Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 21, No. 4, Sep-Oct 2013
Pages: 505-513

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۱، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۲
صفحه: ۵۱۳-۵۰۵

بررسی سایتوکاین‌های سلول‌های Th1 و TH17 تحریک شده در محیط کشت سلولی در زنان مبتلا به سقط مکرر خود به خودی

یاسر ورقائیان[۱]، حسین هادی ندوشن[*۲]، عباس افلاطونیان[۳]، سیدعلی میرغنی زاده[۴]، سهیل نجفی[۵]

۵،۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲ - دانشیارگروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳- استاد گروه زنان و زایمان، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۴- استاد گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲۱۳۹/۳/۲۳

چکیده

مقدمه: در علل ناشناخته سقط مکرر، عوامل ایمونولوژیکی مختلف از قبیل اختلالات اتوایمیون و افزایش ایمنی سلولی از قبیل بالا رفتن سطح سلول‌های NK ،Th1 و Th17 گزارش شده است. سلول‌های Th1 و Th17 در فرآیند التهاب نقش بسزایی را ایفا می‌کنند. سلول‌های Th1 سایتوکاین‌های IFN-γ و IL2 و سلول‌های Th17 عمدتاً سایتوکاین‌های IL-17A,F و IL-22 را تولید می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت سلول‌های Th1 و Th17 در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی است.

روش بررسی: در این مطالعه مورد- شاهد، تعداد ۳۰ نفر زن با سابقه ۲ بار سقط که حداقل۳ ماه از زمان سقط آنها گذشته به عنوان گروه مورد و ۳۰ زن طبیعی بارور بدون سابقه سقط و دارای حداقل یک فرزند به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. میزان سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-17A,F در سوپرناتنت محیط کشت سلول‌های تک هسته‌ای تحریک شده با PHA، به روش ELISA سنجش و در دو گروه مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون‌های آماری one-sample Kolmogorov-smirnov، Kruskal-wallis و Spearman و نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: سطح IFN-γ ، در گروه مورد نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (p<۰/۰۰۵، ۲۱/۴۴ pg/ml ±۸۸/۰۶ در مقابل ۳۰/۴۱±۱۸۶/۵۳). همچنین سطح IL-17A, F، در گروه مورد نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (p<۰/۰۱، ۸pg/ml ±۲۸/۴۱ در مقابل۲۱/۲۶±۸۴/۷۴). در گروه مورد، غلظت IFN-γ همبستگی مثبت با IL-17A, F نشان داد (p=۰/۰۱۵ و r=۰/۴۵۵).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، سطوح افزایش یافته سایتوکاین‌های IL-17A، F و IFN-γ در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی، یک گرایش پیش التهابی از طریق ایمنی Th1 و Th17 را نشان می‌دهد و احتمال دارد این سلول‌ها در رد آنتی ژن‌های جنینی نقش اساسی را ایفا کنند.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر خود به خودی، سایتوکاین، Th1، Th17

[*] (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۳۵۱-۶۲۴۰۶۹۱، پست الکترونیکی:hhadin@ssu.ac.ir

- **این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد می‌باشد.**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

مقدمه

به بروز ۲ یا بیشتر از ۲ سقط که به صورت بالینی تشخیص داده شده باشند سقط مکرر خود به خودی (RSA: Recurrent Spontaneous Abortions) گفته می‌شود(۱). بر اساس مطالعات انجام شده سقط مکرر ۳-۱ درصد خانم‌های حامله را مبتلا می‌کند(۲). ناهنجاری‌های کروموزومی والدین و عوارض ترومبوتیک سندرم آنتی‌فسفولیپید آنتی‌بادی در مجموع مسئول کمتر از ۱۵-۱۰ موارد سقط مکرر بارداری هستند. از سایر علل می‌توان به حالات غیرطبیعی شکل رحم، مشکلات هورمونی، عفونت‌ها، عوامل ایمنی و علل متفرقه دیگر اشاره کرد(۳). در کل حدود نیمی از موارد سقط مکرر، ناشناخته (Unexplained) می‌باشند که نقش علل ایمونولوژیک در این موارد بیش از سایر علل مورد توجه می‌باشد(۴). در علل ناشناخته سقط مکرر، عوامل ایمونولوژیکی مختلف از قبیل اختلالات اتوایمیون مانند آنتی‌بادی ضدهسته، آنتی‌بادی ضدتیروئیدی و آنتی‌بادی ضدفسفولیپید و افزایش ایمنی سلولی از قبیل بالا رفتن سطح سلول‌های NK و Th1 گزارش شده است(۵). سلول‌های Th1 به مقدار زیادی سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-2 را تولید می‌کنند. عامل رونویسی سلول‌های Th1، T-bet1 و عامل فعال‌کننده رونویسی و انتقال‌دهنده پیام ۴ (STAT4: Signal Tranducer and Activator of Taranscription) است(۶،۷). زیرمجموعه‌ای از سلول‌های Th CD4+ که سایتوکاین IL-17 را تولید می‌کند، Th17 نامیده می‌شود(۸). فاکتور رونویسی سلول‌های Th17 در انسان و موش (RORγt: Retinoic Acid-related Orphan Receptor) است(۹). سلول‌های TH17 در انسان برای تمایز به سایتوکاین‌های IL-1، IL-23، IL-6 و TGF-β1 نیاز دارند و همچنین بعد از تمایز سایتوکاین‌های IL-17A، IL-17F، IL- 22 و IL-26 را تولید می‌کنند(۱۱-۹). این سلول‌ها همچنین برای تمایز به عامل رونویسی STAT-3 نیز نیاز دارند(۱۲). تحقیقات بر روی سلول‌های Th17 در دوران بارداری ثابت کرده است که این سلول‌ها در سه ماهه سوم دوره بارداری کاهش می‌یابند(۱۳). همچنین بررسی‌های اخیر نشان داده است که سلول‌های Th17 در خون محیطی و دسیدوآ زنان دچار سقط مکرر خود به خودی افزایش یافته است(۱۴،۱۵). در این مطالعه، برای بررسی فعالیت سلول‌های Th1 و Th17، سایتوکاین‌های IL-17A, F و IFN- γ را در سوپرناتنت محیط کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells) تحریک شده با میتوژن فیتو هماگلوتینین (PHA: Phyto Hem Agglutinin)، در افراد دچار سقط مکرر خود به خودی و کنترل مقایسه کرده و مورد سنجش قرار گرفته است.

روش بررسی

مطالعه به صورت مورد - شاهدی بر روی دو گروه مختلف مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقاتی- درمانی ناباروری یزد انجام گرفت که بر اساس معیارهای مندرج در پرسشنامه که شامل اطلاعات جمعیت‌شناختی سن، تعداد دفعات سقط، تعداد دفعات حاملگی و سابقه بیماری هر دو گروه مورد مطالعه قرار گرفتند. با توجه به بررسی‌های مشابه و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و توان آزمون ۸۰٪ و p=۰/۰۱ تعداد ۳۰ نمونه در هر گروه مورد نیاز بود و افراد مورد مطالعه از لحاظ سنی یکسان بودند. گروه اول زنانی بودند که حداقل دارای یک فرزند بوده و فاقد هرگونه بیماری، سابقه سقط و یا مشکلات بارداری از جمله افزایش فشار خون در طی حاملگی (پره‌اکلامپسی) باشند. گروه دوم زنانی بودند که به علت سقط مکرر خود به خودی (RSA) به مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد مراجعه نموده بودند و حداقل ۲ بار دچار سقط شده بودند و حداقل ۳ ماه از زمان سقط آنها گذشته بود. در این مطالعه زوجینی در گروه ۲ مورد بررسی قرار گرفتند که علت شناخته شده‌ای برای موارد سقط مکرر آنها وجود نداشت، بنابراین زوجین، تحت بررسی‌هایی از قبیل کاریوتایپینگ به منظور رد اختلالات کروموزومی، CBC به منظور رد تالاسمی و آنمی، بررسی سطح TSH و T4 به منظور رد اختلالات تیروئیدی، اندازه‌گیری سطح هورمون پرولاکتین به منظور رد هایپر پرولاکتینمی، بررسی سطوح آنتی‌بادی‌های IgG و IgM آنتی‌کاردیولیپین و آنتی فسفو لیپید به منظور رد سندرم آنتی‌فسفولیپید، بررسی عوامل انعقادی و خونی نظیر عامل V لیدن، میزان فعالیت پروتئین C و S، هموسیستئین و پروترومبین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

به منظور رد ترومبوفیلی، معاینه زنان و در صورت لزوم هیستروسکوپی و یا هیستروسالپنگوگرافی جهت رد اختلالات آناتومیک، آنالیز اسپرم و در صورت لزوم معاینه ارولوژی جهت رد عامل مردانه قرار می‌گرفتند و در صورتی که هر کدام از موارد فوق مثبت بود و زوجین اختلالی در تست‌های فوق داشتند، از مطالعه حذف می‌شدند و در صورتی که تمام موارد منفی بود، زنان با تشخیص سقط مکرر خود به خودی با علت ناشناخته وارد مطالعه می‌شدند. با کسب رضایت از بیماران و افراد گروه کنترل و توضیح در مورد اهمیت مطالعه، خونگیری از افراد مورد نظر به عمل آمد. از هر فرد مورد مطالعه حدود ۵ سی‌سی خون هپارینه گرفته شد. لوله فالکون حاوی خون و ضدانعقاد هپارین به آزمایشگاه کشت سلولی انتقال داده شده و در همان روز عمل کشت سلولی بر روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انجام شد و بعد از ۴۸ ساعت مایع رویی (سوپرناتنت)کشت سلولی برداشته و به میکروتیوپ‌ها انتقال داده شد و نمونه‌ها کدگذاری گردید و تا جمع‌آوری کامل نمونه ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند.

به منظور کشت سلول‌ها و تهیه سوپرناتنت، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول (ساخت شرکت گل افشان) جدا شده و به وسیله بافر فسفات (PBS: Phosphate Buffer Salin) (Sigm Chemical, USA) دو بار شستشو داده و شمارش سلولی و سلول‌ها قابلیت زنده ماندن (Vability) به وسیله تریپان بلو تعیین شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640(Gibco- BRL, USA) که شامل پنی‌سیلین (۱۰۰IU/ml), استرپتومایسین (۱۰۰mg/ML), L-glutamin و۱۰٪ سرم جنین گاوی (Sigma Chemical, USA) (FBS: Fetal Bovine Serum) است، کشت داده شدند. ۱×۱۰۶ سلول منونوکلئار را در پلیت‌های ۶ حفره‌ای به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵٪ CO2 و (Gibco- BRL, USA) (۱/۱۰۰) PHA تحریک کرده و سوپرناتنت سلول‌های کشت داده شده را برداشته و تا جمع‌آوری کامل نمونه‌ها در ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. بعد از جمع‌آوری دستورالعمل کیت سازنده به روش الایزای ساندویچ غلظت سایتوکاین‌های IL-17A, F و INF-γ تعیین شد.

جهت سنجش سایتوکاین‌های IL-17A، F و IFN-γ در سوپرناتنت کشت سلولی به روش الایزا از کیت‌های شرکت (NorthAmerica Europe/International EBioscience) استفاده شد که نوع کیت Human platinum ELISA و اصول کار همه کیت‌ها به روش الایزای ساندویچ بود. در تمامی کیت‌های سایتوکاین‌های مربوطه، آنتی‌بادی علیه سایتوکاین مربوطه در کف حفره‌های پلیت کوت شده بود. وقتی که نمونه‌های مورد مطالعه به همراه استانداردها به پلیت اضافه شدند، سایتوکاین‌های موجود در نمونه‌ها به عنوان آنتی‌ژن تلقی شده و در کف پلیت به آنتی‌سایتوکاین‌های مربوطه کوت شدند. پس از شستشو و مدت زمان معینی از انکوباسیون، بیوتین-کنژوگه آنتی‌سایتوکاین منوکلونال مربوطه اضافه شده و اگر آنتی‌ژنی وجود داشته باشد (که همان سایتوکاین‌های مربوطه هستند) به آن باند می‌شود. بعد از مدت زمان معینی انکوباسیون بیوتین-کنژوگه آنتی‌سایتوکاین‌هایی که به سایتوکاین مربوطه باند نشده‌اند، در جریان شستشو حذف شدند و بعد استرپتوآویدین متصل به آنزیم پرواکسیداز (HRP) اضافه شده و به بیوتین کنژوگه آنتی‌سایتوکاین مربوطه وصل شد. به دنبال انکوباسیون، استرپتوآویدین متصل به آنزیم پراکسیداز باند نشده به بیوتین کنژوگه آنتی‌ساتیوین مربوطه در جریان شستشو حذف شد. در مرحله بعد محلول سوبسترا H2O2 و کروموژن (تترا متیل بنزیدین) اضافه شد و با HRP واکنش داد و بعد از انکوبه شدن در زمان معین، متناسب با مقدار سایتوکاین رنگ آبی ظاهر شد. در این مرحله واکنش با اضافه کردن محلول متوقف کننده (اسیدفسفریک ۱مولار) پایان یافت و شدت رنگ حاصله (OD: Optical density) در طول موج ۴۵۰nm و طول موج رفرانس ۶۲۰nm در دستگاه الایزاریدر (State Fax 3200, USA) خوانده شد. دستگاه الایزا ریدر بر اساس میزان شدت رنگ استانداردها و غلظت آنها منحنی استاندارد رسم کرد و غلظت سایتوکاین‌ها بر اساس این منحنی محاسبه گردید. حساسیت اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL-17A، F و IFN-γ بر اساس دستورالعمل کیت‌های مربوطه به ترتیب ۸/۸ pg/ ml و ۰/۹۹ بود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. ابتدا با آزمون Kolmogorov-smirnov one-sample توزیع نرمال و غیرنرمال بودن متغیرهای مورد مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهایIL-17A، F و IFN-γ در سوپرناتانت کشت سلولی، دارای توزیع غیرنرمال بودند و برای تجزیه و تحلیل آنها از آزمون Kruskal - Wallis استفاده شد و میانه آنها مورد مقایسه قرار گرفت. جهت تعیین همبستگی بین غلظت سایتوکاین‌ها در سوپرناتانت کشت سلولی از ضریب همبستگی Spearman استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

محدوده سنی نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب در گروه کنترل از ۲۱ تا ۴۱ سال با میانگین ۴/۷±۳۰/۴۷ سال و در گروه سقط مکرر خود به خودی از ۱۹ تا ۴۱ با میانگین ۵/۳±۲۹/۲۷ سال بود. دامنه تغییرات حاملگی در گروه کنترل از ۲ تا ۴ با میانگین ۰/۰۸±۲/۲۰ بود و در گروه سقط مکرر دامنه تغییرات سقط از ۲ تا ۸ با میانگین ۰/۲۴±۳/۱ بود.

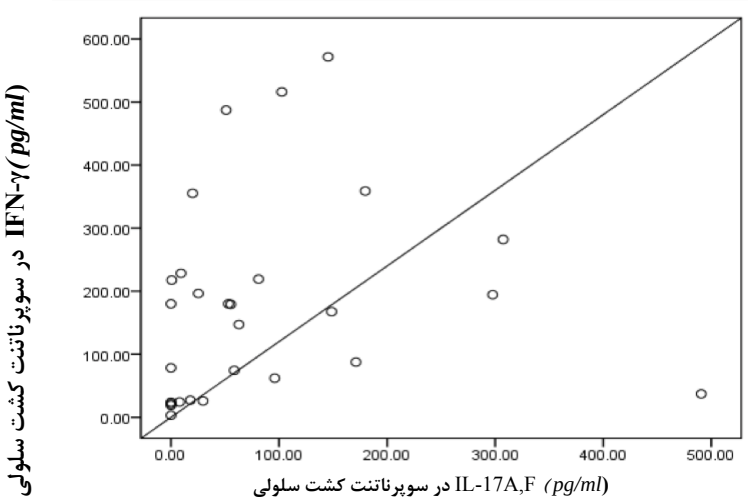
غلظت سایتوکاین IL-17A, F در سوپرناتانت کشت سلولی گروه‌های مورد مطالعه یکسان نبود و غلظت این سایتوکاین در گروه سقط مکرر خود به خودی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (p<۰/۰۱). غلظت IFN-γ در سوپرناتانت کشت سلولی گروه‌های مورد مطالعه یکسان نبود و غلظت این سایتوکاین درگروه سقط مکرر خود به خودی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (p<۰/۰۰۵) (جدول ۱).

در گروه سقط مکرر خود به خودی، غلظت IL-17A، F در سوپرناتانت کشت سلولی دارای همبستگی مثبت معنی‌داری با غلظت IFN-γ(p=۰/۰۱۵ و r=۰/۴۵۵) در سوپرناتانت کشت سلولی بود (نمودار ۱).

جدول ۱: غلظت سایتوکاین‌ها در سوپرناتانت کشت سلولی گروه‌های مورد مطالعه

غلظت سایتوکاین‌ها* / گروه‌های مورد مطالعه	IL-17A, F (میانگین ± انحراف معیار)	IFN-γ (میانگین ± انحراف معیار)
گروه سقط مکرر خود به خودی	۸۴/۷۴±۲۱/۲۶	۳۰/۴۱±۱۸۶/۵۳
	(۰-۴۹۰)	(۳/۲-۵۷۱/۶)
گروه کنترل	۲۸/۴۱±۸	۲۱/۴۴±۸۸/۰۶
	(۰-۱۶۶)	(۳/۲-۴۷۴/۴)
P-value	۰/۰۱	۰/۰۰۵

*غلظت بر حسب Pg/Ml می باشد.



نمودار ۱: همبستگی بین غلظت سایتوکاین IL-17A,F و IFN-γ در سوپرناتانت کشت سلولی در گروه سقط مکرر خود به خودی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

بحث و نتیجه گیری

وقتی جنین به عنوان یک پیوند آلوتایپ در بدن مادر جایگزین می‌شود، توسط سیستم ایمنی مادر به عنوان بیگانه شناسایی شده و بر علیه آن پاسخ‌های ایمنی صورت می‌گیرد(۱۶). در دوران حاملگی تمامی لنفوسیت‌ها در تماس با سلول‌های تروفوبلاست بوده و در فرآیندهایی که منجر به پاسخ ایمنی سلولی می‌شود، شرکت می‌کنند(۱۷). همچنین سلول‌های ترفوبلاست در زنان مبتلا به سقط مکرر خود به خودی می‌توانند سبب تحریک سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells)، تکثیر آنها و تولید عوامل توکسیک برای جنین شوند(۱۸). در بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که افزایش لنفوسیت‌های Th1 سبب افزایش توکسینی علیه جنین و در نهایت منجر به عدم لانه گزینی و سقط می‌شود(۱۹). همچنین بررسی‌های اخیر افزایش تعداد لنفوسیت‌های Th17 را در افراد دچار سقط مکرر خود به خودی ثابت کرده است(۱۴،۲۰،۲۱).

یکی از راه‌های تعیین میزان فعالیت سلول‌های Th، سنجش سایتوکاین‌های مترشحه از این سلول‌ها می‌باشد. سایتوکاین‌ها پلی‌پپتیدهای شبه هورمونی هستند که با رسپتورهای سطح سلولی واکنش داده و سیگنال‌های داخل سلولی را به راه انداخته و به عنوان میانجی پاسخ‌های ایمنی عمل می‌کنند. در دوران بارداری سایتوکاین‌ها نقش مهمی را در بقای جنین ایفا می‌کنند و باعث کنترل پاسخ‌های ایمنی مادری می‌شوند و همچنین باعث فرآیند رگ‌سازی می‌شوند(۲۲،۲۳). در این مطالعه، برای بررسی فعالیت سلول‌های Th1 و Th17 به ترتیب سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-17A, F را در سوپرناتنت محیط کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با میتوژن (PHA)، در افراد دچار سقط مکرر و کنترل مقایسه کرده و مورد سنجش قرار دادیم.

نتایج حاصل نشان داد که غلظت IFN-γ در سوپرناتنت کشت سلولی افراد با سابقه سقط مکرر در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود. همان طوری که در بررسی Makhseed و همکاران، مشخص شد که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با فیتوهماگلوتینین سطح بالاتری از سایتوکاین‌های تولید شده Th1 مانند IL-12، IFN-γ و TNF-α را در زنان دچار سقط مکرر نشان می‌دهند(۲۴). همچنین در مطالعه‌ای مشابه بر روی زنان سقط مکرر خود به خودی و زنان حامله در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین صورت گرفت، مشخص شد که سطح سایتوکاین‌های Th1 مانند IFN-γ و IL-2 در زنان دچار سقط مکرر در مقایسه با زنان حامله افزایش یافته است(۲۵). در بررسی که بر روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با لنفوسیت‌های آلوژنیک صورت گرفت، مشخص شد که در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی به نسبت زنان دارای حاملگی نرمال، سایتوکاین‌های تولید شده Th1 به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته بود(۲۶). در مطالعه‌ای که در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی، بر روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی مادری تحریک‌شده با سلول‌های پلاسنتای اتولوگ انجام دادند، مشخص شد که نسبت سایتوکاین‌های IL-2 و IFN-γ در زنان دچار سقط مکرر، در مقایسه با زنانی که دارای بارداری نرمال بودند، به طور قابل توجهی افزایش یافته است(۲۷). Wilson و همکاران در بررسی که بر روی زنان دارای حاملگی نرمال و زنان دارای سقط مکرر در سه ماهه اول بارداری انجام دادند، مشخص شد که سطح سایتوکاین‌های Th1 مانند IL-18، IL-12 و IFN-γ در زنان دچار سقط مکرر افزایش یافته است است(۲۸) و این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر سازگاری داشتند و نشان می‌دهد که در افراد دچار سقط مکرر خود به خودی میزان فعالیت سلول‌های Th1 بیشتر است.

غلظت IL-17A,F (که عمدتاً از سلول‌های Th17 ترشح می‌شوند) نیز در سوپرناتنت کشت سلولی افراد با سابقه سقط مکرر خود به خودی در مقایسه با افراد باردار غیرحامله بیشتر بود. در سال ۲۰۱۰ میلادی در تحقیقی که بر روی سلول‌های Th17 در خون محیطی و دسیدوآ، در اوایل بارداری افراد دچار سقط مکرر خود به خودی و همچنین زنان حامله انجام گردید،

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

معین شد که نسبت سلول‌های Th17 در خون محیطی و دسیدوآ افراد دچار سقط نسبت به افراد حامله به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان داده است. همچنین بیان IL-17، IL-23 و RoRc که از جمله عوامل مرتبط با تمایز سلول Th17 هستند، در خون محیطی و دسیدوآ زنان دچار سقط مکرر در مقایسه با زنان باردار افزایش یافته بودند(۱۴). Liu و همکاران ر مطالعه‌ای مشخص کردند که نسبت سلول‌های TH17 در خون محیطی و غلظت IL-17A در سوپرناتنت کشت سلولی (مایع رویی سلول‌های لفنوسیت تحریک‌شده با PHA) در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی در مقایسه با زنان باردار (در مرحله اولیه بارداری) و زنان دارای بارداری نرمال غیرحامله بیشتر بود. از این بررسی‌ها می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های TH17 ممکن است در رد آنتی ژن‌های جنینی نقش اصلی را ایفا کنند و برای یک بارداری موفقیت آمیز مضر باشند(۲۹). همچنین در این بررسی، در افراد دچار سقط مکرر خود به خودی، غلظت IL-17A,F در سوپرناتنت کشت سلولی همبستگی مثبت معنی‌داری با غلظت IFN-γ در سوپرناتنت کشت سلولی داشت. در بررسی که توسط Lee و همکاران بر روی زنان دچار سقط مکرر انجام شد، مشخص گردید که در سلول‌های TCD3+CD4+ نسبت سایتوکاین TNF-α، در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی نسبت به زنان دارای بارداری نرمال بالاتر بود. همچنین سلول‌های T IL-17+ در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی نسبت به زنان دارای بارداری نرمال افزایش یافته بودند. همچنین سطح سلول‌های T IL-17+ دارای همبستگی مثبت با سلول‌های TCD3+CD4+ تولید کننده TNF-α و IFN-γ بودند(۳۰). از این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که پاسخ‌های ایمنی پیش التهابی از طریق سلول‌های TH1 و TH17 در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی زیاد است. ولی با توجه به اینکه فعالیت همزمان سلول‌های Th1 و Th17 در زنان دچار سقط مکرر کمتر بررسی شده است نیاز به بررسی‌های بیشتر در این مورد می‌باشد.

با توجه به اینکه سایتوکاین‌های سلول‌های Th1 و Th17 باعث پاسخ‌های پیش التهابی می‌شوند، در یافته‌های مطالعه حاضر سایتوکاین‌های سلول‌های Th1 و Th17 در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی در مقایسه با افراد دارای بارداری نرمال افزایش یافته بودند و زنان دچار سقط مکرر خود به خودی یک گرایش پیش التهابی از طریق ایمنی Th1 و Th17 داشتند و احتمال دارد این سلول‌ها در رد آنتی‌ژن‌های جنینی نقش اساسی را ایفا کنند. به علت اینکه بررسی‌های کمتری در مورد نقش سلول‌های Th1 و Th17 در زنان دچار سقط مکرر خود به خودی انجام شده، مطالعات بیشتر برای ایجاد شواهد جدیدتری در آینده نیاز است.

سپاسگزاری

از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش با محققین همکاری داشتند از جمله مدیریت مرکز درمانی تحقیقاتی ناباروری یزد جناب آقای دکتر عبدلی و کارشناسان محترم آزمایشگاه سلول‌های بنیادی مرکز، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1- Cook CL, Pridman DD. ***Recurrent pregnancy loss.*** Curr Opin Obstet Gynecol 1995; 7(5): 357-66.

2- Coulam CB. ***Epidemiology of recurrent spontaneous abortion.*** Am J Reprod Immunol 1991; 26(1): 23-30.

3- Stephenson MD. ***Fretuquency of factors associated with habitual abortion in 197couples.*** Fertil Steril 1996; 66(1): 24-9.

4- Laird SM, TucKerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AIF, Li TC. ***A review of immune cell andmolecular in women with recurrent miscarriage.*** Hum Reprod Update 2003; 9(2): 163-74.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

5- Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, et al. ***Increased T helper 1 cytokine responses by circulating Tcells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile womenwith multiple implantation failures after IVF.*** Hum Reprod 2003; 18(4): 767-73.

6- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. ***Functional diversity of helper T lymphocytes.*** Nature 1996; 383(6603): 787-93.

7- Peck A, Mellins ED. ***Plasticity of T-cell phenotype andfunction: the T helper type 17 example.*** Immunology2010; 129(2): 147-53.

8- Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. ***IL-17 cytokine family.*** J Allergy Clin Immunol 2004; 114(6): 1265-73.

9- Laurence A, O'Shea JJ. ***T(H)-17 differentiation: of mice and men.*** Nat Immunol 2007; 8(9): 903-5.

10- Manel N, Unutmaz D, Littman DR. ***The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and inductionof the nuclear receptor RORgammat.*** Nat Immunol 2008; 9(6): 641-9.

11- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. ***IL-21 and TGF-beta arerequired for differentiation of human T(H)17 cells.*** Nature 2008; 454(7202): 350-2.

12- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. ***STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatoryhelper T cells.*** J Biol Chem 2007; 282(13): 9358-63.

13- Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, et al. ***Systemicincrease in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but notin preeclampsia.*** J Immunol 2009; 183(11): 7023-30.

14- Wang WJ, Hao CF, Yi Lin, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, et al. ***Increased prevalence of T helper 17 (Th17)cells in peripheral blood and decidua in unexplainedrecurrent spontaneous abortion patients.*** J Reprod Immunol 2010; 84(2): 164-70.

15- Wang WJ, Hao CF, Qu QL, Wang X, Qiu LH, Lin QD. ***Thederegulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing Thelper cells in patients with unexplained early recurrentmiscarriage.*** Hum Reprod 2010; 25(10): 2591-6.

16- Gendron RL, Baines MG. ***Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice.*** Cell Immunol 1988; 113(2): 261-7.

17- Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. ***Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion.Altered profile and pregnancy outcome.*** J Immunol 1996; 156(10): 4027-34.

18- Yamada H, Polgar K, Hill JA. ***Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion.*** Am J Obstet Gynecol 1994; 170(5 Pt 1): 1339-44.

19- Mosmman TR, Coffman RL. ***TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.*** Annu Rev Immunol 1989; 7; 145-73.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

20- Lee SK, Kim JY, Lee M, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. ***Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss.*** Am J Reprod Immunol 2012; 67(4): 311-18.

21- Zenclussen AC. ***Adaptive immune responsesduring pregnancy.*** Am J Reprod Immunol 2013; 69(4): 291-303.

22- Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. ***Interferon gamma contributes toinitiation of uterine vascular modication, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy.*** J Exp Med 2000; 192(2): 259-70.

23- Bulla R, Bossi F, Radillo O, De Seta F, Tedesco F. ***Placental trophoblast and endothelial cells as target of maternal immune response.*** Autoimmunity 2003; 36(1): 11-18.

24- Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Al-Azemi MM,Hassan NA, Bandar A. ***Mitogen-induced cytokine responses ofmaternal peripheral blood lymphocytes indicate a differential Thtypebias in normal pregnancy and pregnancy failure.*** Am J Reprod Immunol 1999; 42(5): 273-8.

25- Hossein H, Mahroo M, Abbas A, Firouzeh A, Nadia H. ***Cytokine production byperipheral blood mononuclear cells in recurrent miscarriage.*** Cytokine 2004; 28(2): 83-6.

26- Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, et al. ***Characterization of type 1 and type 2 cytokineproduction profile in physiologic and pathologic human pregnancy.*** Clin Exp Immunol 1996; 106(1): 127-33.

27- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E. ***Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placentalantigens in normal humanpregnancy and unexplained recurrentspontaneous abortions.*** Cell Immunol 199; 196(2): 122-30.

28- Wilson R, Moor J, Jenkins C, Miller H, Walker JJ, McLean MA, et al. ***Abnormal first trimester serum interleukin 18 levels are associatedwith a poor outcome in women with a history of recurrentmiscarriage.*** Am J Reprod Immunol 2004; 51(2): 156-9.

29- Liu YS, Wu L, Tong XH, Wu LM, He GP, Zhou GX, et al. ***Study on therelationship between Th17 cells andunexplained recurrent spontaneous abortion.*** Am J Reprod Immunol 2011; 65(5): 503-11.

30- Lee SK, Kim JY, Hur SE, Kim CJ, Na BJ, Lee M, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. ***An imbalance in interleukin-17-producing T andFoxp3+ regulatory T cells in women with idiopathic recurrentpregnancy loss.*** Hum Reprod 2011; 26(11): 2964-71.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]

Evaluation of Th1 and Th17 cells cytokines in cell culture stimulated in women with recurrent spontaneous abortion

*Varghaiyan Y(MSc)[1], Hadinedoushan H(PhD) [*2], Aflatoonian A(MD)[3], Mirghanizadeh SA(MSc)[4], Najafi S(MSc)[5]*

[1,2,4,5]*Department of Medical immunology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[3]*Department of Obstetrics and Gynecology, Research and Clinical Centre for Infertility, Shahid Sadoughi University Medical Sciences, Yazd, Iran*

Received: 18 Feb 2013 ***Accepted:*** 13 Jun 2013

Abstract

Introduction: Various immunological abnormalities have been reported in women with RSA of unknown aetiologies including autoimmune abnormalities and increased cellular immunity such as elevated natural killer (NK) , Th1 and Th17 cell levels. Th17 and Th1 cells play a central role during inflammation. Th1 cells product cytokines IFN-γ, IL-2 and Th17 cells mainly cytokines IL-17A, F, IL-22. The aim of this study is evaluation of Th1 and Th17 activity in women with recurrent spontaneous abortion.

Methods: In this case-control study, 30 women with history of two or more abortion who at least 3 months past after last abortion considered as case group and 30 normal fertile healthy women with at least one delivery as control group. We determined the levels of IL-17A, F and IFN-γ in cell culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with the mitogen phytohemagglutinin (PHA) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method and compared in the two groups. The results obtained using the one-sample kolmogorov-smirnov Test, Kruskal-wallis Test and Spearman were analyzed using SPSS 16 software.

Results: The level of IFN- γ in case group was significantly higher than control group (186/53±30/41 versus 88/06±21/44 pg/ml, $P < 0.005$). Also the level of IL-17 A, F in case group was significantly higher than control group (84/74±21/26 versus 28/41±8 pg/ml, $P < 0.01$). IFN-γ concentration showed positive correlation with IL-17 A, F in case group ($P=0.015$, $r= 0.455$).

Conclusion: In this study the increased levels of cytokines IFN- γ and IL-17 A, F in women with recurrent spontaneous abortion shows a propensity of pro inflammation via Th17 and Th1 immunity and may be these cells play a pivotal role in rejecting fetus antigens.

Keywords: Recurrent Spontaneous Abortion; Cytokine; Th1; Th17

This paper should be cited as:

Varghaiyan Y, Hadinedoushan H, Aflatoonian A, Mirghanizadeh SA, Najafi S. ***Evaluation of Th1 and Th17 cells cytokines in cell culture stimulated in women with recurrent spontaneous abortion***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(4): 505-13.

Corresponding author: Tel: +98 351 6240691, Email: hhadin@ssu.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-15]