و جنین انتقال داده شده باید بتواند در

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Moazzeni@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

آندومتر جایگزین شده و مراحل بعدی تکوین را سپری کند [۸]. جمعیت‌های سلولی موجود در آندومتر در زمان لانه‌گزینی جنین و چگونگی عملکرد آن‌ها نقش بسیار مهمی در موفقیت لانه-گزینی و در نتیجه موفقیت IVF دارد [۲۸]. نقص در لانه‌گزینی با حاملگی‌های ناموفق و کاهش شانس باروری در تکنیک‌هائی مثلIVF همراه می‌باشد. تقریباً نیمی از موارد لانه‌گزینی جنین در انسان دچار شکست می‌شود و تعداد زیادی از حاملگی‌های ناموفق به دلیل عدم آمادگی مناسب بافت رحم در پذیرفتن جنین است [۲۱]. مطالعات نشان می‌دهد ارتشاح سلول‌های ایمنی قبل از لانه‌گزینی در آمادگی رحم برای پذیرفتن جنین نقش مهمی را ایفا می‌کند. مثلاً سلول‌های NK با ترشح فاکتورهای رگ‌زا باعث رشد عروق خونی و پایداری سلول‌های دسیدوا می‌شوند [۳]. کاهش سلول‌های NK در محل لانه-گزینی مانع تخریب شریان‌های مارپیچی اندومتر و تشکیل دسیدوا می‌شود [۲۱]. علاوه بر این، سلول‌های دندریتیک نیز قبل از لانه‌گزینی در موضع رحم تجمع می‌یابند و نقش مهی در شکل‌گیری و بلوغ رگ‌های خونی از طریق ترشح فاکتور-هایی مثل FLT3 و TGF-β ایفا می‌کنند [۲۱]. مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهند در زمان لانه‌گزینی تعداد سلول‌های دندریتیک به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد، به همین دلیل محققین نقش مهمی برای سلول دندریتیک در طی پروسه لانه‌گزینی قائل هستند. مطالعات بیشتر در این زمینه نشان داد که در رحم فاقد سلول دندریتیک، رگ‌زایی، افزایش نفوذپذیری عروق و بلوغ رگ‌های خونی به تأخیر می‌افتد. در اثر این تأخیر شکل‌گیری دسیدوا با مشکل روبه‌رو می‌شود. در نتیجه موش-های ترانسژنیک فاقد سلول دندریتیک رحمی مبتلا به کاهش باروری، نقص در شکل‌گیری دسیدوا و لانه‌گزینی مناسب جنین هستند که نهایتاً منجر به سقط جنین می‌شود [۱۴، ۲۱]. به دنبال تحریک تخمک‌گذاری مقادیر هورمون‌های مترشحه از تخمدان به ویژه استرادیول و پروژسترون بیش از حد فیزیولوژیک است [۵، ۱۵، ۱۸] و در مطالعات مختلف نشان داده شده که افزایش هورمون‌های تخمدانی خود می‌تواند اثرات سوء مختلفی بر جایگزینی و تکامل جنین بگذارد [۶]. یکی از مهم‌ترین اندام‌های هدف این هورمونها، رحم و به خصوص آندومتر است که محل اصلی تماس جنین و مادر می باشد. رحم باید از لحاظ سیستم ایمنی و دفاعی دارای مکانیسم‌هایی باشد که توانایی تحمل جنین را با خصوصیات آنتی‌ژنی متفاوت از خصوصیات آنتی ژنی مادر داشته باشد. از آنجا که سلول‌های ایمنی به ویژه سلول دندریتیک دارای رسپتور برای هورمونهای پروژسترون و استروژن هستند [۱] و در لانه‌گزینی مناسب و ایجاد یک حاملگی موفق نقش مهمی دارند، افزایش هورمون-های پروژسترون و استرادیول که به دنبال تحریک تخمک-گذاری در تکنیک‌های باروری مثل IVF ایجاد می‌شود، می‌تواند بر فراخوانی و فراوانی سلول‌های ایمنی به ویژه سلول دندریتیک تأثیر بگذارد. احتمال دارد که تغییرات در فراوانی سلول دندریتیک یکی از عوامل کاهش موفقیت لانه‌گزینی در تکنیک IVF و نهایتاً سقط جنین باشد. در این مطالعه فراوانی سلولهای دندریتیک در رحم به عنوان محل اصلی لانه گزینی جنین و شکل گیری پاسخ ایمنی مادر بر علیه جنین و طحال به عنوان نماینده ای از تغییرات سیستمیک این سلولها متعاقب تحریک تخمک گذاری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تعدادی موش نر و ماده ۱۰-۶ هفته‌ای از نژاد NMRI از موسسه رازی تهیه شده و در شرایط ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای مناسب (°C ۲۳-۱۸) در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شد. جهت تطبیق موش‌های ماده با محیط جدید، آزمایشات حدود ۲-۱ هفته بعد از انتقال به حیوانخانه شروع شد. کلیه آزمایشات انجام شده روی حیوان آزمایشگاهی به تایید کمیته اخلاق زیستی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است. موشهای ماده جهت هم سیکل شدن در قفس جداگانه و دور از موشهای نر نگهداری می‌شدند. به منظور القاء تحریک تخمک گذاری به موش‌های ماده گروه آزمایش به میزان ۱۰-۵ واحد بین‌المللی هورمون (Pregnant mare serum gonadotropin) PMSG (Bionich, Australia) و ۴۸ ساعت بعد به میزان ۱۰-۵ واحد بین‌المللی هورمون β-HCG (Human chorionic gonadotropin) (Exir, Iran) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. (به موش‌های گروه کنترل هیچ نوع هورمونی تزریق نگردید) و سپس موش‌های ماده از هر دو گروه به قفس موش‌های نر برای بارداری انتقال داده

شدند.

برای تعیین سن بارداری از تکنیک تشخیص پلاک واژینال استفاده شد. موش‌های ماده تا ۳ روز متوالی هر روز صبح از نظر تشکیل پلاک واژینال بررسی شدند. بدین ترتیب که با فشار دادن پی‌پت پاستور در دهانه واژن حالت سفتی و صدای خش‌دار احساس می‌شد. در تمام موش‌های ماده پلاک مثبت، وجود اسپرم در ترشحات واژن از طریق تهیه اسمیر واژینال بررسی گردید. روز رویت اسپرم در اسمیر واژینال به عنوان روز ۰/۵حاملگی در نظر گرفته شد. سپس در روز هفتم بارداری هر دو گروه موش باردار شده با دی اتیل اتر بیهوش شده، از آنها خونگیری به عمل آمد و میزان استروژن و پروژسترون سرم با روش الیزا اندازه‌گیری شد. بعد از خونگیری موش‌های باردار شده با روش قطع نخاع کشته و با استفاده از قیچی و پنس ناحیه شکمی باز گردید به این صورت که هر دو بافت طحال و رحم قابل جداسازی باشند. شاخ‌های رحمی خارج شده و در زیر میکروسکوپ استریو نقاط کاشت جنین تعیین و نمونه‌برداری از نقاط کاشت جنین و همچنین از بافت طحال انجام شد. سپس قطعاتی از بافت طحال و رحم به ابعاد ۴×۴ میلی‌متر بریده شده و در قالب‌های جداگانه با جهت مناسب قرار داده شدند. قالب‌ها از چسب فروزن OCT (Jung, Germany) پر گردید و در فلاسک ازت فرو برده شدند. پس از یخ‌زدن چسب فروزن قالب‌ها خارج و در سرمای۷۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تهیه برش های انجمادی (Cryosection) بلوک‌های بافتی از فریزر ۷۰– درجه سانتی‌گراد خارج و به مدت ۱ساعت در دستگاه Cryosection (Shoudon,U.K) سرد (۲۰– درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد و سپس برش‌های بافتی به قطر ۵ میکرومتر تهیه شده و پس از فیکس نمودن در استون سرد در فریزر۷۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی بافت‌های طحال و رحم، اسلایدها از فریزر خارج و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه خشک شدند. دور برش‌های بافتی با Dako pen (Dako, Denmark) علامت‌گذاری شد. سپس برش‌های بافتی سه بار با بافر Tris buffered saline (TBS) و هر بار به مدت ۲ دقیقه شسته شدند. محلول Protein block (serum free) (Dako, Denmark) به مدت ۱۵دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه شد. بعد از این مرحله بافر بلوک‌کننده (سرم بز) با غلظت ۲٪ به مدت ۱۵دقیقه بر روی بافت‌ها اضافه گردید. برای خنثی نمودن بیوتین بافتی به اسلایدها اویدین (Dako, Denmark) اضافه و برش‌های بافتی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. بعد از شستشو با TBS، محلول بیوتین (Dako, Denmark) اضافه و برش‌های بافتی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس اسلایدها شسته و آنتی‌بادی (Hamster anti- mouse CD11c) (BD, USA) با غلظت ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی (antibody diluent) (BD, USA) بر روی برش‌های بافتی اضافه گردید. (در اسلاید کنترل منفی به جای آنتی‌بادی ضد CD11c یک قطره بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی اضافه شد). پس از ۷۵ دقیقه انکوباسیون در درجه حرارت آزمایشگاه، لام‌ها سه بار با TBS شسته شدند. پس از شستشو، آنتی‌بادی ضد IgG همستر کونژوگه با بیوتین (biotin conjugated goat anti hamster) (BD, USA) با رقت ۱:۵۰ در بافر رقیق‌کننده آنتی‌بادی به روی اسلایدها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه گردید. برش‌های بافتی سه بار با بافر TBS شسته و استرپتواویدین کونژوگه با آنزیم آلکالین فسفاتاز (Roch, Germany) conjugated Streptavidin (AP) به روی اسلایدها اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از شستشوی اسلایدها با TBS، سوبسترای آبی آلکالین فسفاتاز (alkaline phosphatase blue substrate) (Vector Labratories, USA) به همراه لوامیزول به عنوان مهار کننده آنزیم آلکالین فسفاتاز بافتی اضافه شد و ظهور رنگ زیر میکروسکوپ بررسی گردید. پس از۱۰ دقیقه، برش‌های بافتی با آب شسته و اسلایدها در رنگ Nuclear fast red (Sigma, USA) قرار داده شده و شسته شدند.

پس از انجام مراحل آبگیری با درجات فزاینده اتانول هر کدام به مدت ۱۵ ثانیه، اسلایدها توسط Histoclear (National diagnostics, USA) شفاف و سپس توسط Vecta mount (Vector Labratories, USA) مانته شدند. پس از اتمام رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی دو سلول متفاوت از نظر رنگ در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید، سلول‌های قرمز که از نظر شاخص CD11c منفی بوده و رنگ زمینه (Nuclear fast red) را به خود گرفته‌اند و سلول‌هایی که از نظر شاخص CD11c مثبت بوده، تحت تأثیر آنزیم آلکالین

فسفاتاز و سوبسترا قرار گرفته به رنگ آبی مشاهده شدند[۲۹].

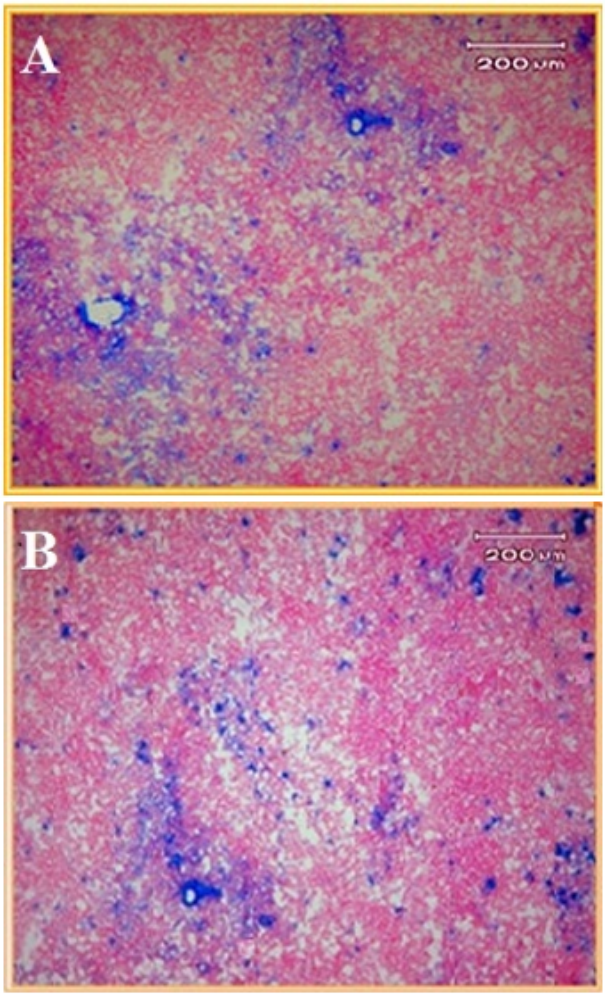
برای تعیین درصد سلول دندریتیک در بافت رحم، از سه منطقه بافت رحم شامل میومتر و دو بخش دسیدوا (اطراف لومن و غدد رحمی) از هر کدام به تفکیک پنج فیلد با بزرگ-نمایی ۴۰۰ انتخاب و تعداد کل سلول‌های $CD11c^+$(سلول-های آبی) شمارش و به تعداد کل سلول‌های هسته‌دار در همان سطح تقسیم شد. برای به دست آوردن درصد سلول دندریتیک در بافت طحال نیز پنج فیلد با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ از اطراف پولپ سفید و پنج فیلد نیز از پولپ قرمز انتخاب گردید و درصد سلولهای آبی رنگ نسبت به کل سلول‌ها تعیین گردید. سپس تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. به منظور مقایسه درصد سلول‌های دندریتیک در دو گروه مورد مطالعه از تست غیر پارامتریک Mann-Whitney استفاده شد. حدود اطمینان در آزمون‌های آماری ۹۵٪ در نظر گرفته شده و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید. لازم بذکر است کلیه نتایج در اینجا به صورت Mean± SD حداقل پنج آزمایش مستقل ارائه گردیده است.

یافته ها

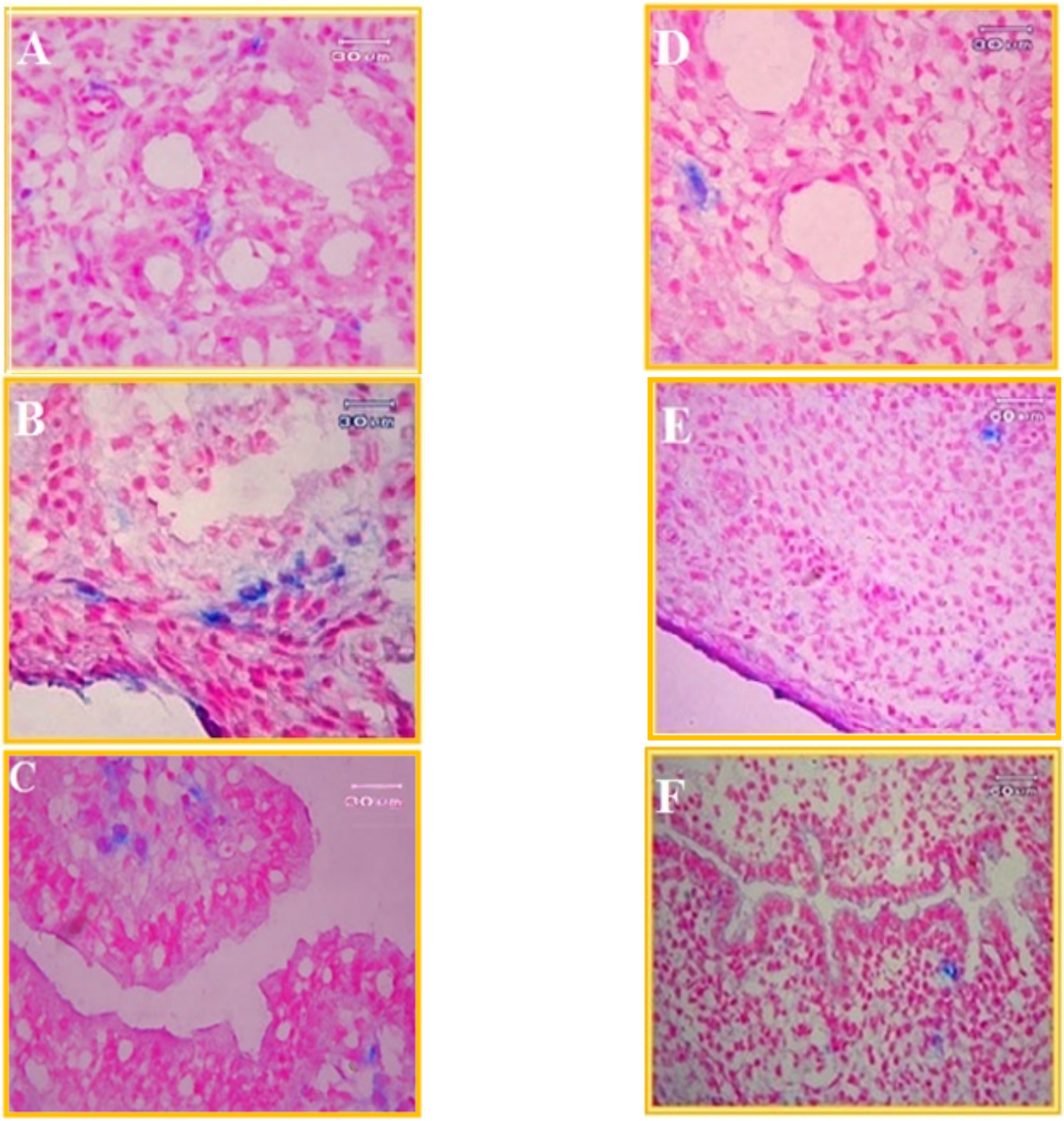
در این مطالعه فراوانی و چگونگی پخش (لوکالیزاسیون) سلول‌های DC در بافت طحال و رحم موش‌های باردار شده طبیعی (بدون تحریک تخمک‌گذاری) و موش‌های باردار شده پس از تحریک تخمک‌گذاری و همچنین سطح سرمی هورمون‌های استروژن و پروژسترون در روز هفتم حاملگی بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که میزان هورمون‌های پروژسترون و استروژن در گروه تحریک تخمک‌گذاری به صورت معنی دار (P=۰/۰۰۸) بیشتر از گروه کنترل است. میزان استروژن سرم در گروه کنترل و تحریک تخمک‌گذاری شده برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۷/۶ ±۹۴/۴ و ۸/۶ ±۱۶۳/۴ برآورد گردید و میزان پروژسترون سرم در گروه کنترل و تحریک تخمک‌گذاری شده برحسب نانوگرم بر میلی-لیتر به ترتیب ۵/۱±۲۸ و ۱۴/۵±۱۸۸/۸ به دست آمد.

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی بافت طحال با آنتی‌بادی ضد CD11c نشان داد که سلول‌های DC در هر دو گروه کنترل و تحریک تخمک‌گذاری عمدتاً در اطراف فولیکول‌های لنفاوی متمرکز شده‌اند همچنین تعدادی سلول $CD11c^+$ نیز در پولپ قرمز مشاهده شد. سلول‌های DC بندرت در داخل فولیکول-های لنفاوی دیده می‌شدند. الگوی پراکندگی سلول‌های دندریتیک در هر دو گروه مشابه بود (شکل۱). رنگ‌آمیزی بافت دسیدوا با آنتی‌بادی ضد CD11c نشان داد که سلول‌های DC در گروه کنترل و تحریک تخمک‌گذاری با فراوانی متفاوت در سرتاسر بافت رحم پراکنده هستند. این سلول‌ها در اطراف میومتر و در بخش‌های مختلف دسیدوا از جمله غدد رحمی و اطراف لومن حضور دارند (شکل ۲ و شکل ۳).

فراوانی سلول‌های دندریتیک بافت طحال در گروه کنترل نسبت به گروه تحریک تخمک‌گذاری شده بیشتر بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۳). درصد سلول‌های



شکل ۱- پراکندگی سلول‌های دندریتیک بافت طحال در گروه تحریک شده (A) و کنترل (B). آنزیم مورد استفاده در این رنگ‌آمیزی آنزیم آلکالین فسفاتاز بوده که با تاثیر بر سوبسترا نهایتاً رنگ آبی ایجاد می‌کند. سلول‌های آبی سلول-های دندریتیک هستند و سلول‌های قرمز سلول‌هایی هستند که از نظر مارکر CD11c منفی بوده و رنگ زمینه (قرمز) را به خود گرفته‌اند.

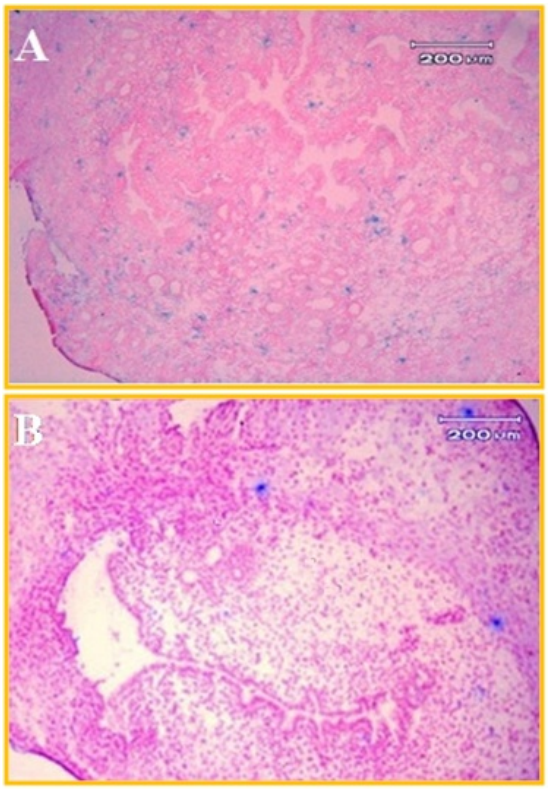


شکل ۲- مقایسه فراوانی و پراکندگی سلول‌های دندریتیک در بافت رحم در گروه کنترل و تحریک شده. شکل‌های سمت چپ شامل: A , B و C فراوانی سلول‌های دندریتیک را در مناطق اطراف غدد، میومتر و اطراف لومن در گروه کنترل را نشان می‌دهد و شکل‌های سمت راست D، E و F فراوانی سلول‌های دندریتیک را در سه منطقه اطراف غدد، میومتر و اطراف لومن در گروه تحریک شده نشان می‌دهد. سلول‌های آبی سلول‌های دندریتیک هستند.

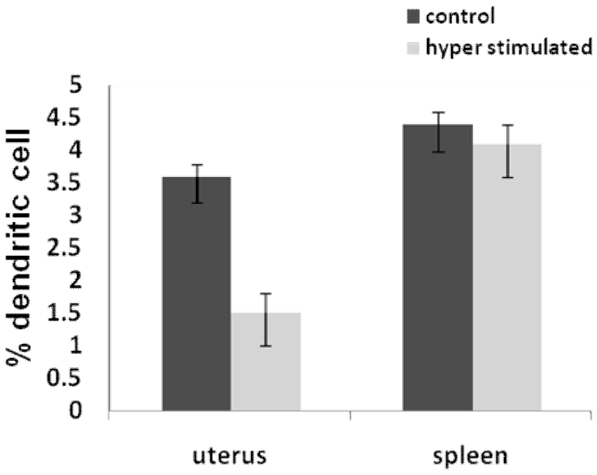
دندریتیک در گروه کنترل ۰/۴ ± ۴/۴ و در گروه تحریک تخمک‌گذاری شده ۰/۵±۳/۶ تعیین شد (شکل ۴). مقایسه درصد سلول‌های دندریتیک در بافت رحم در دو گروه مورد مطالعه نشان داد که درصد سلول مذکور در گروه کنترل (بدون تزریق هورمون) بطور معنی‌داری از گروه تحریک تخمک‌گذاری بیشتر است (P=۰/۰۰۸). درصد سلول‌های $CD11c^+$ در گروه کنترل ۰/۲ ± ۴/۱ برآورد گردید. اما درصد این سلول در گروه تحریک تخمک‌گذاری ۰/۳± ۱/۵ تعیین شد (شکل ۴).

بحث

این مطالعه برای اولین بار تأثیر استفاده از هورمون و تحریک تخمک‌گذاری را بر فراوانی و چگونگی پخش سلول-های دندریتیک در بافت طحال و رحم گزارش می‌کند.



شکل ۳- رنگ‌آمیزی سلول‌های دندریتیک بافت دسیدوا در گروه کنترل (A) و گروه تحریک تخمک‌گذاری (B) در محل لانه‌گزینی با آنتی‌بادی ضد CD11c در موش‌های باردار نژاد NMRI. برش‌های بافتی از بافت طحال و دسیدوا تهیه شده و با آنتی‌بادی ضد CD11c رنگ‌آمیزی شد. سلول‌های آبی سلول‌های دندریتیک هستند و سلول‌های قرمز سلول‌هایی هستند که از نظر مارکر CD11c منفی بوده و رنگ زمینه (قرمز) را به خود گرفته‌اند. کاهش سلول‌های دندریتیک در گروه تحریک تخمک‌گذاری مشهود است.



شکل ٤- درصد سلول‌های دندریتیک در دو بافت رحم و طحال در گروه‌های کنترل و تحریک تخمک‌گذاری شده

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد درصد سلول دندریتیک در بافت رحم درگروه کنترل ۴/۱ درصد کل سلول-های بافت رحم است. مطالعات نشان می‌دهد که بیشترین تعداد سلول‌های دندریتیک در اوایل حاملگی موش به ویژه زمان لانه‌گزینی و تا چند روز پس از آن است [۲۱] به‌طوریکه این افزایش از روز ۵/۵ بارداری شروع و در روز ۸/۵ بارداری به حداکثر میزان خود می‌رسد و بعد از این دوره تعداد سلول‌های دندریتیک از روز ۹/۵ تا روز ۱۷/۵ در یک سطح پایدار باقی می‌ماند. در این فاصله زمانی سلول‌های دندریتیک ۱۰٪ سلول-های رحم را به خود اختصاص می‌دهند [۲]. علت افزایش سلول‌های دندریتیک در اوایل حاملگی می‌تواند به دلیل ارتشاح سلول‌های ایمنی به ویژه مونوسیت و سلول دندریتیک قبل از لانه‌گزینی به موضع رحم باشد. ارتشاح سلول‌های ایمنی قبل از لانه‌گزینی در آمادگی رحم برای پذیرفتن جنین نقش مهمی را ایفا می‌کنند. سلول‌های دندریتیک نیز قبل از لانه‌گزینی در موضع رحم تجمع می‌یابند و نقش مهی در لانه‌گزینی جنین در موش ایفا می‌کنند. بطوریکه کاهش سلول‌های دندریتیک در ناحیه لانه‌گزینی باعث عدم جایگزینی مناسب و نهایتاً سقط جنین می‌شود. [۱۴،۲۱] علاوه بر این دانشمندان بیان کردند که سلول دندریتیک با ترشح کموکاین‌ها و سایتوکاین‌هایی باعث تجزیه لایه MUC-1 و نفوذ بلاستوسیست به جایگاه مناسب برای لانه‌گزینی می‌شود [۳]. یکی دیگر از دلایل افزایش سلول دندریتیک در اوایل حاملگی احتمالاً ناشی از پدیده التهابی القاء شده توسط اسپرم می‌باشد. پس از جفت‌گیری فاکتورهای موجود در مایع منی به ویژه TGF-β سبب تولید طیف وسیعی از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی نظیر GM-CSF، IL-6، TNF-α و کموکاین‌ها از سلول‌های اپیتلیال رحم می‌شوند. این عوامل به نوبه خود موجب مهاجرت طیف وسیعی از سلول‌ها به ناحیه می‌گردند. بنابراین به نظر می‌رسد افزایش قابل توجه سلول دندریتیک در اوایل حاملگی ناشی از استقرار پدیده التهابی و تولید سایتوکاین‌هایی نظیر GM-CSF در ناحیه باشد [۲۲، ۲۳]. با توجه به نقش مهم سلول دندریتیک در اوایل بارداری به ویژه زمان لانه‌گزینی درصد بالای سلول دندریتیک در روز هفتم بارداری قابل توجیه است. اما درصد کل سلول‌های دندریتیک در بافت رحم در گروه کنترل به طور معنی‌داری با گروه تحریک تخمک‌گذاری تفاوت داشت و سلول‌های دندریتیک در گروه تحریک تخمک‌گذاری نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری نشان داد. مطالعات نشان می‌دهند

سلول‌های ایمنی شامل سلول‌های T، NK، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک در سرتاسر بارداری در دسیدوا حضور دارند [۱۲] اما نسبت این سلول‌ها در طول حاملگی تغییر می‌کند. تغییرات هورمون‌های استروئیدی در فازهای مختلف بارداری بر فراخوانی و حضور سلول‌های ایمنی در بافت رحم تأثیر می‌گذارند. در رت‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده است تعداد سلول‌های $MHC\text{-}II^+$ اندومتر به شدت کاهش می‌یابد. تلقیح استرادیول به این رت‌ها سبب افزایش سلول‌های $MHC\text{-}II^+$ در تمام اندومتر می‌شود. در رت‌هایی که به آن‌ها پروژسترون تلقیح شده بود، تعداد کمی سلول‌های $MHC\text{-}II^+$ در اطراف غدد اپیتلیومی مشاهده شده ولی در پاسخ به تزریق توأم پروژسترون و استرادیول تعداد سلول‌های $MHC\text{-}II^+$ رحم به شدت افزایش یافت. همچنین این مطالعه نشان می‌دهد که تلقیح استروژن به تنهایی سبب مهاجرت شدید سلول‌های $OX\text{-}41^+$ (سلول‌های DC، ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها) به رحم می‌شود ولی در تلقیح پروژسترون به همراه استروژن تجمع سلول‌های $OX\text{-}41^+$ کمتر از زمانی است که استروژن به تنهایی تلقیح شود [۲۷].

مطابق برخی از گزارشات احتمال دارد که پروژسترون از طریق کاهش تولید GM-CSF در ممانعت از مهاجرت سلول‌های DC به رحم نقش داشته باشد. تولید GM-CSF توسط سلول‌های اپیتلیال رحم در فاز استروس (که غلظت استروژن بالاست) بیش از سایر فازهای سیکل استروس است. در موش‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده تلقیح استروژن و نه پروژسترون سبب افزایش تولید GM-CSF توسط سلول‌های اپیتلیال رحم می‌شود. این افزایش با تلقیح همزمان پروژسترون مهار می‌شود. همچنین تلقیح آنتاگونیست پروژسترون به موش‌هایی که تخمدان آن‌ها برداشته شده و به آن‌ها استروژن تزریق شده است، تولید GM-CSF را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد [۲۴]. در نتیجه به نظر می‌رسد که استروژن موجب تولید و یا رهاسازی GM-CSF توسط سلول‌های اپیتلیال رحم می‌گردد، در حالی که پروژسترون مانع این عمل می‌شود. سایر مطالعات نشان داده‌اند که تزریق داخل جلدی rGM-CSF به افراد مبتلا به جذام [۱۶] و یا به موش‌ها سبب مهاجرت سلول‌های DC می‌شود همچنین در اثر مجاورت طحال با سایتوکاین GM-CSF افزایش قابل توجهی در تعداد سلول‌های دندریتیک مشاهده شده است [۲۰]. درصد سلول‌های طحال و دسیدوا موش‌های حامله در اواسط بارداری به کمترین حد خود می‌رسد و این دوره دقیقاً زمانی است که غلظت پروژسترون به بیشترین حد خود می‌رسد [۲۶] در تایید نقش هورمون‌های جنسی در فراخوانی و تعداد سلول‌های دندریتیک در بافت رحم مطالعه‌ای صورت گرفته که نشان می‌دهد بیشترین تراکم سلول DC در فاز استروس می‌باشد پس از آن و با شروع فاز متاستروس فراوانی این سلول‌ها به تدریج کاهش می‌یابد و در فاز پرواستروس به کمترین سطح خود می‌رسد. به نظر می‌رسد که کم بودن سلول‌های DC در فاز پرواستروس ناشی از غلظت بالای پروژسترون باشد و برعکس در فاز استروس که سطح استروژن بالا و سطح پروژسترون بسیار پایین است تعداد سلول‌های دندریتیک افزایش چشمگیری دارد [۱۰]. با توجه به توضیحات فوق به نظر می‌رسد که پروژسترون از طریق کاهش تولید GM-CSF از مهاجرت سلول‌های DC به رحم جلوگیری نماید. علاوه بر نقش هورمون‌ها در فراخوانی و یا مهار حضور سلول‌های دندریتیک به رحم، مطالعه‌ای صورت گرفته که نشان می‌دهد هورمون استروژن و رسپتور آن می‌توانند بقاء سلول‌ها را تنظیم نمایند. هورمون استروژن باعث افزایش ملکول Fas-L بر سطح سلول‌های مونوسیت و القاء آپپتوزیس در این سلول‌ها می‌گردد. علاوه بر موارد ذکر شده مطالعه‌ای صورت گرفته که نشان می‌دهد تزریق مقادیر زیادی هورمون استرادیول منجر به کاهش سلول‌های دندریتیک ارگان‌های لنفاوی در مدل موشی انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی (EAE) می‌گردد [۱۷]. با توجه به اینکه در گروه تحریک تخمک‌گذاری مقادیر سرمی هورمون استرادیول و پروژسترون نسبت به گروه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای دارد. بنابراین کاهش سلول‌های دندریتیک در گروه تحریک‌تخمک‌گذاری شده دور از انتظار نمی‌باشد. در این مطالعه همچنین تأثیر تحریک تخمک‌گذاری بر جمعیت سلول‌های دندریتیک طحال نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که اگرچه درصد سلول‌های دندریتیک (CD11c+) طحال در گروه تحریک‌تخمک‌گذاری نسبت به گروه کنترل (بدون تحریک تخمک‌گذاری) کاهش یافته است، لیکن این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. این امر احتمالاً به دلیل پاسخگویی ضعیف سلول‌های دندریتیک طحال و یا خون محیطی به تغییرات غلظت هورمون‌هاست. مطالعات

نشان می‌دهد تحریک تخمک‌گذاری با گنادوتروپین‌ها بـر روی جمعیت سایر سلولهای خون محیطـی مثـل سـلول‌هـای NK، سلول‌های +TCD8، +TCD4 و سلول‌های B تأثیری نـدارد. همچنین سـطح سـرمی IL-1، IL-2، IL-4 و INF-γ تغییـری نمی‌کند [۱۱]. در مطالعه‌ای دیگر در اثر مجـاورت سـلول‌هـای دندریتیک خون محیطی خانم‌های غیر بـاردار بـا غلظـت‌هـای متفاوت هورمون پروژسترون، استرادیول و β-HCG هیچ گونـه تغییری در بیان شاخص‌هـای سـطحی مثـل CD83، CD86، CD40، HLA-DR و فنوتیـپ سـلول دنـدریتیک در محـیط کشت مشاهده نشده است [۱۳]. همچنـین مطالعـه‌ای صـورت گرفته که نشان می‌دهد هورمون استرادیول تـأثیری بـر تعـداد، فنوتیپ و بلوغ سلول دندریتیک طحالی نـدارد [۲۵]. عـلاوه بـر این درصد سلول دندریتیک لنفوئیدی و میلوئیـدی در فـازهـای مختلف سـیکل جنسـی مـوش‌هـای مـاده در بافـت طحـال و همچنین درصد سلول دندریتیک خون محیطـی خـانم‌هـا در دو فاز مختلف لوتئال و فولیکولار تفاوت ندارد و این نشان می‌دهد جمعیت سلول‌های دندریتیک لنفوئیـدی و میلوئیـدی طحـال از تغییرات غلظت هورمون‌های استروئیدی در طی سیکل ماهیانـه خانم‌ها [۴] و یـا فـازهـای سـیکل اسـتروس مـوش‌هـا متـأثر نمی‌شوند [۲۹].

با توجه به نتایج این مطالعه به نظر مـی‌رسـد کـه افـزایش هورمون‌های استرادیول و پروژسترون پس از تحریک تخمـک-گذاری بر جمعیت سلول‌های دندریتیک طحال اثرگذار نبوده اما موجب کاهش سلول‌های دندریتیک رحم می‌گردد. از آنجـا کـه سلول‌های دندریتیک در پدیده لانه‌گزینی و شکل‌گیری دسیدوا نقش مهمی را ایفا می‌کنند کاهش فراوانی این سلولها در گـروه تحریک‌تخمک‌گذاری نسبت به گـروه کنتـرل مـی‌توانـد مـانع جایگزینی مناسب جنین و نهایتاً سـقط جنـین گـردد و ممکـن است یکی از عوامـل کـاهش موفقیـت در کلینیـک‌هـای IVF باشد. با توجه به اهمیت موضوع مطالعات بیشتری باید در زمینه تاثیر تحریک تخمک‌گذاری بـر بخـش‌هـای مختلـف سیسـتم ایمنی و ارتباط این تغییرات بـا میـزان سـقط و کیفیـت رشـد و تکامل جنین صورت پذیرد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد ایمنی‌شناسـی مصـوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس مـی‌باشـد لـذا نگارنـدگان از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه و نیز پرسنل آزمایشگاه سـلول‌هـای دندریتیک و گروه علوم تشریح که مساعدت‌های لازم را مبذول داشته‌انـد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

[1] Butts C, Shukair S, Duncan K, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. ***Int Immunol*** 19 (2006) 287-296.

[2] Blois S, Soto C, Tometten M, Klapp B, Margni R, Arck P, Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. ***Biol Reprod*** 70 (2004) 1018-1024.

[3] Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G, Inflammation and implantation. ***Am J Reprod Immunol*** 63 (2010) 17-21.

[4] Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Leszczynska-Gorzelak B, Buczkowski J, Wojas K, Oleszczuk J, Blood myeloid and lymphoid dendritic cells are stable during the menstrual cycle but deficient during mid-gestation. ***J Reprod Immunol*** 59 (2003) 193-203.

[5] Ertzeid G, Storeng R, The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. ***Hum Reprod*** 16 (2001) 221-225.

[6] Ertzeid G, Storeng R, Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and post implantation development in mice. ***J Reprod Fertil*** 96 (1992) 649-655.

[7] Fuser B, Devroey P, Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. ***Trends Endocrinol Metab*** 14 (2003) 236-242.

[8] Fauser B, Devroey P, Macklon N, Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. ***Lancet*** 365 (2005) 1807-1816.

[9] Fauser B, Heusden A, Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical

consequences. ***Endocr Rev*** 18 (1997) 71-106.

[10] Fata J, Chaudhary V, Khokha R, Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17β-estradiol during the estrous cycle. ***Biol Reprod*** 65 (2001) 680-688.

[11] Ho H, Wu M, Chen H, Chao K, Yang Y, In vivo CD3+CD25+ lymphocyte subpopulation is down-regulated without increased serum-soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) by gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH). ***AM J Reprod Immunol*** 33 (1995) 134-139.

[12] Hunt J, Immunologically relevant cells in the uterus. ***Biol Reprod*** 50 (1994) 461-466.

[13] Huck B, Steck T, Habersack M, Dietl J, Kammerer U, Pregnancy associated hormones modulate the cytokine production but not the phenotype of PBMC-derived human dendritic cells. ***Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*** 122 (2005) 85-94.

[14] Krey G, Frank P, Barrientos G, Cordo-Russo R, Ringel F, Moschansky P, Klapp B, Arck P, Blois S, In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency,affecting implantation and early placental development in mice. ***J Mol Med*** 86 (2008) 999-1011.

[15] Kramer B, Stein B, Lavd W, Exogenous gonadotropins - serum oestrogen and progesterone and the effect on endometrial morphology in the rat. ***J Anat*** 173 (1990) 177-186.

[16] Kaplan G, Walsh G, Guido L, Meyn P, Burkhardt R, Abalos R, Barker J, Frindt P, Fajardo T, Celona R, Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. ***JEM*** 175 (1992) 1717-1728.

[17] Kovats S, Carrerasa E, Regulation of dendritic cell differentiation and function by estrogen receptor ligands. ***Immunol Med Microbiol*** 252 (2008) 81-90.

[18] Nocia I, Borria P, Cocciaa M, Criscuolia L, Scarsellia G, Hormonal patterns, steroid receptors and morphological pictures of endometrium in hyper stimulated IVF cycles. ***Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*** 75 (1997) 215-220.

[19] Oehninger S, Hodgen G, Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. ***Clin Obstet Gynaecol*** 4 (1990) 541-573.

[20] O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Pooley J, Evans R, Shortman K, Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice. ***Blood*** 99 (2002) 2122-2130.

[21] Plaks V, Brinberg T, Berkutzki T, Sela S, AYashar, Kalchenko V, Mor G, Keshet E, Dekel N, Neeman M, Uterine DCs are crucial for decidua formation during implantation in mice. ***J Clin Invest*** 118 (2008) 32-38.

[22] Robertson A, Control of the immunological environment of the uterus. ***Rev Reprod*** 5(2000)164-174.

[23] Robertson S, Sharkey D, The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy. ***Semin Immunol*** 13 (2001) 243-254.

[24] Robertson S, Mayrhofer G, Seamark R, Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. ***Biol Reprod*** 54 (1996) 183-196.

[25] Scott A, Klein S, Siracusa M, Overstreet M, Housseau F, 17β-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. ***J Immunol*** 180 (2008) 1423-1431.

[26] Varga B, Patay E, Horváth E, Folly G, Ovarian venous outflow, progesterone and 17 beta-oestradiol secretion and peripheral blood level during pregnancy in the rat. ***Acta Physiol Acad Sci Hung*** 58 (1981) 141-146.

[27] Wira C.R., Kaushic C., Richardson J. Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the femal reproductive tract. In***:*** ***Mucosal Immunol***. Orga P. (Editors) Aca-demic Press. (1999) 1449-1461.

[28] Yoshinaga K, Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. ***Semin Cell Dev Biol*** 19 (2008) 161-169.

[29] Zarnani A, Moazzeni S, Shokri F, Salehnia M, Jeddi-Tehrani M, Kinetics of murine decidual dendritic cells. ***Reprod*** 133 (2007) 275-283.