

مقدمه

جنین یک پیوند نیمه بیگانه^۱ است؛ چرا که نیمی از ژنوم خود را از پدر و نیم دیگر را از مادر دریافت می‌کند. بنابراین همانگونه که بافت پیوندی پدر توسط سیستم ایمنی مادر دفع می‌شود، این انتظار وجود دارد که جنین نیز دفع شود (۱). اما معمولاً چنین اتفاقی نمی‌افتد. تحمل ایمنولوژیک^۲ مادر نسبت به جنین نیمه بیگانه معمایی است که علیرغم مطالعات گسترده انجام شده در طی نیم قرن اخیر هنوز پاسخ مناسب و جامعی، برای آن پیدا نشده است. در سال ۱۹۵۳، Medawar چهار نظریه را در توضیح عدم رد جنین توسط سیستم ایمنی مادر مطرح کرد:

(۱) جنین ایمنوژن نیست.

(۲) در طی حاملگی پاسخ‌گویی ایمنولوژیک مادر به طور چشمگیری کاهش می‌یابد.

(۳) رحم یک مکان امن ایمنولوژیک^۳ است.

(۴) جفت به عنوان یک سد ایمنولوژیک عمل می‌کند (۲).

نظریه اول در حال حاضر مورد پذیرش نیست؛ چرا که جنین فوق‌العاده ایمنوژن است. مطالعات Hoskin نشان می‌دهد که سلول‌های طحال موش‌های حامله با آلوآنتی‌ژن‌های جنین یک واکنش قوی نشان می‌دهند، در حالی که موش‌های باکره قادر به القا چنین پاسخ‌هایی نیستند (۳). همچنین فراوانی سلول‌های T مادر با ویژگی برعلیه آنتی‌ژن‌های جنین بسیار بالا بوده و در حدود ۳۰-۱۰٪ خزانه سلول‌های T مادر را تشکیل می‌دهد (۴). از طرف دیگر حاملگی‌های خارج رحمی و دفع پیوند بافت پدر در رحم مادر (۵) نشان می‌دهند که رحم یک مکان امن ایمنولوژیک نمی‌باشد. از طرف دیگر مطالعات Tafuri (۶) نشان می‌دهند که یک سد ایمنولوژیک که مانع تماس آلوآنتی‌ژن‌های جنین با

سلول‌های T مادر باشد وجود ندارد.

از مجموع مطالب فوق‌الذکر می‌توان دریافت که نظریه‌های اول، سوم و چهارم Medawar نمی‌توانند توضیح مناسبی برای بقاء جنین نیمه بیگانه باشد. نظریه دوم مبنی بر اینکه پاسخگویی مادر در طی حاملگی کاهش می‌یابد با بسیاری از مطالعات انجام شده همخوانی و مطابقت دارد (۴).

مکانیسم‌هایی که تحمل ایمنولوژیک سلول‌های T مادر را در طی حاملگی القاء می‌کنند، به طور کامل روشن نشده‌اند. ولی به نظر می‌رسد که تحمل ایمنولوژیک مادر به آمیزه^۴ منحصر به فردی از مواد سرکوبگر ایمنی^۵، سیتوکین‌ها و هورمون‌ها که قبل و بعد از لانه‌گزینی بلاستوسیست تولید می‌شوند، ارتباط داشته باشد.

فاکتورهای سرکوبگر متعددی در طی بارداری تولید می‌شوند که هر یک از آنها بر روی بخش خاصی از سیستم ایمنی مادر اثر مهاری دارند. از جمله عوامل سرکوبگر ایمنی در طی بارداری می‌توان به فاکتورهای ۴/۵ و ۱۰/۷ کیلو دالتونی مشتق از عصاره مغز و نخاع رویان، $TGF\beta^1$ ، $IL-10^y$ ، $IL-4^x$ ، AFP^a ، $Tj6^b$ ، اسپرمین^۹، گیرنده‌های محلول TNF^{۱۰}، Annexin II^{۱۱}، DHA^{11} ، EPF^{12} ، $CD95^{13}$ ، $IFN\tau^{14}$ ، پروژسترون، $PIBF^{14}$ ، $PGE2^{15}$ ، HCG^{16} ویتامین D3 اشاره کرد. این عوامل بر روی جنبه‌های مختلف سیستم ایمنی اثر مهاری دارند که از آن جمله می‌توان به موارد زیر شامل: مهار تولید

4- Cocktail

5- Immunosuppressive

6- Transforming Growth Factor

7- Interleukin

8- Alpha Feto Protein

9- Spermin

10- Tumor Necrotic Factor

11- Doeosahexaenoic Acid

12- Eearly Pregnancy Factor

13- Interferon

14- Progesterone- induced Blocking Factor

15- Prostaglandin E2

16- Human Chorionic Gonadotropin

1-Semiallograft

2- Immunologic Tolerance

3-Immunoprivileged site

مهاریه عرضه آنتی ژن توسط مایع رویی کشت سلولهای دسی جوا

دکتر زررانی و ...

لنفوسیت های T سیتوکسینک، مهار تحریک لنفوسیت ها با میتوزن ها، مهار تولید سلول های LAK، مهار تولید سیتوکین های مختلف نظیر $IL-1$ ، $IL-2$ ، $TNF\alpha$ ، $IFN\gamma$ ، مهار سنتز آنتی بادی ها، مهار MLR^۱، القاء آپوپتوز^۲، عدم بیان مولکول های MHC-II و مولکول های همراه^۳، مهار تولید NO^۴ و مهار GVHD^۵ اشاره کرد (۷).

علیرغم مطالعات وسیعی که در مورد تأثیر سرم و یا مایع رویی^۶ کشت سلول های دسی جوا^۷ و جفت بر روی سلول ها و جنبه های مختلف سیستم ایمنی صورت گرفته است، تاکنون هیچ مطالعه ای در مورد تأثیر این عوامل بر روی عملکرد سلول های دندریتیک^۸ به عنوان مهمترین سلول های پاسخ ایمنی ذاتی انجام نگرفته است. در این پژوهش تأثیر مایع رویی کشت سلول های دسی جوا بر توانایی سلول های دندریتیک در القاء تکثیر اختصاصی به آنتی ژن لنفوسیت ها مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

الف) موشها: موش های Balb/c از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش ها در شرایط مناسب از نظر بهداشت، دما، رطوبت و روشنایی (سیکل ۱۲ ساعته تاریکی - روشنایی) نگه داری شدند. تمام روش های تجربی مورد استفاده در این کار پژوهشی توسط کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده ابن سینا مورد بررسی و تصویب قرار گرفت.

ب) تخلیص سلول های دندریتیک طحال موش: سلول های دندریتیک طحال موش مطابق با روش ارائه شده در مقاله قبل (۸) از طحال موش های ۱۲-۱۰ هفته ای

تخلیص شد. به طور خلاصه، طحال موش ها پس از نخاعی کردن حیوان در شرایط استریل خارج و پس از خرد کردن با قیچی توسط آنزیم های کلاژناز^۹ D و DNase (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) هضم شدند. پس از شستشوی سوسپانسیون تک سلولی حاصله با PBS-EDTA، سلول های کم چگال^{۱۰} توسط شیب غلظت^{۱۱} اپتی پریپ^{۱۲} ۱۲٪ (Axis-Shield, Norway) جدا گردیدند. سلول های کم چگال به مدت ۲ ساعت در RPMI کامل (Sigma, USA) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) (Gibco, Eggenstein, Germany) کشت داده شدند. پس از پایان مدت انکوباسیون، سلول های غیر چسبان با RPMI گرم (۳۷°C) چندین بار به آرامی شسته و دور ریخته شدند. به سلول های باقی مانده در کف پلیت محیط کامل RPMI گرم اضافه گردید و پلیت ها به مدت ۱۶-۱۰ ساعت دیگر در انکوباتور ۳۷°C حاوی CO₂ به میزان ۵٪ قرار داده شدند. پس از پایان مدت انکوبه شدن، سلول های دندریتیک بالغ که به صورت شناور درآمده بودند جمع آوری و پس از شستشو، شمارش و تعیین میزان حیات^{۱۳}، خلوص آنها به روش فلوسیتومتری بررسی گردید.

ج) تعیین خلوص سلول های دندریتیک تخلیص شده: به روش فلوسیتومتری: سلول های دندریتیک تخلیص شده، ۳ بار با بافر رنگ آمیزی فلوسیتومتری (PBS حاوی ۲٪ سرم جنین گاوی) شسته شدند و در بافر رنگ آمیزی به حالت سوسپانسیون درآوردند. سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ با غلظت ۵٪ سرم نرمال موش انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ μl از آنتی بادی ضد CD11c موش با منشأ هامستر (BD, Pharmingen, USA) به ازای هر ۵۰۰۰۰۰

- 1- Mixed Lymphocyte Reaction
- 2- Apoptosis
- 3- Costimulatory Molecule
- 4- Nitric Oxide
- 5- Graft Versus Host Disease
- 6- Supernatant
- 7- Decidua
- 8- Dendritic Cell (DC)

- 9- Collagenase
- 10 - Low Density
- 11- Gradient
- 12- Optiprep
- 13- Fetal Culf Serum
- 14- Viability

مهارة عرضه آنتی ژن توسط مایع رویی کشت سلولهای دسی جوا

دکتر زررانی و ...

سلولها به آرامی و چندین بار با PBS مخلوط و 3×10^6 سلول به کف یا کف دست موشها تزریق شد. سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژن به موشهای گروه آزمون و سلولهای دندریتیک بدون آنتی ژن به موشهای گروه کنترل تزریق شد.

(و) *آزمون ترانسفورماسیون لنفوسیتی (LTT)*؛ ۵ روز پس از تزریق سلولهای دندریتیک به کف دست یا کف پای موش، حیوان به روش نخاعی کردن کشته شد. بسته به محل تزریق (کف پا یا کف دست) غدد لنفاوی پس زانویی^۲ و یا بازویی^۳ در شرایط استریل خارج و توسط ته سرنگ له شدند. سوسپانسیون سلولی به دست آمده یک بار با محلول PBS-EDTA با غلظت 5 mM و ۲ بار با PBS شسته شدند. سلولها در محیط کشت Click (Sigma, USA) کامل حاوی 0.5% کشت سرم نرمال موش به تعداد $3 \times 10^6 \text{ cell/well}$ در میکروپلیت ۹۶ خانیه (Falcon, USA)، به همراه $100 \mu\text{g/ml}$ آنتی ژن کشت داده شدند. تمام کشتها به صورت سه گانه^۴ انجام شد و در حفره های کنترل منفی به جای آنتی ژن، فقط محیط کشت کامل Click اضافه گردید. پلیتها به مدت ۸۰ ساعت در انکوباتور 37°C حاوی $5\% \text{ CO}_2$ انکوبه شدند. پس از مدت مذکور، به هر حفره $1 \mu\text{Ci}$ تیمیدین رادیواکتیو (Pharmacia, Sweden) اضافه و پلیت کشت سلول به مدت ۱۶-۱۸ ساعت دیگر در انکوباتور CO_2 ، انکوبه شد. سلولها با استفاده از دستگاه هاروستر سلول^۱ (A3, ICN-Flow Co. USA) بر روی فیلترهای glass fiber (Whatman, USA) هاروست شدند. میزان cpm با دستگاه β -Counter مدل Wallash 1410

سلول اضافه و مخلوط گردید. برای لوله های کنترل منفی (جای آنتی بادی ضد CD11c) سرم 5% هامستر استفاده شد. سلولها به مدت ۴۰ دقیقه بر روی یخ و در تاریکی انکوبه شدند. پس از شستشوی سوسپانسیون سلولی، آنتی بادی ثانویه^۱ (آنتی بادی موشی ضد IgG هامستر کونژوگه با PE) (BD, Pharmingen, USA) با رقت ۱:۱۰۰ روی رسوب سلولی اضافه شد. سوسپانسیون سلولی به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ و در تاریکی انکوبه شد. پس از شستشو، سوسپانسیون سلولی به لوله های مخصوص فلوسیتومتری منتقل و نتایج توسط دستگاه فلوسیتومتری کولتر (Culter, USA) آنالیز گردید. لازم به ذکر است که غلظت مناسب آنتی بادی های اولیه و ثانویه طی آزمایشات تیتراسیون تعیین گردید.

(د) *بارگذاری آنتی ژن بر روی سلولهای دندریتیک و ایمن سازی موشها با این سلولها*: مراحل تخلیص سلولهای دندریتیک طحال موش تا مرحله کشت ۲ ساعته و اتصال به پلاستیک انجام شد. سلولهای غیرچسبان با RPMI گرم حاوی 5% سرم جنین گاوی شسته شد و محیط کشت RPMI کامل حاوی 10% سرم جنین گاوی و $100 \mu\text{g/ml}$ آنتی ژن (Sigma, USA) Conalbumine به پلیتها اضافه گردید. به عنوان کنترل منفی، در برخی از پلیتها فقط RPMI-10 (بدون آنتی ژن) اضافه شد. پلیت های سلولی به مدت ۱۶-۱۰ ساعت و به طور متوسط ۱۲ ساعت در انکوباتور 37°C حاوی $5\% \text{ CO}_2$ انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، سلولهای غیر چسبان به عنوان سلولهای دندریتیک بالغ جمع آوری گردیدند.

(ه) *ایمن سازی موشها با سلولهای دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژن*: سلولهای دندریتیک جمع آوری شده در مرحله قبل، ۳ بار با PBS شستشو شدند. سپس

2-Lymphocyte Transformation Test
3- Popliteal
4- Brachial
5- Triplicate
6- Cell harvester
7- Count Per Minute

1- Secondary Antibody

توسط قیچی به قطعات ریز تقسیم شد. قطعات حاصل (بدون سانتریفوژ) ۲ بار با RPMI شسته شدند. سپس حدود ۱ml مخلوط آنزیمی حاوی ۱mg/ml کلاژناز تیپ II (Worthington, USA) و ۳۰µl/ml DNase (Roche, Germany) به قطعات بافتی اضافه و پس از پیپت کردن به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. مایع رویی به دقت خارج و دور ریخته شد و به قطعات بافتی باقی مانده، ۵ml از مخلوط آنزیمی مذکور اضافه گردید. پس از چندین بار مخلوط کردن، قطعات بافتی در انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵% CO₂ به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه شد. سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیمی دو بار با محلول PBS-EDTA ۵mM شستشو شد. سلول‌ها به تعداد ۴۰۰۰۰۰ cell/well در RPMI-1640 کامل حاوی ۲۰% سرم جنین گاوی و در حفره‌های پلیت کشت ۲۴ خانه (BD, Pharmingen, USA) کشت داده شدند. پلیت به انکوباتور CO₂ منتقل و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. پس از مدت مذکور مایع رویی حفره‌های مختلف جمع‌آوری و با یکدیگر مخلوط گردید. این مایع در دور ۱۲۰۰۰g، درجه حرارت ۴°C و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی پس از سانتریفوژ به آرامی جمع‌آوری و در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد. جهت بررسی مرفولوژی سلول‌های چسبان، پلیت کشت سلول با PBS گرم شستشو داده شد و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی گردید. به عنوان کنترل، سلول‌های رحمی موش‌های غیر حامله در فازهای مختلف استروس مطابق روش بالا کشت داده شد و مایع رویی کشت جمع‌آوری و فریز گردید.

(ی) *آزمون‌های آماری*: این مطالعه یک مطالعه تجربی است که بر روی گروه‌هایی دارای ۵ سر موش‌های حامله آلون در اوایل، اواسط و اواخر حاملگی (گروه تجربی) و گروه‌هایی دارای ۵ سر موش‌های ماده غیرحامله در سیکل‌های مختلف فاز استروس (گروه شاهد) انجام

(Pharmacia, Sweden) قرائت شده و اندیس تحریک^۱ از فرمول میانگین cpm حفره‌های آزمون = SI محاسبه می‌انگین cpm حفره‌های کنترل منفی گردید.

(ز) *تعیین سن حاملگی موش*: غالباً از اثر Whitten^۲ برای همزمان کردن سیکل استروس^۳ در موش‌ها استفاده شد (۹). پس از جفت‌گذاری موش‌های ماده Balb/c با موش‌های نر C57BL/6 هر روز صبح، وجود پلاک واژینال^۴ در زیر نور کافی توسط پیپت پاستوری که انتهای آن توسط شعله مسدود بود، بررسی شد. در موش‌های پلاک مثبت همچنین وجود اسپرم در واژن بررسی شد. روز مشاهده اسپرم، روز ۰/۵ حاملگی در نظر گرفته شد.

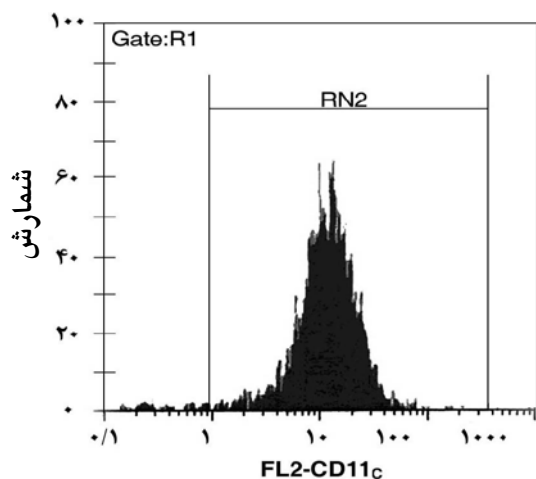
(ح) *تعیین سیکل استروس*: از بررسی اسمیر واژینال برای تعیین فاز استروس موش‌های ماده Balb/c استفاده شد. برای این کار، از مایع واژینال اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن، اسمیرها به روش پاپانیکولا^۵ رنگ‌آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

(ط) *کشت سلول‌های دسی‌جوا*: پس از نخاعی کردن حیوان (موش‌های ماده با سن حاملگی ۱۲ روزه)، رحم در شرایط استریل خارج گردید و به خوبی با PBS شسته شد. رحم از ناحیه آنتی-مزومتريال^۶ برش داده شد و جنین و لایه‌های اطراف آن به دقت از کپسول جفتی جدا شد. سپس کپسول‌های جفتی^۷ از دیواره رحم به دقت جدا و در PBS سرد قرار داده شدند. با استفاده از پنس و قیچی ریز دسی‌جوا^۸ از کپسول‌های جفتی جدا گردید. بافت دسی‌جوا ۳ بار با PBS شسته و سپس در RPMI-1640 حاوی ۵% سرم جنین گاوی

- 1- Stimulation Index
- 2- Whitten Effect
- 3- Estrous Cycle
- 4- Vaginal Plaque
- 5- Papanicolau
- 6- Antimesometrial
- 7- Placental Capsules
- 8- Deciduas Basalis

درآمدند، در حالیکه اکثر سلول‌های غیر DC، به صورت چسبیده باقی ماندند. تعدادی از سلول‌های دندریتیک پس از شناور شدن به هم متصل شده و تجمعات کوچک تا بزرگ سلولی را تشکیل می‌دادند. این تجمعات سلولی به راحتی با پیپت کردن محیط کشت حاوی سلول، شکسته می‌شد. در مجموع از هر طحال موش‌های مورد مطالعه $7 \times 10^6 - 4 \times 10^7$ سلول دندریتیک با میزان حیات بیش از ۹۵٪ بدست آمد. مطالعه فلوسیتومتری با آنتی‌بادی ضد CD11c نشان داد که خلوص سلول‌های دندریتیک تخلیص شده $93.7 \pm 3\%$ می‌باشد (شکل شماره ۱).

ب) کشت سلول‌های دسی‌جوا: دسی‌جوا قاعده‌ای موش‌های حامله آلوزن^۲ (Balb/c × C57BL/6) در روز دوازدهم حاملگی جدا گردید و پس از هضم آنزیمی کشت داده شد. در مجموع از هر موش حامله با ۵ کیسول جفتی به طور متوسط $1.0 \times 10^6 \pm 1/3$ سلول با میزان حیات $95 \pm 3\%$ به دست آمد. 4×10^6 سلول در حجم $800 \mu l$ از RPMI کامل حاوی ۲۰٪ سرم جنین گاوی در هر حفره پلیت‌های کشت ۲۴ خانه کشت داده



شکل ۱- بررسی بیان مارکر CD11c در سطح سلول‌های دندریتیک تخلیص شده از طحال موش به روش فلوسیتومتری، میزان خلوص حدود ۹۵٪ است.

گرفت. برای مقایسه تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های دندریتیک از آزمون غیر پارامتری کروسکال - والیس استفاده شد. نتایج (میانگین \pm انحراف معیار) از ۵ آزمایش مستقل بدست آمد. P-value کوچکتر و یا مساوی ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

الف) تخلیص سلول‌های دندریتیک از طحال موش: پس از هضم آنزیمی طحال موش‌های همخون^۱ با آنزیم‌های کلاژناز و DNase، تعداد $10^6 \times 2/95 - 1/95$ و به طور متوسط $2/36 \times 10^6$ لکوسیت به ازای هر طحال به دست آمد. در این مطالعه از محیط شیب غلظت اپتی‌پرپ با چگالی $1/0.68 \text{ gr/ml}$ برای غنی‌سازی اولیه سلول‌های دندریتیک طحال استفاده شد. تعداد سلول‌های LD در چگالی $1/0.68 \text{ gr/ml}$ معادل ۶-۳٪ و به طور متوسط $1/4$ کل سلول‌ها بود. مطالعه با میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus, Japan) نشان داد که تنها ۱۵ دقیقه پس از کشت سلول‌های کم چگال، سلول‌های دندریتیک به کف پلیت متصل شده و به آرامی در سطح آن گسترش می‌یابند. پس از حدود ۲-۱/۵ ساعت، سلول‌های دندریتیک کاملاً به سطح پلیت چسبیده و زواید سیتوپلاسمی خود را در کف پلیت انتشار می‌دادند. شستشوی پلیت پس از مدت مذکور سبب حذف سلول‌های غیر چسبان شده و مرفولوژی دقیق سلول‌های دندریتیک نمایان می‌گردید. پس از شستشو، تنها حدود ۳٪ کل سلول‌های اولیه طحال در کف پلیت باقی می‌ماند که عمدتاً در زیر میکروسکوپ نمای دندریتیک داشتند. سلول‌های غیر دندریتیک، کوچکتر، گرد و براق بودند. پس از حدود ۱۶-۱۲ ساعت سلول‌های دندریتیک بالغ شده و به صورت شناور

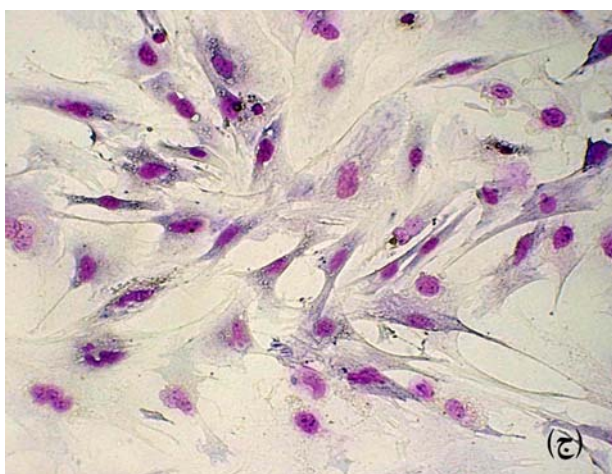
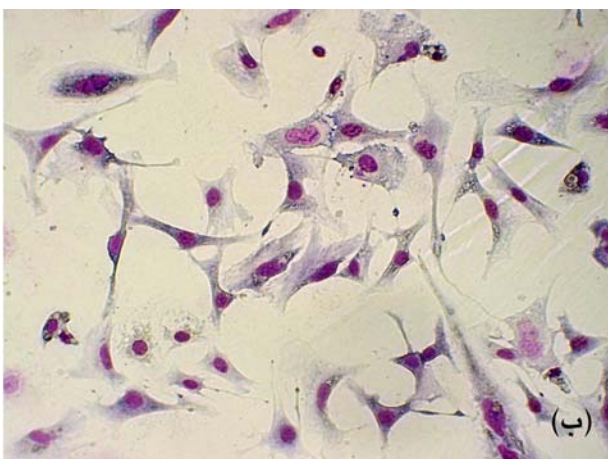
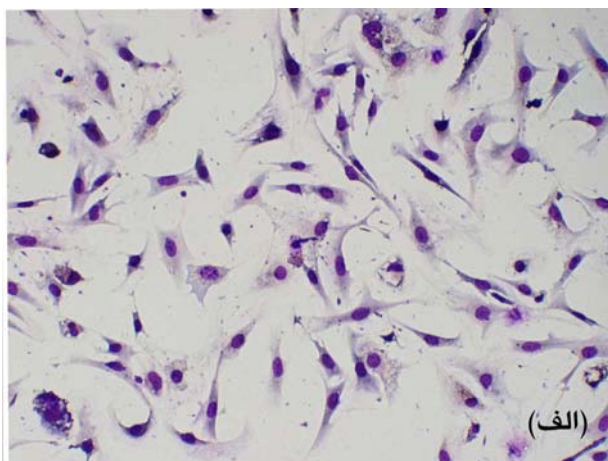
2- Allogenic Pregnancy

1- Inbred

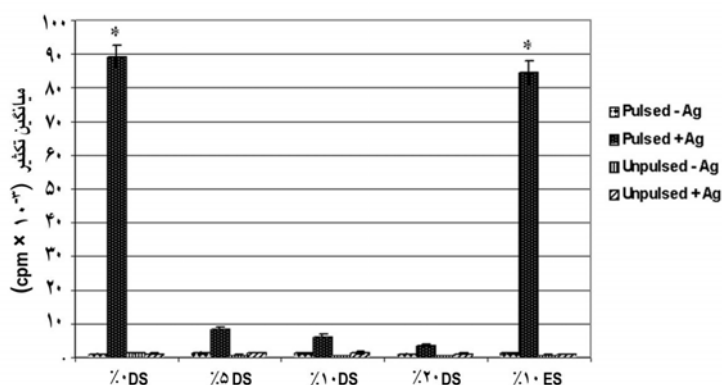
شدند. مطالعه مرفولوژی سلول‌های کشت شده دسی‌جوا نشان داد که سه جمعیت اصلی سلولی شامل سلول‌های بسیار بزرگ، متوسط و کوچک قابل مشاهده است. همچنین تعداد کمی سلول با نمای دندریتیک در کشت سلول‌های دسی‌جوا وجود داشت. تنها در عرض چند ساعت پس از کشت، تعدادی از سلول‌ها به کف پلیت چسبیدند. این سلول‌ها عمدتاً کشیده با زواید سیتوپلاسمی و از نظر نمای کلی شبیه فیروپلاست بودند. ۲۴ ساعت پس از کشت، این سلول‌ها کاملاً در سطح پلیت پخش شدند. پس از ۴۸ ساعت مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا جمع‌آوری و با یکدیگر مخلوط گردید و پس از سانتریفوژ در دور بالا در فریزر $-70^{\circ}C$ منجمد شد.

جهت بررسی بیشتر سلول‌های دسی‌جوا، در برخی از موارد پلیت‌های سلولی در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت با گیمسا رنگ‌آمیزی شد (شکل شماره ۲). مقایسه سلول‌های کف پلیت در فواصل زمانی مذکور نشان داد که با افزایش مدت زمان کشت، اندازه هسته و بویژه سیتوپلاسم سلول‌ها به نحو قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین زواید اطراف سلول در این رنگ‌آمیزی کاملاً مشخص بود. مطالعه سلول‌ها نشان داد که برخی از سلول‌ها دارای دو هسته و برخی دیگر سه هسته‌ای می‌باشند.

ج) بارگذاری سلول‌های دندریتیک با آنتی‌ژن و ایمن‌سازی موش‌ها با این سلول‌ها: به منظور بررسی توانایی سلول‌های دندریتیک تخلیص شده از طحال موش در القاء پاسخ‌های اختصاصی آنتی‌ژن در لنفوسیت‌ها، سلول‌های دندریتیک با آنتی‌ژن بارگذاری و به کف پا یا دست موش‌ها تزریق شدند. سپس مطابق به روش Inaba (۱۰) غدد لنفاوی پس زانویی و یا بازویی (بسته به محل تزریق) خارج و سلول‌های آن با همان آنتی‌ژن مجدداً تحریک گردید. به طور کلی میانگین cpm حفره‌های آزمون (سلول‌های غدد لنفاوی موش‌های



شکل ۲- رنگ‌آمیزی سلول‌های دسی‌جوا با واسط حاملگی موش به روش گیمسا، سلول‌های غیرچسبان شسته و حذف شده‌اند (درشت‌نمایی ۲۰۰ برابر): ۲۴ ساعت پس از کشت (الف)، ۴۸ ساعت پس از کشت (ب)، ۷۲ ساعت پس از کشت (ج).



نمودار ۱- تاثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر سلول‌های دندریتیک از نظر القاء پاسخ تکثیر اختصافی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌ها. سلول‌های دندریتیک به هنگام بارگذاری با آنتی‌ژن با ۵٪، ۱۰٪ و یا ۲۰٪ سوپ کشت سلول‌های دسی‌جوا (DS) و یا با ۱۰٪ سوپ کشت سلول‌های آندومتر موش‌های ماده غیرحامله (ES) تیمار شده و سپس به کف دست و یا کف پای موشها تزریق شدند. پس از ۵ روز غدد لنفاوی ناحیه‌ای خارج و در حضور آنتی‌ژن (+Ag) و یا غیاب آنتی‌ژن (-Ag) کشت داده شدند. به عنوان کنترل منفی عملیات مشابهی روی سلول‌های دندریتیک بدون بارگذاری آنتی‌ژن صورت گرفت. میزان تکثیر به روش مندرج در فصل مواد و روشها اندازه‌گیری گردید. نتایج (انحراف معیار ± میانگین) از پنج آزمایش مستقل بدست آمده‌اند.

P=0.000 :*

سلول‌های دسی‌جوا میزان تکثیر کاهش می‌یافت؛ ولی اختلاف معنی‌داری از این نظر مشاهده نشد. تیمار کردن سلول‌های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا (بدون آنتی‌ژن) در تمام غلظت‌های مورد استفاده تأثیری بر تکثیر سلول‌های غدد لنفاوی نداشت. از طرف دیگر اضافه کردن مایع رویی کشت سلول‌های آندومتر موش‌های غیر حامله به روی کشت سلول‌های دندریتیک تأثیری بر توانایی سلول‌های دندریتیک از نظر القاء تکثیر اختصافی به آنتی‌ژن در لنفوسیت‌ها نداشت.

بحث

در این پژوهش جهت جمع‌آوری مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا، در روز دوازدهم حاملگی دسی‌جوا از کیسول جفتی موش‌های حامله جدا و پس از

تحریک شده با سلول‌های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی‌ژن) دره آزمایش مستقل، در حضور $100 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌ژن 3632 ± 89210 و در عدم حضور آنتی‌ژن 105 ± 202 بود. همچنین میانگین cpm حفره‌های کنترل منفی (سلول‌های غدد لنفاوی موش‌های تحریک شده با سلول‌های دندریتیک بارگذاری نشده) در حضور $100 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌ژن 130 ± 960 و در عدم حضور آنتی‌ژن 220 ± 1200 بود. به این ترتیب میانگین اندکس تحریک $14/4 \pm 87/3$ برآورد گردید. آزمون آماری نشان داد که بین cpm حفره‌های آزمون و حفره‌های کنترل منفی در حضور آنتی‌ژن اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.001$).

د) تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر عرضه آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک: جهت بررسی تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر عرضه آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک مقدار ۵٪، ۱۰٪ و یا ۲۰٪ مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا در طی بارگذاری آنتی‌ژنی و کشت شبانه به محیط کشت سلول‌های دندریتیک اضافه شد. بقیه مراحل مشابه با مراحل ارائه شده در قسمت‌های «د»، «ه» و «و» قسمت مواد و روشها انجام شد. نتایج حاصله از ۵ آزمون نشان داد که تیمار کردن سلول‌های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا موش‌های حامله آلورژن در تمام غلظت‌های ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ موجب مهار تکثیر اختصافی لنفوسیت‌ها در برابر آنتی‌ژن می‌گردد ($P < 0.001$). پس از اضافه کردن مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا به مقدار ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪، میزان cpm و SI^۲ به ترتیب به میزان 1037 ± 8100 و $6/24 \pm 0/4$ ، 820 ± 6200 ($SI = 6/24 \pm 0/4$)، $6200 \pm 0/75$ ($SI = 5/68 \pm 0/75$) و 442 ± 3500 ($SI = 3/5 \pm 0/2$) کاهش پیدا کرد (نمودار شماره ۱)؛ اگرچه با افزایش غلظت مایع رویی کشت

1- Treatment

2- Stimulation Index

هضم آنزیمی کشت داده شد. در کشت سلول‌های دسی‌جوا سه جمعیت اصلی سلولی شامل سلول‌های بزرگ، متوسط و کوچک دیده شد. سلول‌های چسبنده عمدتاً کشیده، با زواید سیتوپلاسمی فراوان و از نظر نمای کلی شبیه سلول‌های فیروپلاست بودند. در مطالعه Pippard (۱۱) نیز چندین جمعیت سلولی در کشت سلول‌های دسی‌جوا موش‌های حامله ۱۱ روزه گزارش شده است. ولی اکثر سلول‌ها از نوع پهن و ستاره‌ای مطابق شکل شماره ۱ بودند. او همچنین گزارش کرد که با افزایش زمان کشت، تعداد سلول‌ها و نیز اندازه و تعداد هسته‌ها افزایش می‌یابد. با توجه به خصوصیات مرفولوژیک و نیز ویژگی‌های رشد، به نظر می‌رسد که سلول‌های پهن و ستاره‌ای شکل گزارش شده در مطالعه Pippard همان سلول‌هایی باشند که ما نیز در این پژوهش بدان دست یافتیم. این سلول‌ها احتمالاً منشأ استرومایی داشته و از نوع سلول‌های استرومایی دسی‌جوا^۱ می‌باشند (۱۱-۱۳). در مطالعه Valadimirsky و همکاران (۱۲) نیز نتایج مشابهی گزارش شده است.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که برخی از سلول‌های چسبیده به کف پلیت و با نمای ستاره‌ای دارای دو و یا بیشتر از دو هسته می‌باشند. چنین سلول‌هایی در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است (۱۱-۱۲). این پدیده احتمالاً ناشی از تقسیم میتوز در این سلول‌ها می‌باشد. نتایج حاصله از این پژوهش نشان داد که تیمار کردن سلول‌های دندریتیک با مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا موش‌های حامله آلوژن در تمام غلظت‌های ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ موجب مهار تکثیر اختصاصی لنفوسیت‌ها در برابر آنتی‌ژن می‌گردد.

مطالعات متعددی در زمینه تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا، سلول‌های تروفوبلاست و

عصاره جفت^۲ بر روی جنبه‌های مختلف سیستم ایمنی صورت گرفته است ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه تأثیر فاکتورهای مذکور بر عملکرد سلول‌های دندریتیک ارائه نشده است. مطالعه Badet و همکارانش (۱۴) نشان می‌دهد که مایع رویی حاصل از کشت ۴۸ ساعته دسی‌جوا موش‌های حامله دارای اثر مهارتی قوی بر MLR آلورژیک است و این تأثیر در اواسط حاملگی موش (حدود روزهای ۹-۸ حاملگی) به اوج خود می‌رسد.

فاکتورهای موجود در سوپ دسی‌جوا همچنین بر تکثیر تیموسیت‌ها و تکثیر لنفوسیت‌ها در برابر میتوز اثر مهاری دارند (۱۵). Beer و Dodd نیز نشان دادند که بافت دسی‌جوا می‌تواند رد پیوند پوست را در رحم موش به تأخیر اندازد (۱۷-۱۶).

در مطالعات دیگر نیز کاهش قدرت کشندگی طبیعی سلول‌های NK و اثر مهاری سلول‌های تروفوبلاست بر تولید سلول‌های T سیتوتوکسیک و فرایند ADCC^۳ نشان داده شده است (۱۸-۱۹). با توجه به اینکه الف) دسی‌جوا در سطح تماس مادر - جنین قرار گرفته است ب) تشکیل آن مستقل از ژنوتیپ جنین است و ج) رشد و تکامل آن به هورمون‌های استروئیدی با فعالیت سرکوبگر ایمنی بستگی تام دارد، به نظر می‌رسد که این بافت محل مناسبی برای تولید فاکتورهای سرکوبگر ایمنی باشد.

سرکوب ایمنی یکی از جنبه‌های بارز و شناخته شده بارداری است. مطالعات بسیار متعددی در زمینه سرکوب ایمنی در طی بارداری انجام شده است. اصولاً با توجه به ماهیت شبه پیوند جنین و احتمال القاء پاسخ‌های ایمنی مخرب بر علیه جنین، وجود مکانیسم‌های سرکوب ایمنی در طی بارداری کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. فاکتورهای سرکوبگر متعددی

2- Placental Extract

3- Antibody Dependent Cell- Mediated Cytotoxicity

1- Decidual Stromal Cells

در طی بارداری تولید می‌شوند که هر یک از آنها بر روی بخش خاصی از سیستم ایمنی مادر اثر مهاری دارند. با توجه به اینکه می‌توان پاسخ‌های ایمنی را به دو بخش موضعی و عمومی تقسیم‌بندی نمود و با توجه به اینکه سرکوب ایمنی موضعی در موضع تماس مادر- جنین از اهمیت بالاتری برخوردار است، منطقی به نظر می‌رسد که عوامل سرکوبگر ایمنی عمدتاً در موضع بارداری با غلظت بالاتری حضور داشته باشند.

در این پژوهش نشان داده شد که مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بطور قابل ملاحظه‌ای توانایی سلول‌های دندریتیک را در القاء تکثیر لنفوسیت‌ها کاهش می‌دهد. عوامل متعددی توسط سلول‌های دسی‌جوا تولید می‌شوند که می‌توانند پاسخ‌های القایی توسط سلول‌های دندریتیک را سرکوب نمایند. یکی از این عوامل HLA-G است. این مولکول بطور انتخابی بر روی سلول‌های تروفوبلاست عرضه می‌شود (۷).

HLA-G محلول می‌تواند توانایی سلول‌های دندریتیک مشتق از سلول‌های $CD34^+$ و یا منوسیت را در القاء تکثیر سلول‌های T آلورژن به طور قابل ملاحظه‌ای مهار نماید؛ بدون اینکه تأثیری روی تمایز، بلوغ و یا آپوپتوز داشته باشد (۲۰). مطالعات انجام شده دیگر نشان می‌دهند که HLA-G بلوغ سلول‌های دندریتیک موش را در شرایط In Vitro مختل می‌کند. این امر سبب کاهش قدرت عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های دندریتیک شده و موجب بالا رفتن بقاء پیوند آلوگرافت می‌شود (۲۱).

یکی دیگر از فاکتورهایی که به مقدار زیاد توسط سلول‌های دسی‌جوا تولید شده و بر روی سلول‌های دندریتیک اثر مهاری دارد، IL-10 است. تیمار کردن سلول‌های دندریتیک با IL-10 موجب کاهش توانایی این سلول‌ها در عرضه آنتی ژن می‌شود (۲۲). این کار همچنین سبب القاء آنرژي^۱ اختصاصی به آنتی ژن در

لنفوسیت‌های $TCD8^+$ (۲۳) و $TCD4^+$ (۲۴) می‌گردد. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که سلول‌های T آنرژیک که توسط سلول‌های دندریتیک تیمار شده با IL-10 القاء شده‌اند، از تکثیر لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی ژن از طریق مکانیسم غیر وابسته به آنتی ژن^۲ جلوگیری می‌نمایند (۲۵، ۲۶).

یکی دیگر از مولکول‌هایی که توسط سلول‌های دسی‌جوا تولید شده (۲۷) و دارای اثر مهاری بر روی سلول‌های دندریتیک می‌باشد، PGE2 است. نکته جالب توجه اینکه همانند IL-10، فقط سلول‌های دندریتیک نابالغ نسبت به اثرات PGE2 حساس بوده و پس از بلوغ نسبت به آن مقاوم می‌شوند (۲۸).

در مطالعه ما نیز مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر روی سلول‌های دندریتیک نابالغ اثر داده شد. بنابراین احتمال دارد که فاکتورهایی نظیر IL-10 و PGE2 که توسط سلول‌های دسی‌جوا تولید می‌شوند، در همان مراحل اولیه بلوغ بر روی سلول‌های دندریتیک اثر کرده و موجب مهار عرضه آنتی ژن توسط این سلول‌ها شده باشند. اخیراً نقش سرکوب کنندگی ایمنی ویتامین D3 نظر بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. ویتامین D3 مانع بلوغ سلول‌های دندریتیک انسانی مشتق از منوسیت‌ها شده و توانایی سلول‌های دندریتیک را برای برداشت آنتی ژن‌های محلول و نیز تحریک آلورژنیک و اتولوگ سلول‌های T به نحو قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد (۲۹-۳۰). جالب توجه اینکه همانند IL-10 و PGE2، سلول‌های دندریتیک بالغ نسبت به اثر ویتامین D3 مقاوم می‌باشند (۳۰).

تحریک لنفوسیت‌های T توسط سلول‌های دندریتیک در مجاورت دگزامتازون و آنالوگ ویتامین D موجب می‌شود که لنفوسیت‌های T حساس شده مقادیر زیادی IL-10 تولید کنند (۳۱). این سیتوکین نیز به نوبه خود

1- Anergy

2- By-stander

استرومایی رحم در فاز پرواستروس^۱ بیشتر از فاز استروس است (۳۴). لازم به ذکر است که در فاز استروس غلظت استرادیول به بیشترین حد خود می‌رسد (۳۵).

با توجه به مجموع مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد که اثر مهاری مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر توانایی سلول‌های دندریتیک در تحریک لنفوسیت‌های T ناشی از حضور طیف وسیعی از مولکول‌های تنظیم کننده سیستم ایمنی^۷ است که توسط سلول‌های دسی‌جوا تولید می‌شوند. این مولکول‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلف نظیر مهار بلوغ و تمایز (۲۲، ۲۹)، مهار عرضه مولکول‌های همراه (۲۹-۳۰، ۲۴، ۲۲)، القاء بیان گیرنده‌های مهاری (۳۶، ۲۶)، میان کنش با گیرنده‌های مهاری سطح سلول (۲۰)، کاهش برداشت آنتی ژن (۲۹) و القاء سیتوکین‌های مهاری نظیر TGF-β (۳۷) می‌توانند عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های دندریتیک را در شرایط *in vivo* مهار نمایند.

اگرچه برخی از فاکتورهای فوق‌الذکر نظیر IL-10 از طریق اختلال در فرایند بلوغ سلول‌های دندریتیک، توانایی آنها را در عرضه آنتی ژن مهار می‌نمایند، ولی به نظر نمی‌رسد که در مجموع مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا از این طریق بر عملکرد سلول‌های دندریتیک تأثیر گذاشته باشد. چرا که حتی غلظت‌های ۲۰٪ سوپ دسی‌جوا نتوانست از بلوغ ناشی از کشت شبانه سلول‌های دندریتیک ممانعت به عمل آورد. ولی این احتمال وجود دارد که مهار فرایند بلوغ در سطح مولکولی مانند مهار بیان عواملی نظیر مولکول‌های همراه باشد.

از طرف دیگر تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر روی سلول‌های دندریتیک ناشی از سمیت آن بر روی سلول‌های دندریتیک نیست، چرا که مطالعه

می‌تواند اثرات مهاری خود را بر روی سلول‌های دندریتیک اعمال نماید. لنفوسیت‌های T فوق‌الذکر قادرند که به صورت اختصاصی به آنتی ژن^۱ تکثیر سایر لنفوسیت‌های T را مهار نمایند (۳۱). از طرف دیگر ویتامین D3 و گلوکوکورتیکوئیدها در مهار سلول‌های دندریتیک اثر هم‌افزایی^۲ دارند بطوریکه سلول‌های دندریتیک تیمار شده با این دو فاکتور قدرت تحریکی بسیار کمی برای تکثیر لنفوسیت‌های T دارند (۳۲).

دسی‌جوا علاوه بر گلوکوکورتیکوئیدها حاوی مقادیر زیادی از آنزیم ۱- آلفا هیدروکسیلاز^۳ می‌باشد که می‌تواند پروهورمون ۲۵- کوله کلسیفرول^۴ را به ۱ و ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله کلسیفرول (ویتامین D3)^۵ تبدیل نماید (۷).

استرادیول یکی دیگر از فاکتورهای است که می‌تواند توانایی سلول‌های دندریتیک را در فعال کردن لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی ژن مهار نماید. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که تزریق استرادیول به موش‌ها، قدرت عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های دندریتیک طحال موش را کاهش می‌دهد (۳۳). مطالعه‌ای دیگر نشان می‌دهد که استرادیول عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های اپی‌تلیال رحم را افزایش می‌دهد ولی عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های استرومایی رحم را کاهش می‌دهد (۳۴). با توجه به اینکه سلول‌های عرضه کننده اصلی بافت رحم، سلول‌های استرومایی (شامل ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک) می‌باشند، به نظر می‌رسد که در مجموع استروژن سبب کاهش قدرت عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن در رحم شود. مطالعات Wira و همکارانش نشان می‌دهند که توانایی عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های

1- Antigen- Specific

2- Synergism

3- 1-α hydroxylase

4- 25 hydroxy cholecalciferol

5- 1, 25 (OH)₂ Colecalciferol

6- Proestrus

7-Immunomodulatory Molecule

در مجموع نتایج حاصله نشان داد که مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا می‌تواند بر توانایی سلول‌های دندریتیک در عرضة آنتی ژن اثر مهاری داشته باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که سلول‌های دندریتیک موضع بارداری نیز از محصولات ترشحی سلول‌های دسی‌جوا متأثر گردند. این مکانیسم در واقع یکی از راه‌کارهای تحمل ایمنولوژیک مادر نسبت به جنین است، چرا که سلول‌های دندریتیک به عنوان قویترین سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن می‌توانند آنتی ژن‌های پدری را به لنفوسیت‌های T مادر عرضه کرده و موجب القای پاسخ‌های مخرب ایمنولوژیک بر علیه جنین گردند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات سرکار خانم پروانه احمدی و سرکار خانم اکرم روزبهانی که در حروفچینی و صفحه‌آرایی این مقاله همکاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارد.

ما نشان داد که حتی ۱۸ ساعت پس از تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر سلول‌های دندریتیک، میزان حیات این سلول‌ها بسیار بالا (۹۵٪ >) است. از طرف دیگر این احتمال وجود دارد که پس از تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های دسی‌جوا بر سلول‌های دندریتیک، حرکت این سلول‌ها پس از تزریق از پوست به سمت غدد لنفاوی مهاری شده باشد. اگرچه با توجه به افزایش تعداد سلول غدد لنفاوی ناحیه‌ای پس از تزریق سلول‌های دندریتیک تیمار شده با سوپ دسی‌جوا، مهاری کامل حرکت سلول‌های دندریتیک را نمی‌توان پذیرفت. دسی‌جوا همچنین حاوی PGD2 است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که PGD2 از مهاجرت سلول‌های لانگرهانس^۱ به سمت غدد لنفاوی جلوگیری می‌نماید (۳۸). PGD2 به طور فعال در رحم و اندومتر ساخته می‌شود (۳۹) بنابراین به نظر می‌رسد که PGD2 در دسی‌جوا می‌تواند از مهاجرت سلول‌های دندریتیک ناحیه به سمت غدد لنفاوی جلوگیری کرده و بدین ترتیب از حساس شدن سلول‌های T با آنتی ژن‌های پدری ممانعت نماید.

References

- 1- Bouma G.J., Van Caubergh P., Van Bree S.P., Castelli-Visser R.M., Witvliet M.D., Van der Meer-Prins E.M., Van Rood J.J., Claas F.H. Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation. *Transplantation*. 1996;62(5):672-8.
- 2- Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. 1953. *Transplantation*. 2003;76(10):1409-12.
- 3- Hoskin D.W., Murgita R.A. Specific maternal anti-fetal lymphoproliferative responses and their regulation by natural immunosuppressive factors. *Clin Exp Immunol*. 1989;76(2):262-7.
- 4- Mellor A.L., Munn D.H. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:367-91 (Review).
- 5- Borland R. Placenta as an allograft. In: *Comparative placentation*. Eds. Steven DH. London, Academic press. 1975; pp:268-281.
- 6- Tafuri A., Alferink J., Moller P., Hammerling G.J., Arnold B. T cell awareness of paternal allo-antigens during pregnancy. *Science*. 1995;270 (5236):630-3.
- ۷- مصفا نریمان، زررانی امیرحسین، حسن زهیر محمد. ایمنولوژی حاملگی طبیعی. تهران، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی، چاپ اول ۱۳۸۲.

1- Langerhans

۸- امیرحسین زررانی، سید محمد مؤذنی، فاضل شکری، مزده صالح‌نیا، علی‌احمد بیات، محمود جدی تهرانی. بهینه‌سازی تخلیص سلول‌های دندریتیک طحال موش به منظور استفاده در تخلیص و مطالعه سلول‌های دندریتیک ارگان‌های تولید مثل. فصلنامه باروری و ناباروری، سال چهارم (۱۳۸۱)، شماره ۱، صفحات ۲۹-۱۷.

9- Pool T. The UFAW handbook on the care & management of laboratory animals, Longman scientific & Technical, 6th Edition. 1989; pp:289-323.

10- Inaba K., Metlay J.P., Crowley M.T., Steinman R.M. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med.* 1990; 172(2): 631-40.

11- Pippard D.F. In-vitro development and degeneration of stromal cells from the uterus of the rat at three stages of pregnancy. *J Reprod Fertil.* 1987; 81(1):249-57.

12- Vladimirovsky F., Chen L., Amsterdam A., Zor U., Lindner H.R. Differentiation of decidual cells in cultures of rat endometrium. *J Reprod Fertil.* 1977; 49(1):61-8.

13- Olivares E.G., Montes M.J., Oliver C., Galindo J.A., Ruiz C. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod.* 1997; 57(3):609-15.

14- Badet M.T., Bell S.C., Billington W.D. Immunoregulatory activity of supernatants from short-term cultures of mouse decidual tissue. *J Reprod Fertil.* 1983; 68(2):351-8.

15- Badet M.T., Bell S.C., Billington W.D. Partial characterization of immunosuppressive factors from short-term cultures of murine decidual tissue *Ann Immunol (Paris).* 1983; 134C(3):321-9.

16- Beer A.E., and Billingham R.E. Host responses to intra-uterine tissue, cellular and fetal allografts. *J Reprod Fert.* 1974; 21:59-88.

17- Dodd M., Andrew T.A., Coles J.S. Functional behaviour of skin allografts transplanted to rabbit deciduomata. *J Anat.* 1980; 130(2):381-90.

18- Kolb J.P., Chaouat G., Chassoux D. Immunoactive products of placenta. III. Suppression of natural killing activity. *J Immunol.* 1984; 132(5): 2305-10.

19- Chaouat G., Kolb J.P. Immunoactive products of placenta. IV. Impairment by placental cells and their products of CTL function at effector stage. *J Immunol.* 1985; 135(1):215-22.

20- Le Fric G., Laupeze B., Fardel O., Sebti Y., Pangault C., Guilloux V., Beauplet A., Fauchet R., Amiot L. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol.* 2003; 64(8): 752-61.

21- Liang S., Baibakov B., Horuzsko A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur J Immunol.* 2002; 32(9):2418-26.

22- Zheng Z., Narita M., Takahashi M., Liu A., Furukawa T., Toba K., Aizawa Y. Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27(2):93-103.

23- Steinbrink K., Jonuleit H., Muller G., Schuler G., Knop J., Enk A.H. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood.* 1999; 93(5): 1634-42.

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

25- Levings M.K., Sangregorio R., Roncarolo M. G. Human CD25(+)CD4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 2001; 193(11):1295-302.

26- Steinbrink K., Graulich E., Kubsch S., Knop J., Enk A.H. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* 2002; 99(7):2468-76.

27- Anteby S.O., Bauminger S., Zor U., Lindner H.R. Prostaglandin synthesis in decidual tissue of the rate uterus. *Prostaglandins.* 1975; 10(6):991-9.

28- Kalinski P., Schuitemaker J.H., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998; 161(6):2804-9.

29- Penna G., Adorini L. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 2000; 164(5):2405-11.

30- Berer A., Stockl J., Majdic O., Wagner T., Kollars M., Lechner K., Geissler K., Oehler L. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic

- cell differentiation and maturation in vitro. *Exp Hematol.*2000;28(5):575-83.
- 31- Dong X., Bachman L.A., Kumar R., Griffin M.D. Generation of antigen-specific, interleukin-10- producing T-cells using dendritic cell stimulation and steroid hormone conditioning. *Transpl Immunol.*2003;11(3-4):323-33.
- 32- Xing N. L., Maldonado M.L., Bachman L.A., McKean D.J., Kumar R., Griffin M.D. Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. *Biochem Biophys Res Commun.*2002;297(3):645-52.
- 33- Liu H.Y., Buenafe A.C., Matejuk A., Ito A., Zamora A., Dwyer J., Vandenbark A.A., Offner H. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *J Neurosci Res.*2002;70(2) : 238-48.
- 34- 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 Immunology*. Orga P. (Editors) Aca-demic Press.1999; pp: 1449-1461.
- 35- Fata J.E., 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.
- 36- Vlad G., Piazza F., Colovai A., Cortesini R., Della Pietra F., Suci-Foca N., Manavalan J.S. Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Hum Immunol.*2003;64(5): 483-9.
- 37- Wira C.R., Roche M.A., Rossoll R.M. Antigen presentation by vaginal cells: role of TGFbeta as a mediator of estradiol inhibition of antigen presentation. *Endocrinology.*2002;143 (8):2872-9.
- 38- Angeli V., Faveeuw C., Roye O., Fontaine J., Teissier E., Capron A., Wolowczuk I., Capron M., Trottein F. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *J Exp Med.*2001;193(10):1135-47.
- 39- Rees M.C., Kelly R.W. Prostaglandin D2 release by endometrium and myometrium. *Br J Obstet Gynaecol.*1986;93(10):1078-82.