

The effect of decidual microenvironment on dendritic cell function in normal pregnancy and abortion

Namdar Ahmadabad H¹, Salehnia M², Moazzeni SM^{3*}

1- PhD student, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 11.Sep.2013, Accepted: 23.Oct.2013

Abstract

Background Decidua as maternal-fetal contact surface has a completely different immunological environment from the maternal peripheral blood. The present study aimed to investigate the immunomodulatory activity of molecules secreted by decidual cells on dendritic cells (DCs) function in abortion-prone compared with non-abortion-prone mice.

Materials and Methods: The decidual cell supernatants (DS) were obtained from abortion and non-abortion mouse models. Splenic DCs were treated with antigen and DS. Treated DCs were injected into mice palms. After 5 days, draining lymph nodes were removed, cultured in the presence of cognate antigen, and proliferation of lymphocyte cells was measured by ³H-thymidin incorporation.

Results: Our results showed that immunosuppressive activity of DS from non-abortion-prone mice significantly decrease dendritic cells' ability to stimulate lymphocytes proliferation compared with DS from abortion-prone mice (Simulation index (SI) of 4.93 ± 0.34 versus 11.84 ± 0.79). We, also found that DS prepared from non-resorption sites compared with DS from resorption sites in abortion-prone mice had increased immunosuppressive activity on DC function (SI of 7.31 ± 1.02 versus 2.67 ± 0.49).

Conclusion: We concluded that *immunomodulatory activity* of molecules secreted within decidual tissue is different between abortion-prone and non-abortion-prone mice. We claimed that these molecules, through modulation of DCs function, play crucial role on pregnancy outcome.

Keywords: Abortion, Decidua, Dendritic cells, Lymphocytes

*Corresponding Author:

Address: Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Jalale Al-e-Ahmad Highway, Tehran, Iran

Email: Moazzeni@modares.ac.ir

اثر ریز محیط دسی جوا بر عملکرد سلول‌های دندریتیک در حاملگی طبیعی و سقط

حسن نامدار احمد آباد¹، مژده صالح نیا²، سید محمد موذنی^{3*}

1. دانشجوی دکتری ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

2. استاد گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

3. استاد گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: 92/6/20 تاریخ پذیرش: 92/8/1

چکیده

زمینه و هدف: دسی جوا به عنوان سطح تماس مادر با جنین دارای محیط ایمنولوژیکی کاملاً متفاوت از خون محیطی مادر می‌باشد. در مطالعه حاضر فعالیت تعدیل ایمنی مولکول‌های ترشح شده توسط سلول‌های دسی جوا از منشاء موش‌های مستعد سقط و موش‌های با حاملگی طبیعی بر عملکرد سلول‌های دندریتیک (DCs) مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: مایع کشت سلول‌های دسی جوا (DS) از مدل‌های موشی مستعد سقط و موش‌های با حاملگی طبیعی تهیه شد. DCs طحالی به طور همزمان با آنتی ژن و DS تیمار شدند. DCs تیمار شده به کف دست موش تزریق شده و پس از 5 روز غده‌های لنفاوی ناحیه‌ای خارج گردید و در حضور آنتی ژنی اولیه کشت داده شدند. میزان تکثیر لنفوسیت‌ها با استفاده از تایمیدین رادیواکتیو سنجیده شد.

یافته‌ها: DS از منشاء موش‌های با حاملگی طبیعی در مقایسه با DS از منشاء موش‌های مستعد سقط به صورت معنی داری توانایی DCs برای تحریک تکثیر لنفوسیت‌ها را کاهش داد (اندیکس تحریک $4/93 \pm 0/34$ در مقابل $11/84 \pm 0/79$). همچنین فعالیت مهاری DS تهیه شده از جایگاه‌های با جنین سالم در مقایسه با مواردی که این مایع از جایگاه‌های سقط از منشاء موش‌های مستعد سقط تهیه شده است بر عملکرد DCs بیشتر است (اندیکس تحریک $2/67 \pm 0/49$ در مقابل $7/31 \pm 1/02$).

نتیجه‌گیری: فعالیت تعدیل ایمنی مولکول‌های ترشح شده درون دسی جوا بین موش‌های مستعد سقط و موش‌های با حاملگی طبیعی متفاوت است. ممکن است این مولکول‌ها از طریق تعدیل عملکرد DCs نقشی اساسی در تعیین نتیجه حاملگی بازی می‌کنند.

واژگان کلیدی: سقط، دسی جوا، سلول‌های دندریتیک، لنفوسیت‌ها

* نویسنده مسئول: ایران، تهران، بزرگراه جلال آل احمد دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی

Email: Moazzeni@modares.ac.ir

مقدمه

این حقیقت که پیوند نیمه بیگانه جنین می‌تواند در کمال سلامت و به دور از خطر در رحم مادر رشد و تکامل پیدا کند، نشان دهنده وجود مکانیسم‌های حفاظتی متعدد در سطح تماس مادر- جنین است. مصونیت ایمنی و حفظ تحمل ایمنولوژیک در مقابل آلوآنتی ژن‌های موجود در بافت جنینی منجر به یک حاملگی موفق می‌گردد در حالی که از دست رفتن این مکانیسم‌ها منجر به ایجاد شرایط پاتولوژیک هم چون سقط مکرر جنین خواهد شد (1).

دسی جوا به عنوان سطح تماس مادر با جنین دارای محیط ایمنولوژیک کاملاً متفاوت از خون محیطی مادر می‌باشد. مشخص شده که الگوی پاسخ‌های ایمنی در بافت دسی جوا به عنوان یک بافت مادری بسیار مرتبط با جنین، نقش مهمی در حفظ یا رد ایمنولوژیک جنین نیمه بیگانه بازی می‌کند (2). وضعیت ایمنی ریز محیط دسی جوا تا حد زیادی تحت تاثیر فراوانی و نوع سلول‌های ایمنی و همچنین عوامل ترشحی مثل سایتوکاین‌ها، هورمون‌ها و فاکتورهای رشد می‌باشد (3). سلول‌های دندریتیک از جمله سلول‌های حاضر در بافت دسی جوا می‌باشند که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته اند.

سلول‌های دندریتیک موثرترین سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن هستند که حضور آنها برای آغاز پاسخ‌های ایمنی اولیه و هماهنگ کردن پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطبیقی ضروری می‌باشد. این سلول‌ها با ترشح الگوی متفاوت از سایتوکاین‌ها و بروز مولکول‌های سطحی خاص به طور مستقیم در تمایز لنفوسیت‌های $CD4^+$ TCD4 بکر به سلول‌های TH1 و سلول‌های TH2 نقش دارند (4). علاوه بر نقش موثر سلول‌های دندریتیک در القاء و جهت‌گیری پاسخ‌های ایمنی، این سلول‌ها دارای نقش موثری در تنظیم پاسخ‌های ایمنی به واسطه لنفوسیت‌های T می‌باشند. در سال‌های اخیر به خوبی مشخص شده که سلول‌های دندریتیک به خصوص سلول‌های

دندریتیک نابالغ با تولید سلول‌های T تنظیمی دارای نقش موثری در بروز تحمل ایمنولوژیک می‌باشند (5).

همزمان با لانه‌گزینی، سلول‌های دندریتیک شروع به تجمع در رحم می‌کنند. این سلول‌ها در طول حاملگی در بافت دسی جوا حضور دارند اما فراوانی آنها در مراحل مختلف حاملگی متفاوت می‌باشد (6). در مورد اهمیت سلول‌های دندریتیک در حفظ حاملگی، پلاکس و همکاران نشان دادند که حذف سلول‌های دندریتیک از رحم موش، میزان سقط در آنها را به شدت افزایش می‌دهد (7). بلویس و همکاران نشان دادند که سلول‌های دندریتیک با تولید فاکتورهای رگرایی هم چون sFlt1 و $TGF-\beta 1$ نقش مهمی در تکثیر، تمایز و شکل‌گیری بافت دسی جوا بازی می‌کنند (8). هم‌چنین این سلول‌ها در ایجاد تحمل ایمنولوژیک در مقابل آلوآنتی ژن‌های جفتی-جنینی نیز نقش دارند. مشخص شده این سلول‌ها از طریق القای سلول‌های T تنظیمی و به حداقل رساندن برخورد لنفوسیت‌های T ایمنولوژیک با آلوآنتی ژن‌های جفتی-جنینی نقش مهمی در القای این تحمل ایمنولوژیک ایفا می‌نمایند (9).

عملکرد سلول‌های دندریتیک تحت تاثیر پیام‌های دریافتی از ریز محیطی است که در آن قرار گرفته‌اند. این پیام‌های دریافتی می‌تواند ناشی از تماس سلول با سلول یا در اثر فاکتورهای محلول ترشح شده در ریز محیط باشد (10-12). با توجه به این که از یک سو الگوی فاکتورهای ترشح شده از سلول‌های بافت دسی جوا در حاملگی طبیعی و موارد سقط ایمنولوژیک متفاوت می‌باشد و از سوی دیگر سلول‌های دندریتیک دسی جوا نقش تعیین کننده ای در الگوی پاسخ‌های ایمنی مخاط رحم دارند، در مطالعه حاضر ما برای اولین بار اثر فاکتورهای ترشح شده از سلول‌های بافت دسی جوا را در دو وضعیت حاملگی طبیعی و حاملگی مستعد سقط بر سلول‌های دندریتیک مورد بررسی قرار دادیم.

جفت‌گیری موش ماده $CBA/J (H2^k)$ با موش نر $DBA/2 (H2^d)$ که منجر به سقط بالای جنین می‌گردد، به

تعیین نتیجه حاملگی

در روز 13/5 حاملگی موش های ماده CBA/J به روش قطع نخاعی کشته شدند. رحم این موش ها برداشته و از ناحیه آنتی مزومتريال برش داده شد. شمار کل جایگاه های لانه گزینی و جایگاه های سقط ثبت شد. جایگاه های سقط بر اساس اندازه کوچک، ظاهر نکروز و هموراژیک در مقایسه با جنین و جفت طبیعی تشخیص داده شدند. درصد سقط نیز بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد سقط} = \frac{\text{تعداد کل جایگاه های سقط}}{\text{تعداد کل جایگاه های لانه گزینی}} \times 100$$

تهیه مایع رویی کشت سلول های دسی جوا

موش های ماده CBA/J در روز 13/5 حاملگی (از مدل حاملگی مستعد سقط یا حاملگی طبیعی) به روش قطع نخاعی کشته شدند. رحم آنها در شرایط استریل خارج شد و سپس از ناحیه آنتی مزومتريال برش داده شد. سپس جنین و لایه های اطراف آن از کپسول جفتی جدا شدند. در ادامه، مجموعه دسی جوی قاعده ای و کپسول های جفتی از دیواره رحم جدا و به پلیت استریل انتقال داده شدند. در زیر میکروسکوپ استریو، دسی جوی قاعده ای با دقت از کپسول های جفتی جدا شد. با کمک قیچی و پنس، قطعات دسی جوا به قطعات ریزی خرد شدند. کوکتل آنزیمی شامل کلاژناز D (Roche, Germany) با غلظت 1 میلی گرم در میلی لیتر و DNase (Roche, Germany) با غلظت 30 میکروگرم در میلی لیتر به قطعات بافتی افزوده شده و برای مدت 1 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد. سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیمی از تور سیمی عبور و به ترتیب با بافرهای فسفات سالین حاوی EDTA و فسفات سالین شستشو داده شد. پس از مراحل شستشو، رسوب سلولی حاصل در محیط کشت کامل RPMI-1640 (Invitrogen, USA) با 20 درصد FCs

عنوان مدل حاملگی مستعد سقط شناخته شده است (13). مطالعه های زیادی وجود نقایص مختلف ایمنولوژیک را در این مدل موشی گزارش کرده اند (14-16). نقایصی که با دستورالعمل های درمانی بر پایه اصلاح پاسخ های ایمنی بهبود یافته اند (17, 18). از سوی دیگر جفت گیری موش ماده CBA/J (H2^k) با موش های نر BALB/c (H2^d) - دارای آنتی ژن H2^d مشترک با موش DBA/2 - که با میزان بسیار پایین سقط جنین همراه است به عنوان مدل حاملگی طبیعی مورد قبول قرار گرفته است. با توجه به وجود این مدل های مورد قبول، در این مطالعه از این موش ها استفاده گردید.

مواد و روش ها

حیوانات

موش های هم خون CBA/J ماده و BALB/c و DBA/2 نر با سن 8-10 هفته از انستیتو پاستور تهران خریداری گردیدند. موش ها در شرایط مناسب از نظر دما، رطوبت و روشنایی (سیکل 12 ساعته تاریکی - روشنایی) نگهداری شدند. تمام روش های مورد استفاده در این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس مورد بررسی و تصویب قرار گرفت.

تعیین سن حاملگی موش

از تکنیک تشخیص پلاک واژینال برای تعیین سن بارداری استفاده شد. بدین منظور دو موش ماده CBA/J در کنار یک موش نر DBA/2 یا BALB/c قرار داده شدند. هر روز به کمک پیپت پاستور، واژن موش های ماده از نظر وجود پلاک واژینال مورد بررسی قرار گرفت. آن دسته از موش های ماده که از نظر پلاک واژینال مثبت بودند، وجود اسپرم در ترشحات واژن آنها از طریق تهیه لام اسمیر واژینال بررسی گردید. روز رویت اسپرم در اسمیر واژینال به عنوان روز 0/5 حاملگی در نظر گرفته شد.

آهن ربای مخصوص ستون (MiniMACS™) بر روی سه پایه نصب شد و ستون (Miltenyi Biotec, MS Germany) در شیار آهن ربا قرار داده شد. پس از شستشوی ستون با بافر، سوسپانسیون سلولی به ستون افزوده شد. پس از عبور سوسپانسیون سلولی، ستون سه بار با بافر ستون شستشو داده شد. با خروج کامل بافر ستون در مرحله سوم شستشو، بافر ستون با حجمی برابر 1 سی سی به ستون افزوده و پس از جداسازی ستون از آهن ربا و با فشار پیستون، محتویات ستون در یک لوله فالكون استریل تخلیه گردید. تعداد سلول خارج شده از ستون و میزان حیات آنها با کمک تریپان بلو تعیین شد. همچنین میزان خلوص سلول های دندریتیک با استفاده از آنتی بادی ضد CD11c متصل به PE (BD Bioscience, USA) و دستگاه فلو سائتومتری (BD Bioscience, USA) تعیین گردید.

بارگذاری آنتی ژن بر سلول های دندریتیک در حضور مایع رویی کشت سلول های دسی جوا

سلول های دندریتیک تخلیص شده در مرحله قبل، در پلیت حاوی محیط RPMI-1640 با 10 درصد FCS کشت داده شدند. دو آنتی ژن (Sigma, Conalbumin) و (Sigma, USA) Turkey Albumin با غلظت یکسان 100 µg/ml و مایع رویی حاصل از کشت سلول های دسی جوا با درصدهای مختلف 5، 10 و 20 درصد به محیط کشت سلول های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژن افزوده شد. پلیت های کشت به مدت 14-12 ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. در جدول 1، زیر گروه های مختلف طراحی شده در بارگذاری آنتی ژن بر سلول های دندریتیک و تیمار با مایع رویی کشت سلول های دسی جوا نشان داده شده است.

(Invitrogen, USA) به صورت سوسپانسیون در آمد. سلول ها با فراوانی 4×10^5 سلول در حجم 800 میکرولیتر محیط کشت به هر حفره از پلیت کشت 24 خانه ای منتقل شدند. پلیت برای مدت 48 ساعت در انکوباتور نگهداری شد. پس از طی زمان انکوباسیون، مایع رویی حفره های مختلف جمع آوری شد و برای مدت 15 دقیقه در دور $12000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی جمع آوری شده به عنوان مایع رویی کشت سلول های دسی جوا در حجم 1 سی سی تقسیم و در فریزر -70 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در حاملگی های مستعد سقط، سه نوع مایع رویی کشت متفاوت به ترتیب از دسی جوا با جنین سالم، دسی جوا با جنین سقط شده و دسی جوا با مجموع جنین های سقط شده و سالم تهیه گردید. در حاملگی های طبیعی نیز مایع رویی کشت مربوط به دسی جوا با جنین های سالم تهیه شد.

تخلیص سلول های دندریتیک از طحال موش

طحال موش های CBA/J پس از نخاعی کردن حیوان در شرایط استریل خارج و با قیچی به قطعات ریز تقسیم شد. به ازای هر طحال، یک میلی لیتر ترکیب کلانازان D و DNase اضافه گردید. قطعات بافتی به مدت 45 دقیقه در انکوباتور نگهداری شدند. سپس قطعات بافتی هضم شده از توری فلزی عبور داده شد. سوسپانسیون سلولی به دست آمده پس از دو بار شستشو با محیط RPMI-1640 به روی محیط گرادیان فایکول منتقل گردیده و سانتریفیوژ شد. لایه سلولی از روی فایکول برداشته شد و پس از شستشو 25 میکرولیتر از آنتی بادی (Miltenyi Pan DC MicroBeads) (Miltenyi Biotec, Germany) که (شامل آنتی بادی های منوکلونال علیه مولکول های CD11c موشی و آنتی ژن 1 سلول دندریتیک پلاسما سیتوئیدی موشی (1-mPDCA)) به سوسپانسیون سلولی افزوده شده و برای 15 دقیقه در 4 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سلول ها دو بار با بافر ستون (حاوی بافر فسفات سالین، EDTA و FCS) شستشو داده شدند.

جدول 10. گروه های مختلف مربوط به بارگذاری آنتی ژن بر سلول های دندریتیک و تیمار با مایعروبی کشت سلول های دسی جوا

| گروه | آنتی ژن | مایع رویی کشت سلول های حاملگی طبیعی | مایعروبی کشت سلول های دسی جوا از مستعد سقط | مایعروبی کشت سلول های دسی جوا از جایگاه های سقط در حاملگی مستعد سقط | کشت سلول های دسی جوا از جایگاه های سقط در حاملگی مستعد سقط |
|------|---------|-------------------------------------|--|---|--|
| 1 | + | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - |
| 3 | + | غلظت 5، 10 و 20 درصد | - | - | - |
| 4 | + | - | غلظت 5، 10 و 20 درصد | - | - |
| 5 | + | - | - | غلظت 5، 10 و 20 درصد | - |
| 6 | + | - | - | - | غلظت 5، 10 و 20 درصد |

ایمن سازی موش ها با سلول های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژن

سلول های دندریتیک بارگذاری شده در مرحله قبل، 3 بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. سپس غلظت سلولی با بافر فسفات سالین روی 1×10^7 cell/ml تنظیم شد. 30 میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی (معادل 3×10^5 سلول) به کف دست موش ها توسط سرنگ انسولین تزریق شد.

آزمون ترانسفورماسیون لنفوسیتی (LTT)

5 روز بعد از تزریق سلول های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژن به کف دست موش، حیوان به روش قطع نخاعی کشته شد. غدد لنفاوی زیر بغلی در شرایط استریل خارج و با ته سرنگ له شدند. سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم مکانیکی از تور سیمی عبور و به ترتیب با بافرهای فسفات سالین حاوی EDTA و فسفات سالین شستشو داده شد. سلول ها با فراوانی 2×10^5 cell/well - $1/5$ در محیط کشت DMEM حاوی 0/5 درصد سرم طبیعی موش CBA/J در میکروپلیت 96 خانه کشت داده شدند. سلول های به دست آمده از هر موش به صورت دو مجموعه سه گانه کشت داده شدند. در یکی از این مجموعه ها آنتی ژن Conalbumine با غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ به هر حفره افزوده

شد که به عنوان حفره های آزمون در نظر گرفته شدند و در مجموعه دیگر این ترکیب آنتی ژنی افزوده نشد و به عنوان حفره های کنترل منفی در نظر گرفته شدند. برای بررسی صحت سیستم کشت، به سه حفره، PHA با غلظت $\mu\text{g/ml}$ 10 افزوده شد.

پلیت کشت به مدت 72 ساعت در انکوباتور نگهداری شد. پس از طی زمان مذکور، به هر حفره 1 میکروکوری تیمیدین رایواکتیو (Amersham, Sweden) اضافه و پلیت کشت به مدت 18 ساعت در انکوباتور CO_2 قرار گرفت. سلول ها با استفاده از دستگاه هاروستر سلول، بر روی فیلترهای Glass fiber (Whatman, USA) هاروست شدند. میزان cpm با دستگاه بتا کانتر (Wallac 1410, USA) قرائت شده و اندیکس تحریک از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{اندیکس تحریک} = \frac{\text{بیانگن cpm حفره های آزمون}}{\text{بیانگن cpm حفره های کنترل منفی}}$$

آنالیز آماری

داده ها توسط نرم افزار SPSS نسخه 15 و براساس آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون آماری

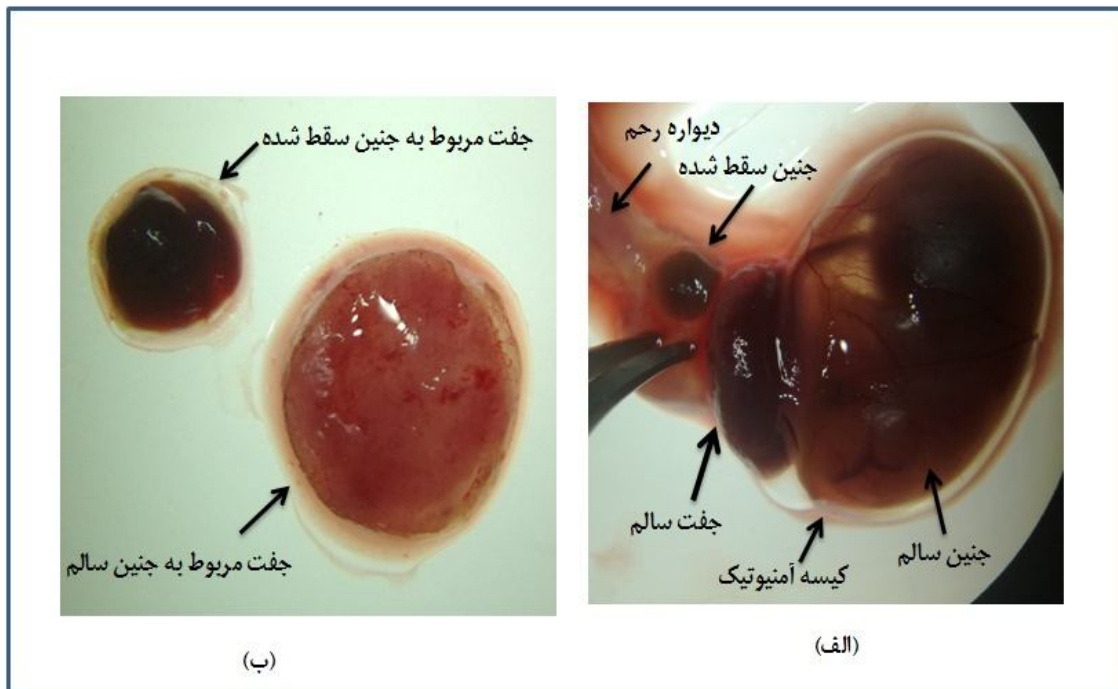
موش های نر DBA/2 (به عنوان حاملگی مستعد سقط) جفت گیری کرده بودند به صورت معنی داری بیشتر از میزان سقط در موش های CBA/J ماده بود که با موش های نر BALB/c (به عنوان حاملگی طبیعی) جفت گیری کرده بودند ($p < 0/05$). میزان سقط در حاملگی مستعد سقط 40 درصد و در حاملگی طبیعی 8 درصد به دست آمد. در شکل 1، نحوه شناسایی جایگاههای سقط و مقایسه جفت طبیعی و جفت مرتبط با جنین سقط شده نشان داده شده است.

LSD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این آنالیزها- p value کمتر از 5 درصد از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج از 5 آزمون مستقل به دست آمد و به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد.

یافته ها

نتایج میزان سقط در حاملگی های آلوزنیک

نتایج بررسی میزان سقط در گروه های مورد مطالعه نشان داد که میزان سقط در موش های CBA/J ماده که با



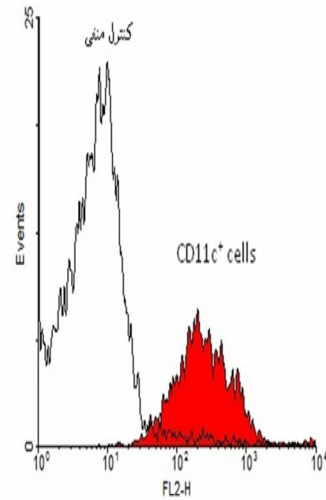
شکل 1. تشخیص سقط جنین در موش حامله CBA/J در روز 13/5 حاملگی. (الف) جایگاه های سقط بر اساس اندازه کوچک، ظاهر نکروزه و هموراژیک در مقایسه با جنین و جفت طبیعی تشخیص داده شد. (ب) جفت مربوط به جنین سقط شده در مقایسه با جفت مربوط به جنین سالم با اندازه کوچک تر و ظاهر تیره تر مشخص است.

تخلیص سلول های دندریتیک از طحال موش

از طحال هر موش ماده CBA/J پس از هضم آنزیمی $10^8 \times 1-1/5$ لکوسیت حاصل شد. پس از انتقال این سلول ها روی محیط گرادیان فایکول، شمار سلول های تک هسته ای برابر 20-25 درصد لکوسیت های اولیه بود. پس از عبور سلول های تک هسته ای از ستون و حذف سلول های

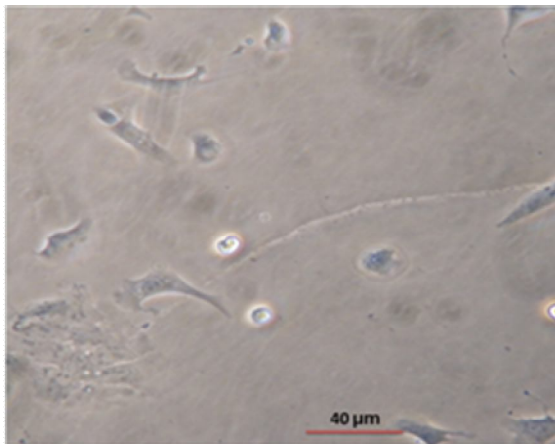
CD11c-، در حدود 0/5-1 درصد سلول های طحالی را سلول های دندریتیک تشکیل می دادند. مطالعه فلوسایتمتری با آنتی بادی CD11c متصل به PE میزان خلوص این سلول ها را بیش از 85 درصد نشان داد (نمودار 1). میزان حیات سلول های تخلیص شده از ستون با استفاده از تریان بلو بیش از 95 درصد گزارش شد.

از هر دسی جوی قاعده‌ای به طور متوسط $10^5 \times$ 6-8 سلول حاصل شد. میزان حیات سلول‌های دسی جوا در قبل و بعد از کشت 48 ساعته با استفاده از تریپان بلو بیش از 95 درصد گزارش شد. این سلول‌ها از رشد وسیعی برخوردار بودند و پس از 48 ساعت بیشتر سطح چاهک را می‌پوشاندند. سلول‌های مدور در اندازه بزرگ و کوچک، سلول‌های ستاره‌ای شکل و سلول‌های دو هسته‌ای با ظاهر سلول‌های دندریتیک از جمله سلول‌های مشاهده شده در کشت سلول‌های دسی جوا بودند (شکل 2). برخی از این سلول‌ها به خصوص سلول‌های دارای استتاله که مشابه سلول‌های دندریتیک بودند با فراوانی 20-10 درصد کل سلول‌های اولیه، متصل به سطح پلیت کشت بودند. پس از گذشت 48 ساعت مشخص شد اندازه سلول‌های مدور بزرگ و همچنین فراوانی سلول‌های شبه دندریتیکی افزایش پیدا کرده است.

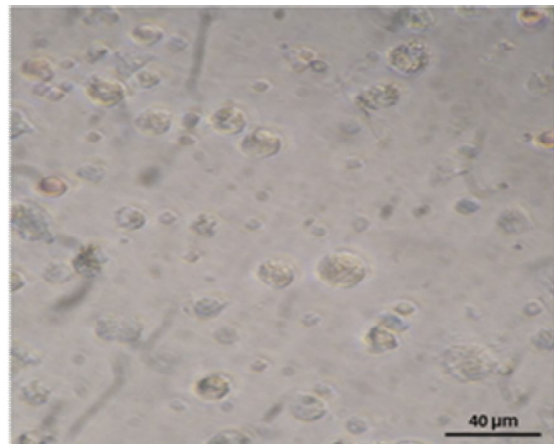


نمودار 1. بررسی بروز شاخص CD11c بر سطح سلول‌های دندریتیک خالص شده توسط فلوسایتومتر. میزان خلوص این سلول‌ها بیش از 85 درصد بود.

کشت سلول‌های دسی جوا



(ب)



(الف)

شکل 2. کشت سلول‌های تخلیص شده از دسی جوی قاعده‌ای در محیط کشت. (الف) سلول‌های تخلیص شده از دسی جوی قاعده‌ای در ساعت اول کشت، سلول‌هایی با سه اندازه متفاوت کوچک، بزرگ و متوسط بود. برخی از سلول‌ها با استتاله‌هایی در اطراف آنها قابل تشخیص بودند. (ب) پس از گذشت 48 ساعت از کشت اولیه، شمار سلول‌های شبه دندریتیکی در مقایسه با سایر سلول‌ها افزایش پیدا کرد.

حاملگی‌های مستعد سقط) بر توانایی سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ‌های اختصاصی آنتی ژن در لئوسیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که توانایی سلول‌های دندریتیک مجاور شده با مایع‌رویی کشت

اثر مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا بر قابلیت عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های دندریتیک

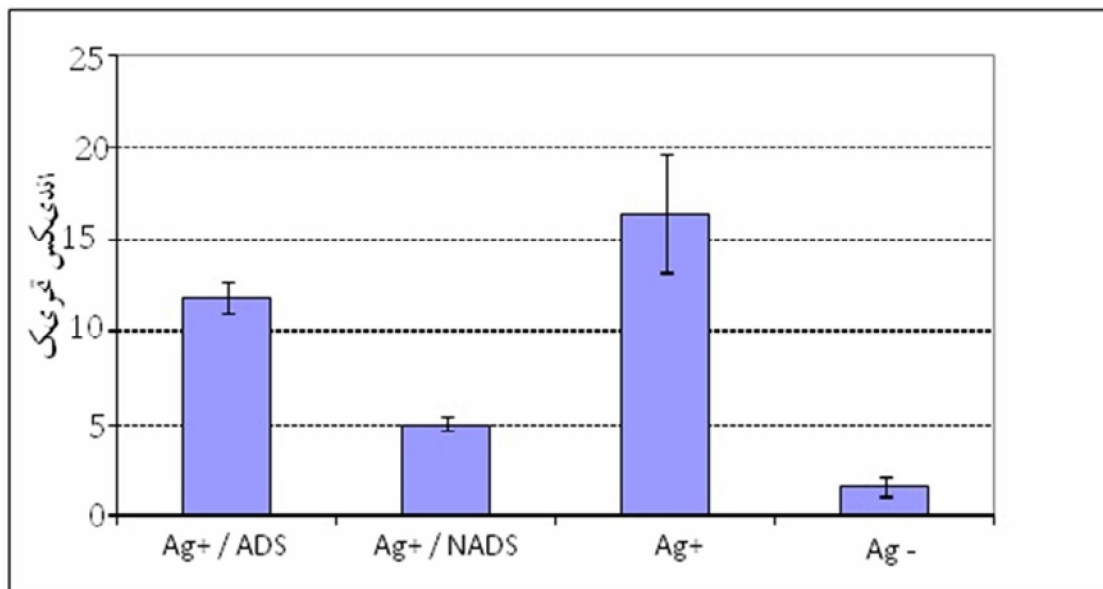
در این مطالعه اثر عوامل محلول ترشح شده از سلول‌های دسی جوا (مربوط به حاملگی‌های طبیعی یا

جوا از جایگاه‌های با جنین سالم در حاملگی مستعد سقط به صورت معنی داری بیشتر از مایع‌روی کشت سلول‌های دسی جوا از جایگاه‌های سقط در حاملگی مستعد سقط بود ($p < 0/01$) (نمودار 3). میزان SI این دو گروه به ترتیب برابر با $2/67 \pm 0/49$ و $7/31 \pm 1/02$ بود.

قابل ذکر است که غلظت‌های مختلف (5، 10 و 20 درصد) مایع‌روی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء حاملگی طبیعی، اثری یکسان بر توان سلول‌های دندریتیک داشتند. این در حالی بود که مایع‌روی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء حاملگی مستعد سقط با غلظت‌های 10 و 20 درصد اثر بهاری بیشتری در مقایسه با غلظت 5 درصد داشتند. بر اساس این یافته‌ها، نتایج گزارش شده در نمودارهای 2 و 3 مربوط به غلظت 10 درصد مایع روی کشت سلول‌های دسی جوا است. در ضمن هر کدام از نتایج گزارش شده، از آنالیز آماری 5 آزمون می‌چزا به دست آمده است.

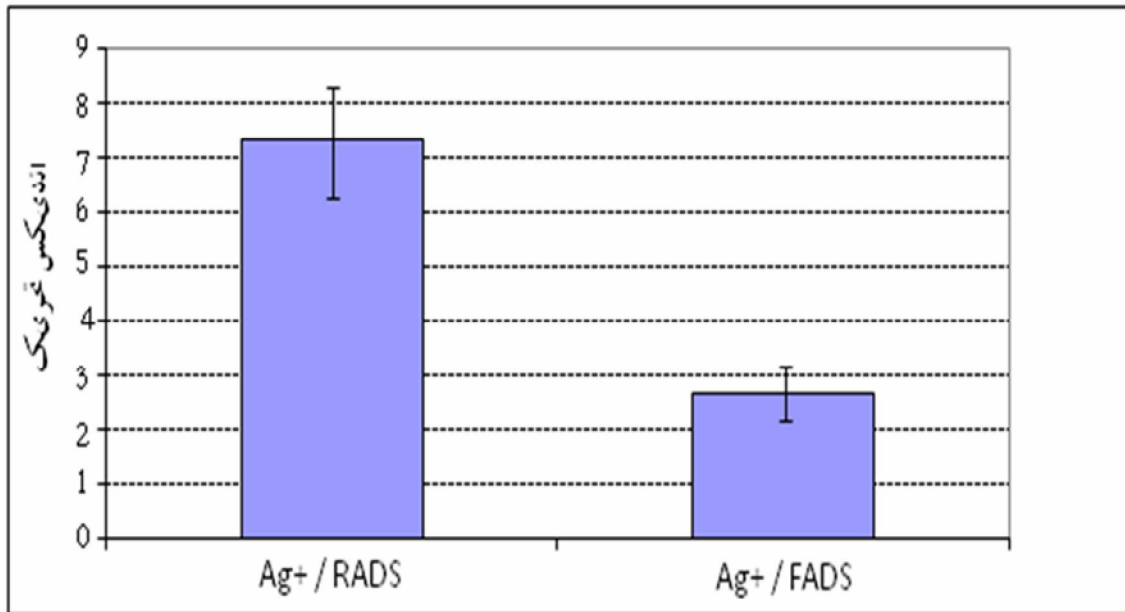
سلول‌های دسی جوی مختلف (از منشاء حاملگی طبیعی، حاملگی مستعد سقط، حاملگی مستعد سقط مربوط به جایگاه‌های سقط و حاملگی‌های مستعد سقط مربوط به جایگاه‌های با جنین سالم) و آنتی ژن در مقایسه با سلول‌های دندریتیکی که تنها با آنتی ژن مجاور شده بودند برای القای پاسخ تکثیری اختصاصی آنتی ژن به صورت معنی داری کاهش یافته بود ($p < 0/05$) (نمودار 2).

بررسی‌ها نشان داد مایع‌روی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء حاملگی طبیعی در مقایسه با مایع‌روی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء حاملگی مستعد سقط به صورت معنی داری از توانایی بالاتری برای سرکوب توان سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ تکثیری اختصاصی آنتی ژن برخوردار بود ($p < 0/01$) (نمودار 2). میزان SI این دو گروه به ترتیب برابر با $4/93 \pm 0/34$ و $11/84 \pm 0/79$ بود. همچنین سرکوب توان سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ تکثیری اختصاصی آنتی ژن توسط مایع روی کشت سلول‌های دسی



نمودار 2. تاثیر مایع‌روی کشت سلول‌های دسی جوا بر توانایی سلول‌های دندریتیک در القای تکثیر اختصاصی آنتی ژن در لنفوسیت‌ها. سلول‌های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژن و تیمار شده با مایع روی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء حاملگی مستعد سقط ($Ag+ / ADS$) در مقایسه با سلول‌های دندریتیک بارگذاری شده با آنتی ژن و تیمار شده با مایع‌روی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء حاملگی طبیعی ($Ag+ / NADS$) به صورت معنی داری توانایی بالاتری برای القای تکثیر اختصاصی آنتی ژن در لنفوسیت‌ها برخوردار بودند ($p < 0/01$). این در حالی بود که توان هر دوی این گروه‌ها به صورت معنی داری از توان سلول‌های دندریتیکی که تنها با آنتی ژن تیمار شده

بودند (Ag^+) کمتر بود ($p < 0/05$). سلول های دندریتیک بدون بارگذاری با آنتی ژن، به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند (Ag^-). نتایج اندیکس تحریک (میانگین \pm انحراف معیار) از پنج آزمایش مستقل به دست آمد.



نمودار 3. مقایسه جایگاه سقط و جایگاه با جنین سالم در یک حاملگی مستعد سقط. توان القای تکثیر اختصاصی در لنفوسیت ها توسط سلول های دندریتیک که همزمان با آنتی ژن و مایعروبی کشت سلول های دسی جوا از جایگاه های با جنین سالم در حاملگی مستعد سقط ($Ag^+/FADS$) تیمار شده بودند در مقایسه با سلول های دندریتیک که همزمان با آنتی ژن و مایعروبی کشت سلول های دسی جوا از جایگاه های سقط در حاملگی مستعد سقط ($Ag^+/RADS$) تیمار شده بودند، به صورت معنی داری کاهش یافته بود ($p < 0/01$).

بحث

ژن Conalbumin با استفاده از تایمیدین رایواکتیو سنجیده شد.

برای بهتر مشخص بودن نتایج مربوط به اثرات تعدیل ایمنی مایعروبی کشت سلول های دسی جوا بر عملکرد سلول های دندریتیک، از اثر کمکی متقابل استفاده شد. اثری که به واسطه تیمار همزمان سلول دندریتیک با بیش از یک آنتی ژن میسر می شود و منجر به افزایش توان سلول های دندریتیک برای القای تکثیر در لنفوسیت ها می گردد. این ادعا وجود دارد که عرضه همزمان دو ترکیب آنتی ژنی توسط یک سلول دندریتیک می تواند دو جمعیت لنفوسیت T اختصاصی هر آنتی ژن را به طور همزمان درگیر و فعال نماید. لنفوسیت های T به دنبال فعال شدن در پاسخ به عرضه آنتی ژن توسط سلول های دندریتیک، از طریق مولکول CD40 لیگاند

در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر عوامل ترشح شده از بافت دسی جوا در دو مدل موش با حاملگی طبیعی و حاملگی مستعد سقط بر عملکرد سلول های دندریتیک مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور سلول های دندریتیک تخلیص شده از طحال موش با خلوص بالا به طور همزمان با دو آنتی ژن Conalbumin و Turkey Albumin و همچنین غلظت های مختلف از مایعروبی کشت سلول های دسی جوا از موش های مستعد سقط ($CBA/J \times DBA/2$) یا موش های با حاملگی طبیعی ($CBA/J \times BALB/c$) مواجه شدند. این سلول های دندریتیک پس از کشت شبانه به کف دست موش های ماده CBA/J تزریق شد و پس از 5 روز گره لنفاوی آنها خارج و میزان تکثیر لنفوسیت ها در مواجه با آنتی

می‌شوند (20-23). در توضیح این ویژگی‌های خاص سلول‌های دندریتیک دسی جوا در حاملگی طبیعی، بلویس و همکارانش ادعا می‌نمایند که بسته به این که سلول‌های دندریتیک در دسی جوا تحت تاثیر چه عواملی قرار بگیرند توانایی آنها برای القای پاسخ‌های ایمنی متفاوت می‌باشد. در یک حاملگی موفقیت‌آمیز محرک‌های تولروژنیک همچون پروژسترون، HLA-G محلول، پروستاگلاندین E2، ویتامین D و سلول‌های موجود در محیط دسی جوا مثل سلول‌های NK و ماکروفاژها منجر به فعال شدن جزئی سلول‌های دندریتیک (Partial activation) موجود در دسی جوا می‌گردند. این سلول‌های دندریتیک که تحت تاثیر محرک‌های تولروژنیک قرار گرفته‌اند سایتوکاین‌های ضد التهابی مثل IL-10 تولید می‌کنند که سبب القای تحمل در سطح تماس مادر- جنین می‌گردند. همچنین با مکانیسم‌های متفاوتی همچون تولید سایتوکاین‌های TH2/TH3 محافظت‌کننده حاملگی و تولید سلول‌های T تنظیمی منجر به مهار سیستم ایمنی و حفظ تحمل به جنین می‌گردند (24). بر این اساس کاهش میزان عملکرد سلول‌های دندریتیک تحت تاثیر عوامل مترشح از بافت دسی جوا در موش‌های با حاملگی طبیعی می‌تواند حاکی از وجود عواملی همچون IL-10، پروستاگلاندین E2، ویتامین D3، پروژسترون و HLA-G محلول در مایع رویی کشت سلول‌های دسی جوا این موش‌ها باشد. این عوامل سبب القای فنوتایپی در سلول‌های دندریتیک شده‌اند و توانایی آنها را برای عرضه آنتی ژن و فعال کردن لنفوسیت‌های T اختصاصی کاهش داده‌اند.

مشخص شده در طی حاملگی ناموفق و سقط جنین، ارتشاح گسترده سلول‌های NK در محل تماس مادر-جنین و تولید سایتوکاین IFN- γ توسط این سلول‌ها همراه با حضور ماکروفاژهای تولید کننده TNF- α سبب خارج شدن سلول‌های دندریتیک از وضعیت تولروژنیک و فعال شدن کامل این سلول‌ها و تولید IL-12 توسط آنها می‌گردد. عرضه آنتی ژن به وسیله DC بالغ سبب تولید سایتوکاین‌های التهابی

سطح خود پیام‌هایی را به سلول‌های دندریتیک ارسال می‌نمایند که این پیام‌ها فعال شدن کامل و افزایش ظرفیت عرضه آنتی ژن توسط این سلول‌ها را در پی خواهد داشت (19).

نتایج این پژوهش حاکی از تفاوت فعالیت تعدیل ایمنی عوامل ترشح شده از بافت دسی جوا در این دو مدل موش بود. به طوری که مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء موش‌های با حاملگی مستعد سقط توانایی کمتری برای مهار عملکرد سلول‌های دندریتیک در مقایسه با مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا از منشاء موش‌های با حاملگی طبیعی داشت. در موش‌های با حاملگی مستعد سقط به طور معمول تعدادی از جنین‌ها حفظ و تعدادی از آنها سقط می‌شوند (نمودار 2). حال این سوال مطرح شد که آیا الگوی عوامل ترشح شده در بافت دسی جوا در جایگاه‌های سقط و جایگاه‌های با جنین سالم یکسان است یا خیر؟ برای پاسخ به این سوال بافت دسی جوا و بعد مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا از دو جایگاه سقط و جایگاه با جنین سالم مربوط به موش‌های با حاملگی مستعد سقط تهیه شد. توانایی سرکوب عملکرد سلول‌های دندریتیک توسط مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا مربوط به جایگاه‌های سقط در مقایسه با مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا مربوط به جنین سالم به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود (نمودار 3).

سلول‌های دندریتیک مهم‌ترین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی ژن در درون بافت دسی جوا می‌باشند. این سلول‌های موجود در بافت دسی جوا در طی یک حاملگی طبیعی تحت تاثیر تماس‌های سلولی و عوامل ترشح شده در ریز محیط، ویژگی‌های خاصی همچون غلبه فنوتایپ میلیویدی به لنفوتیپی، افزایش نسبت فنوتایپ نابالغ به بالغ با بیان متوسطی از مولکول‌های CD80/86 و تولید بالاتر IL-10 در مقایسه با IL-12 را بروز می‌دهند. همگی این ویژگی‌ها توسعه سلول‌های دندریتیک تولروژنیک و القای تحمل در مقابل آلوانتی ژن‌های جنینی را موجب

بلاستوسیتی در دیواره رحم موش اتفاق می‌افتد. در موش‌های مستعد سقط برخی از این لانه‌گزینی‌ها بدون این که جذب شوند منجر به طی نمودن مراحل تکامل می‌گردند. حال این که برخی از آنها نیز از روز 8/5 حاملگی شروع به جذب شدن می‌نمایند. با این مشاهده‌ها این فرضیه مطرح شد که شدت پاسخ‌های ایمنی به آلوآنتی ژن‌های جنینی می‌تواند در نواحی مختلف دیواره رحم و به خصوص بافت‌های دسی جوا (مختلف متفاوت باشد. بدین منظور مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا از دو جایگاه جنین سالم و جنین سقط شده تهیه شد و اثر این مایع‌رویی کشت بر عملکرد سلول‌های دندریتیک بررسی شد. نتایج مطالعه حکایت از افزایش مهار عملکرد سلول‌های دندریتیک توسط مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا از جایگاه جنین سالم در مقایسه با جایگاه جنین سقط شده داشت. این نتیجه حاکی از عدم توزیع یکنواخت عوامل مهارکنندگی ایمنی در دیواره رحم موش می‌باشد که این توزیع غیریکنواخت خود می‌تواند تحت تاثیر ارتشاح غیر یکسان سلول‌های ایمنی در جایگاه‌های مختلف دیواره رحم باشد. بر این اساس شاید بتوان گفت ریز محیط به وجود آمده در محل لانه‌گزینی جنین در دیواره رحم می‌تواند در سرنوشت آن برای رد یا پذیرش ایمونولوژیک توسط مادر نقش داشته باشد.

تغییر فعالیت عملکردی سلول‌های دندریتیک تحت تاثیر عوامل مترشح از سلول‌های دسی جوا و اثبات وجود تفاوت در ویژگی‌های تعدیل ایمنی این عوامل مترشح در حاملگی‌های طبیعی و سقط‌های ایمونولوژیک به خوبی در نتایج حاصل از این مطالعه به اثبات رسید. اما به نظر می‌رسد طراحی مطالعه‌های بیشتر از جمله بررسی توانایی سلول‌های دندریتیک تیمار شده با عوامل مترشح از سلول‌های دسی جوا (در طی حاملگی طبیعی و حاملگی مستعد سقط) در جهت گیری پاسخ‌های ایمنی TH1، TH2 و TH17، تعیین توانایی سلول‌های دندریتیک تیمار شده با عوامل مترشح از سلول‌های دسی جوا (در طی حاملگی طبیعی و حاملگی مستعد

TH1 توسط لنفوسیت‌ها می‌گردد که منجر به بروز آپوپتوز در سلول‌های تروفوبلاست و سقط جنین و انحراف پاسخ‌های ایمنی به TH1 می‌شود (25). در تایید این وقایع مشخص شده در مقایسه بین سلول‌های دندریتیک موجود در بافت دسی جوا در موش‌های مستعد سقط و موش‌های با حاملگی طبیعی، الگوی بیان مولکول‌هایی همچون MHC-II، CD40 و CD86 و فنوتایپ لنفوتیدی یا میلوتیدی آنها متفاوت می‌باشد (6، 26).

مشخص شده علت بروز میزان بالای سقط در مدل موشی CBA/J × DBA/2 در مقایسه با موش‌هایی که میزان سقط کمی را بروز می‌دهند با فنوتایپ سلول‌های دندریتیک که به طور کامل بالغ شده‌اند (بیان بالای MHC-II، CD80 و ICAM-I) مرتبط می‌باشد. این امکان وجود دارد که سلول‌های دندریتیک فعال شده بر تحمل القاء شده در مقابل آنتی ژن‌های پدری غلبه نمایند و سبب القای رد جنین گردند (27). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از افزایش توان سلول‌های دندریتیک برای فعال کردن سلول‌های T اختصاصی آنتی ژن تحت تاثیر مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا در موش‌های مستعد سقط در مقایسه موش‌های با حاملگی طبیعی می‌باشد. بی‌شک تحلیل عوامل محلولی که سبب بروز فنوتایپ تولروژنیک در سلول‌های دندریتیک می‌گردند، نقش اساسی در بروز این نتایج دارد.

با وجود این که فعالیت مهار عوامل ترشح شده توسط سلول‌های دسی جوا بر سلول‌های دندریتیک در موش‌های مستعد سقط کمتر از موش‌های با حاملگی طبیعی بود، ولی با مقایسه این نتایج با نتایج مربوط به سلول‌های دندریتیک که تنها با آنتی ژن تیمار شده بودند متوجه شدیم که عوامل مهار سلول‌های دندریتیک در مایع‌رویی کشت سلول‌های دسی جوا از موش‌های مستعد سقط نیز وجود دارد. چرا با وجود این عوامل مهار درصد سقط در موش‌های مستعد سقط بالا است؟ در پاسخ به این سوال باید گفت در طی یک حاملگی، لانه‌گزینی متعددی از توده‌های

- implications. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2010;21(7):428-34. Epub 2010/03/23.
3. Vassiliadou N, Searle RF, Bulmer JN. Immunoregulatory activity of decidua in spontaneous early pregnancy loss. Hum Reprod. 1999;14(9):2252-6. Epub 1999/09/02.
4. Moser M. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. Immunobiology. 2001;204(5):551-7. Epub 2002/02/16.
5. Kushwah R, Hu J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. Cell & bioscience. 2011;1(1):20. Epub 2011/06/30.
6. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jeddi-Tehrani M. Kinetics of murine decidual dendritic cells. Reproduction. 2007;133(1):275-83. Epub 2007/01/25.
7. Plaks V, Birnberg T, Berkutzki T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. The Journal of clinical investigation. 2008;118(12):3954-65. Epub 2008/11/27.
8. Blois SM, Klapp BF, Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. Journal of reproductive immunology. 2011;88(2):86-92. Epub 2011/01/14.
9. Collins MK, Tay CS, Erlebacher A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. The Journal of clinical investigation. 2009;119(7):2062-73. Epub 2009/06/24.
10. Michielsen AJ, Hogan AE, Marry J, Tosetto M, Cox F, Hyland JM, et al. Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. PloS one. 2011;6(11):e27944. Epub 2011/11/30.
11. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Dokouhaki P, Ghods R, et al. Microenvironment of the fetomaternal interface protects the semiallogenic fetus through its immunomodulatory activity on dendritic cells. Fertility and sterility. 2008;90(3):781-8. Epub 2007/05/08.
12. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nature reviews Immunology. 2003;3(4):331-41. Epub 2003/04/02.

سقط) برای القای سلول های T تنظیمی و نیز مطالعه الگوی بیان سایتوکاینی و گیرنده های شناساگر الگو (مثل Toll like receptors) در سلول های دندریتیک پس از تیمار با عوامل مترشح از سلول های دسی جوا (در طی حاملگی طبیعی و حاملگی مستعد سقط) می تواند به تکمیل اطلاعات به دست آمده از این مطالعه و روشن تر شدن مکانیسم های دخیل در حفاظت جنین در برابر پاسخ های ایمنی مادر کمک شایانی نماید.

نتیجه گیری

با توجه به نقش کلیدی سلول های دندریتیک در القای تحمل مادر نسبت به جنین، به نظر می رسد تغییر الگوی مولکول های ترشح شده توسط سلول های دسی جوا می تواند ویژگی های عملکردی سلول های دندریتیک و در نتیجه سرنوشت حاملگی را تحت تاثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان نامه دانشجویی دانشگاه تربیت مدرس بوده و بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خویش را نسبت به معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تامین قسمتی از هزینه های پژوهش اعلام می دارند. هم چنین کمال تشکر را از همکاران خویش در گروه ایمنی شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به واسطه کمک ها و راهنمایی های ارزشمند ابراز می نمایم.

منابع

1. Kanellopoulos-Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the fetomaternal interface. Reproductive biology and endocrinology : RB&E. 2003;1:121. Epub 2003/12/04.
2. Erlebacher A. Immune surveillance of the maternal/fetal interface: controversies and

20. Rieger L, Honig A, Sutterlin M, Kapp M, Dietl J, Ruck P, et al. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2004;11(7):488-93. Epub 2004/10/02.
21. Kammerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kampgen E, et al. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *The American journal of pathology*. 2000;157(1):159-69. Epub 2000/07/06.
22. Gardner L, Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biology of reproduction*. 2003;69(4):1438-46. Epub 2003/06/27.
23. Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, et al. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *The American journal of pathology*. 2003;162(3):887-96. Epub 2003/02/25.
24. Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, et al. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biology of reproduction*. 2007;77(4):590-8. Epub 2007/06/29.
25. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of reproduction and fertility*. 1990;89(2):447-58. Epub 1990/07/01.
26. Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biology of reproduction*. 2004;70(4):1018-23. Epub 2003/12/19.
27. Blois S, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni RA, et al. Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the fetomaternal interface in murine pregnancies. *J Immunol*. 2005;174(4):1820-9. Epub 2005/02/09.
13. Clark DA, Chaput A, Tutton D. Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VII. Spontaneous abortion of allogeneic CBA/J x DBA/2 fetuses in the uterus of CBA/J mice correlates with deficient non-T suppressor cell activity. *J Immunol*. 1986;136(5):1668-75. Epub 1986/03/01.
14. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *The American journal of pathology*. 2005;166(3):811-22. Epub 2005/03/04.
15. Yin G, Li C, Shan B, Wang W, Chen H, Zhong Y, et al. Insufficient peroxiredoxin-2 expression in uterine NK cells obtained from a murine model of abortion. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(3):773-81. Epub 2011/02/18.
16. Clark DA, Croitoru K. TH1/TH2,3 imbalance due to cytokine-producing NK, gammadelta T and NK-gammadelta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2001;45(5):257-65. Epub 2001/07/04.
17. Du MR, Dong L, Zhou WH, Yan FT, Li DJ. Cyclosporin a improves pregnancy outcome by promoting functions of trophoblasts and inducing maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings in the mouse. *Biology of reproduction*. 2007;76(5):906-14. Epub 2007/01/19.
18. Li W, Li B, Li S. Adenovirus mediated CTLA4Ig transgene therapy alleviates abortion by inhibiting spleen lymphocyte proliferation and regulating apoptosis in the fetoplacental unit. *Journal of reproductive immunology*. 2013;97(2):167-74. Epub 2013/02/26.
19. Shojaeian J, Jeddi-Tehrani M, Dokouhaki P, Mahmoudi AR, Ghods R, Bozorgmehr M, et al. Mutual helper effect in copulsing of dendritic cells with 2 antigens: a novel approach for improvement of dendritic-based vaccine efficacy against tumors and infectious diseases simultaneously. *J Immunother*. 2009;32(4):325-32. Epub 2009/04/04.