مطالعه تغییردر فاگوسیتوز نوتروفیلها در طول بارداری

دکترعلیرضا زمانی ــ مربی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان

دکتر احمد مسعود ــ استاد ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

علی رغم ایمنی اختصاصی که حین بارداری کاهش می یابد (برای عدم دفع جنین)، قدرت فاگوسیتوز و میکروب کشی نوتروفیلها (ایمنی ذاتی)افزایش می یابد. کاهش ایمنی اختصاصی در مراحل اولیه بارداری است و با پیشرفت آن بحد طبیعی میرسد. اما تغییرات فاگوسیتوز با پیشرفت بارداری بخوبی روشن نیست. برای مطالعه این تغییرات از زنانی که در مراحل مختلف بارداری (۱۵ نفر در سه ماهه اول ، ۱۵ نفر در سه ماهه دوم، و ۱۵ نفر دیگر در سه ماهه سوم) بودند استفاده شد. بعلاوه ۲۰ نفر نیز بعنوان کنترل (غیر باردار) انتخاب شدند. برای آغاز فاگوسیتوز ازسوسپانسیون مخمرکشته و آپسونیزه شده به همراه نوتروفیلها استفاده شد. در اثربلع مخمرها توسط نوتروفیلها و ایجاد انفجار تنفسی، مواد اکسیدانت آزاد میشوند که این مواد در حضور لومینول تولید نوری میکنندکه مقدار آن با میزان این مواد متناسب است. نور تولید شده توسط لومینومتر (تکنیک کمیلومینسانس) اندازه گیری شد. حداکثر نور ساطع شده بعنوان شاخصی از سرعت و قدرت فاگوسیتوز مورد توجه قرار گرفته است. نتایج بدست آمده نشان میدهند در سه ماهه اول و دوم بارداری فاگوسیتوز افزایش یافته ($p < ۰/۰۵$) ولی در سه ماهه سوم فاگوسیتوز افزایشی را ($p < ۰/۰۵$) نشان نمی دهد. بنظر می رسد عوامل هورمونی و سرمی مسئول چنین تغییراتی هستند.

واژه های کلیدی : کمیلومینسانس - فاگوسیتوز - بارداری

آدرس مکاتبه : همدان- دانشگاه علوم پزشکی- دانشکده پزشکی- گروه پاتوبیولوژی- کدپستی ۶۵۱۷۷ تلفن ۸-۵۶۲۹۶ داخلی ۲۳۸

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

حین بارداری، ایمنی اختصاصی، خصوصاً ایمنی سلولی تضعیف میشود. عواملی چون PAG (Pregnancy associated glycoprotein)، α2–PAG، PAM (Pregnancy associated molecules)، PZP (Pregnancy zone protein)، TSF (Trophoblastic suppressor factor)، HPL(Human placental lactogen)، 1,25 Dihydroxy Vit D3 و EASF (Embryo-associated suppressor factor) از جفت ترشح شده و باعث سرکوب سیستم ایمنی میشوند. از عوامل سرکوبگر دیگر میتوان از AFP (α-fetoprotein)، ASF (Afferent suppressor factor)، SIF (Suppressor inducing factor)، NK IF (Natural killer Inhibitor Factor)، CTL IF (Cytotoxic T-lymphocyte inhibitor factor) ، TBG (Thyroid binding globulin)، HCG (Human chorionic gonadotropin)، PAPPc (Pregnancy associated plasma protein-c)، β1–Glycoprotein، CSF (Colony stimulating factor)، TGF-β (Transforming growth factor-β)، FDGF (Follicular deriaved growth factor)، EPC (Ecto placental cones)، E2 و پروژسترون را نام برد. عوامل فوق از طریق اثر بر روی سلولهای T و ماکروفاژها باعث این اعمال میشوند. بعلاوه بین جایگزینی موفقیت آمیز جنین و تولید مواد فوق رابطه مستقیم وجود دارد. در صورت آزاد نشدن مواد فوق الذکر بارداری منجر به سقط خواهد شد(۴،۵،۷،۸،۹،۱۱).

درزنان باردارتعداد لکوسیتها و نوتروفیلها بیشتر از افراد غیر باردار بوده، کیموتاکسی آنها کاهش یافته و کمپلمان نیز از طریق آلترناتیو فعال است. بعلاوه حین بارداری تحت تأثیر عوامل خاصی همانند افزایش هورمون تیروکسین، هورمونهای جفتی، هورمونهای تخمدان و hCG فاگوسیتوز افزایش می یابد(۱،۱۳). ولی با پیشرفت بارداری عوامل فوق نیز به مرور کاهش می یابند و بنظر میرسد که افزایش فاگوسیتوز نیز فقط در ماههای اولیه بارداری اتفاق افتد و بمرور زمان بحد طبیعی افراد غیر باردار برسد. ولی متاسفانه تا کنون مطالعه ای در این زمینه صورت نگرفته است و اگر یکی دو مطالعه هم بوده نتایج آنها با هم متناقض هستند(۶). بنابر این ما این فعالیت را در ۳ ماهه اول، دوم و سوم مورد مطالعه قرار دادیم. نوتروفیلها از نظر تعداد بسیار فراوان هستند و بطور متوسط ۷۰-۶۰ درصد کل لکوسیتهای خون محیطی را تشکیل میدهند. این سلولها بعد از تولید در مغز استخوان و گذشت مدت زمانی کوتاه فعالیتهای فاگوسیتوزی و ضد میکروبی خود را شروع می کنند. اکثراً نوتروفیلها دارای هسته ۵-۳ قسمتی هستند. نوتروفیلها در اثر تحریک باعث ایجاد انفجارتنفسی، فعال شدن شنت هگزوزمنو فسفات(HMS)، مصرف اکسیژن، و در نهایت تولید بنیانهای چون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن، اکسیژن منفرد و..... می شود. بعلاوه انفجار تنفسی در نوتروفیلها بهمراه افزایش مصرف اکسیژن، تولید سوپر اکسیژن و پخش نور است. در تکنیک کمیلومینسانس روند تولید نور مشابه فلورسانس است ولی با این تفاوت که در آن مواد مسئول تولید نور انرژی آزاد شده توسط مواد شیمیائی را جذب نور تابش میکند (کمیلومینانس طبیعی). برای تقویت این نور میتوان از مواد مختلفی چون لومینول (5-amino-2,3 dihydro-1,4-phthalazindione) استفاده کرد که یک ماده سنتیتیک است و در اثر اکسیداسیون توسط مواد اکسیدانت یا رادیکالهای آزاد تولید نور می کند. بااندازه گیری حداکثر نور تولید شده در طی واکنش میتوان از آن برای سنجش ترکیبات اکسید کننده استفاده کرد. طول موج نور ساطع شده ۴۲۵ نانومتر است (۲). که آن را دستگاه لومینومتر بر حسب *mv* (میلی ولت) اندازه گیری می کند. از طریق کنترل میزان نور تولید شده توسط لومینومتر می توان پیشرفت روند فاگوسیتوز، نقایص پروسه آپسونیزاسیون و اختلال عملکردلکوسیتی دریک فرد را مطالعه کرد. بنظر می رسد

Downloaded from http://www.jri.ir

کمیلومینانس تشدید شده توسط لومینول یک تکنیک آنالیتیک مؤثر برای مطالعه فاگوسیتوز در افراد سالم باشد. هدف تحقیق بررسی تغییرات فاگوسیتوز در طول بارداری است.

روش کار

در این تحقیق از روش کمیلومینسانس نوتروفیلها استفاده شد. محرک نوتروفیلها مخمر نانوائی (Baker's yeast) آپسونیزه شده توسط سرم تازه افرادسالم (۵ الی ۶ نفر) با گروه خونی AB (Fresh AB pooled serum) بود. برای تشدید نور ساطع شده (توسط نوتروفیلها) از لومینول استفاده شد(۱،۱۲). نمونه های این تحقیق شامل زنان بارداری که (۱۵ نفر در سه ماهه اول ۱۵ نفر در سه ماهه دوم و ۱۵نفر در سه ماهه سوم) که به درمانگاه پره ناتال و آزمایشگاه بیمارستان میرزا کوچک خان تهران مراجعه کرده بودند، گروه شاهد نیز شامل خانمهائی سالم (۲۰نفر) که در سن باروری بوده و دارای سیکل قاعدگی طبیعی بودند(جدول۲). برای جدا کردن نوتروفیلها حدود ۵ الی ۱۰ میلی لیتر خون توسط سرنگ ml ۲۰ هپارینه از هر نفر کشیده شد. سپس هم حجم خون داخل همان سرنگ، دکستران ۶٪(با وزن ملکولی ۵۰ تا۱۵۰ هزار وزن / حجم در نرمال سرم) اضافه شد. بعد از مخلوط کردن محتویات داخل آن سرنگ در حرارت اتاق طوری قرار داده میشد که نوک سوزن به سمت بالا قرار گیرد. پس از گذشت ۴۵ دقیقه، قسمت بالای سرنگ که سرشار از لکوسیت بود با دقت و کج کردن سر سوزن بداخل لوله پلاستیکی خالی میشد. سپس لوله های پلاستیکی به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. در مرحلهٔ بعدی محلول روئی با ساکشن بیرون کشیده می شد. وجود گلبولهای قرمز احتمالی با محلول لیز کننده از بین رفت و بعد از چندین بار شستشو، سلولهای لکوسیت آماده بودند. در انتها با استفاده از لام نئوبار و توجه به شکل نوتروفیل و لنفوسیت ها، درصد هر کدام از آنها مشخص شد. سپس سوسپانسیونی از نوتروفیلها با غلظت (۵×۱۰^{۶}) عدد نوترفیل در هر میلی لیتر تهیه شد. لنفوسیتها نیز در محیط وجود دارند ولی غلظت آنها در نظر گرفته نشده است. این سوسپانسیون بایستی حداکثر در مدت چند ساعت اول مورد استفاده قرار گیرد. چون طول عمر نوتروفیلها محدود است. برای کنترل درصد سلولهای ائوزینوفیل و بازوفیل نیز که جزو نوتروفیلها جدا شده بودند از رنگ آمیزی رایت – گیمسا استفاده شد و مقدار آنها از کل سلولهای PMN کسر شدتا اینکه مقدار خالص نوتروفیلها به غلظت مورد نظر(۵×۱۰^{۶}) برسد(۳). برای تهیه مخمر آپسونیزه شده، مخمر را در بافر PBS ریختم و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش حرارت دادیم تا اینکه غیرفعال شوند بعد ازاین مدت آنرا ۳ بار با بافر PBSشستشو دادیم. در نهایت سوسپانسیونی از مخمرها با غلظت (۲×۱۰^{۸}) مخمر درهر میلی لیتر PBS تهیه شد. برای آپسونیزاسیون مخمرها مقدار۱۰۰ میکرولیتر سرم تازه AB با ۹۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد. عمل فوق باید درست قبل از انجام آزمایش، محلول ذخیره آن را با حل کردن ۱/۷۷*mg* لومینول دریک میلی لیتر DMSO (Dimethyl Sulphoxide) تهیه کردیم ($۱۰^{-۲}$ M) سپس قبل از آزمایش محلول را به نسبت ۱ به ۱۰۰ ($۱۰^{-۴}$ M) یا به ($۱۰^{-۵}$ M) بافر رقیق کردیم تا محلول کار تهیه شود. در هر آزمایش از یک یا دو بافر نرمال نیز نمونه گیری شد و مراحل جداسازی نوتروفیلها و انجام آزمایش بر روی آنها همراه با نمونه بیماران انجام شد. تا به این ترتیب شرایط و نحوه آزمایش برای افراد طبیعی و بیمار یکسان باشد. برای انجام آزمایش مواد، سلولها و مخمر آپسونیزه شده را طبق جدول شماره ۱ در کووتهای پلاستیکی یکبار مصرف مخصوص دستگاه لومینومتر ریخته و پس از

Downloaded from http://www.jri.ir

قرار دادن در محفظه مخصوص دستگاه لومینومتر شدت نور تولید شده را برحسب میلی ولت در فواصل زمانی یک دقیقه به یک دقیقه ثبت شد.

معرفها	نمونه	شاهد A	کنترل	شاهد B
محلول کار لومینول	۷۰۰ µl	۷۰۰ µl	۷۰۰ µl	۷۰۰ µl
سوسپانسیون مخمر آپسونیزه شده با سرمهای گروه خونی AB	۲۰۰ µl	-----	۲۰۰ µl	-----
بافر PBS	-----	۲۰۰ µl	-----	۲۰۰ µl
نوتروفیلهای حاصل از نمونه ها (۵×۱۰^{۶})	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl	-----	-----
نوتروفیلهای حاصل از افراد کنترل (۵×۱۰^{۶})	-----	-----	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl

جدول شماره ۱- روش انجام آزمایش کمیلومینانس

نمونه ها	تعداد	میانگین سنی	SD	میانگین N-CL/mv	SD
سه ماهه اول	۱۵	۲۹/۳	۶/۵	۲۵۴	۶۵/۳
سه ماهه دوم	۱۵	۲۸/۴	۶/۳	۲۰۶	۷۲/۶
سه ماهه سوم	۱۵	۳۴	۶/۳	۱۶۶	۴۸/۷
خانمهای باردار (کل)	۴۵	۳۰/۷	۶/۶	۲۰۹/۱	۷۱/۶۶
افراد کنترل	۲۰	۳۱/۸	۶	۱۵۲/۶	۴۹/۴

جدول شماره ۲- پراکندگی سنی نمونه ها و افراد کنترل

نتایج

جداول شماره ۳،۴ و ۵ به همراه نمودارهای ۱و۲ میانگین N-CL را بر حسب میلی ولت نشان میدهند. مقایسه این داده ها با یکدیگر و استفاده از آزمونهای آنالیز واریانس و t-Test نشان میدهند که اولاً: فاگوسیتوز در زنان باردار نسبت به افراد کنترل افزایش یافته است . ثانیاً: در سه ماهه اول (با $p< ۰/۰۱$) و در سه ماهه دوم نیز (با $p< ۰/۰۵$) فاگوسیتوز(N-CL) افزایش یافته است. درصورتی که درسه ماهه سوم ($p< ۰/۰۵$) چنین ادعائی را نمی توان داشت. بعلاوه افزایش N-CL در سه ماهه اول چشمگیرتر از سه ماهه دوم است.

Downloaded from http://www.jri.ir

شماره	سن	طول بارداری	(N-CL/mv)
۱	۳۴	ماه اول	۴۰۱
۲	۲۳	ماه اول	۱۹۶
۳	۲۶	ماه اول	۳۳۸
۴	۳۶	ماه اول	۲۵۱
۵	۳۲	ماه دوم	۲۶۰
۶	۳۴	ماه دوم	۲۰۸
۷	۱۸	ماه دوم	۲۴۳
۸	۳۱	ماه دوم	۲۸۳
۹	۳۲	ماه دوم	۱۸۸
۱۰	۱۷	ماه دوم	۱۴۵
۱۱	۲۴	ماه دوم	۲۴۱
۱۲	۳۹	ماه سوم	۳۱۱
۱۳	۳۱	ماه سوم	۲۵۷
۱۴	۲۸	ماه سوم	۳۶۱
۱۵	۳۴	ماه سوم	۲۴۰

جدول شماره ۳ – ارزیابی فاگوسیتوز نوتروفیلها برای خانمهای باردار در سه ماهه اول (FT)

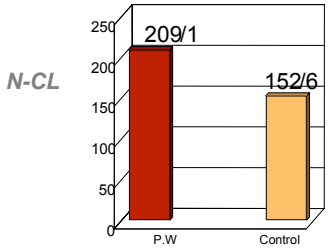
شماره	سن	طول بارداری	(N-CL/mv)
۱	۲۹	ماه چهارم	۱۰۶
۲	۱۹	ماه چهارم	۲۲۰
۳	۳۱	ماه چهارم	۱۲۹
۴	۲۹	ماه چهارم	۱۸۱
۵	۲۷	ماه چهارم	۲۶۷
۶	۳۸	ماه پنجم	۱۰۰
۷	۲۹	ماه پنجم	۳۲۱
۸	۲۲	ماه پنجم	۳۰۹
۹	۲۰	ماه پنجم	۱۸۱
۱۰	۲۵	ماه پنجم	۱۵۹
۱۱	۲۳	ماه پنجم	۲۲۰
۱۲	۴۰	ماه ششم	۱۹۲
۱۳	۳۵	ماه ششم	۱۸۱
۱۴	۳۳	ماه ششم	۳۲۶
۱۵	۳۱	ماه ششم	۲۰۳

جدول شماره ۴ – ارزیابی کمی فاگوسیتوز نوتروفیلها برای خانمهای باردار در سه ماهه دوم (ST)

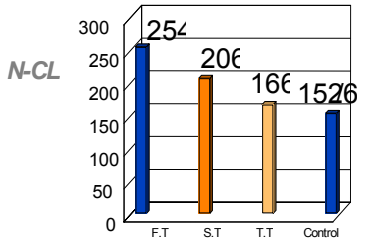
شماره	سن	طول بارداری	(N-CL/mv)
۱	۳۲	ماه هفتم	۲۰۷
۲	۳۵	ماه هفتم	۱۲۲
۳	۳۹	ماه هشتم	۱۹۶
۴	۳۸	ماه هشتم	۱۵۳
۵	۴۱	ماه هشتم	۳۰۱
۶	۳۵	ماه هشتم	۱۳۸
۷	۴۴	ماه هشتم	۹۰
۸	۳۶	ماه هشتم	۱۴۲
۹	۲۵	ماه نهم	۱۷۰
۱۰	۳۸	ماه نهم	۱۷۴
۱۱	۳۵	ماه نهم	۱۷۹
۱۲	۳۷	ماه نهم	۱۵۳
۱۳	۲۵	ماه نهم	۱۱۶
۱۴	۲۲	ماه نهم	۱۸۱
۱۵	۳۰	ماه نهم	۱۶۹

جدول شماره ۵ – ارزیابی کمی فاگوسیتوز نوتروفیلها برای خانمهای باردار در سه ماهه سوم (TT)

نمودار شماره 1 -میانگین N-CL در گروه کنترل و P.W



نمودار شماره 2– میانگین N-CL در گروه کنترل و TT,ST,FT



Downloaded from http://www.jri.ir

بحث

همانطور که مشاهده شد N-CL(فاگوسیتوز) در مراحل اولیه بارداری افزایش قابل توجه ای را نشان میدهد. ولی با پیشرفت بازداری N-CL بحد طبیعی (افراد غیر باردار) می رسد. چونکه خود ایمنی اختصاصی سرکوب است(۱،۱۲،۱۳). این افزایش را نمی توان بعلت کمک آن (سلولهای Th) به ایمنی ذاتی و فاگوسیتها دانست. پس بایستی عوامل دیگری دخیل باشند. در ضمن میدانیم کمپلمان در زنان باردار از طریق آلترناتیو فعال است (۳). و هورمون hCG بعد از جایگزینی تخم و در سه ماهه اول افزایش یافته و به اوج خود می رسد، که سپس کاهش می یابد و در انتها ی حاملگی به کمترین مقدار خود میرسد. پس میتوان گفت عوامل هورمونی و سرمی را در این افزایش فاگوسیتوز دخیل دانست که آنها از دو طریق باعث این عمل میشوند.

الف- افزایش گیرنده ها (رسپتورها) بر روی نوتروفیلها و دیگر فاگوسیتها

ب- افزایش فعالیت مسیرهای MPO,HMS ومتابولیتهائی چون H2O2 و غیره .

ولی بنظر نمی رسد که این افزایش قدرت فاگوسیت ها تأثیر چندانی بر مقاومت افراد در مقابل عفونتها داشته باشد. چون کموتاکسی نوتروفیلها در بارداری مختل است(۳،۱۳). و بنظر می رسد یکی از عوامل عفونتهای دستگاه تناسلی - ادراری در حین بارداری همین کاهش کموتاکسی باشد. البته لازم است مطالعات بیشتری درباره سیستم ایمنی و فاگوسیتهای افرادی که دچار چنین عفونتهائی هستند صورت گیرد.

سپاسگزاری

مؤلفین از کلیه اساتید، مسئولین و کارکنان گروه ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران و بیمارستان میرزا کوچک خان تهران جهت همکاری آنان در اجرای طرح تقدیر و تشکر می کنند .

Downloaded from http://www.jri.ir

References

1. Bio. Orbit company1990. Luminescent analysis. Application note 100
2. Bjorksten, B. Poly morphonuclear leukocyte function during pregnancy. Scanned. Y. immunol. 1978; 8:257-262
3. Colbern and Main Immunology of the maternal-placental interface in normal pregnancy. Seminar in perinatalogy. 1991; 15(3): 196-205
4. Coulam.Carrolyn. B Immunological obstetrics. 1992; First edition
5. Hynes.M.K. ShepleyksCytokine production in first trimester choronic villi. Cell immune 1993.
6. King, H. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. Immunol. Today. 1991; 12(12): 432-435.
7. Kordon. Drouva, S. V Gonadotropin regulation oesterogens and immune system. Horn Res. 1992; 37(sup.3): 11-15
8. Lahita,R.G The effect of sex hormones on the immune system in pregnancy. Am. Journal of Repro. Immunol. 1992; 28: 136-137.
9. MitchellThe role of The phagocyte in host -- parasite interactions. Am. Journal. Obst.Gyncol. 1970; 108(5): 687-697
10. SajiThe fetus as an allograft. Am. Journal. Obstet . Gynecol. 1992; 251-256.
11. Shibaya Study on nonspecific immunity in pregnant persons Is Journal Of Repro immune.(AJRI). 1991; 26: 76-81.
12. William's. Cunnigham, F. G. William's obstetrics. 1993; 19th edition.

Downloaded from http://www.jri.ir