

## بررسی اثر سیکلوسپورین بر میزان آنتی‌بادی‌های نامتقارن و سایتوکین TGF- $\beta$ 1 در مدل موشی سقط CBA/J $\times$ DBA/2

بیژن صدیقی مقدم (M.Sc)، سید محمد موذنی\* (Ph.D)  
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی

### چکیده

سابقه و هدف: یکی از علل بروز سقط‌های مکرر، دخالت عوامل ایمنولوژیک در این نوع سقط می‌باشد. داروی سیکلوسپورین، موجب کاهش سقط در مدل حیوانی CBA/j $\times$ DBA/2 می‌گردد. آنتی‌بادی‌های نامتقارن و TGF- $\beta$ 1 از عوامل مهم تعیین‌کننده سرنوشت حاملگی است. مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر سیکلوسپورین بر میزان این نوع آنتی‌بادی‌ها و سایتوکین TGF- $\beta$ 1 سرمی، در مدل حیوانی سقط، انجام گرفت. مواد و روش‌ها: موش‌های CBA/J ماده پس از جفت‌گیری با موش‌های DBA/2 به دو گروه تقسیم گردیدند، به گروه آزمون در روز پنجم حاملگی ۱ mg/kg سیکلوسپورین و به گروه کنترل حامل دارو به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روز ۱۳/۵ حاملگی، سرم تمامی موش‌ها تهیه و با روش الیزا آنتی‌بادی‌های نامتقارن و TGF- $\beta$ 1 اندازه‌گیری شد. هم‌چنین درصد سقط در روز ۱۳/۵ حاملگی بین این دو گروه با یکدیگر مقایسه گردید. یافته‌ها: میزان آنتی‌بادی‌های نامتقارن ( $P < 0.01$ ) و درصد سقط ( $P < 0.02$ ) در گروه آزمون کاهش معنی‌داری را نشان داد. در حالی‌که سایتوکین TGF- $\beta$ 1 در دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P > 0.06$ ). نتیجه‌گیری: علی‌رغم کاهش میزان آنتی‌بادی نامتقارن در گروه آزمون و نداشتن تفاوت معنی‌دار در میزان سایتوکین TGF- $\beta$ 1 سرمی، میزان سقط در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌دار کاهش یافته است لذا بایستی به مکانیسم‌های دیگر سرکوب پاسخ ایمنی و کاهش میزان سقط غیر از آنتی‌بادی‌های نامتقارن و TGF- $\beta$ 1، متعاقب مصرف سیکلوسپورین توجه نمود.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر خودبه‌خودی، آنتی‌بادی نامتقارن، سیکلوسپورین

### مقدمه

جنین در پستانداران ناخالص (Outbred) معمولاً محصول جفت‌گیری (Mating) دو موجود با ناسازگاری بافتی می‌باشد لذا مشابه یک پیوند نیمه آلوژنیک (Semi allogenic graft) بوده که در طول حاملگی، تحمل می‌شود. طی حاملگی پاسخ‌های سیستم ایمنی مادر علیه آنتی‌ژن‌های پدری موجود روی سلول‌های تروفوبلاست به کمک عوامل سلولی و عوامل ملکولی محلول و نامحلول

مختلف، به صورت موضعی و سیستمیک تخفیف پیدا می‌کند. نقص در هر یک از این مکانیسم‌ها و عوامل آن برای جنین مخاطره‌آمیز بوده، می‌تواند منجر به سقط گردد. از عوامل سلولی دخیل در کنترل پاسخ‌های مادر نسبت به جنین می‌توان به زیرگروه‌های سلول‌های T تنظیمی [۱] اشاره نمود، در موش‌ها دو روز بعد از جفت‌گیری جمعیت این سلول‌ها افزایش می‌یابد [۲] و انتقال آدپتیو آن‌ها از موش باردار طبیعی به موش مدل سقط از دفع جنین ممانعت به عمل

از جفت‌گیری موش‌های CBA/J × DBA/2 به دست می‌آید [۱۸].

سیکلوسپورین، ملکولی لیپوفیلیک است که از طریق مهار کلسینورین از دفسفوریل‌اسیون NFAT و مهاجرت آن به هسته و نسخه‌برداری از ژن IL-2 ممانعت می‌نماید که نتیجه آن جلوگیری از فعال شدن پروموتورهای فعالیت سلول T می‌باشد [۱۹]. مکانیسم اثر سیکلوسپورین در افزایش و یا کاهش بیان ملکول‌های دخیل در فعالیت سیستم ایمنی در مطالعات دیگران مورد توجه قرار گرفته است [۲۴، ۲۳، ۲۲، ۲۱، ۲۰، ۱۹، ۲۵].

TGF- $\beta$  قوی‌ترین سایتوکین سرکوب‌کننده ایمنی می‌باشد. کاهش فعالیت IL-2، مهار تمایز سلول‌های T سیتوتوکسیک، تداخل در سنتز سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF- $\alpha$  و IFN $\gamma$  از تاثیرات این سیتوکین می‌باشد [۲۶]. خانواده TGF- $\beta$  خود از سه پروتئین همو دایمر  $\beta$ 2-، TGF- $\beta$ 1 و  $\beta$ 3 تشکیل شده است [۲۷]. تجویز TGF- $\beta$  می‌تواند ارگان‌های پیوندی را تا حدودی از خطر دفع محافظت نماید [۲۸، ۲۹]. افزایش بیان TGF- $\beta$  را متعاقب مصرف سیکلوسپورین به منابع مختلف بافتی و سلولی نسبت می‌دهند که بعضی عبارتند از: سلول‌های proximal tubular، فیبروبلاست‌های tubulointerstitial و سلول‌های T فعال شده [۳۰]. TGF- $\beta$  در embryogenesis نیز اهمیت زیادی دارد [۳۱].

با توجه به اهمیت حضور آنتی‌بادی‌های نامتقارن و TGF- $\beta$  در جلوگیری از سقط جنین و گزارشات موجود در ارتباط با کاهش میزان سقط متعاقب تجویز سیکلوسپورین در مدل موشی سقط ایمنولوژیک، در این مطالعه به بررسی تاثیر تجویز این دارو بر میزان آنتی‌بادی‌های نامتقارن AAb و TGF- $\beta$  سرمی پرداختیم.

## مواد و روش‌ها

مدل موشی مورد استفاده. موش‌های ماده نژاد CBA/J و موش‌های نر نژاد DBA/2J با سن ۸-۶ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در یک محیط مناسب با سیکل ۱۲ ساعته تاریکی/روشنایی و شرایط مناسب دمایی و رطوبت

می‌آورد [۳]. سلول‌های NK رحمی نیز برای لانه‌گزینی موفق در حاملگی بسیار مهم می‌باشند و بعد از تکمیل ته‌اجم تروفوبلاست تعدادشان کاهش می‌یابد [۴، ۵].

از عوامل ملکولی محلول که در حاملگی موفق نقش مهمی دارند، می‌توان به هورمون پروژسترون [۶]، هورمون hCG [۷]، هورمون CRH [۸]، آنزیم ایندولآمین ۲،۳ دی‌اکسیژناز [۹] و عامل مهاری لوسمی [۱۰] و از عوامل ملکولی غیر محلول می‌توان به پروتئین‌های تنظیمی کمپلمان MCP، DAF، CD59 و هم‌چنین ملکول‌های PDL1 و PDL2 در موضع جفت و دسیجوا [۱۱، ۱۲] و هم‌چنین بیان HLA-G، HLA-E و HLA-F بر روی سلول‌های تروفوبلاست اشاره نمود [۱۳].

از مکانیسم‌های ایمنولوژیک که پاسخ سیستم ایمنی مادر را در دوران حاملگی به صورت موضعی کاهش می‌دهد، آنتی‌بادی‌های نامتقارن (AAb) می‌باشد. این آنتی‌بادی‌ها به علت طرح خاص گلیکوزیلاسیون فقط در یکی از نواحی Fab فعال بوده، لذا ملکول آنتی‌بادی به آنتی‌ژن متصل می‌شود ولی فاقد فعالیت بیولوژیک می‌باشد. این آنتی‌بادی با آنتی‌بادی متقارن مشابه خود در اتصال به آنتی‌ژن رقابت نموده و نقش آنتی‌بادی بلوکه‌کننده را در حاملگی بازی می‌کند. آنتی‌بادی‌های نامتقارن، در حاملگی از ۱۵٪ به ۵۰٪ کل آنتی‌بادی‌های سرم افزایش می‌یابند. ۶۰٪ از آنتی‌بادی‌های متصل به جفت از این نوع بوده که ۸۰٪ آن بر علیه آنتی‌ژن‌های پدري است. کاهش تولید این نوع آنتی‌بادی در تعیین سرنوشت حاملگی مهم گزارش شده است [۱۴، ۱۵]. در سرم زنان مبتلا به سقط مکرر این آنتی‌بادی‌ها به میزان کم‌تری حضور دارند [۱۶، ۱۷].

در انسان سقط مکرر خودبه‌خودی Recurrent spontaneous abortion (RSA) به پدیده‌ای اطلاق می‌گردد که در آن سه یا بیش‌تر از سه بار سقط قبل از هفته بیستم حاملگی تجربه شود. نارسایی‌های ایمنولوژیک یکی از عوامل اصلی بروز سقط خودبه‌خودی می‌باشد. مدل حیوانی مناسب و شناخته شده برای مطالعه سقط ایمنولوژیک

mannopyranosyl، alpha-D-glucopyranosyl متصل می‌شود. به‌طور خلاصه (ConA-Sepharose) با بافر استخراج (Elution buffer) حاوی ۲۵ میلی‌مول Tris-HCl، ۰/۲ مول NaCl، ۳ میلی‌مول از هر یک از نمک‌های CaCl<sub>2</sub>، MgCl<sub>2</sub>، MnCl<sub>2</sub> ۲٪ Na<sub>3</sub>N با pH ۷/۲ شسته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰ نمونه‌های سرم با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون Con A-Sepharose در بافر مذکور با تراکم ۵۰٪ مخلوط گردید و برای مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. لوله‌های حاوی مخلوط پیش گفت هر ۱۰ دقیقه تکان داده شد. در لوله دیگر نیز ۱۰۰ میکرولیتر رقت ۱/۱۰۰ سرم با ۱۰۰ میکرولیتر بافر مذکور مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ به نمونه گرفته شده از لوله حاوی Con A نمونه جذب شده و به نمونه همراه بافر نمونه جذب نشده گفته می‌شود.

تعیین درصد آنتی‌بادی نامتقارن بروش الیزا. غلظت آنتی‌بادی ضد IgG موشی (Capture antibody) تولید شرکت DAKO با استفاده از بافر فسفات سالین در حدود ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تنظیم شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این آنتی‌بادی به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای NuncMaxisorp, Immunoplates, (NUNC, Denmark) منتقل و یک شب در یخچال قرار داده شد. هر یک از چاهک‌های پلیت ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر از فسفات بافر حاوی ۵٪ ماده Tween ۲۰ شسته شد. جهت بلاک کردن به هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر از بافر بلاک‌کننده حاوی نیم درصد از ماده Tween ۲۰ اضافه شد و میکروپلیت دو ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. بعد از شستشو با استفاده از بافر رقیق‌کننده، استاندارد‌ها IgG موشی با غلظت‌های ۱۵۰۰ pg/ml، ۷۵۰ pg/ml، ۳۷۵ pg/ml، ۱۸۷/۵ pg/ml، ۹۳/۷۵ pg/ml و ۴۶/۸۷ pg/ml تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد به‌صورت دو تایی در حفره‌های مربوطه اضافه گردید. همچنین نمونه‌ها سرم موش جذب شده با Con-A sepharose و سرم جذب نشده در حفره‌های مربوطه به‌صورت دو تایی اضافه شد. در حفره‌های بلانک فقط ۱۰۰ میکرولیتر بافر

و جدا از یکدیگر نگهداری شدند. سپس موش‌های ماده به قفس موش نر منتقل گردیدند (۱-۲ موش ماده CBA/J با یک موش نر DBA/2) و هر روز در دو نوبت موش‌های ماده از نظر وجود پلاگ واژینال مورد بررسی قرار گرفتند، به‌دنبال مشاهده پلاگ واژینال در ناحیه واژن موش ماده، این موش جدا شده و آنروز به عنوان روز ۰/۵ حاملگی ثبت گردید [۳۲]. موش‌های حامله به دو گروه آزمون و کنترل تقسیم گردیدند.

تزریق سایکلواسپورین. به موش‌های گروه آزمون در روز ۵ حاملگی داروی سایکلواسپورین ساخت شرکت Sandimmune سوئیس به مقدار ۱ mg/kg از طریق داخل صفاقی تزریق گردید. به موش‌های گروه کنترل به‌جای سایکلواسپورین، فقط PBS تزریق شد.

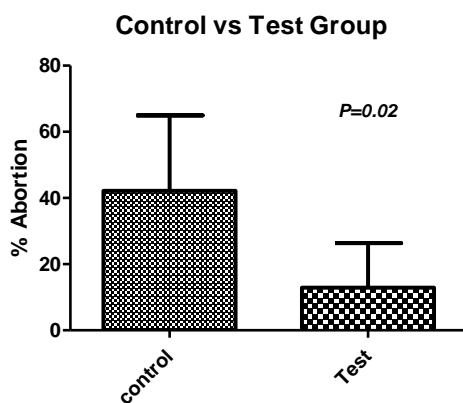
تهیه سرم و تعیین درصد سقط. در روز ۱۳/۵ حاملگی موش‌های باردار هر دو گروه با تزریق کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلزین (۱۰ mg/kg) ساخت شرکت آلفاسان-هلند، به صورت داخل صفاقی بی‌هوش شدند. خون‌گیری از قلب موش‌ها به منظور تهیه سرم صورت گرفت. لوله حاوی خون در یخچال قرار داده شد و پس از انعقاد با سانتریفیوژ سرم آن جدا و تا اندازه‌گیری آنتی‌بادی نامتقارن AAb و TGF-β1 در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس موش‌ها به روش قطع نخاع کشته و بر روی صفحه جراحی خوابانده شده و با سوزن ته گرد کاملاً ثابت شدند. شکاف کوچکی در ناحیه پایین شکم ایجاد شده و با استفاده از قیچی و پنس ناحیه شکمی باز گردید. پس از خارج کردن شاخ‌های رحمی و قرار دادن آن‌ها در پلیت شیشه‌ای شاخ‌های رحمی از ناحیه آنتی‌مزومترال برش داده شد و تعداد جنین سالم و سقط شده شمارش گردیدند.

جداسازی آنتی‌بادی IgG نامتقارن از متقارن. جداسازی IgG نامتقارن از IgG متقارن توسط روش کروماتوگرافی با استفاده از سفاروز کانکاناوالین آ (ConA-Sepharose) (سیگما - آمریکا) انجام شد. لکتین موجود در ConA به ملکول IgG نامتقارن حاوی-alpha-D-

آن‌ها PBS تزریق شده بود، کاهش داد ( $P=0/02$ ) که با مطالعات قبلی در این زمینه مطابقت داشت [۲۵]. (شکل ۱).

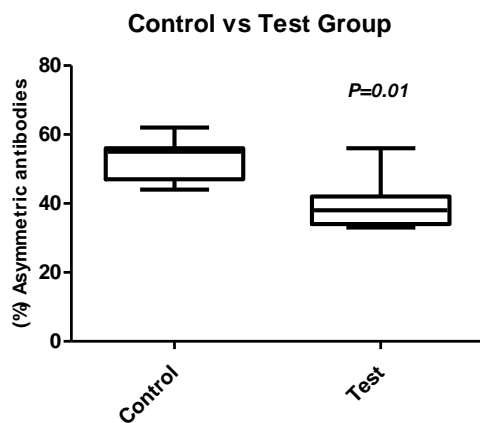
جدول ۱. تاثیر سیکلوسپورین بر میزان سقط جنین در موش‌های حامله CBA/J×BDA/2 گروه آزمون و مقایسه آن با گروه کنترل

ترکیب جفت گیری	دوز سیکلوسپورین mg/kg	تعداد موش	تعداد لانه گزینی	تعداد جنین سقط شده	درصد سقط
CBA/J×DBA/2	حامل	۷	۶۲	۲۵	۴۰
CBA/J×DBA/2	۱	۷	۶۱	۷	۱۱/۴



شکل ۱. تاثیر سیکلوسپورین بر درصد سقط جنین در جفت گیری موش‌های CBA/J×BDA/2 (مدل سقط) نسبت به گروه کنترل

نتایج، نشان داد که تجویز سیکلوسپورین سبب کاهش معنی‌دار ( $P=0/01$ ) درصد آنتی‌بادی نامتقارن در گروه آزمون ( $39/57 \pm 7/82$ ) نسبت به گروه کنترل ( $53/14 \pm 6/06$ ) شده است. (شکل ۲)



شکل ۲. تاثیر سیکلوسپورین بر میزان آنتی‌بادی نامتقارن در نمونه سرم موش‌های گروه آزمون نسبت به گروه کنترل

رقیق‌کننده اضافه گردید. پلیت‌ها پس از پوشانده شدن با چسب به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شدند. پس از شستشو آنتی‌بادی Detection آنتی‌بادی ضد IgG موشی کونزوگه با Horse radish peroxidase ساخت شرکت رازی بیوتک (ایران-تهران) با رقت ۱/۲۰۰۰۰ تهیه گردید، ۱۰۰ میکرولیتر از این آنتی‌بادی به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده گردید. پلیت مورد نظر دو ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای TMB به تمام حفره‌ها اضافه و به مدت نیم ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه و در تاریکی قرار گرفت. سپس به هر حفره ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش اضافه گردید و جذب نوری حفره‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از رسم منحنی استاندارد و تعیین غلظت آنتی‌بادی موجود در هر حفره، درصد IgG نامتقارن از فرمول ( $100 \times \text{مقدار کل IgG} / \text{مقدار IgG جذب نشده}$ ) -  $100 =$  درصد آنتی‌بادی نامتقارن) محاسبه گردید. لازم به ذکر است که تیتراژ مناسب آنتی‌بادی‌ها برای آزمون الیزا با انجام آزمایشات اولیه تیتراسیون تعیین گردید.

تعیین مقدار  $TGF-\beta 1$  بروش الیزا: از کیت شرکت R&D ساخت امریکا و کانادا به منظور اندازه‌گیری  $TGF-\beta 1$  در نمونه‌های سرم مطابق دستورالعمل کیت استفاده شد.

آنالیز آماری: نتایج به صورت میانگین حداقل هفت تکرار مجزا ارائه می‌شوند. در این مطالعه ابتدا یافته‌ها با آزمون Gaussian مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به این‌که از توزیع نرمال پیروی نمی‌کردند از آزمون Mann-Whitney جهت آنالیز آن‌ها استفاده گردید. مقادیر P-value کم‌تر از ۰/۰۵ مهم و معنی‌دار در نظر گرفته شد [۳۳].

## نتایج

همان‌گونه که در جدول یک نشان داده شده است، تجویز سیکلوسپورین به‌طور معنی‌داری میزان سقط را در گروه آزمون در مدل حیوانی سقط در مقایسه با گروه کنترل که به

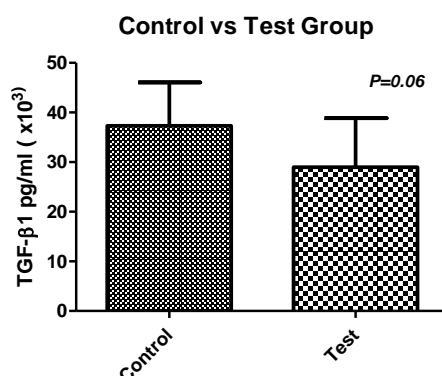
سرم زنان با حاملگی طبیعی قادر است واکنش MLR علیه لنفوسیت‌های همسرشان را متوقف کند، اما سرم زنان مبتلا به RSA دارای این قابلیت نیست، در صورتی که زنان مبتلا به RSA با لنفوسیت‌های همسر ایمنیزه شوند، سرم آن‌ها نیز مانند سرم زنان با حاملگی طبیعی از واکنش MLR علیه لنفوسیت‌های همسر ممانعت به عمل آورده و حاملگی موفق هم خواهند داشت [۳۴].

نقص در انتقال پاسخ ایمنی از Th1 به Th2 در حاملگی یکی از عوامل RSA در نظر گرفته شده است [۳۵، ۳۶]. در حاملگی طبیعی انتقال پاسخ ایمنی از Th1 به Th2 با افزایش تولید آنتی‌بادی‌های نامتقارن بر ضد آنتی‌ژن‌های پدري همراه است. این‌که چه عواملی بر روی تولید آنتی‌بادی‌های نامتقارن چه در حاملگی و چه در شرایطی غیر از حاملگی تاثیرگذار بوده تحقیقات متعددی را به خود اختصاص داده است، در مطالعات انجام شده، نشان داده شده است که جفت موش‌ها فاکتورهای محلولی را تولید می‌کند که سبب تغییرات در میزان و کیفیت این آنتی‌بادی‌ها می‌شود [۳۷]. به هر حال پاسخ Th2 را در افزایش نسبت آنتی‌بادی‌های نامتقارن موثر دانسته‌اند [۳۸].

IL-6 جفتی از عوامل دیگری می‌باشد که در افزایش آنتی‌بادی‌های نامتقارن دخیل می‌باشند. از آن‌جا که در موش‌های دارای نقص در این سیتوکین میزان این آنتی‌بادی به صفر نمی‌رسد، نشان می‌دهد که IL-6 تنها عامل دخیل در تولید این آنتی‌بادی‌ها نمی‌باشد [۳۹].

در این تحقیق سیکلوسپورین به صورت معنی‌داری موجب کاهش درصد سقط شده است، که با مطالعات قبلی نیز در این زمینه مطابق می‌باشد [۲۵]. اما تجویز سیکلوسپورین درصد آنتی‌بادی نامتقارن IgG را در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری کاهش داده است. این یافته نشان می‌دهد، علی‌رغم اهمیت این آنتی‌بادی‌ها در حاملگی موفق، به احتمال زیاد تاثیر سیکلوسپورین در کاهش معنی‌دار درصد سقط با استفاده از مکانیسم‌های دیگری اعمال گردیده است که مطالعه بیش‌تری را در این زمینه نیاز دارد. احتمالاً

در این مطالعه سیکلوسپورین تاثیر معنی‌داری بر میزان TGF- $\beta$ 1 در گروه آزمون ( $26/19 \pm 28/97$ ) نسبت به گروه کنترل ( $23/18 \pm 37/31$ ) نداشت ( $P=0/06$ ). (شکل ۳)



شکل ۳. تاثیر سیکلوسپورین بر میزان سایتوکاین TGF- $\beta$ 1 در نمونه سرم موش‌های حامله گروه آزمون نسبت به گروه کنترل

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما به بررسی اثر تجویز سیکلوسپورین بر میزان سقط جنین و هم‌چنین مقدار آنتی‌بادی نامتقارن و TGF- $\beta$ 1 سرمی در مدل موشی مستعد سقط پرداختیم. نتایج ما نشان داد که تجویز سیکلوسپورین توانسته میزان سقط را به صورت معنی‌داری کاهش دهد. در حالی‌که تجویز سیکلوسپورین باعث کاهش معنی‌دار درصد آنتی‌بادی نامتقارن در سرم موش‌های حامله شده بود، میزان TGF- $\beta$ 1 سرم موش‌های گروه آزمون نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشت.

در حاملگی طبیعی میزان آنتی‌بادی نامتقارن علیه آنتی‌ژن‌های پدري افزایش می‌یابد. افزایش آنتی‌بادی‌های نامتقارن در سرنوشت حاملگی مهم است و گزارش‌های زیادی مویید این واقعیت است که درصد این آنتی‌بادی در زنان مبتلا به RSA کم‌تر از زنانی است که حاملگی طبیعی دارند. دلیل دیگر این‌که با ایمنوتراپی زنان دارای سابقه RSA با لنفوسیت‌های همسرشان، توانسته‌اند میزان این آنتی‌بادی را افزایش دهند [۱۴] که در جلوگیری از سقط نیز موثر بوده است [۳۴].

کنترل پاسخ‌های ایمنی ناخواسته در طی حاملگی، به‌نظر می‌رسد که تصحیح پاسخ ایمنی به نفع حاملگی موفق در این تحقیق احتمالاً با القا مکانیسمی غیر از افزایش TGF- $\beta$ 1 است. لذا پیشنهاد می‌گردد سایر مکانیسم‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی نظیر افزایش سلول‌های T تنظیمی و افزایش تولید آنزیم ایندولآمین ۲،۳ دی اکسیژناز متعاقب تجویز سیکلوسپورین در این مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پروژه رساله دوره دکتری دانشگاه تربیت مدرس بوده، لذا از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به‌خاطر حمایت مالی که در این تحقیق داشته‌اند کمال تشکر را داریم.

## منابع

- [1] Nagaeva O, Jonsson L, Mincheva-Nilsson L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48: 9-17.
- [2] Robertson SA, Guerin LR, Moldenhauer LM, Hayball JD. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *J Reprod Immunol* 2009; 83: 109-116.
- [3] 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. *Am J Pathol* 2005; 166: 811-822.
- [4] Acar N, Ustunel I, Demir R. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem* 2011; 113: 82-91.
- [5] Lash GE, Otun HA, Innes BA, Percival K, Searle RF, Robson SC, et al. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum Reprod* 2010; 25: 1137-1145.
- [6] Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38: 13-22.
- [7] Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 601-610.
- [8] McLean M, Smith R. Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction* 2001; 121: 493-501.
- [9] Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells

سیکلوسپورین، به‌طور غیر مستقیم و از طریق سرکوب سلول‌های T کمکی، در تولید این آنتی‌بادی‌ها تاثیر خود را اعمال نموده است. این‌که سیکلوسپورین تولید اتو آنتی‌بادی را کاهش می‌دهد، در چندین مطالعه تایید شده است [۴۰، ۴۱]. شاید در دوران حاملگی بتوان آنتی‌بادی‌های غیر متقارن را نوعی اتوآنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های پدري تلقی نموده، و با این فرض سیکلوسپورین آنتی‌بادی نامتقارن را با مکانیسمی مشابه اتوآنتی‌بادی‌ها کاهش داده است.

در بیماران پیوندی متعاقب مصرف سیکلوسپورین، میزان سیتوکین TGF- $\beta$ 1 افزایش می‌یابد [۴۲، ۴۳]. افزایش تولید این سیتوکین متعاقب مصرف سیکلوسپورین در gingival fibroblasts نیز مشاهده شده است [۴۴]. این سیتوکین ابتدا با سرکوب پاسخ ایمنی سبب حفظ بافت پیوندی شده، اما از طرف دیگر این سیتوکین به‌عنوان فاکتور رشد پیش فیبروتیک به تدریج با تحریک فیبروبلاست‌ها، تولید و رسوب ماتریکس خارج سلولی را باعث شده که در نهایت به دفع حاد، مزمن و نفروتوکسیستی در کلیه پیوندی، منجر می‌شود [۴۵، ۴۶].

Pregnancy specific protein-1 (PSG1) در انسان و موش القاکننده تولید TGF- $\beta$ 1 از ماکروفاژها بوده و تنظیم‌کننده تولید این سیتوکین دارای خاصیت ضد التهابی و محرک رگ‌زایی است می‌باشد. PSG1 حتی با فرم فعال TGF- $\beta$ 1 هم‌راه بوده و از این طریق در تنظیم پاسخ ایمنی بین مادر و جنین دارای اهمیت است [۴۷].

عدم افزایش در میزان TGF- $\beta$ 1 در این تحقیق می‌تواند بدو علت باشد: ۱- دوز مصرف شده سیکلوسپورین در این تحقیق بسیار پایین‌تر از مقدار مصرف این دارو در گیرندگان پیوند می‌باشد ۱ mg/kg [۲]. در این تحقیق تجویز تنها یک دوز از این دارو در روز ۵ حاملگی موش انجام شد، در حالی‌که مصرف این دارو در گیرندگان پیوند با مقادیر متناوب و منظم صورت می‌گیرد. با توجه به کاهش معنی‌دار میزان سقط در موش‌های حامله دریافت‌کننده سیکلوسپورین و عدم تغییر میزان TGF- $\beta$ 1 سرم این موش‌ها و تنوع مکانیزم‌های

- [26] de Visser KE, Kast WM. Effects of TGF-beta on the immune system: implications for cancer immunotherapy. *Leukemia* 1999; 13: 1188-1199.
- [27] Lyall F, Simpson H, Bulmer JN, Barber A, Robson SC. Transforming growth factor-beta expression in human placenta and placental bed in third trimester normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am J Pathol* 2001; 159: 1827-1838.
- [28] Bitzer M, Sterzel RB, Bottinger EP. Transforming growth factor-beta in renal disease. *Kidney Blood Press Res* 1998; 21: 1-12.
- [29] Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51: 1388-1396.
- [30] Wolf G, Thaiss F, Stahl RA. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells. Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects. *Transplantation* 1995; 60: 237-241.
- [31] Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 2009; 16: 329-343.
- [32] Bozorgmehr M, Zarnani AH, Nikoo S, Moazzeni SM. Suppressive effect of pregnant serum on murine dendritic cell function. *J Obstet Gynaecol Res* 2012; 38: 797-803.
- [33] Li W, Li B, Fan W, Geng L, Li X, Li L, et al. CTLA4Ig gene transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4+CD25+ regulatory T cells and inducing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Reprod Immunol* 2009; 80: 1-11.
- [34] Pandey MK, Saxena V, Agrawal S. Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) in human pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth* 2003; 3: 2.
- [35] Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999; 196: 122-130.
- [36] Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 13-23.
- [37] Miranda S, Borel IM, Freire SM, Binaghi R, Margni R. Influence of mouse placental factors on in vitro antibody synthesis. *J Reprod Immunol* 1996; 30: 151-171.
- [38] Gutierrez G, Gentile T, Miranda S, Margni RA. Asymmetric antibodies: a protective arm in pregnancy. *Chem Immunol Allergy* 2005; 89: 158-168.
- [39] Dubinsky V, Junovich G, Gentile T, Gutierrez G. IL-6 as a regulatory factor of the humoral response during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 197-203.
- [40] Boitard C, Feutren G, Castano L, Debray-Sachs M, Assan R, Hors J, et al. Effect of cyclosporin A treatment on the production of antibody in insulin-dependent (type I) diabetic patients. *J Clin Invest* 1987; 80: 1607-1612.
- [41] Pisetsky DS. Inhibition of in vitro NZB antibody responses by cyclosporine. *Clin Exp Immunol* 1988; 71: 155-158.
- [42] Shehata M, Cope GH, Johnson TS, Raftery AT, el Nahas AM. Cyclosporine enhances the expression of TGF-beta in the juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Kidney Int* 1995; 48: 1487-1496.
- [43] Waiser J, Dell K, Bohler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K, et al. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-beta1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1568-1577.
- during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol* 2004; 61: 67-77.
- [10] Paiva P, Menkhorst E, Salamonsen L, Dimitriadis E. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 319-328.
- [11] Holmes CH, Simpson KL, Okada H, Okada N, Wainwright SD, Purcell DF, et al. Complement regulatory proteins at the feto-maternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). *Eur J Immunol* 1992; 22: 1579-1585.
- [12] Petroff MG, Kharatyan E, Torry DS, Holets L. The immunomodulatory proteins B7-DC, B7-H2, and B7-H3 are differentially expressed across gestation in the human placenta. *Am J Pathol* 2005; 167: 465-473.
- [13] Hunt JS, Langat DL. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 462-469.
- [14] Zenclussen AC, Gentile T, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R. Asymmetric antibodies and pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45: 289-294.
- [15] Gentile T, Borel IM, Angelucci J, Miranda S, Margni RA. Preferential synthesis of asymmetric antibodies in rats immunized with paternal particulate antigens. Effect on pregnancy. *J Reprod Immunol* 1992; 22: 173-183.
- [16] Tangri S, Wegmann TG, Lin H, Raghupathy R. Maternal anti-placental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. *J Immunol* 1994; 152: 4903-4911.
- [17] Rocklin RE, Kitzmiller JL, Carpenter CB, Garovoy MR, David JR. Maternal-fetal relation. Absence of an immunologic blocking factor from the serum of women with chronic abortions. *N Engl J Med* 1976; 295: 1209-1213.
- [18] Redecha P, van Rooijen N, Torry D, Girardi G. Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. *Blood* 2009; 113: 4101-1409.
- [19] Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: a review. *J Transplant* 2012; 2012: 230386.
- [20] Tajima K, Amakawa R, Ito T, Miyaji M, Takebayashi M, Fukuhara S. Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology* 2003; 108: 321-328.
- [21] 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. *Biol Reprod* 2007; 76: 906-914.
- [22] Kerstan A, Armbruster N, Leverkus M, Hunig T. Cyclosporin A abolishes CD28-mediated resistance to CD95-induced apoptosis via superinduction of caspase-3. *J Immunol* 2006; 177: 7689-7697.
- [23] Wang H, Grzywacz B, Sukovich D, McCullar V, Cao Q, Lee AB, et al. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood* 2007; 110: 1530-1539.
- [24] Wicker LS, Boltz RC Jr, Matt V, Nichols EA, Peterson LB, Sigal NH. Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2277-2283.
- [25] Zhou WH, Dong L, Du MR, Zhu XY, Li DJ. Cyclosporin A improves murine pregnancy outcome in abortion-prone matings: involvement of CD80/86 and CD28/CTLA-4. *Reproduction* 2008; 135: 385-395.

[46] Robertson H, Wong WK, Burt AD, Mohamed MA, Talbot D, Kirby JA. Relationship between TGFbeta(1), intratubular CD103 positive T cells and acute renal allograft rejection. *Transplant Proc* 2001; 33: 1159.

[47] Ballesteros A, Mentink-Kane MM, Warren J, Kaplan GG, Dveksler GS. Induction and activation of latent TGF-beta1 is carried out by two distinct domains of Pregnancy-Specific Glycoprotein 1. *J Biol Chem* 2014.

[44] Chung Y, Fu E, Chin YT, Tu HP, Chiu HC, Shen EC, et al. Role of Shh and TGF in cyclosporine-enhanced expression of collagen and alpha-SMA by gingival fibroblast. *J Clin Periodontol* 2015; 42: 29-36.

[45] Sharma VK, Bologna RM, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49: 1297-1303.



# The effect of cyclosporine on asymmetric antibodies and serum transforming growth factor *beta*1 in abortion-prone model of mice *CBA/J* x *DBA/2*

Bizhan Sadighi-Moghaddam (M.Sc), Seyed Mohammad Moazzeni (Ph.D)\*

Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received:; Accepted:)

**Introduction:** One of the common causes of recurrent spontaneous abortion is interference of immunological factors. Administration of cyclosporine, as an immunosuppressive drug, has reportedly reduced the rate of abortion in abortion-prone model of mice *CBA/J* mated *DBA/2* male mice. On the other hand, asymmetric antibodies and TGF- $\beta$ 1 have been considered as an important factor in successful pregnancy outcomes. Intravaginal administration of TGF- $\beta$  has also been reported to reduce the resorption rate in the same mouse model. In this study, the immunomodulatory effects of cyclosporine on serum level of asymmetric antibodies (AABs) and T cell growth factor *beta* (TGF- $\beta$ 1) were investigated.

**Material and Methods:** Female *CBA/J* mice were mated with male *DBA/2*. The pregnant females were divided into two groups: 1- test group; received intraperitoneal injection of 1mg/kg cyclosporine (n=7), 2- control group; received intraperitoneal injection of Phosphate Buffered Saline (PBS) (n=7). Both groups received treatments on the 5<sup>th</sup> day of pregnancy. Serum samples were collected on the 13.5<sup>th</sup> day of pregnancy, when the percentage of abortion was also calculated.

**Results:** The percentage of AABs and abortion rate were significantly reduced in cyclosporine group ( $P < 0.05$ , for both variables), while the serum levels of TGF- $\beta$ 1 did not show significant difference between groups ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Our study showed that despite the significant reduction in percentage of AABs and no significant difference in serum level of TGF- $\beta$ 1, the abortion rate was markedly reduced in cyclosporine group. So other mechanisms of immunomodulation and reduction of abortion rate except asymmetric antibodies and TGF- $\beta$ 1 should be involved in this mouse model following cyclosporine administration.

**Key words:** Recurrent Spontaneous Abortion, Asymmetric Antibodies, Cyclosporine

\* Corresponding author. Tel: +98 2182883846  
moazzeni@modares.ac.ir