Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 19, No. 3, Jul-Aug 2011
Pages: 313-322

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۹ ، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۰
صفحه: ۳۲۲-۳۱۳

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

درصد و تعداد مطلق سلول‌های کشنده طبیعی خون محیطی در سقط جنین مکرر

اکرم شیخ[۱]، جواد بهار آرا[۲]، نزهت موسوی فر[۳]، رویا مزینی[۴]، مریم راستین[۵]، نفیسه طبسی[۶]، زهرا حسینی پور[۷]، نوشین لطفی[۸]، محمود محمودی[*۹]

۱،۴- کارشناس ارشد زیست تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد
۲- دکترای زیست تکوینی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد
۳- دکترای تخصصی زنان و نازایی، استادیار گروه زنان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۵- دکترای ایمونولوژی، محقق مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۶- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۷- دکترای تخصصی دندان پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۸- کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۹- دکترای تخصصی ایمونولوژی، استاد گروه ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۲

چکیده

مقدمه: به نظر می‌رسد سلول‌های موثر و مرتبط با سقط جنین مکرر شامل دو گروه لنفوسیت‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی(NK) باشند. ما در این مطالعه به بررسی درصد و تعداد مطلق سلول‌های کشنده طبیعی CD16+/56+ و سلول‌های CD16+/56+bright و CD16+/56+dim موجود در خون محیطی پرداخته، همچنین با بررسی مارکرهای CD69/CD56، درصد و تعداد مطلق سلول‌های کشنده طبیعی فعال شده در خون محیطی بیماران مبتلا به سقط جنین مکررو زنان با حاملگی طبیعی را مورد مقایسه قرار دادیم.

روش بررسی: بیماران مورد بررسی، ۲۴ خانم دارای سابقه سقط مکرر بودند که از نظر آزمایشات مربوط به کاریوتایپ، سندرم آنتی‌فسفولیپید، آنتی‌کاردیولیپین و پرولاکتین و سایر علل طبیعی بودند و از ۲۱ خانم در سه ماه اول حاملگی که سابقه سقط نداشتند به عنوان گروه شاهد استفاده شد. از خون محیطی این افراد لنفوسیت‌ها را جدا کرده که با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی نشاندار شده با ماده فلورسنت مجاور شد که آنتی‌بادی‌های استفاده شده در این تحقیق CD3/16+56 و CD56/CD69 بودند. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی در دستگاه فلوسایتومتری خوانده و سپس آنالیز شدند.

نتایج: نتایج نشان داد تعداد مطلق سلول‌های CD16+/CD56+ در گروه بیمار افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت(p=۰/۰۴). قدر مطلق سلول‌های CD16+/CD56+bright و نیز CD56+/CD69+ در گروه بیمار افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشتند(p=۰/۰۰)،(p=۰/۰۴).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش سلول‌های CD16+/56+ در خون محیطی ارتباط معنی‌داری با سقط جنین مکرر دارد. از طرفی افزایش معنی‌دار سلول‌های CD56+/69+ در افراد بیمار می‌تواند بیانگر دخالت سلول‌های کشنده طبیعی فعال شده در سقط جنین مکرر با اتیولوژی ناشناخته باشد.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر، سلول‌های NK، عوامل ایمونولوژیک سقط مکرر، فلوسیتومتری، CD56، CD16، CD69

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۷۱۱۲۶۱۴-۵۱۱ ، پست الکترونیکی: mahmoudim@mums.ac.ir

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

مقدمه

طبق تعریف، سقط مکرر به سه یا بیش از سه مورد ختم حاملگی خودبخودی قبل از هفته ۲۰ گفته می‌شود(۱). البته در این تعریف گروه وسیعی از بیماران یا طیف گسترده‌ای از علل سقط قرار می‌گیرند. چنانچه این بیماران را به عنوان یک گروه واحد در نظر بگیریم در کل از پیش‌آگهی خوبی برخوردار هستند بطوریکه زنده‌زایی به رقمی در حدود ۷۰-۶۰ درصد نزدیک می‌شود(۲). علل سقط مکرر خودبخودی مولتی فاکتوریال می‌باشد ولی می‌توان آنها را به دو دسته عمده جنینی(ناشی از کاریوتایپ‌های غیرطبیعی) یا مادری تقیسم کرد. در مورد علل مادری سقط راجعه می‌توان به اختلالات انعقادی، اختلالات غدد درون‌ریز و نقص‌های اندومتریال اشاره کرد. اخیراً به نقش عوامل ایمونولوژیک نیز در این خصوص اشاره شده است(۳،۴). در کل در حدود نیمی از موارد سقط مکرر، غیرقابل توجیه می‌باشند که نقش علل ایمونولوژیک در این بین بیش از سایر علل مطرح می‌باشد(۵).

جنین به عنوان یک پیوند آلوتایپ در بدن مادر جایگزین می‌شود و از این جهت که توسط سیستم ایمنی مادر به عنوان بیگانه شناسایی شود و برعلیه آن پاسخ‌های ایمنی صورت بگیرد مکانیسم‌های مختلفی شناسایی شده است از جمله عدم بیان مولکول‌های HLA کلاسیک، بیان مولکول‌هایی مانند اعضای خانواده B7 از قبیل B7-H3، B7-H2 و B7-H7 که از پاسخ سلول Th1 ممانعت می‌کنند و آنزیم 2,3 dioxygenase (IDO) Indolamine که یک آنزیم کاتابولیسمی تریپتوفان است که از تکثیر سلول‌های T توسط کاهش تریپتوفان یا تولید متابولیت‌های سمی ممانعت می‌کند که این آنزیم بر روی تروفوبلاست‌ها بیان می‌شود و در نهایت بیان Fas-L بر روی تروفوبلاست‌ها که باعث ایجاد اپوپتوز در سلول‌هایی می‌شود که مولکول Fas بر روی آنها بیان شده است(۶).

تئوری‌های ایمونولوژیک متعددی برای توجیه سقط مکرر در حیوانات و انسان مطرح شده است، یکی از آنها تغییر وضعیت و عملکرد لکوسیت‌ها در بافت دسیدوآی زنان مبتلا به سقط می‌باشد(۷،۸). پیشرفت‌های گسترده‌تر در زمینه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و تکنیک‌های بیولوژی مولکولی اطلاعات ما را درباره جمعیت‌های مختلف لکوسیتی موجود در دسیدوآی انسان گسترش داده است. لکوسیت‌ها جمعیت سلولی عمده‌ای از سلول‌های استرمای اندومتریوم رحم را تشکیل می‌دهند. نسبت این لکوسیت‌ها در طی مراحل دوره قاعدگی افزایش می‌یابد به طوری که در سه ماهه اول بارداری به ۴۰-۳۰ درصد می‌رسد. در ترکیب لکوسیتی دسیدوآ در سه ماهه اول بارداری، سه گروه اصلی شامل ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T و یک جمعیت غیرمعمول به نام لنفوسیت‌های گرانوله اندومتریوم(eGL) حضور دارند. لنفوسیت‌های B و سلول‌های کشنده طبیعی(NK: Natural Killer) با مارکرهای CD56 و CD16 نیز در استرومای اندومتریوم مشاهده می‌شود(۹،۱۰).

سلول‌های NK حدود ۱۵-۱۰درصد از لنفوسیت‌های خون محیطی را شامل می‌شوند که در طول حاملگی طبیعی توسط سیستم هورمونی تعدیل می‌شوند. به طوری که در طول حاملگی طبیعی انسان، سلول‌های NK در خون محیطی از نظر تعداد کاهش می‌یابند که به طور اصلی کاهش در زیر واحدهای CD16+ می‌باشد(۱۱،۱۲). همچنین فعالیت لیتیک این سلول‌ها نیز کاهش پیدا می‌کند به علاوه افزایش در بیان رسپتورهای مهار کننده موجود بر سطح سلول‌های NK از قبیل CD94 و NKG2A نیز در هفته‌های اول حاملگی دیده می‌شود که در سومین ماه حاملگی به حداکثر خود می‌رسد(۱۳). این تغییرات در تعداد، فنوتیپ و فعالیت سلول‌های NK در طول حاملگی می‌تواند بیانگر تنظیم هورمونی این سلول‌ها باشد که هورمون‌های احتمالی در این تنظیم شامل استروژن، پروژسترون و پرولاکتین می‌باشند(۱۴).

افزایش تعداد سلول‌های NK می‌تواند باعث اثر سایتوتوکسیک این سلول‌ها بر روی تروفوبلاست‌ها باشد به طوری که در موارد سقط جنین مکرر با اتیولوژی ناشناخته تعداد سلول‌های NK افزایش معنی‌داری داشته است و امروزه اکثر تحقیقات که سعی در درک پاتوفیزیولوژی سقط مکرر با عامل ناشناخته داشته‌اند بر روی سلول‌های NK متمرکز شده‌اند که البته شواهدی را نیز در نقش این سلول‌ها در پاتوژنز

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

سقط مکرر به دست آورده‌اند(۱۵). هدف از مطالعه حاضر بررسی سلول‌های NK در خون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی در مقایسه با زنان دارای حاملگی طبیعی در سه ماهه اول بارداری می‌باشد.

روش بررسی

۱- جمعیت مورد مطالعه: مطالعه به صورت مورد-شاهد از تابستان ۱۳۸۷ تا بهار ۱۳۸۸ بر روی دو گروه مراجعه کننده به بخش زنان و زایمان بیمارستان امام رضا(ع) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات ناباروری منتصریه و مرکز درمانی ام‌البنین مشهد انجام گرفت. گروه مورد ۲۴ بیمار با سابقه سقط مکرر با علل ناشناخته بودند. این بیماران تا زمان انجام تست مورد نظر دارو دریافت نکرده و وضعیت این بیماران از نظر کاریوتایپ، آنتی‌فسفولیپیدآنتی‌بادی‌ها، آنتی‌کاردیولیپین آنتی‌بادی‌ها، ANA، هورمون‌های تیروئیدی و پرولاکتین طبیعی بود. همچنین این بیماران مبتلا به بیماری تخمدان پلی کیستیک(PCOS) نبوده و اسپرموگرام همسران آنها نیز طبیعی و سن آنها بین ۳۶-۲۰ سال بود. گروه شاهد نیز شامل ۲۱ زن حامله بدون سابقه سقط و حداقل دارای یک فرزند بود که از نظر سنی با گروه مورد یکسان بودند. از افراد مورد مطالعه ۵ سی سی خون گرفته شد و در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردید.

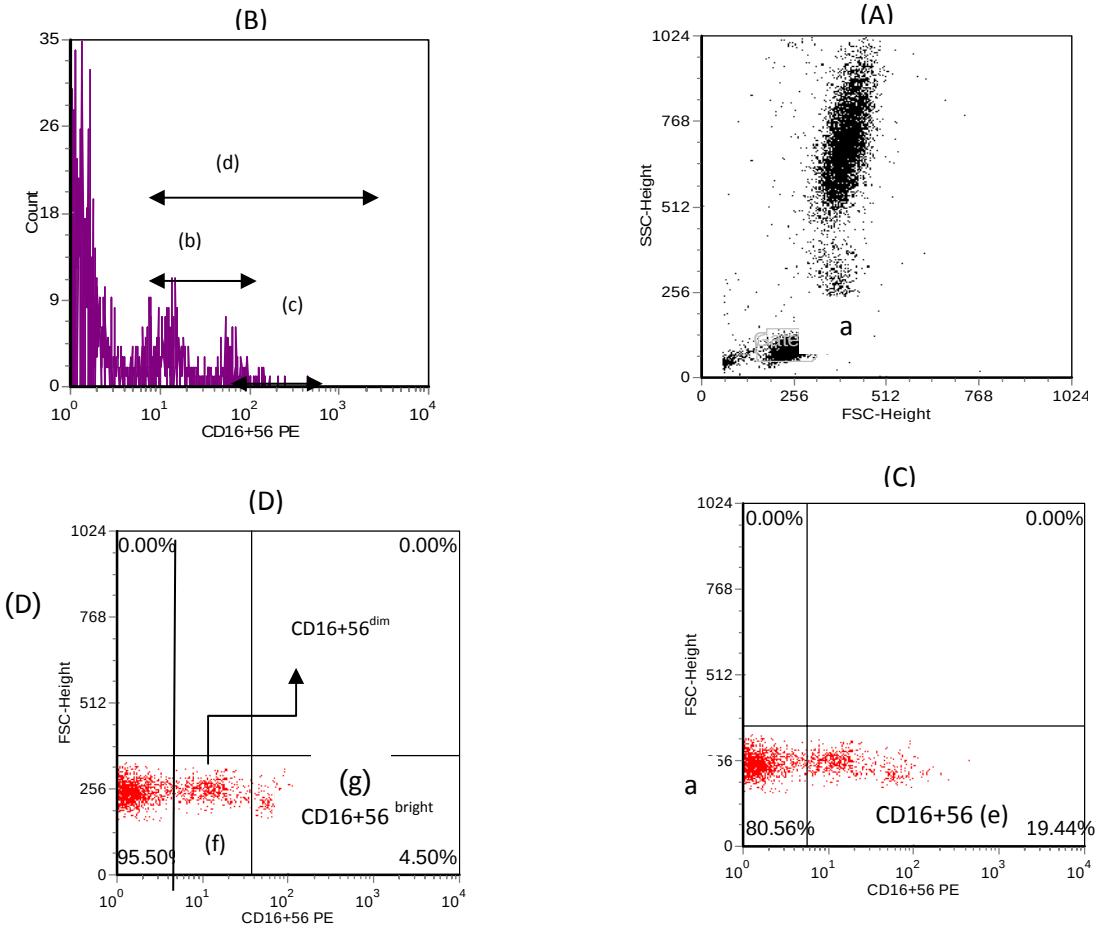
۲-جداسازی لنفوسیت‌ها: به منظور جداسازی لنفوسیت‌های خون محیطی از محلول فایکول(Ficol hypac, BioSera, UK) استفاده شده به این صورت که به نسبت ۱ به ۲ به ترتیب فایکول و خون در لوله آزمایش به این صورت که خون در بالای فایکول قرار گرفته و با آن مخلوط نشود، ریخته شد. سپس در دور 1222 xg در دمای اتاق سانتریفوژ گردید و ابرلنفوسیتی بر اساس گرادیان دانسیته جدا شده، توسط نوک سمپلر به لوله آزمایش دیگر منتقل و با نسبت مساوی با محلول (Phosphate Buffer Salin)PBS شستشو داده شد تا کلیه مواد و پروتئین‌های اضافی از محیط خارج شوند. جهت شستشو، لنفوسیت‌های جدا شده، با PBS مخلوط و در دور 202 xg در دمای اتاق سانتریفوژ شده، محلول رویی خارج و رسوب مجدداً با PBS سرد رقیق می‌شود و بقیه مراحل نیز بر روی یخ انجام می‌شود.

۳- بررسی فلوسایتومتری: لنفوسیت‌های جدا شده با آنتی‌بادیهای مونوکلونال anti- CD16 FITC، anti-CD3(CYQ)، anti-CD69 FITC و anti- CD56 Phyco erythrin(PE) رنگ آمیزی شدند. لازم به ذکر است که این آنتی‌بادی‌ها همه از شرکتIQ Product, The Netherland تهیه شدند. ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های استفاده شده به این ترتیب می‌باشد: IgG1 ⟶ IgG1،CD56 ⟶ CD16 ، IgG2a ⟶ CD69 ، IgG1 ⟶ CD3. به این صورت که لنفوسیت‌ها با مارکرهای فوق به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه و پس از۲ بار شستشو با ۲cc بافر PBS نمونه آماده خواندن توسط دستگاه فلوسایتومتری(FACS Calibure, Becton Dickinson, USA) می‌باشد. نمونه‌ها پس از خوانده شدن براساس جمعیت سلولی انتخاب شده توسط نرم‌افزار cell Quest در دستگاه (Becton Dickinson, USA) آنالیز می‌شوند. به این صورت که ابتدا بر اساس اندازه و گرانولیتی سلول‌ها مجموعه لنفوسیت‌ها انتخاب شده و سپس نمودار هیستوگرام مربوط به آنتی بادی CD16+56 ترسیم شد. جمعیت سلول‌های CD16+/CD56+ به دو جمعیت CD16+/CD56+dim و CD16+/CD56+ bright تفکیک شدند. (شکل۱).

در پلات نقطه‌ای مربوط به سلول‌های CD69+ و CD56+ (شکل ۲) جمعیت سلول‌هایی که از نظر هر دو مارکر CD69 و CD56 مثبت می‌باشند مشخص شد، این سلول‌ها، سلول‌های NK فعال بوده و در این نمودار جمعیت سلول‌های CD56+ و CD69+ را نیز تفکیک کردیم.

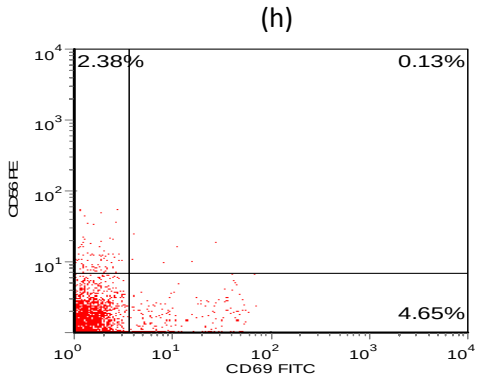
۴- آنالیز آماری: اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزار(SPSS(16.0 آنالیز شده، میانگین داده‌ها مشخص شد و جهت مقایسه میانگین داده‌ها در دو گروه ابتدا با استفاده از آزمون f تفاوت واریانس‌های دو گروه را بررسی کرده سپس از آزمون t در دو حالت برابری یا نابرابری واریانس‌ها جهت بررسی تفاوت میانگین دو گروه مورد و شاهد استفاده شد.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019



شکل ۱: A) نمونه‌ها در دستگاه Becton Dickinson مدل FACS calibure توسط نرم افزار Cell Quest آنالیز می‌شوند. در پلات نقطه‌ای Forward Scatter وSide Scatter جمعیت سلولی مورد نظر ما یعنی لنفوسیت‌ها مشخص و انتخاب می شوند(a). B) در این تصویرکه یک نمودار هیستوگرام می باشد سلول‌های CD16+56 و زیر مجموعه‌های آن که از جمعیت لنفوسیتی انتخاب می‌شوند در ۳ ناحیه نمودار قابل تشخیص می‌باشند. ناحیه b معرف سلول‌هایCD16+56 dim می‌باشد. ناحیه c سلول‌های CD16+56bright را مشخص می‌کند و ناحیه d معرف کل سلول‌های CD16+56 می باشد. C این نمودار یک پلات نقطه‌ای می‌باشد که محور x نماینده CD16+56- PE و محور y، Forward Scatter می‌باشد. سلول‌هایی که در ناحیه(e) قرار گرفته‌اند معرف سلول‌های CD16+56+ می‌باشند.

D) سلول‌های CD16+56 و یا ناحیه (e) از دو زیر مجموعه تشکیل شده‌اند. ناحیه (f) جمعیت سلول‌های CD16+56dim که حدود ۸۰٪ سلول‌های CD16+56 را تشکیل داده است و ناحیه (g) که سلول‌های CD16+56bright می باشند که ۲۰٪ مابقی سلول‌های CD16+56 را تشکیل داده‌اند.



(شکل ۲): این تصویر مربوط به پلات نقطه‌ای می باشد که محور x نماینده CD69-FITC و محور y نماینده CD56-PE می‌باشد . ناحیه (h) که از نظر هر دو مارکر CD56 و CD69 مثبت می‌باشد در صد سلول‌های NK ی فعال شده را مشخص می‌کند.

FITC=fluorescin isothiocyanate CYQ= Tandem conjugate of Cy5.18 and R-PE PE= R-phycoerythrin

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

نتایج

طیف‌های سنی در دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد(p=۰/۰۶). تعداد حاملگی‌ها در دو گروه و تعداد سقط در گروه مورد در جدول ۱ مشخص شده است. میانگین تعداد سلول‌های CD16+/CD56+ در گروه مورد(افراد با سابقه سقط مکرر) و شاهد(افراد با حاملگی طبیعی) به ترتیب ۳۲۴.۰۸ و ۲۳۸.۹۰ می باشد بر اساس آزمون f و با توجه به اینکه واریانس دو نمونه برابر بود از آزمون t با فرض برابری دو واریانس استفاده شد و نتایج نشان داد که میانگین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشتند(p=۰/۰۴). در حالی که در صد سلول‌های CD16+56+ در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد بود اما تفاوت معنی‌داری نشان نداد(p=۰/۵۲). با توجه به نتیجه آزمون t و مقدار احتمال محاسبه شده میانگین تعداد مطلق سلول‌های CD16+/CD56+brigth در گروه مورد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت(p=۰/۰۰). درصد این سلول‌ها نیز در گروه مورد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد(p=۰/۰۰۱). با توجه به مقدار احتمال محاسبه شده، متوسط و درصد تعداد مطلق سلول‌های CD16+/CD56+dim در دو گروه شاهد و مورد تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین با توجه به مقدار احتمال محاسبه شده متوسط تعداد مطلق سلول‌های CD69+/CD56+ در گروه مورد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد(p=۰/۰۱). درصد این سلول‌ها نیز در گروه مورد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد(p=۰/۰۶). متوسط تعداد قدر مطلق(p=۰/۰۲) و درصد سلول‌های CD69+(p=۰/۰۳) نیز در گروه مورد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت(جداول ۲ و ۳).

جدول ۱: تغییرات سن، تعداد حاملگی و تعداد سقط در دو گروه مورد و شاهد

	سن (سال)	تعداد حاملگی	تعداد سقط
بیمار	۰/۸۸۷±۲۸/۷۹	۰/۲۳۳±۳	۰/۲۲۸±۲/۸۸
شاهد	۱/۲۰۴±۲۵/۹۵	۰/۱۹±۲/۴۸	0±0
P-value	۰/۰۶	۰/۰۸۱	۰/۰۰۰

-در هر جدول Mean±SEM نشان داده شده است.

-آزمون انجام شده برای تعداد حاملگی و تعداد سقط آزمون ناپارامتری من-ویتنی می‌باشد.

-آزمون انجام شده برای سن آزمون t می باشد.

جدول ۲: تغییرات تعداد مطلق سلولهای مورد مطالعه در دو گروه مورد و شاهد

	تعداد لنفوسیت‌ها cell/µl	تعداد سلول‌های CD16+/CD56+ در میکرولیتر	تعداد سلول‌های CD16+/CD56+bright در میکرولیتر	تعداد سلول‌های CD16+/CD56+dim در میکرو لیتر	تعداد سلول‌های CD69+ در میکرولیتر	تعداد سلول‌های CD56+/CD69+ در میکرولیتر
بیمار	۱۲۹/۹۰۹ ±۲۳۰۷/۷۵	۳۲۴/۰۸ ±۳۴/۹۲	۴۶/۹۸۵±۵/۸۵	۲۷۹/۸±۳۱/۰۹۴	۴۵/۸۷۲±۷/۱۴۱	۱۸/۹۷۱± ۳/۲۵
شاهد	۱۵۹/۲۰۸± ۱۶۹۸/۵۷	۲۲۷/۵۲±۳۹/۲۸	۱۷/۳۵۹±۳/۳۷	۳۶/۶۲±۲۲۰/۱۶	۵/۸±۲۱/۵۹۶	۳/۰۳±۹/۵۸۷
Pvalue	۰/۰۰۹	۰/۰۴۳	۰/۰۰۰	۰/۲۲	۰/۰۲	۰/۰۱۴

-در هر جدول Mean±SEM نشان داده شده است.

-آزمون انجام شده در جدول۲ آزمون ناپارامتری من-ویتنی می باشد

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

جدول۳: تغییرات درصد سلول‌های مورد مطالعه در دو گروه مورد و شاهد

گروه	درصد سلول‌های CD16+/CD56+	درصد سلول‌های CD16+/CD56+bright	درصد سلول‌های CD16+/CD56+ dim	درصدسلول‌های CD69+	درصد سلول‌های CD56+/CD69+
بیمار	۱۳/۹±۱/۱۹۶	۲/۰۲±۰/۲۲۴	۱۲/۰۰۸± ۱/۰۸	۱/۹۶±۰/۳۰۲	۰/۷۷۱±۰/۰۹۵
شاهد	۱۲/۳۶±۱ /۴۵	۰/۹۸±/۱۶۹	۱۱/ ۳۸۵±۱/۳۳۶	۱/۱±۰/۲۷۵	۰/ ۵۱۹±۰/۱۳۲
Pvalue	۰/۴۱	۰/۰۰	۰/۷۱	۰/۰۲۸	۰/۰۶۵

-در هر جدول SEM±Mean نشان داده شده است.

-آزمون انجام شده در جدول ۳ آزمون ناپارامتری من-ویتنی می باشد.

بحث

نقش سلول‌های NK در حاملگی نرمال و غیرنرمال در انسان بررسی شده است. سلول‌های NK بیشترین میزان جمعیت لنفوسیت‌ها در دسیدوآی انسان را تشکیل می‌دهند و نقش‌های فیزیولوژیکی مهمی در طول پروسه لانه گزینی(Implantation) نرمال دارند. اگرچه در زنانی با سقط‌های مکرر میزان بالای سلول‌های NK خون محیطی گزارش شده است(۱۴). این باعث ایجاد اثر سایتوتوکسیسیتی سلول‌های NK بر روی تروفوبلاست‌ها می‌شود. سلول‌های تروفوبلاست با عدم بیان مولکول‌های HLA کلاسیک(کلاس I و II) و با بیان HLA- G به علت اینکه توسط لنفوسیت‌های T شناخته نشوند، مستعد لیز توسط سلول‌های NK می‌شوند(۱۶).

بررسی وضعیت و عملکرد سلول‌های صلاحیت‌دار ایمنی در خون محیطی زنان دارای سقط مکرر و مقایسه آن با افراد طبیعی بارور به ما کمک می‌کند تا فاکتورهای ایمونولوژیک تعیین کننده در ادامه یا خاتمه بارداری را دریابیم. در این مطالعه با تکنیک فلوسایتومتری درصد و تعداد سلول‌های CD16+/CD56+ خون محیطی و سلول‌های CD69+ و همچنین سلول‌های CD56+/CD69+ بین دو گروه حاملگی طبیعی و سقط مکرر خودبخودی مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند. تعداد سلول‌های CD16+/CD56+bright در موارد سقط مکرر خودبخودی به طور معنی‌داری بالاتر از تعداد آنها در حاملگی‌های طبیعی است که البته در گزارشات قبل نیز این نتیجه به دست آمده است(۱۴). با توجه به اینکه بر اساس مطالعات قبل(۱۵) قسمت اعظم سلول‌های NK رحمی مشتق شده از سلول‌های CD16+/56+brigth می باشند بنابراین افزایش سلول‌های CD16+/56+brigth با افزایش سلول‌های NK رحمی همراه می‌باشد و اگر چه سلول‌های uNK از نظر فنوتیپی و عملکردی با سلول‌های NK خون محیطی متفاوت می‌باشند(۱۶) اما به این علت که سلول‌های NK محیطی نیز در نزدیکی تروفوبلاست‌ها در حال گردش می‌باشند و از آنجایی که این سلول‌ها دارای بیان بسیار کمتر و یا حتی عدم بیان گیرنده‌های مهار کننده نسبت به سلول‌های NK رحمی می‌باشند، افزایش در تعداد این سلول‌ها باعث افزایش سایتوتوکسیسیتی بر روی تروفوبلاست‌ها می‌شود. در سقط مکرر خودبخودی افزایش در تعداد سلول‌های NK خون محیطی ممکن است با افزایش تعداد سلول‌های CD16+/CD56+dim در اندومتریال ارتباط داشته باشد که افزایش سلول‌های CD16+CD56+dim سایتوتوکسیتی بیشتری بر روی تروفوبلاست‌ها دارد(۱۴). در مطالعه حاضر تعداد مطلق سلول‌های CD16+/CD56+ در زنان با سابقه سقط مکرر نسبت به گروه کنترل بالاتر می‌باشد. تعداد سلول‌های NK با توجه به اختلافات تغییرپذیر مانند دلیل به کار گرفته شدن آنها و زمان حاملگی(۱۷،۱۸) می‌تواند نوسان داشته باشد که البته افزایش تعداد سلول‌های NK در دوره حاملگی و یا اوایل حاملگی در زنان با سابقه سقط مکرر یک اخطار نگران کننده به حساب می‌آید(۱۹،۲۰). اگر چه در مطالعه(۲۱) که

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

توسط Hill و همکارانش انجام شد مشخص شد که تعداد سلول‌های NK با سطح سایتوتوکسیسیتی آنها ارتباط نداشته است. به هر حال مجموع مطالعات نیاز به تایید و اثبات دارند، به علاوه تغییرات فنوتیپی در سلول‌های NK زنان دارای سقط مکرر ممکن است در افزایش فعالیت آنها نقش داشته باشد(۲۲)، مکانیسم این تغییرات که در افراد با سابقه سقط مکرر خودبخودی اتفاق می‌افتد هنوز ناشناخته است.

CD69 یک گلیکوپروتئین داخل غشایی است که روی بیشتر سلول‌های فعال شده خون‌ساز بیان می‌شود(۲۳). ژن CD69 انسانی روی بازوی کوچک کروموزوم ۱۲ به همراه کمپلکس ژنی NK قرار گرفته است(۲۴). نقش CD69 شروع فعالیت سلولی است که در ۵٪ از سلول‌های NK در حال استراحت نیز ردیابی می‌شود و همچنین بر روی سلولهای NK تحریک شده توسط IL-2، IFN-α و anti CD16 یافت می‌شود(۲۵). این پروتئین باعث تنظیم عملکرد سلول‌های NK مانند تکثیر و تولید TNFα می‌شود(۲۶).

در حاملگی طبیعی سلول‌های NK محیطی از نظر تعداد و فعالیت کاهش پیدا می‌کنند این تغییرات محیطی و موضعی می‌تواند نتیجه عمل پروژسترون بر روی سلول‌های NK محیطی و رحمی باشد(۲۷). طبق نتایج به دست آمده در مطالعه ۱۴ افزایش بیان CD69 با افزایش فعالیت و سایتوتوکسیتی سلول‌های NK مرتبط می‌باشد.

در این مطالعه سلول‌های CD56+ که مارکر CD69 بر روی آنها بیان شده است با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری بررسی شدند که در بیماران با سابقه سقط مکرر درصد و تعداد مطلق سلولهای CD56+/CD69+ به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. که این نتیجه در مطالعات قبل نیز به دست آمده است(۱۴). همچنین گزارشاتی در مورد افزایش تعداد سلول‌های NK CD56+/CD69+ در جفت زنان با سابقه سقط مکرر در مقایسه با حاملگی‌های نرمال نیز وجود دارد(۲۸).

از چندین مطالعه‌ای که سعی در اثبات افزایش فعالیت سلول‌های NK یا بالا بودن تعداد سلول‌های NK به عنوان عاملی برای ایجاد سقط مکرر داشته‌اند در اکثر آنها بررسی سلول‌های NK بر روی بیمارانی با عامل‌های متعدد سقط صورت گرفته است در حالی که در این مطالعه عوامل متعدد سقط از جمله عوامل ژنتیکی، هورمونی از جمعیت مورد بررسی خارج شده‌اند. Aoki و همکارانش(۲۰) افزایش معنی‌دار فعالیت سلول‌های NK را در ۶۸ زن با سابقه سقط مکرر ناشناخته در مقایسه با ۴۷ کنترل به دست آوردند. در بین زنان با سابقه سقط مکرر افزایش فعالیت سلول‌های NK باعث ریسک ۳/۵ برابری حاملگی بعدی می‌شود. همچنین در یک بررسی متوجه افزایش در سیتوتوکسیسیتی سلول‌های NK که پیک آن در هفته ۸ حاملگی بود و همچنین افزایش درصد سلول‌های CD16+/CD56+ در زنان با سقط مکرر خودبخودی شدند(۲۹)، که در مطالعه حاضر نیز درصد سلول‌های CD16+/CD56+ در زنان با سابقه سقط مکرر نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. در یک مطالعه که توسط Souza و همکارانش انجام شد(۳۰) کاهش فعالیت سلولهای NK خون محیطی را در زنان با سابقه سقط مکرر ناشناخته در مقایسه با گروه کنترل گزارش کردند، که اختلافات مشاهده شده می‌تواند ناشی از تفاوت در نحوه استفاده از سلول‌های PBMC باشد که یا به صورت تازه مورد بررسی قرار می‌گیرند(در مطالعه حاضر) و یا در بعضی از مطالعات به صورت(Cryopreserved) (سلولهای نگهداری شده در حالت انجماد) بررسی می‌شوند(۲۹).

به طور خلاصه برخی از سقط‌های مکرر با دلیل ناشناخته می‌تواند ناشی از افزایش سلول‌های NK در خون محیطی باشد. ممکن است این سلول‌ها توسط سیتوکاین‌های موضعی فعال شده و به سلول‌های تروفوبلاست جفت حمله کنند، در نتیجه در فرآیند سقط نقش اساسی داشته باشند. البته هنوز به جزئیات بیشتری در مورد نحوه عملکرد سلول‌های NK در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی در سه ماهه اول بارداری نیاز داریم تا مکانیسم‌های مداخله‌گر در فرآیند حفظ بارداری و شکست آن روشن شود و در نهایت روش‌های موثری برای درمان در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی

دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای تامین بودجه این تحقیق قدردانی نموده همچنین از پرسنل محترم مرکز تحقیقات ناباروری منتصریه و پرسنل محترم درمانگاه ام‌البنین به خصوص سرکار خانم اقدس پیله وری جهت همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها و همکاران محترم بخش زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد تشکر نمایند.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

منابع:

1- Orgad S, Hoewenthal R, Gazit E, Sadetzki S, Novikov I, Carp H. ***The prognostic value of anti-paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live birth in couples with consecutive recurrent miss carriages.*** Hum Reprod 1999; 14(12): 2974-79.

2- Clifford K, Rai R, Regan L. ***Future pregnancy outcomes in unexplained recurrent first trimester miscarriage.*** Hum Reprod 1997; 12(5): 387-89.

3- Aplin J. ***Maternal influences on placental development.*** Semin Cell Biol 2000; 11(3): 115-25.

4- Li TC, MaKris M, Tomsu M, Tuclcerman EM, Laird M. ***Recurrent miscarriage, etiology, management and prognosis.*** Hum Reprod Update 2002; 8(1): 463-81.

5- Laird SM, TucKerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AIF, Lit C. ***A review of immune cell and molecular in women with recurrent miscarriage.*** Hum Reprod Update 2003; 9(1): 163-74.

6- Gendron RL, Baines MG. ***infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice.*** Cell Immunol 1988; 113(4):261-67.

7- Arck PC, Hildebrandt HM, Klapp BF, HerTwig K. ***Pregnancy as a model of controlled invasion might be attributed to the ratio of CD3/CD8 to CD56.*** Am J Reprod Immunol 2000; 44(1): 1-8.

8- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Riston A, Pace D. ***Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies.*** Hum Reprod 1991; 6(6): 791-8.

9- Klentzeris LD, Bulmer JN, Warren A, Morrison L, Li TC, Cooke ID. ***Endometrial lymphoid tissue in the timed endometrial biopsy: morphometric and immunohistochemical aspects.*** Am J Obs Gyn 1992; 167(11): 667-74.

10- Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. ***Comparative studies of human FCRIII-positive and negative natural killer cells.*** J Immunol 1989; 43(9): 3183-9.

11- Roitt I, Brostoff J, Male D. ***Immunology***. 4 th ed. London: Mosby; 1996.p.18-22.

12- Ferry BL, Starkey PM, Sargent IL. ***Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes***. Immunol 1990; 70(12): 446-52.

13- Chrysoula D, Linda C. ***Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives.*** Endocrine Reviews 2005; 26(1): 44-62.

14- Ryan KJ, Berkowitz RS, Barbieri RL. ***Kistners Gynecology & Women Health.*** 7 th ed. London: Mosby. 1999.p. 396-416.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019

15- Beer AE, Kwak-Kim J. ***Immunology of normal pregnancy.*** Immunol Allerg Clin North Am 1998; 18(14): 249-70.

16- -Koop man LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. ***Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential***. J Exp Med 2003; 198: 1201-12.

17- Gilman-Sachs A, DuChateau BK, Aslakson CJ, Wohlgemuth GP, Kwak JY, Beer AE, et al. ***Natural killer (NK) cell subsets and NK cell cytotoxicity in women with histories of recurrent spontaneous abortions.*** Am J Reprod Immunol 1999; 41(9):99-105.

18- Nielsen HB, Secher NH, Christensen NJ, Pedersen BK. ***Lymphocytes and NK cell activity during repeated bouts of maximal exercise.*** Am J Physiol 1996; 271: R222–27.

19- Terao K, Suzuki J, Ohkura S. ***Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer(NK) cells in macaque monkeys, implication of plasma cortisol levels.*** Primates 2002; 43(10):329-38.

20- Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. ***Preconceptional natural-killer-cell activity as apredictor of miscarriage.*** Lancet 1995; 345(6):1340-42.

21- Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. ***T-helper 1-type immunity to trophoblast inwomenwith recurrent spontaneous abortion.*** JAMA 1995; 273(14):1933-36.

22- Ntrivalas EI, Kwak-KimJY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, NgSC, Beaman KD, et al. ***Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology.*** Hum Reprod 2001; 16(5):855-61.

23- Testi R, Ambrosio D, Maria RD, Santoni A. ***The CD69 receptor : a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells.*** Immunol 1994; 15(10); 479-83.

24- Lopez C, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez- Mateos P. ***Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors.*** J Exp Med 1993; 178(7): 537-74.

25- Borrego F, Pena J, Solana R. ***Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosin e kinase.*** Ear J Immunol 1993; 23(6):1039-43.

26- Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. ***Cd69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor.*** Immunology1999; 97(1):159-65.

27- Kodama T, Hara T, Okamoto E, Kusunoki Y, Ohama K. ***Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy.*** Hum Reprod 1998; 13(15):1036-43.

28- Vassiliadou N, Bulmer JN. ***Immunohistochemical evidence for increased numbers of classic CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss***. Hum Reprod 1996; 11(7): 101-6.

29- Saito S. ***Cytokine network at the feto-maternal interface***. J Reprod Immunol 2000; 47: 87-103.

30- Souza SS, Ferriani RA, Santos CM, Voltarelli JC. ***Immunological evaluation of patients with recurrent abortion.*** J Reprod Immunol 2002; 56(3): 111-21.

Percentage and Absolute Count of Peripheral Blood Natural Killer Cells in Cases of Recurrent Spontaneous Abortion

Sheikh A(MSc)[1], Bahar Ara J(PhD)[2], Mousavifar N(MD)[3], Mozayani R(MSc)[4], Rastin M(PhD)[5], Tabasi N(MSc)[6], Hosseini pour Z(DDS)[7], Lotfi N(MSc)[8], Mahmoudi M(PhD)*[9]

[1,2,4]*Developmental Biology, Azad University of Mashhad, Biology Section, Mashhad, Iran*
[3]*Department of Gynecology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
[5,8,9]*Department of Immunology, Bu-Ali Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
[6]*Department of Animal physiology, Bu-Ali research center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
[7]*Department of Dentist, Bu-Ali research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

Received: 18 May 2010 ***Accepted:*** 23 Dec 2010

Abstract

Introduction: Immunological processes are most important in recurrent spontaneous abortion(RSA). According to studies T lymphocytes and natural killer cells(NK cells) are two effective cell groups in RSA. The aim of this study was to investigate the percentage and absolute number of natural killer(NK) cells in women with RSA with unknown etiology.

Methods: 24 Women with a history of recurrent pregnancy losses with unknown etiology. We compared the percentage of peripheral blood NK cells with a group of fertile patients. Lymphocytes from peripheral blood were isolated by ficoll paque density centrifugation. Lymphocytes were stained using anti CD56 and(FITC)-anti CD16 and CYQ-CD3 monoclonal antibodies for identification of NK cells and was used anti CD56 and(FITC)-anti CD69 for detection of activated NK cells. We used BD FACS calibure flow cytometry for data analysis.

Results: On the basis of the obtained results, absolute number of CD16+56+ cells showed significant increases in Recurrent spontaneous abortion(RSA) in comparison with control group(P= 0.43). Also absolute number of CD16+56bright cells had significant increase in RSA(P=0.00). There was no significant difference(P= 0.08) of CD16+56dim cells between RSA and control group. In RSA, the absolute number of CD69+cells significantly increased(P=0.02). Also, results showed significant increase in the absolute number of CD56+/CD69+ cells in RSA(P=0.04).

Conclusion: The results suggested that the higher percentage of NK cells in peripheral blood of RSA patients compared to control group may indicate the same increase in number and cytotoxicity of uterin NK cells.

Keywords: Killer Cells, Natural; Flow Cytometry; Abortion, Habitual/immunology; Immunologic Factors

This paper should be cited as:
Sheikh A, Bahar Ara J, Mousavifar N, Mozayani R, Rastin M, Tabasi N, Hosseini pour Z, Lotfi N, Mahmoudi M. ***Percentage and absolute count of peripheral blood natural killer cells in cases of recurrent spontaneous abortion***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(3): 313-22.

****Corresponding author: Tel: +98 511 7112614, Email: mahmoudim@mums.ac.ir***

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:27 IRST on Monday September 23rd 2019