



## مقایسه تعداد مطلق جمعیت لنفوسیت های $CD4+CD25+T$ خون محیطی در زنان با سقط جنین مکرر و حاملگی های طبیعی

رویا مزینی<sup>۱</sup>، جواد بهار آراء<sup>۲</sup>، نزهت موسوی فر<sup>۳</sup>، محمد امین اسلامی<sup>۴</sup>، علی اسلامی<sup>۵</sup>، مریم راستین<sup>۶</sup>، اکرم شیخ<sup>۷</sup>، نفیسه طبسی<sup>۸</sup>، محمود محمودی<sup>۹\*</sup>

۱- کارشناس ارشد سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ایران

۳- استادیار گروه زنان و زایمان، مرکز تحقیقات زنان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان شعبه بین الملل چابهار

۵- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۶- دکترای تخصصی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۸- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۹- استاد گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۴/۲۶

### چکیده

مقدمه: تولید مثل به عنوان اصل بقای بشر از اهمیت ویژه ای برخوردار است و حاملگی موفق یک پارادوکس ایمنی است. این پژوهش به منظور بررسی فاکتورهای ایمونولوژیکی در سقط مکرر صورت گرفته است، به این ترتیب که تغییرات تعداد سلول های  $CD4+CD25dimT$ ،  $CD4+CD25brightT$  خون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر با جمعیت سلولی در زنان با حاملگی طبیعی با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال مورد مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی: گروه بیمار از میان خانم هایی با علل سقط مکرر نامشخص که "un explained" بوده، انتخاب شدند. این افراد همچنین از نظر آزمایشات کاربوتایپ، آنتی کاردیولپین، پرولاکتین و اسپرموگرام همسران طبیعی بوده و جزء موارد سندروم پلی کیستیک نبوده و تا زمان انجام آزمایش دارویی مصرف نکرده اند. لنفوسیت های جداسازی شده از خون محیطی با آنتی بادی ضد  $CD4$   $CD25$  نشاندار شده با ماده فلورسنس مجاور شدند، سپس داده های گروه بیمار و شاهد (زنان با حاملگی طبیعی) مورد مقایسه و آنالیز آماری قرار گرفتند. نتایج: یافته ها بیانگر این بود که میانگین تعداد مطلق  $CD4+CD25brightTcells/CD4+$  در بیماران سقط مکرر نسبت به شاهد کاهش معنی داری داشته است ( $Pvalue=0/000$ )، در حالیکه تعداد  $CD4+CD25dimT$  cells در گروه بیمار نسبت به شاهد بطور معناداری افزایش پیدا کرده است ( $Pvalue=0/000$ ).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده کاهش تعداد سلولهای T تنظیمی  $CD25bright$  می تواند با سقط مکرر جنین ارتباط داشته باشد. جزییات عملکرد این سلول ها در فرایند حاملگی به مطالعات بیشتر نیازمند است.

واژه های کلیدی: لنفوسیت های T- سقط مکرر- حاملگی طبیعی

\* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۶۱۴، پست الکترونیکی: mahmoudim@mums.ac.ir

## مقدمه

تولید مثل به عنوان اصل بقای بشر و تداوم خانواده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و عوامل مختلفی در آن موثرند. بارداری تغییرمنحصر به فرد ایمونولوژیکی در آنتی ژن های جنینی و تکوین جفت در رحم مادر است، که با لانه‌گزینی تخم و یا چسبیدن بلاستوسیت به یک اندومتر پذیرا در مادر پیشرفت می‌کند. جنین یک پیوند نیمه آلوگرافت است، که توسط سیستم ایمنی مادر تحمل می‌گردد. مکانیسم های ایمونولوژیکی که جنین را از خطر دفع شدن حفاظت می‌کنند هنوز کاملاً شناخته نشده اند، ولی به نظر می‌رسد که تحمل ایمونولوژیک مادر به آمیزه‌ی منحصر به فردی از مواد سرکوبگر ایمنی، سایتوکاین ها و هورمون ها که قبل و بعد از لانه‌گزینی بلاستوسیت تولید می‌شوند، بستگی دارد. یک مکانیسم احتمالی برای حفظ جنین این است که تروفوبلاست که لایه بین جنین و بافت مادر می‌باشد پروتئین های کلاسیک MHC کلاس I و II را بیان نمی‌کند (تروفوبلاست به میزان اندکی HLA-c را که کلاسیک می‌باشد بیان می‌کند) و آن را نسبت به شناسایی و حمله سلول های مادری مقاوم می‌سازد. مکانیسم دیگر که ممکن است به تحمل مادری جنین کمک کند، ترشح سایتوکاین ها در لایه بین اپیتلیوم مادر و تروفوبلاست جنین است که شامل: فاکتور تغییر دهنده رشد  $TGF-\beta$ ، اینترلوکین ۴ و ۱۰، می‌باشد. این الگوی ترشح سایتوکاین ها به سرکوب پاسخ های  $Th1$  تمایل دارد و بر روی جنبه های مختلف سیستم ایمنی اثر مهاری دارند، که از آن جمله می‌توان به مهار تولید لنفوسیت های  $T$  سایتوتوکسیک، مهار تحریک لنفوسیت ها با میتوزن ها، مهار تولید لنفوسیت های کشته اشاره کرد. القای یا تزریق سایتوکاین هایی نظیر اینترلوکین ۲، اینترفرون گاما که پاسخ های  $Th1$  را در حیوانات آزمایشگاهی پدید می‌آورد به بازجذب جنین منجر می‌شود که معادل سقط در انسان است (۱). سقط جنین قبل از هفته بیستم اگر بیش از ۲ یا ۳ بار متوالی تکرار گردد جنبه پاتولوژیک پیدا نموده و تحت عنوان سقط مکرر نیازمند درمان مناسب خواهد بود. اتیولوژی سقط مکرر ناشناخته است، اگرچه

ناهنجارهای آناتومیک، ژنتیکی، عفونی، ایمونولوژیکی، اندوکرینولوژی و محیطی را در ایجاد آن موثر می‌دانند و در ۱ تا ۵ درصد از زنان باردار ایجاد می‌شود (۲). سقط مکرر مرتبط با تحمل ایمونولوژی مادر و جنین می‌باشد و با ناسازگاری سیستم ایمنی بدن همراه است (۳).

حداقل سه زیر جمعیت سلول های  $CD4+ T$  با مکانیزم سرکوبگری به وسیله فنوتیپ، سایتوکاین ترشحی و منشاء بافتی شان متمایز می‌شوند (۴). اصطلاح  $CD4+ CD25+ T$  cells به گروهی از لنفوسیت های  $T$  با خواص تنظیمی- سرکوبی اطلاق می‌شود. این سلول ها یک جمعیت کوچک از سلول های  $CD4+ T$  در خون محیطی هستند و از تیموس طی فرایند انتخابی بر اساس ساختار فردی  $TCR$  و یا در بافت های محیطی بوجود می‌آیند، که توان پلاستیسیته و انطباق با محیط زیست را دارند (۵). این سلول ها نقش پاتولوژی و فیزیولوژی در بیماری های اتوایمیون (۶)، بیماری التهابی (۷) و تحمل پیوند (۸) دارند. این سلول ها از خون محیطی، تیموس، گره لنفی و بند ناف نیز جدا شدند (۹). جمعیت موثر تنظیمی در انسان  $CD4+CD25^{bright} T$  cells می‌باشند، که بیش از ۹۵ درصد هموژنیسیته (نسبت به موش) هستند و  $CD45RO$  و  $GITR$ ،  $CD122(IL-2R\beta)$  و  $CD621$  را بیان می‌کنند (۱۰). این سلول ها به مقدار زیادی  $IL10$  ترشح می‌کنند.  $CD4+CD25^{dim} T$  cells هم که سلول های  $T$  فعال کننده می‌باشند نیز مخلوط هتروژنی از سلول ها می‌باشند که  $CTLA-4$  را بیان نمی‌کنند و  $HLA-DR$  و  $CD45RA$  بیشتر از  $CD45RO$  دارند و اینترفرون گاما و اینترلوکین ۱ را به مقدار زیاد ترشح کرده و شبیه به سایتوکاین های  $Th1$  می‌باشد که عملکرد توکسیک برای جنین دارد (۹).

$Aluvihare$  و همکارانش برای اولین بار مطرح کردند که  $CD4+CD25+T$  cells برای تحمل جنین آلوگرافت در موش لازم هستند، زیرا تعداد این سلول ها در خون و غدد لنفی اطراف رحم موش باردار افزایش پیدا می‌کند و پیشنهاد کردند که سلول های فوق واسطه تحمل مادری می‌باشند (۱۱). اولین

مشاهده این سلول ها در حاملگی انسان با افزایش این سلول ها در بافت دسیدوا تشریح شد (۱۲). لذا این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای جمعیت این سلول‌ها در خون محیطی زنان با حاملگی طبیعی با زنان با سقط مکرر طراحی گردید.

### روش بررسی

#### ۱- جمعیت مورد مطالعه:

جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۴ خانم با سابقه سقط مکرر که علت خاصی برای سقط آنان (عفونت، اشکالات آناتومیکی، اینورمالیتی‌های کروموزومی، کمبود پروژسترون و غیره) مشخص نشده بود. این بیماران تا زمان انجام تست مورد نظر دارو دریافت نکرده و از نظر کاربوتایپ، آنتی فسفولیپید آنتی بادی‌ها، آنتی کاردیولیپین آنتی‌بادی‌ها، هورمون‌های تیروئیدی و پرولاکتین طبیعی بودند. همچنین این خانم‌ها مبتلا به بیماری تخمدان پلی‌کیستیک (PCOD) نبوده و اسپرموگرام همسران آنها نیز طبیعی بود. این خانم‌ها به عنوان گروه آزمون انتخاب شدند، که به طور متوسط ۲۸/۷۹ سال (۲۰-۳۶ سال) سن داشتند. گروه شاهد شامل ۲۱ خانم حامله بدون سابقه سقط و حداقل دارای یک فرزند بود که از نظر سنی با گروه آزمون یکسان شد. از افراد مورد مطالعه ۵ سی‌سی خون گرفته شد و در تیوب های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردید. پژوهش حاضر پس از کسب مجوزهای لازم با روش مورد-شاهدی، بر روی بیماران مراجعه کننده به بخش زنان و زایمان بیمارستان اما رضا وابسته به دانشکده علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات ناباروری منتصریه و مرکز درمانی ام البنین مشهد از تیر ماه سال ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸ صورت پذیرفت. این مطالعه با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی و تکمیل پرسشنامه ای که بدین منظور تهیه شده بود و در آن اطلاعاتی در مورد سن، جنس، بیماری زمینه‌ای، میزان WBC، پلاکت، سابقه بستری رسیده شده بود، انجام گرفت.

#### ۲- جداسازی لنفوسیت ها:

به منظور جداسازی لنفوسیت های خون محیطی از محلول فایکول (Ficol hypac, BioSera, UK) به نسبت ۱ به ۲ استفاده شد، به گونه ای که خون در بالای فایکول قرار گرفته و با آن

مخلوط نشود. سپس در ۲۷۰۰G در دمای اتاق سانتریفوژ گردید و ابرلنفوسیتی بر اساس گرادیان دانسیته جدا شده، توسط سمپلر به لوله آزمایش دیگر منتقل و با نسبت مساوی با محلول PBS (Phosphate buffer saline) شستشو داده شد، تا کلیه مواد و پروتئین‌های اضافی از محیط خارج شوند. جهت شستشو، لنفوسیت های جدا شده، با PBS مخلوط و در دور ۱۱۰۰rpm 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:

سلول های PBLs (Peripheral Blood Lymphocyte) های سازی شده پس از شستشو به دو لوله منتقل می‌شدند. بعد لنفوسیت های جدا شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با مشخصات زیر کونژوگه می شدند:

Phycoerythrin (PE) – conjugated anti-CD25

Fluoresce in isothiocyanate (FITC) – conjugated anti-CD4

لازم به ذکر است که این آنتی‌بادی‌ها همه از شرکت IQ Product, The Netherland تهیه شدند. بعد لنفوسیت ها با مارکرهای فوق به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ درجه، انکوبه می شدند، سپس دو بار با ۲cc بافر PBS شستشو داده و نمونه ها آماده خواندن توسط دستگاه فلوسایتومتری می‌شدند. سپس نمونه‌ها بر اساس جمعیت سلولی در دستگاه Becton Dickinson مدل FACS calibure انتخاب شده و توسط نرم افزار cell Quest آنالیز می‌شدند. به این صورت که ابتدا توسط نمودار Forward Scatter- side scatter مجموعه لنفوسیت های مورد نظر را انتخاب کرده (نمودار ۱) و سپس نمودار نقطه ای مربوط به آنتی بادی CD4+CD25+ ترسیم می‌شدند. در پلات نقطه‌ای مربوط به سلول های CD4+ و CD25+ (نمودار ۲) جمعیت سلول هایی که از نظر هر دو مارکر CD4+ و CD25+ مثبت می‌باشند سلول های T تنظیمی بوده و در این نمودار می‌توان جمعیت سلول های CD4+ و CD25- را نیز تفکیک کرد.

CD25bright (چهارگوش قسمت بالاتر)، سلول‌های CD25dim (چهارگوش قسمت پایین‌تر) طبقه بندی می شوند. در صد سلول‌های CD4+CD25bright T، در ربع سمت راست بالا و درصد سلول‌های CD4+CD25dim در چهارگوش سمت راست وسط شناسایی می شوند.

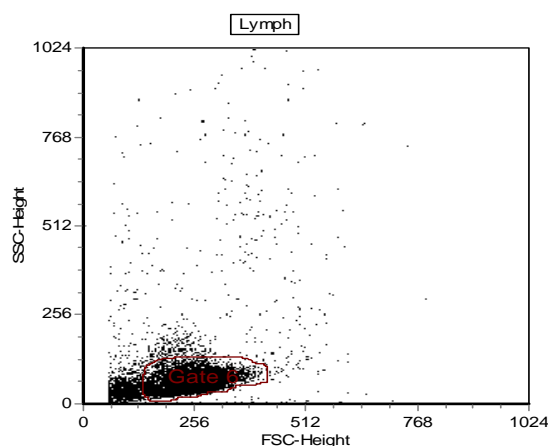
درصد سلول‌های CD4-CD25bright T در ربع سمت چپ بالا و سلول‌های CD4-CD25dim در چهارگوش سمت چپ وسط شناسایی می شوند.

#### آنالیز آماری:

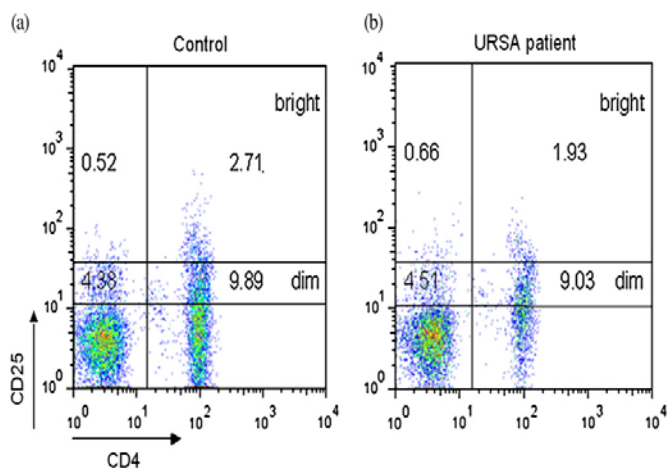
در این مطالعه تعداد کل لنفوسیت‌ها از طریق محاسبه شمارش کامل خون (WBC) انجام می شود، سپس اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار SPSS (ver 16 Chicago, IL) مورد بررسی آماری قرار گرفته، بدین منظور نتایج نمونه‌های بیماران و گروه شاهد با آزمون‌های پارامتریک (Student t- test) و غیرپارامتریک Mann-whitney بررسی شدند. سطح معنی‌دار بودن نیز در  $P < 0.05$  تعریف می‌شود.

#### نتایج

در این مطالعه، ۲۴ خانم با سابقه سقط مکرر به عنوان گروه آزمون و ۲۱ خانم با حاملگی طبیعی و داشتن حداقل یک فرزند سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها همه دارای کاربوتایپ نرمال بوده و از نظر آماری تغییر قابل ملاحظه‌ای در سن بارداری بین افراد با سقط مکرر و افراد با حاملگی طبیعی مشاهده نشد (جدول ۱). همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده میانگین تعداد مطلق سلول‌های لنفوسیت در گروه آزمون ( $129/909 \pm 2307/755$  cells/ $\mu$ l) با توجه به مقدار احتمال محاسبه شده ( $P$ value =  $0/09$ ) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ( $133/712 \pm 1775/63$  cells/ $\mu$ l) داشت. همچنین میانگین تعداد مطلق سلول‌های CD3+ T نیز در گروه آزمون ( $115/711 \pm 1656/6$  cells/ $\mu$ l) نسبت به گروه شاهد ( $102/016 \pm 1251/5$  cells/ $\mu$ l) افزایش یافت. میانگین تعداد مطلق سلول‌های CD4+ T در گروه آزمون (cells/ $\mu$ l) با توجه به مقدار احتمال محاسبه



نمودار ۱. بررسی جمعیت لنفوسیت‌های CD4+CD25+T در خون محیطی به روش فلوسایتومتری در یکی از سقط مکرر



نمودار ۲. جمعیت سلول‌های CD4+CD25 bright، CD4+CD25 dim در لنفوسیت‌های خون محیطی در گروه شاهد (a) و گروه آزمون URSA (b)

نمودار شماره ۱ یک پلات نقطه‌ای می باشد که محور x نماینده CD4-FITC و محور y، CD25-PE می باشد. لنفوسیت‌های خون محیطی جداسازی شده برای فرکانس فنوتیپی به وسیله فلوسایتومتری آنالیز می شوند. سلول‌ها Isotype Immunoglobulin G بر اساس مارکرهای CD4+CD25+ به دو زیر مجموعه‌ی سلول‌ها CD4+، CD4+CD25dim، CD4+CD25bright طبقه بندی می شوند.

لنفوسیت‌ها به سلول‌های CD4+ (چهارگوش سمت راست)، سلول‌های CD4- (چهارگوش سمت چپ)، سلول‌های

به گروه شاهد (cells/  $\mu$ l)  $145/60 \pm 18/486$  نشان داد. همچنین میانگین تعداد مطلق سلول های T CD4-CD25dim در گروه آزمون (cells/  $\mu$ l)  $83/568 \pm 8/779$  نسبت به گروه شاهد (cells/  $\mu$ l)  $57/354 \pm 6/504$  افزایش نشان داد. میانگین تعداد مطلق سلول های T CD25 در بیماران (cells/  $\mu$ l)  $364/200 \pm 24/966$  با توجه به احتمال محاسبه شده (Pvalue=0/003) از نظر آماری به صورت قابل ملاحظه ای بیشتر از گروه شاهد (cells/  $\mu$ l)  $260/64 \pm 29/601$  بود.

شده (Pvalue=0/034) افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد (cells/  $\mu$ l)  $723/27 \pm 59/388$  داشت، همچنین میانگین تعداد مطلق سلول های T CD4+ CD25bright /CD4 نیز در گروه آزمون (cells/  $\mu$ l)  $4/904 \pm 0/625$  نسبت به گروه شاهد (cells/  $\mu$ l)  $7/185 \pm 0/554$  کاهش نشان داد. میانگین تعداد مطلق سلول های CD4+ CD25dim T نیز در گروه آزمون (cells/  $\mu$ l)  $226/12 \pm 15/286$  با توجه به مقدار احتمال محاسبه شده (Pvalue =0/000) افزایش معنی داری را نسبت

جدول (۱): مشخصات نمونه های آزمون و شاهد

گروه	سن (سال)	تعداد حاملگی	تعداد سقط
آزمون	$0/887 \pm 28/79$	$0/233 \pm 3$	$0/228 \pm 2/88$
شاهد	$1/204 \pm 25/95$	$0/19 \pm 2/48$	$\cdot \pm \cdot$
P-value	$0/06$	$0/081$	$0/000$

در هر جدول SEM $\pm$ Mean نشان داده شده است.

آزمون انجام شده برای تعداد حاملگی و تعداد سقط آزمون ناپارامتری من-وینتی می باشد.

آزمون انجام شده برای سن آزمون t-test می باشد.

جدول (۲): میانگین تعداد مطلق لنفوسیت های بیماران سقط مکرر (گروه آزمون) و مقایسه آن در افراد با حاملگی طبیعی (گروه شاهد)

P-value	گروه شاهد (۲۱ نمونه)	گروه آزمون (۲۴ نمونه)	تعداد لنفوسیت ها cell/ $\mu$ l
*0/009	$1775/63 \pm 133/712$	$2307/75 \pm 129/909$	تعداد سلول های CD3+ در میکرولیتر
0/024*	$1251/5 \pm 102/016$	$1656/6 \pm 115/711$	تعداد سلول های CD4+ در میکرولیتر
*0/034	$723/27 \pm 59/388$	$977/42 \pm 90/507$	تعداد سلول های CD4+CD25+ در میکرولیتر
*0/002	$197/83 \pm 23/$	$268/55 \pm 18/112$	تعداد سلول های CD4+CD25- در میکرولیتر
0/032*	$540/15 \pm 48/907$	$753/19 \pm 71/36$	تعداد سلول های CD25 در میکرولیتر
*0/003	$260/64 \pm 29/601$	$364/200 \pm 24/966$	تعداد سلول های CD4+CD25bright در میکرولیتر
*0/055	$52/232 \pm 5/584$	$42/425 \pm 3/693$	تعداد سلول های CD4+CD25dim در میکرولیتر
**0/000	$145/60 \pm 18/486$	$226/12 \pm 15/286$	تعداد سلول های CD4-CD25 bright در میکرولیتر
0/275	$15/241 \pm 2/35$	$12/980 \pm 1/650$	تعداد سلول های CD4-CD25dim در میکرولیتر
*0/034	$57/354 \pm 6/504$	$83/568 \pm 8/779$	

مقادیری احتمالی که با \* و \*\* نشان داده شده اند به ترتیب در سطح معنی دار 0/05 و 0/01 معنادار می باشند.

در هر جدول SEM $\pm$  Mean نشان داده شده است.

## بحث

بررسی قرار گرفت. نتایج آماری نشان داد که تعداد لنفوسیت های T cells CD4+CD25bright کاهش و T cells CD4+CD25dim افزایش داشته است. آزمایش ها در

در این مطالعه تغییرات تعداد جمعیت T cells CD4+CD25+ در خون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر با مقایسه این جمعیت سلولی در زنان با حاملگی طبیعی مورد

ژن های جنینی در اثر هورمون ها گسترش می یابند (۱۵). آنتی ژن های والدینی، به وسیله جنین و یا در اثر گسترش سلول های  $CD4+CD25+ T$  سرکوبگر در پاسخ های ایجاد شده بر علیه جنین، بیان می شود. کاهش پاسخ به حاملگی، با تعداد کمتر و نقص عملکردی سلول های  $CD4+CD25+ T$  مرتبط می باشد که ممکن است با کاهش توانایی ایمنوساپرس و پشتیبانی سیستم ایمنی سبب القاء سقط جنین شود. همچنین سلول های  $CD4-CD25+ T$  واکنش اینترفرون را علیه آلوآنتی ژن های مادری مهار می کنند و در تنظیم دقیق واکنش های ایمنی ضد جنینی در  $Th2/Th1$  سهم می باشند و به لنفوسیت های فعال تبدیل می شوند. Leigh و همکاران مطرح کردند که سلول های  $CD4+CD25- T$  و سلول های  $CD4-CD25+ T$  نیز می توانند با توجه به سیتوکین ها به سلول های تنظیمی القایی تبدیل شوند. در مجموع این نتایج نشان می دهد که در بارداری گسترش سلول های  $CD4+CD25+ T$  به وسیله سرکوب بالقوه پاسخ سلول های  $T$  بر علیه آنتی ژن های آلوژنی و والدینی القاء می شود، اما کاهش سلول های  $TCD4+CD25^{bright}$  در سه ماهه ی اول بارداری باعث القای سقط در زنان باردار می شود. نتیجه بررسی اخیر در واقع نشان دادن مسائل ایمنولوژیک به عنوان عامل احتمالی برای سقط و نازایی می باشد (۱۶). در یک مطالعه ی جامع دیگر توسط Yang و همکارانش مشخص شد زنانی که سقط جنین های مکرر را تجربه می کنند کاهش تعداد این سلول ها را در خون محیطی و کاهش توانایی سرکوب را در مقایسه با زنان نرمال نشان می دهند (۱۵). نتیجه گیری ما نیز با مطالعات قبلی که نشان می دهد نسبت سلول های  $CD4+CD25^{bright} T$  و سلول های  $CD4+CD25^{dim} T$  در بیماران سقط مکرر نسبت به افراد با حاملگی طبیعی تغییر می یابد مطابقت دارد (۱۷). در مطالعه حاضر نیز سلول های  $CD4+CD25^{bright} T$  در گروه آزمون نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشت، به نظر می رسد مشکلات ایمنولوژیکی حاملگی ناشی از تحمل ناقص آلوگرافت ها می باشد و تشخیص نامناسب و نابجای آلوآنتی ژن های جنینی به وسیله ی سیستم ایمنی مادر با حاملگی ناموفق مرتبط است

شرایط *invitro* نشان داده است که زیرگروه های سلول های  $T$  از جمله  $Th1$ ,  $Th2$ ,  $Treg$  می توانند یکدیگر را تنظیم کنند و در ایجاد هموستاز نقش موثر دارند. سلول های  $Treg$  در برابر بیماری های خودایمنی با سرکوب سلول های  $T$  خودواکنشگر از میزبان محافظت می کنند. به همین ترتیب می توانند پاسخ های علیه آلوگرافت ها را مهار کنند. در این خصوص تعداد و عملکرد سلول های  $Treg$  مهم می باشد چرا که افزایش تعداد این سلول ها می تواند به توسعه و رشد جنین کمک کند و در روند حاملگی اعمال اثر کند. بیشتر تحقیقاتی که بر روی پاتوفیزیولوژی سقط مکرر با علل ناشناخته انجام شده بر روی سلول های  $Treg$  متمرکز بوده اند که از این مطالعات و مطالعه حاضر شواهدی به دست آمده که این سلول ها در پاتوژنز سقط مکرر نقش دارند که در ادامه به بحث در این مورد می پردازیم.

Sasaki و همکاران (۱۲) مطرح کردند که افزایش این سلول ها در موش حامله نرمال قادر به جلوگیری از سقط جنین است و افزایش سقط مکرر را در موش هایی که حاوی این سلول ها بودند گزارش کردند، آنها افزایش سقط را به کاهش بیان مولکول های حفاظتی از جمله

LIF (Leukemia Inhibitory Factor),

$TGF-\beta$  (Transformation Growth Factor), heme-oxygenase-1

القاء شده بوسیله این سلول ها نسبت می دهند. سلول های  $CD4+Treg$  تحریک شده در حضور اینترفرون گاما، تکثیر سلول های  $Th2$  را مهار می کند و رده ی سلول های  $Th1$  را افزایش داده، ایمنی سلولی را فعال می کند. در صورت کاهش فعالیت  $Th2$  سایتوکاین های تولید شده نیز کاهش پیدا می کنند که اثر مهاری بر روی سلول های  $Th1$  دارد، لذا سلول های  $Th1$  فعال می شوند که افزایش فعالیت سلول های  $Th1$  می تواند باعث سقط جنین شود. از طرفی کاهش فعالیت سلول های  $Th1$ ، به دلیل فعال کردن مکانیسم تحمل ایمنی، موجب بقاء حاملگی می شود (۱۳، ۱۴). Yang و همکاران بیان کردند که گسترش سلول های  $CD4+CD25+ T$ ، بر اثر گسترش سلول های  $T$  اجرایی خود واکنشگر است که در پاسخ به آنتی ژن های والدینی گسترش می یابند و یا مستقل از آلوآنتی

در مجموع این نتایج نشان می دهد که در بارداری گسترش سلول های  $CD4+CD25+T$  به وسیله سرکوب بالقوه پاسخ سلول های  $T$  برعلیه آنتی ژن های آلوژنی والدینی القاء می شود، اما کاهش سلول های  $CD4+CD25bright$  در سه ماهه اول بارداری باعث القای سقط در زنان باردار می شود. نتیجه بررسی اخیر در واقع نشان دادن مسائل ایمنولوژیک به عنوان عامل احتمالی برای سقط و نازایی می باشد و با شناخت بیشتر مکانیسم عمل این سلول ها و استفاده درمانی از آنها در زنان با سقط های مکرر نیز امکان پذیر می گردد.

نتیجه نهایی نشان داده که بررسی فاکتور های ایمنی می تواند سرآغازی برای پیدا کردن عاملی برای سقط مکرر باشد.

#### نتیجه گیری

با توجه به کاهش معنی دار سلول های  $CD4+CD25bright$  و یا اختلال در ایجاد سلول های  $CD4+CD25+Treg$  و یا تمایز ناکافی سلول های  $T$  به سلول های  $Treg$  در رحم ممکن است توان بارداری را تحت تاثیر قرار دهد. از طرفی پتانسیل و توان سلول های  $Treg$  در هموستاز ایمنی، احتمال درمان سودمند جدیدی را برای پاتولوژی تولید مثل با دستکاری این سلول ها به منظور استفاده دارویی و سلول درمانی در تولید مثل فراهم می کند.

و لنفوسیت های آلوژن نقش مهمی در تحمل حاملگی دارند. در اینجا افزایش سلول های  $dim$  (نوع خاص سلول تیره) که می توانند به سلول های  $T$  فعال شده تبدیل شود موید این امر است. کاهش پاسخ به حاملگی مرتبط با تعداد کمتر و یا نقص عملکردی سلول های  $T$  می باشد که ممکن است با کاهش توانایی ایمنوساپرس و پشتیبانی سیستم ایمنی سبب القای سقط جنین شود (۱۸). گزارش دیگری افزایش سلول های  $CD4+CD25bright$  در طی اولین و دومین دوره سه ماهه بارداری بیان کرده، همچنین Saito و همکاران بیان کردند که زنانی که سقط جنین های مکرر را تجربه می کنند، کاهش این سلول ها در خون محیطی و کاهش توانایی سرکوب را در مقایسه با زنان نرمال نشان می دهند (۱۹). افزایش سلول های  $CD4+CD25bright$   $Treg$  در القاء تحمل ایمنی برای بقای حاملگی لازم است (۲۰). با توجه به کاهش معنی دار سلول های  $CD4+CD25bright$   $T$  اختلال در ایجاد این سلول ها و یا تمایز ناکافی سلول های  $T$  به سلول های  $CD4+CD25+T$  در رحم ممکن است ادامه بارداری را تحت تاثیر قرار دهد، از طرفی پتانسیل و توان سلول های  $CD4+CD25+T$  در هموستاز ایمنی، زمینه های جدیدی را در پاتولوژی تولید مثل مطرح می نماید.

#### منابع:

- 1- Ejn Way CH, Valport M, Terwers P, Shelomichik M. *Immunology system in health & disease*. Trans by Ghaffary S. H; 1 ed th. Theran: Tayebb; 2004.
- 2- Patriarca A, Piccioni V, Gigante V, Benedetto C. *The use of intravenous immunoglobulin in sine causa or alloimmune recurrent spontaneous abortion (RSA)*. Panminerva Med 2000;42(3):193-5.
- 3- Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, et al. *Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss*. Fertil Steril 2005;83(4):821-39.
- 4- Zhu J, Paul WE. *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood 2008;112(5):1557-69.
- 5- Jonuleit H, Schmitt E. *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations*. J Immunol 2003;171(12):6323-7.

- 6- Sakaguchi S. *Naturally arising Foxp3-expressing CD25CD4 regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol 2005;6(4):345-52.
- 7- Wahl SM, Vazquez N, Chen W. *Regulatory T cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation*. Curr Opin Immunol 2004;16(6):768-74.
- 8- Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y. *Regulatory T cells and organ transplantation*. Semin Immunol 2004;16(2):119-26.
- 9- Beacher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. *Human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Semin Immunol 2004; 16(2):89-98.
- 10- Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. *Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?* Human Reproduction Update 2009;15(5) :517-35.
- 11- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus*. Nat Immunol 2004;5(3):266-71.
- 12- Sasaki Y, Satomi M, Miyazaki J, Sakai M, Saito S. *CD4CD25 regulatory T cells are increased in the human early pregnancy decidua and have immunosuppressive activity*. Am J Reprod Immunol 2003;49:356.
- 13- Chaouat G. *The Th1/Th2 paradigm :still important in pragnancy?* Semin Immunology 2007;29(2):95-113.
- 14- Piccinni M. *T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss*. Reproductive BioMedicine 2006; 13(6):840-4.
- 15- Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lu C, Lin Q. *Proportional change of CD4CD25 regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients*. Fertil Steril 2008;89:656-61.
- 16- Leigh R, Jelmer R. *Regulatory T-cell and immune tolerance i n pregnancy:a new target for infertility treatment?* Humen Reproduction 2009;15(5):517-35
- 17- Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. *Expansion of CD4CD25and FoxP3 regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction*. J Immunol 2007; 178:2572-8.
- 18- Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, de Groot-Swings GM, et al. *Differential distribution of CD4CD25(bright) and CD8CD28 T-cells indecidua and maternal blood during human pregnancy*. Placenta 2006;27(Suppl A):S47-S53.
- 19- Saito S, Sasaki Y, Sakai M. *CD+CD25 high regulatory T cells in human pregnancy*. J Reprod Immunol 2005;65(2):111-20.
- 20- Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. *Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance*. Semin Immunopathol 2007; 29(2):115-22.



## **Comparison of the Number of Peripheral Blood CD4+CD25+ T Cells in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion Patients with Normal Pregnant Women**

**Mozayyani R(Msc)<sup>1</sup>, Bahar Ara J(PhD)<sup>2</sup>, Mousavifar N(PhD)<sup>3</sup>, Eslami M(PhD)<sup>4</sup>, Eslami A(PhD)<sup>5</sup>,  
Rastin N(PhD)<sup>6</sup>, Sheikh A(Msc)<sup>7</sup>, Tabasi N(Msc)<sup>8</sup>, Mahmoudi M(PhD)<sup>\*9</sup>**

<sup>1,2,7</sup> Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Women's Health Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>4</sup> International Branch of Zahedan University of Medical Science, Chabahar, Iran

<sup>5</sup> Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

<sup>6,8,9</sup> Immunology Research Center/BuAli Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Received:** 17 Jul 2010

**Accepted:** 20 Jan 2011

### **Abstract**

**Introduction:** Undoubtedly, reproduction is a necessity for survival and successful pregnancy is an immunological paradox. In the present study, we investigated the proportional changes of CD4+CD25<sup>bright</sup> T cells, CD4+CD25<sup>dim</sup> T cells in peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortions (URSA) and compared it with normal pregnant women by antibody monoclonal method.

**Methods:** The study group comprised of women with miscarriages of unexplained etiology who had normal karyotypes, anticardiolipin antibodies, prolactin levels and normal spousal spermograms. They did not have polycystic ovaries and also did not receive any drugs at the time of the study. PBLs lymphocytes were isolated, then FITC-conjugated and anti-CD4 and PE-conjugated anti-CD25 antibody levels were measured. Then results of the study and control group were analyzed and compared.

**Results:** The absolute number of CD25<sup>bright</sup> cells in the CD4+T cells in peripheral blood was statistically significantly lower in the study group as compared to the control group (P=0.000). The absolute number of CD4+CD25<sup>dim</sup> T cells in peripheral blood was statistically significantly higher in the study group as compared to the control group (P=0.000).

**Conclusion:** As decrease in the number of CD4+CD25+ T cells or their functional deficiency may be linked with miscarriage, CD4+CD25+ T cells could serve as a novel biomarker for monitoring in URSA patients, but more studies are needed in this field.

**Keywords:** Abortion, Habitual; Abortion, spontaneous; T- Lymphocytopenia, Idiopathic CD4- Positive; Pregnancy

#### **This paper should be cited as:**

Mozayyani R, Eslami M, Eslami A, Bahar ara J, Mousavifar, Rastin N, Sheikh A, Tabasi N, Mahmoudi M. *Comparison of the Number of Peripheral Blood CD4+CD25+ T Cells in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion Patients with Normal Pregnant Women*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(2):192-200.

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