

افزایش سلولهای NK در دسیدوای زنان مبتلا به سقط مکرر

مهری غفوریان بروجرد نیا (Ph.D.)^۱، زهره آموزگاری (M.S.)^۲.

۱- استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی، اهواز، اهواز، ایران.

۲- مربی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

مکانیسم های ایمنولوژیکی مختلفی در نگهداری و حفظ بارداری شرکت می کنند. ولی تا کنون مکانیسم هایی که مانع از واکنش های منجر به سقط می شوند بخوبی شناخته نشده اند. لکوسیت ها بخش عمده ای از سلولهای استرومای اندومتریوم رحم را تشکیل می دهند و سلولهای NK کلاسیک بعنوان یک عامل ایمنولوژیک در سقط مکرر مطرح شده است. در این مطالعه به منظور روشن شدن نقش ایمنولوژیک سلولهای NK کلاسیک در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی با اتیولوژی نامعلوم در سه ماهه اول بارداری انجام گرفت. این جمعیت لکوسیتی در سی نمونه از بافت های دسیدوای زنان مبتلا به سقط مکرر (گروه آزمون) بررسی و با سی نمونه از بافت های دسیدوای زنان تحت عمل سقط درمانی (گروه شاهد)، مقایسه گردید. از نمونه های بافت اندومتر دو گروه مقاطع بافتی پارافینی تهیه و با آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی علیه مارکر CD57 با روش استریت آویدین-بیوتین پراکسیداز رنگ آمیزی شدند. سلولهای NK دارای مارکر CD57 در مقاطع بافتی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر توسط میکروسکپ نوری مورد بررسی و شمارش قرار گرفت. آزمون آماری Z test جهت مقایسه جمعیت NK در دو گروه آزمون و شاهد بکار برده شد. نتایج نشان داد سلولهای NK دارای مارکر CD57 در بافت های دسیدوا طبیعی و سقط خود بخودی بطور پراکنده بین سلول های استروما حضور دارند. تعداد این سلولها در بافت های دسیدوای طبیعی کم می باشد، اما در زنان مبتلا به سقط خودبخودی بطور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد ($P < 0.003$). بنظر میرسد سلولهای NK در سه ماهه اول بارداری نقش کلیدی در سقط مکرر خودبخودی داشته باشد. احتمالاً سلولهای NK کلاسیک توسط سیتوکاین های موضعی فعال شده و با حمله به سلولهای تروفوبلاست جفت در فرایند سقط خودبخود شرکت می کنند.

گل واژگان : سلولهای NK کلاسیک، سقط مکرر، مطالعه ایمنو هیستوشیمی، دسیدوا و CD57.

آدرس مکاتبه: دکتر مهری غفوریان بروجردنیا، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی

اهواز، صندوق پستی ۱۸۹، اهواز، ایران.

پست الکترونیک: ghafourianb@yahoo.com

مقدمه

علیرغم اختلاف در آنتی‌ژنهای HLA بین مادر و جنین، بارداری با موفقیت حاصل می‌شود. جهت حفظ بارداری واکنش‌های اختصاصی متعددی بین مادر و جنین برقرار می‌شود بطوریکه بهم خوردن و عدم تعادل این واکنش‌ها منجر به سقط بویژه در سه ماهه اول بارداری می‌گردد. سقط خودبخودی جنین در زنان باردار بعنوان یکی از مشکلات اساسی در جوامع بشری محسوب می‌شود بویژه در کشورهای که تداوم بنای خانواده یک اصل به شمار می‌رود. بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده تقریباً ۲۰-۱۰ درصد موارد بارداری در سه ماهه اول منجر به سقط می‌شوند (۱). سقط خودبخودی را می‌توان به انواعی شامل: تهدید به سقط^۱، سقط غیر قابل اجتناب^۲، سقط ناقص^۳، سقط کامل^۴، سقط فراموش شده^۵ و سقط مکرر^۶ تقسیم نمود. سقط مکرر عبارت از تشخیص بالینی وقوع سه مورد یا بیشتر سقط می‌باشد. تقریباً از هر ۳۰۰ مورد بارداری یک مورد سقط خود به خودی رخ می‌دهد (۱). عوامل اتیولوژیک زیادی برای سقط مکرر ارائه شده است که از جمله می‌توان به اختلالات کروموزومی در دوران بارداری اشاره نمود. معمولاً نارسایی و یا افزایش برخی از هورمون‌ها قبل از هفته دهم بارداری نیز منجر به سقط می‌شود. عوامل عفونی، ایمونولوژیک و محیطی نیز از عوامل سقط در سه ماهه اول می‌باشند، این عوامل حتی ممکن است در تمامی مدت بارداری منجر به سقط گردند (۲).

تئوریهای ایمونولوژیک متعددی برای توجیه سقط مکرر در حیوانات و انسان مطرح شده است، یکی از آنها تغییر وضعیت و عملکرد لکوسیت‌ها در بافت دسیدوای زنان مبتلا به سقط می‌باشد (۳-۵). پیشرفت‌های گسترده در

زمینه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و تکنیک‌های بیولوژی مولکولی اطلاعات ما را درباره جمعیت‌های مختلف لکوسیتی موجود در دسیدوای انسان گسترش داده است. لکوسیت‌ها ترکیب عمده‌ای از سلولهای استرومای اندومتریوم رحم را تشکیل می‌دهند. نسبت این لکوسیت‌ها در طی مراحل سیکل قاعدگی افزایش می‌یابد بطوریکه در سه ماهه اول بارداری به ۴۰-۳۰ درصد می‌رسد. در ترکیب لکوسیتی دسیدوا در سه ماهه اول بارداری، سه گروه اساسی شامل ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T و یک جمعیت غیر معمول بنام لنفوسیت‌های گرانوله اندومتریوم (eGL)^۷ حضور دارند. لنفوسیت‌های B و لنفوسیت‌های NK کلاسیک با مارکرهای CD16, CD57, CD56 نیز در استرومای اندومتریوم مشاهده می‌شود (۸-۶).

در سالهای اخیر بررسی‌های زیادی در رابطه با جمعیت‌های مختلف لکوسیتی دسیدوای زنان مبتلا به سقط خودبخودی صورت گرفته است و سلولهای NK بعنوان یکی از عوامل ایمونولوژیک در سقط مکرر مطرح می‌باشند (۹، ۳-۲). مطالعات انجام شده در موشهای نژاد CBA/j × DBA/2 نشان می‌دهد که سلولهای NK نقش کلیدی را در سقط خودبخودی ایفا می‌کنند. مهار و یا افزایش فعالیت سلول‌های NK سبب کاهش و افزایش تعداد سقط‌ها می‌شود (۱۰). براساس تحقیقات انجام شده، در سه ماهه اول بارداری درصد کمی از لکوسیت‌ها در دسیدوای طبیعی متعلق به سلولهای NK است (۶). سلولهای NK ۱۵-۱۰٪ لکوسیت‌های خون محیطی را تشکیل می‌دهند. براساس برخی از گزارشات در سقط مکرر نسبت به بارداری طبیعی تغییر قابل توجهی در تعداد سلولهای NK مشاهده نمی‌شود (۱۱). در حالیکه افزایش قابل توجهی در سلولهای NK بافت دسیدوا در سه ماهه اول بارداری نیز گزارش داده است (۹). مطالعه حاضر به منظور روشن شدن وضعیت

- 1- Threatened abortion
- 2- Inevitable abortion
- 3- Incomplete abortion
- 4- Complete abortion
- 5- Misses abortion
- 6- Recurrent abortion

7- endometrium Granule Lymphocyte

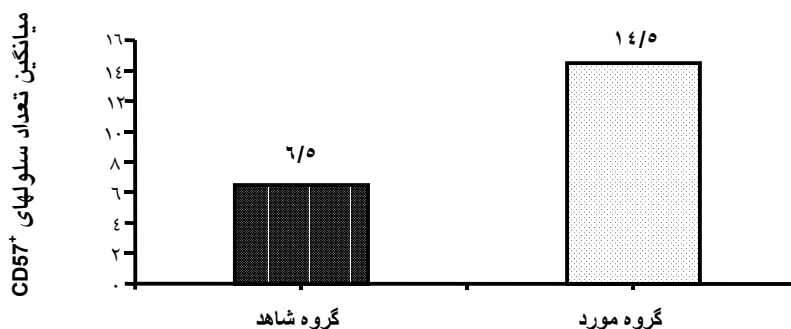
سلولهای NK کلاسیک، طراحی شد. هدف از مطالعه حاضر بررسی لنفوسیت‌های NK کلاسیک در سه ماهه اول بارداری در بافت دسیدوای زنان مبتلا به سقط خودبخودی و مقایسه آن با بافت دسیدوای حاصل از سقط درمانی در همان دوره از بارداری می‌باشد، آیا در این دو گروه تفاوتی در توزیع و تعداد این نوع از لکوسیتها وجود دارد؟ بدین ترتیب نقش ایمونولوژیک این سلولها در جریان سقط بیشتر مشخص خواهد گردید.

مواد و روشها

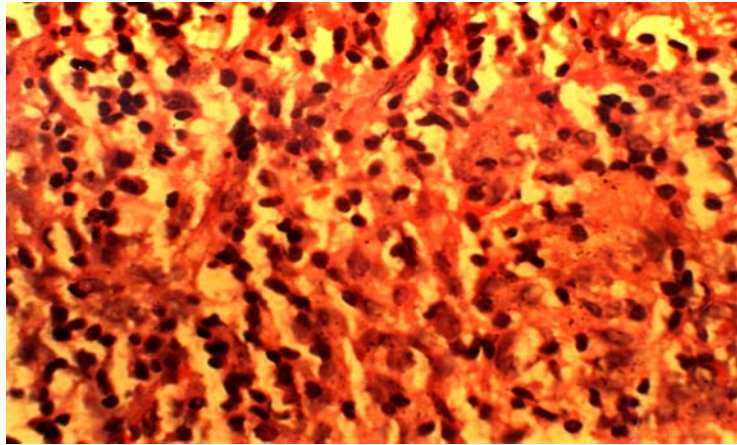
مواد لازم: آنتی بادی مونوکلونال علیه مارکر CD57 (آنتی بادی اولیه) به منظور نشاندارکردن سلولهای NK کلاسیک انسان، آنتی بادی بیوتینه شده بر علیه ایمونوگلوبین موش با منشأ خرگوشی (آنتی بادی ثانویه) و ترکیب استرپت آویدین-بیوتین پراکسیداز از شرکت DAKO (دانمارک) خریداری گردید.

جمع‌آوری بافتها: ۴۸ نمونه از بافتهای جفت و دسیدوای خانمهای گروه سنی ۱۹-۴۲ سال در طی مدت سه سال جمع‌آوری گردید. این افراد بطور انتخابی جمع‌آوری گردیدند که در سه ماه اول بارداری تحت عمل سقط درمانی در بیمارستان امام خمینی شهرستان اهواز قرار

گرفته بودند. از بین این تعداد ۳۰ نمونه دارای بارداری طبیعی بین ۱۲-۸ هفتگی به عنوان گروه شاهد، انتخاب گردید. اکثر این افراد صاحب فرزند بوده و سابقه سقط خودبخودی نداشتند. پس از تشخیص ظاهری، قطعات دسیدوا از محتویات بارداری جدا گردید و در بافر فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید. ۸۷ نمونه از بافتهای جفت و دسیدوا خانمهایی در همان گروه سنی (۱۹-۴۲ سال) که در سه ماه اول بارداری دچار سقط خود بخودی شده بودند بطور تصادفی در بیمارستان امام خمینی شهرستان اهواز در طی مدت سه سال جمع‌آوری شد و مورد بررسی قرار گرفت. از بین این نمونه‌ها، سی نفر از زنان با سه مورد پشت سر هم یا بیشتر سقط خودبخودی و فاقد فرزند زنده در بین ۱۲-۸ هفتگی انتخاب گردید (گروه آزمون). این زنان فاقد ناهنجاریهای آناتومی و یا عفونت در رحم خود بوده و علت سقط آنها قابل توجه نبود. قطعات دسیدوا پس از تشخیص ظاهری از محتویات بارداری جدا و در بافر فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید. علاوه بر بافتهای تهیه شده فوق، نمونه‌هایی از بافتهای لوزه به عنوان کنترل مثبت از اتاق عمل بیمارستان امام خمینی شهرستان اهواز تهیه و در بافر فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید. پس از فیکساسیون و قالب گیری در پارافین، از نمونه‌های بافتی جهت بررسی



نمودار ۱- سلولهای NK کلاسیک در دسیدوا طبیعی سقط درمانی و زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی در سه ماهه اول بارداری

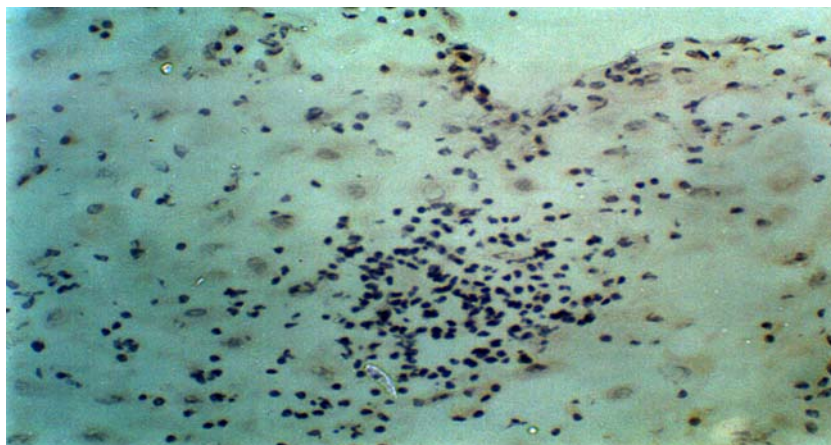


شکل ۱- مقاطع بافتی تهیه شده از دسیدوا طبیعی سه ماهه اول بارداری، رنگ آمیزی شده با روش H&E

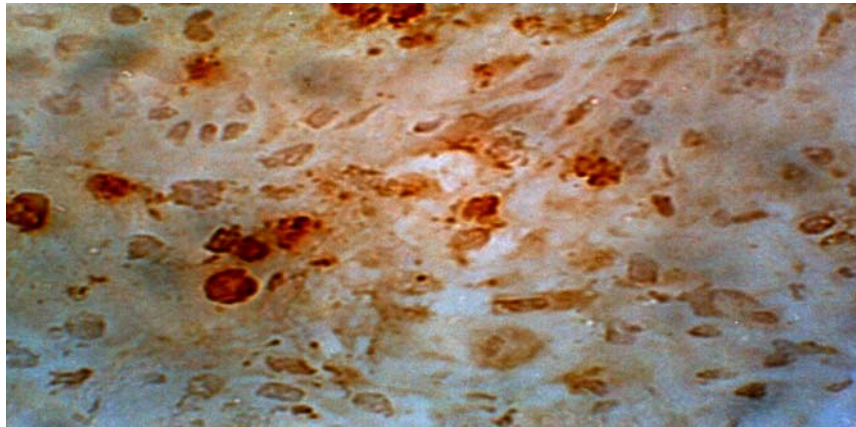
تغییر می‌دهد. مقاطع بافتی بعد از شستشو با آب مقطر جهت آگیری در غلظت‌های افزایشی در الکل اتیلیک و سپس جهت شفاف شدن در گزیلول و سرانجام با چسباندن لامل روی آنها بوسیله چسب انتلان مورد ارزیابی میکروسکپی قرار گرفتند.

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی: جهت تشخیص سلولهای NK در نمونه‌های طبیعی و پاتولوژیک رنگ آمیزی با روش استرپت آویدین-پراکسیداز بر روی مقاطع پارافینی بافت دسیدوا انجام شد. ابتدا مقاطع بافت

میکروسکپی مقطعی به ضخامت ۳ میکرون تهیه گردید. رنگ آمیزی H&E: رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) جهت حذف نمونه‌های بافتی که دچار التهاب و نکروز شده بودند بر روی همه مقاطع بافتی انجام شد. ابتدا مقاطع بافتی در محلول هماتوکسیلین قرار داده شد و پس از شستشو با آب جاری، در محلول ائوزین قرار گرفتند. هماتوکسیلین هسته سلول‌ها و سایر ساختمانهای اسیدی را به رنگ آبی در می‌آورد، در حالیکه ائوزین، سیتوپلاسم را به رنگ قرمز صورتی



شکل ۲-مقاطع بافتی تهیه شده از دسیدوا طبیعی سه ماهه اول بارداری بدون آنتی‌بادی مونوکلونال اولیه رنگ آمیزی شده به روش ایمونوهیستوشیمیایی استرپت آویدین-بیوتین-پراکسیداز



شکل ۳- مقاطع بافتی تهیه شده از دسیدوا طبیعی سه ماهه اول بارداری با آنتی بادی مونوکلونال علیه مارکر CD57 رنگ آمیزی شده به روش ایمونوهیستوشیمیایی استرپت آویدین-بیوتین-پراکسیداز

۴۰۰ برابر انتخاب و سلولهای مثبت (سلولهای قهوه‌ای رنگ) شمارش شدند. تعداد سلولهای مثبت برای هر مورد طبیعی و پاتولوژیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین و انحراف استاندارد (SD) مشخص گردید. سپس، از آزمون Z جهت مقایسه میانگین دو گروه استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در آزمون استفاده گردید.

نتایج

مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با روش H&E مورد بررسی پاتولوژیکی قرار گرفت. بر روی نمونه‌های فاقد نکروز و التهاب (شکل ۱) مراحل بعدی رنگ آمیزی انجام گرفت. نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی بر روی مقاطع پارافینی بافت‌های لوزه و نمونه‌های دسیدوا طبیعی و سقط خودبخودی نشان داد که سلولهای NK در همه آنها با تعداد متفاوت به شرح زیر حضور دارد:

رنگ آمیزی مقاطع لوزه: رنگ آمیزی مقاطع لوزه با روش استرپت آویدین-بیوتین-پراکسیداز بدون آنتی بادی اولیه هیچگونه سلول مثبتی را نشان نداد. اما رنگ آمیزی با

پارافینی پس از آبدار شدن در متانول ۳٪ پراکسید انکوبه گردیدند. پس از شستشو مقاطع بافتی با آب مقطر، مراحل انکوباسیون را بترتیب با سرم خرگوش (۲۰ دقیقه)، آنتی بادی مونوکلونال (یک ساعت)، آنتی بادی ثانویه (نیم ساعت) و ترکیب ABC (نیم ساعت) انجام گرفت. شستشو کوتاه با بافر نمکی Tris بعد از هر انکوباسیون انجام و سپس مقاطع بافتی جهت ایجاد رنگ قهوه‌ای در محل مارکر CD57 در معرض محلول کروموژن (۳،۳ دی آمینو بنزیدین تترا هیدروکلراید) قرار گرفتند. جهت مشخص شدن هسته سلولها مقاطع بافتی بعد از شستشو با آب مقطر توسط هماتوکسیلین رنگ آمیزی گردید. سرانجام مقاطع بافتی پس از آگیری و شفاف شدن به کمک چسب انتلان بوسیله لامل پوشانده شد و توسط میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر نوبت کنترل مثبت (لوزه) برای مارکر CD57 و کنترل منفی (حذف آنتی بادی اولیه) گذاشته شد.

آنالیز نتایج: شمارش سلولهای مثبت بر روی تمام نمونه‌های طبیعی و پاتولوژیکی انجام گرفت. برای این کار بر روی هر کدام از مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با مارکر CD57 هشت میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی

1-Standard deviation

آنتی بادی اختصاصی علیه مارکر CD57 نشان داد که سلولهای NK در بافت لوزه حضور دارند. رنگ آمیزی بدون آنتی بادی اولیه: مقاطع بافتی نمونه‌های طبیعی و پاتولوژیکی رنگ آمیزی شده با روش استریت آویدین-بیوتین-پراکسیداز بدون آنتی بادی اولیه نشان داد که هیچ سلولی مثبت نشده است (شکل ۲). رنگ آمیزی با مارکر CD57 (سلولهای NK کلاسیک): تعداد بسیار کمی سلولهای مثبت CD57 بطور پراکنده در بین سلولهای استروما در دسیدوا طبیعی در ۸ میدان میکروسکوپی دیده شد ($0/80 \pm 0/73$) و اطراف غدد و عروق فاقد سلولهای مثبت بود (شکل ۳). توزیع سلولهای NK در بافت‌های دسیدوا سقط خودبخودی با بافت‌های طبیعی اختلافی نداشت. تعداد سلولهای NK کلاسیک در دسیدوای نمونه‌های پاتولوژیک متغیر بود ($12/60 \pm 2$). تعداد سلولهای مثبت در بعضی موارد تقریباً شبیه آنها در نمونه‌های طبیعی بود، اما در موارد دیگر تعداد این سلولها بطور قابل چشمگیری افزایش نشان داد (نمودار ۱). جالب توجه است که اختلاف تعداد سلولهای مثبت بین دو گروه طبیعی و پاتولوژیک از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/003$).

بحث

بررسی وضعیت و عملکرد سلولهای صلاحیت دار ایمنی در بافت دسیدوا بارداری طبیعی و مقایسه آن با این بافت در افراد مبتلا به سقط خودبخودی به ما کمک می‌کند تا فاکتورهای ایمنولوژیک تعیین کننده در ادامه یا خاتمه بارداری را دریابیم. در مطالعه حاضر با روش ایمنو هیستو شیمیایی تعداد بسیار کمی از سلولهای NK کلاسیک (سلولهای دارای مارکر CD57) در دسیدوای طبیعی سه ماهه اول بارداری تشخیص داده شد که این یافته با مطالعات گذشته مطابقت دارد (۱۲). اما سلولهای NK در دسیدوا سقط خودبخودی در مقایسه با سقط‌های درمانی بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان

می‌داد. در این مطالعه نمونه‌های دارای نکروز و التهاب حذف گردید، زیرا این موارد سبب تغییر جمعیت لکوسیت‌ها در بافت می‌شود. افزایش زیاد سلولهای NK در همه موارد پاتولوژیک تشخیص داده نشد. به همین دلیل SD مربوط به نمونه‌های پاتولوژیک در مقایسه با نمونه‌های طبیعی بالاتر بود. با وجود این مسئله اختلاف قابل توجه بود. بنابراین ممکن است که برخی از این سقط‌های مکرر بدلیل افزایش سلولهای NK با مارکر CD57 در دسیدوای زنان مبتلا باشد. در این صورت ممکن است این سلولها به وسیله تولید موضعی سیتوکاین‌ها فعال شده و با تهاجم به سلول‌های تروفوبلاست زمینه سقط را ایجاد می‌کنند. در بافت دسیدوای تعدادی از زنان مبتلا به سقط خودبخودی افزایش سلولهای CD57 مثبت نیز گزارش شده است (۹). آنالیز فلوسیتومتری سلولهای دسیدوا نشان داده است که درصد لنفوسیت‌های گرانول دار دارای مارکر CD57 که سبب افزایش فعالیت می‌شوند (CD69، LFA-1، HLA-DR)، در سقط‌های خودبخودی بیشتر از بارداریهای طبیعی است (۱۲). اما آنالیز فتوتایپینگ بوسیله فلوسیتومتری بر روی لکوسیت‌های اندومتریم زنان مبتلا به سقط مکرر نشان داده است که سلولهای NK در سقط‌های مکرر و طبیعی یکسان هستند. همچنین دسیدوا نرمال سلول‌های NK که $CD16^-$ و $CD56^+$ هستند عمده سلولها را تشکیل می‌دهند ولی در سقط‌های عادی کاهش تعداد این سلولها مشاهده می‌شود (۱۳). لنفوسیت‌های گرانول دار اندومتریم (eGL) که در سه ماهه اول بارداری طبیعی جمعیت قابل توجهی را تشکیل می‌دهند، فنوتیپ غیر معمول و شبیه سلول‌های NK دارند. این سلولها برای CD56 مارکر شناسایی سلول‌های NK بشدت مثبت هستند. اما بیشتر این سلولها فاقد مارکرهای کلاسیک سلولهای NK مانند CD57، CD11b و CD16 هستند (۱۲، ۱۴). این فنوتیپ مانند زیر جمعیتی از سلولهای خونی می‌باشد که حدود

کمتر از ۱٪ از لنفوسیت‌های خون محیطی را تشکیل می‌دهد (۱۵). سه دسته سلولهای NK در خون محیطی تشخیص داده شده است که شامل CD16 منفی، دارای تعداد کم مارکرهای مثبت CD16 و دارای تعداد زیاد مارکرهای مثبت CD16 می‌باشند. احتمالاً این سه نوع سلول منعکس کننده مراحل تمایز سلولهای NK در خون می‌باشند (۱۵). یکی از خواص سلولهای NK سیتوتوکسیسیته آنها بدون وابستگی به مولکول‌های MHC است (۱۶). سلولهای eGL حاصل از دسیدوا سه ماهه اول بارداری توانسته است سبب لیز سلولهای حساس به NK شوند. اما عملکرد NK این سلولها در مقایسه با سلولهای NK خون محیطی پایین است (۱۷). این فعالیت کم ممکن است از خواص ذاتی این سلولها باشد. یکی از خواص سلولهای NK تبدیل شدن به سلولهای LAK^۱ زمانیکه در مجاورت سیتوکین‌هایی نظیر $IFN\ \gamma$, IL-2 قرار می‌گیرد. خاصیت تهاجمی این سلولها نسبت به سلول هدف افزایش چشمگیری پیدا می‌کند و عمل سیتوتوکسیسیته در آنها تشدید می‌یابد (۱۶). این خاصیت در مورد سلول‌های eGL نیز مورد بحث می‌باشد. بعضی از مطالعات نشان داده است که جمعیت eGL بعد از اینکه در مجاورت IL-2 یا $IFN\ \gamma$ قرار می‌گیرد فعالیت لیزکنندگی آنها افزایش نمی‌یابد (۱۷). اما مطالعات دیگر افزایش این فعالیت را در سلولهای گرانول دار در دسیدوا دارای مارکر CD56 نشان دادند (۱۸). در این مطالعه سلول‌های eGL خالص نبوده و تعدادی سلولهای CD16 مثبت و CD56 مثبت (سلولهای NK کلاسیک) همراه آنها بودند که ممکن است از خون وارد بافت شده و یا در خود بافت دسیدوا موجود باشند. Christmas و همکاران، کلون‌هایی را از لنفوسیت‌های دسیدوا را تهیه کردند و نشان دادند که کلونهای CD56⁺, CD16⁺ و CD3⁻ همان سلول‌های NK کلاسیک می‌باشد که دارای فعالیت لیزکنندگی بالایی، علیه سلولهای هدف

می‌باشند، در حالیکه کلونهای CD56⁺, CD16⁺ و CD3⁻ فعالیت سیتوتوکسیک کمتری از خود نشان می‌دهند (۱۹). Deniz و همکاران گزارش کردند که لنفوسیت‌های گرانوله دسیدوا CD16⁺ و CD3⁻ فعالیت توکسیک کمی در مقابل سلولهای هدف NK دارند، در حالیکه این فعالیت در کلونهای لنفوسیت‌های گرانوله دسیدوا⁺ CD16⁺ و CD3⁻ و کلونهای لنفوسیت‌های خون محیطی⁻ CD3⁻ افزایش نشان می‌دهد (۲۰). لنفوسیت‌های گرانوله اندومتر جدا شده از دسیدوا سقط خودبخودی قادر به لیزکردن سلولهای هدف Raji حساس به LAK نبودند. در مقابل eGL جدا شده از دسیدوا سقط درمانی سه ماهه بارداری تقریباً در ۵۰٪ موارد در کشتن سلولهای K562 منجر به شکست شد (۲۱). بنابراین احتمال دارد که فعالیت NK بیان شده در مطالعات دیگر بدلیل حضور جمعیت کوچک سلولهای CD16⁺ (سلولهای NK کلاسیک) باشد. اخیراً یک جمعیتی از لنفوسیتها بنام سلولهای Valpha 14 NKT تشخیص داده شده است که در دسیدوا دوران بارداری تجمع یافته و بدنال تحریک آنها ممکن است در ایجاد سقط خودبخودی نقش داشته باشد که این مطلب به تحقیق بیشتری نیاز دارد (۲۲). بدنال فعال شدن سلولهای کشنده طبیعی قادر به تولید سیتوکین‌های مختلف شامل $IFN\ \gamma$, TNF α , GM-CSF و IL-1 می‌باشند (۲۳-۲۴). حضور این سیتوکین‌های گوناگون در دسیدوا گزارش شده است و بنظر می‌رسد که سلولهای مختلف مسئول ترشح این سیتوکین‌ها باشند (۲۷-۲۵). گزارش شده است که کلونهای مختلف لنفوسیتی CD3⁺ و CD3⁻ در دسیدوا سه ماهه اول بارداری $TGF\ \beta$, $IFN\ \gamma$ و TNF α را ترشح می‌کنند. در صورتیکه کلون‌های لنفوسیتی CD3⁻ از eGL مشتق شده‌اند، مقدار زیادتری $TGF\ \beta$ ترشح می‌کنند (۱۹). سلولهای eGL بدنال جدا شدن از دسیدوا سه ماهه اول بارداری قادر به تولید سیتوکین‌های GM-CSF, M-CSF, ILF, G-CSF و $IFN\ \gamma$ و TNF α می‌باشد (۲۵). تولید

1- Lymphokine Activated Killer cells

ناشی از TH1 و TH2 در فعال شدن سلولهای NK موجود در دسیدوا نقش داشته و اثرات تخریبی بر عملکرد واحد جنینی جفت داشته باشد. بطور خلاصه، برخی از سقطهای مکرر می‌تواند بدلیل افزایش سلولهای NK کلاسیک در بافت دسیدوا زنان مبتلا باشد. ممکن است این سلولها توسط سیتوکاین‌های موضعی فعال شده و به سلولهای تروفوبلاست جفت حمله کنند، در نتیجه در فرایند سقط نقش اساسی داشته باشند. جزئیات بیشتری از نحوه عملکرد سلولهای NK کلاسیک در زنان مبتلا به سقط خودبخودی در سه ماهه اول بارداری لازم است، تا مکانیسمهای مداخله‌گر در فرایند نگهداری بارداری و شکست آن روشن گردد و در نهایت روشهای مناسبی برای درمان سقط مکرر در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اهواز که هزینه انجام این پروژه را تامین نمودند تشکر و قدردانی می‌شود و نیز از سرکار خانم هما شیبانی مربی گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی جهت همکاری ایشان در تهیه نمونه‌ها تشکر می‌شود.

سیتوکین‌های $IL-2$ ، $TNF\alpha$ ، $IFN\gamma$ علیه سلولهای جفت در حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به سقط نشان داده شده است (۲۸). سلولهای تروفوبلاست که بطور طبیعی نسبت به لیز شدن توسط سلولهای NK مقاوم هستند، می‌توانند بوسیله فعال شدن سلولهای NK در پی تماس با $TNF\alpha$ و $IL-2$ از بین بروند (۲۹). فعالیت سیتوتوکسیسیته سلولهای NK بوسیله $TGF\beta$ دو نیز مهار نمی‌شود (۳۰). ۶۰-۷۰ درصد زنان مبتلا به سقطهای مکرر خودبخودی با علت ناشناخته، شواهد پاسخ ایمنی سلولی TH1 غیر طبیعی به آنتی‌ژن‌های تروفوبلاست را نشان می‌دهند. در حالی که کمتر از ۳٪ زنان با سابقه تولید مثل طبیعی، نسبت به همین آنتی‌ژن‌های تروفوبلاستی، ایمنی سلولی TH1 دارند (۳۱-۳۲). مقادیر بیشتر $TNF\alpha$ ، $IFN\gamma$ و $IL-2$ در نمونه سرم زنان دچار سقط مکرر نسبت به زنان شاهد نشان داده شد. نظیر این پاسخ مربوط به سیتوکین‌های TH1 در بارداری‌های ناموفق مدل‌های حیوانی نیز گزارش شده است (۳۳). اخیراً نیز حضور $TNF\alpha$ بطور نامتعادل در زنان مبتلا به سقط مکرر ناشی از فعالیت زیاد TH1 نسبت به سلولهای تروفوبلاست گزارش شده است (۳۴). احتمال دارد بهم خوردن تعادل سیتوکین‌های

References

- 1- Edmons D.K., Lindsay K.S., Miller, J.F., et al. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril.* 1982; 38:447-53.
- 2- Ryan K. J., Berkowitz R.S., Barbieri R.L., et al. *Kistner's Gynecology & Women's Health.* 7th Edition. Published by S.T. Louis, Missouri, Mosby Company. 1999: 396-416.
- 3- Gendron R.L., Baines, M.G. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol.* 1988; 113:261-67.
- 4- Duclos A.J., Haddad E.K., Baines M.G. Presence of activated macrophages in a murine model of early pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 1995; 33:354-66.
- 5- Arck P.C., Hertwig K., Hagen E., et al. 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.
- 6- Bulmer J.N., Morrison L. Longfellow M., et al. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod.* 1991; 6: 791-8.
- 7- Bulmer J. N., Morrison L., Longfellow M., et al. Leukocytes in human decidua: investigation of surface markers and function. *Colloque INSERM.* 1991; 212: 189-96.

- 8- Klentzeris L.D., Bulmer J.N., Warren A., et al. Endometrial lymphoid tissue in the timed endometrial biopsy: morphometric and immunohistochemical aspects. *Am J Obs Gyn.* 1992; 167: 667-74.
- 9- Vassiliadou, N., Bulmer, J.N. 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.
- 10- Gendron R.L., Fakooohri R., Baines M.G. Resumption of CBA/J × DBA/2 mouse conspectuses in CBA/J uteri correlates with faultier of the fetoplacental unit to suppress natural killer cell activity. *J Reprod Fertil.* 1990; 89:277-84.
- 11- Lachspelle M.H., Miron P., Hemmings R., et al. Endometrial T.B. and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. *J Immunol.* 1996; 156: 4027-34.
- 12- King A., Balendran N., Wooding P., et al. CD3-leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56⁺ population. *Dev Immunol.* 1991; 1:169-90.
- 13- Kodama T., Hara T., Okamoto E., et al. Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod.* 1998; 13(4): 1036-43.
- 14- King A., Wellings V., Gardner L. Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol.* 1989, 24:195-205.
- 15- Nagler A., Lanier L. L., Cwirla S., et al. Comparative studies of human FCRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol.* 1989; 43:3183-9.
- 16- Roitt I, Brostoff J., Male D. *Immunology*, 4th Edition, Published by Mosby Company, London. 1996: 22-18.
- 17- Ritson A., Bulmer J. N. Isolation and functional studies of granulated lymphocytes in first trimester human decidua. *Clin Exp Immunol.* 1989; 77: 263-8.
- 18- Ferry B.L., Starkey P.M., Sargent I.L., et al. Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes. *Immunol.* 1990; 70:446-52.
- 19- Christmas S.E., Bulmer J. N., Meager A., et al. Phenotypic and functional analysis of CD3-decidua leukocyte clone. *Immunol.* 1990; 71:182-8.
- 20- Deniz G., Christmas S. E., Brew R., et al. Phenotypic and functional cellular differences between human CD3- decidua and peripheral blood lymphocytes. *J Immunol.* 1994; 152: 4255-61.
- 21- Vassiliadou N., Bulmer J.N. Functional studies of human decidua in spontaneous early pregnancy loss: effect of soluble factors and purified CD56⁺ lymphocytes on killing of natural killer and lymphokine-activated killer-sensitive targets. *Biol Reprod.* 1998; 58(4): 982-7.
- 22- Ito K., Karasawa M., Kawano T., et al. Involvement of decidual valpha14 NKT cells in abortion. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 18; 97(2): 740-4.
- 23- Degliantoni G., Murphy N., Kobayashi M., et al. Natural killer cell derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon *J Exp Med.* 1985;162: 1512-30.
- 24- Jokhi P.P., King A., Loke Y.W. Production of GM-CSF by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Hum Reprod.* 1994; 9:1660-9.
- 25- Saito S., Nishikawa K., Morii T., et al. Cytokine production by CD16- CD56 bright natural killer cells in the human early pregnant decidua. *Int Immunol.* 1993;5: 559-63.
- 26- Hill J.A. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1992; 28:123-6.
- 27- Ghafourian Boroujerdnia M., Chinipradaz R. Early pregnancy decidua as a source of TGF β. *Iranian J Med Sci.* 1998; 23(3&4): 99-104.
- 28- Tangri S.T., Wegmann G., Lin H., et al. Maternal antiplacenta reactivity in natural immunologically mediated fetal resorption. *J Immunol.* 1994; 152: 4903-8.
- 29- Zukerman F.A., Head J.R. Murine trophoblast resist cell mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* 1988; 116:274-80.
- 30- Saito S., Morii T., Enomoto E., et al. The effect of interleukin-2 and transforming growth factor beta2 on the proliferation and natural killer activity of decidual CD16, CD56 natural killer cells. *Cell Immunol.* 1990; 152:605.
- 31- Polgar K., Yacono P.W., Golan D.E. Immune interferon inhibits lateral mobility of a membrane

protein in murine embryos: a potential mechanism for Th1 mediated reproductive failure, Am J Obs Gyn. 1996; 174: 282-7.
32- Hill J.A., Anderson D.J., Polgar K. T helper 1-type cellular immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. JAMA. 1995; 273: 1933-6.

33- Reghopathy R. Th1-type immunity is compatible with successful pregnancy. Immunol Today. 1995;18: 8-482.
34- Hill J.A., Choi B.C. Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure. J Reprod Fertil Suppl. 2000;55: 91-7.