افزایش سلولهای NK در دسیدوای زنان مبتلا به سقط مکرر

مهری غفوریان بروجرد نیا (Ph.D.)[1]، زهره آموزگاری(M.S.)[2].

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

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

چکیده

مکانیسم های ایمونولوژیکی مختلفی در نگهداری و حفظ بارداری شرکت می‌کنند. ولی تا کنون مکانیسم‌هایی که مانع از واکنش‌های منجر به سقط می‌شوند بخوبی شناخته نشده‌اند.لکوسیت‌ها بخش عمده‌ای از سلولهای استرومای اندومتریوم رحم را تشکیل می‌دهند و سلولهای NK کلاسیک بعنوان یک عامل ایمونولوژیک در سقط مکرر مطرح شده است. در این مطالعه به منظور روشن شدن نقش ایمونولوژیک سلولهایNK 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 بافت‌های دسیدوای زنان مبتلا به سقط مکرر (گروه آزمون) بررسی و با سی نمونه از بافتهای دسیدوای زنان تحت عمل سقط درمانی (گروه شاهد)، مقایسه گردید. از نمونه‌های بافت اندومتر دو گروه مقاطع بافتی پارافینی تهیه و با آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی علیه مارکر CD57 با روش استرپت آویدین –بیوتین پراکسیداز رنگ آمیزی شدند. سلولهای NK دارای مارکرCD57 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 مارکرCD57 در بافت‌های دسیدوا طبیعی و سقط خود بخودی بطور پراکنده بین سلول‌های استروما حضور دارند. تعداد این سلولها در بافت‌های دسیدوای طبیعی کم می‌باشد، اما در زنان مبتلا به سقط خودبخودی بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد($P<0/003$). بنظر میرسد سلولهای NK در سه ماهه اول بارداری نقش کلیدی در سقط مکرر خودبخودی داشته باشد. احتمالاً سلولهای NK کلاسیک توسط سیتوکاین‌های موضعی فعال شده و با حمله به سلولهای تروفوبلاست جفت در فرایند سقط خودبخود شرکت می‌کنند.

گل واژگان : سلولهای NK کلاسیک، سقط مکرر، مطالعه ایمونوهیستوشیمی، دسیدوا وCD57.

آدرس مکاتبه: دکتر مهری غفوریان بروجردنیا، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اهواز، صندوق پستی ۱۸۹، اهواز، ایران.

پست الکترونیک:ghafourianb@yahoo.com

Downloaded from http://www.jri.ir

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 کشورهایی 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[1]، سقط غیر قابل اجتناب[2]، سقط ناقص[3]، سقط کامل[4]، سقط فراموش شده[5] و سقط مکرر[6] 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(۵-۳). پیشرفت‌های گسترده در زمینه آنتی بادی‌های 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)[7] 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(۳،۹-۲). 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

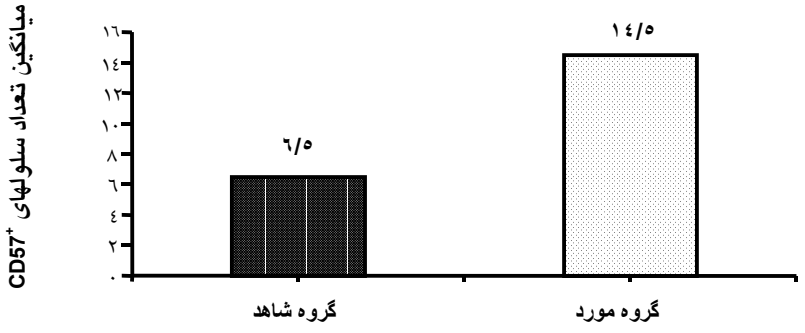
Downloaded from http://www.jri.ir

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

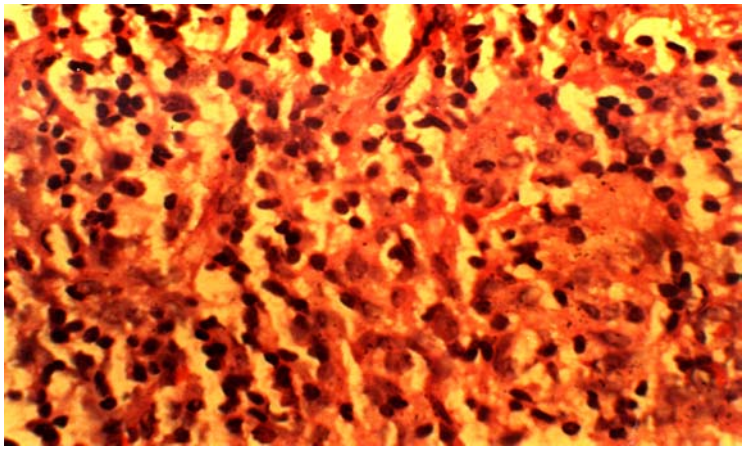
مواد لازم: آنتی بادی مونوکلونال علیه مارکر CD57 (آنتی بادی اولیه) به منظور نشاندارکردن سلولهای NK کلاسیک انسان، آنتی بادی بیوتینه شده بر علیه ایمونوگلوبین موش با منشاء خرگوشی (آنتی بادی ثانویه) و ترکیب استرپت آویدین-بیوتین پراکسیداز از شرکت DAKO (دانمارک) خریداری گردید.

جمع‌آوری بافتها: ٤٨ نمونه از بافتهای جفت و دسیدوا خانمهای گروه سنی ٤٢-١٩ 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 ٣٠ نمونه دارای بارداری طبیعی بین ١٢-٨ هفتگی به عنوان گروه شاهد، انتخاب گردید. اکثر این افراد صاحب فرزند بوده و سابقهٔ سقط خودبخودی نداشتند. پس از تشخیص ظاهری، قطعات دسیدوا از محتویات بارداری جدا گردید و در بافر فرمالین ١٠٪ فیکس گردید. ٨٧ نمونه از بافتهای جفت و دسیدوا خانمهایی در همان گروه سنی (٤٢-١٩ 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 ١٢-٨ هفتگی انتخاب گردید (گروه آزمون). این زنان فاقد ناهنجاریهای آناتومی و یا عفونت در رحم خود بوده و علت سقط آنها قابل توجیه نبود. قطعات دسیدوا پس از تشخیص ظاهری از محتویات بارداری جدا و در بافر فرمالین ١٠٪ 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 ١٠٪ فیکس گردید. پس از فیکساسیون و قالب گیری در پارافین، از نمونه‌های بافتی جهت بررسی



نمودار ١-سلولهای NK کلاسیک در دسیدوا طبیعی سقط درمانی و زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی در سه ماهه اول بارداری

Downloaded from http://www.jri.ir

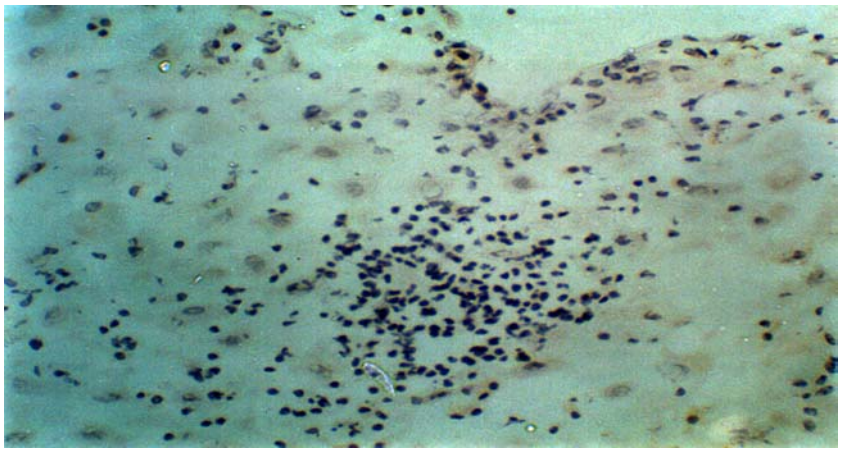


شکل ۱- مقاطع بافتی تهیه شده از دسیدوا طبیعی سه ماهه اول بارداری، رنگ‌آمیزی شده با روش H&E

میکروسکپی مقاطعی به ضخامت ۳ میکرون تهیه گردید.

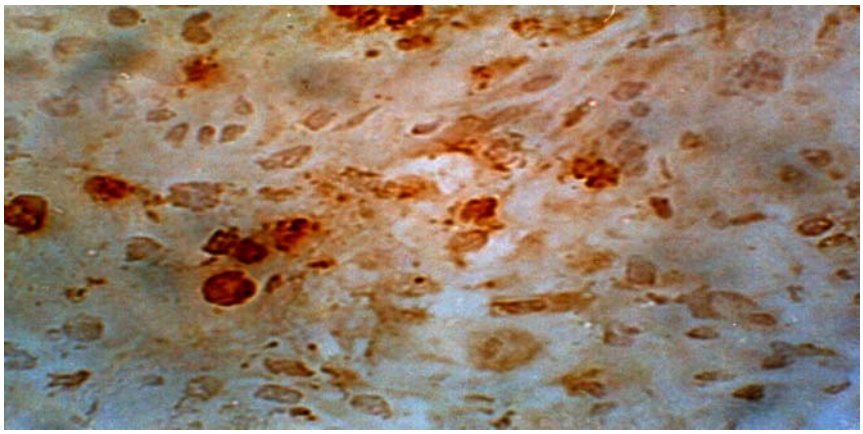
رنگ آمیزی H&E: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(H&E) جهت حذف نمونه‌های بافتی که دچار التهاب و نکروز شده بودند بر روی همه مقاطع بافتی انجام شد. ابتدا مقاطع بافتی در محلول هماتوکسیلین قرار داده شد و پس از شستشو با آب جاری، در محلول ائوزین قرار گرفتند. هماتوکسیلین هسته سلول‌ها و سایر ساختمانهای اسیدی را به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



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

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل۳- مقاطع بافتی تهیه شده از دسیدوا طبیعی سه ماهه اول بارداری با آنتی بادی مونوکلونال علیه مارکر CD57 رنگ‌آمیزی شده به روش ایمونوهیستوشیمیایی استرپت آویدین-بیوتین-پراکسیداز

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)، آنتی‌بادی مونوکلونال (یک ساعت)، آنتی‌بادی ثانویه (نیم ساعت) و ترکیب ABC (نیم‌ساعت) 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 رنگ‌آمیزی گردید. سرانجام مقاطع بافتی پس از آبگیری و شفاف‌شدن 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 آنتی‌بادی 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 رنگ‌آمیزی شده با مارکر CD57 هشت میدان میکروسکوپی با بزرگنمای 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)[1] 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 (شکل۱) مراحل بعدی رنگ‌آمیزی انجام گرفت. نتایج رنگ‌آمیزی 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:

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

1-Standard deviation

Downloaded from http://www.jri.ir

آنتی بادی اختصاصی علیه مارکرCD57 نشان داد که سلولهای NK در بافت لوزه حضور دارند. رنگ‌آمیزی بدون آنتی‌بادی اولیه: مقاطع بافتی نمونه‌های طبیعی و پاتولوژیکی رنگ‌آمیزی شده با روش استرپت آویدین-بیوتین-پراکسیداز بدون آنتی‌بادی اولیه نشان داد که هیچ سلولی مثبت نشده است(شکل۲). رنگ‌آمیزی 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(۰/۷۳±۵/۸۰) و اطراف غدد و عروق فاقد سلولهای مثبت بود (شکل۳). توزیع سلولهای NK در بافت‌های دسیدوا سقط خودبخودی با بافت‌های طبیعی اختلافی نداشت. تعداد سلولهای NK کلاسیک در دسیدوای نمونه‌های پاتولوژیک متغیر بود (۱/۲ ± ۱۲/۶۰). 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 معنی‌دار بود(P<۰/۰۰۳).

بحث

بررسی وضعیت و عملکرد سلولهای صلاحیت‌دار ایمنی در بافت دسیدوا بارداری طبیعی و مقایسه آن با این بافت در افراد مبتلا به سقط خودبخودی به ما کمک می‌کند تا فاکتورهای ایمونولوژیک تعیین کننده در ادامه یا خاتمهٔ بارداری را دریابیم. در مطالعه حاضر با روش ایمونوهیستو شیمیایی تعداد بسیار کمی از سلولهای NK کلاسیک (سلولهای دارای مارکرCD57) 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 دردسیدوای 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 گرانول‌دار دارای مارکرCD57 که سبب افزایش فعالیت می‌شوند (CD69، LFA-1، HLA-DR)، در سقطهای خودبخودی بیشتر از بارداریهای طبیعی است(۱۲). اما آنالیز فنوتایپینگ بوسیله فلوسیتومتری بر روی لکوسیت‌های اندومتریوم 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 عمدهٔ سلولها را تشکیل می‌دهند ولی در سقطهای عادتی کاهش تعداد این سلولها مشاهده می‌شود(۱۳). لنفوسیت‌های گرانول‌دار اندومتریوم (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،۱٤). این فنوتیپ مانند زیر جمعیتی از سلولهای خونی می‌باشد که حدود

Downloaded from http://www.jri.ir

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 سیتوتوکسیسیتی 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 تبدیل‌شدن به سلولهای LAK [1] زمانیکه در مجاورت سیتوکین‌هایی نظیر IFN γ,IL-2 قرار می‌گیرد. خاصیت تهاجمی این سلولها نسبت به سلول هدف افزایش چشمگیری پیدا می‌کند و عمل سیتوتوکسیسیتی 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 γ 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 CD16مثبت 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 NKT Valpha 14 تشخیص داده شده است که در دسیدوا دوران بارداری تجمع یافته و بدنبال تحریک آنها ممکن است در ایجاد سقط خودبخودی نقش داشته باشد که این مطلب به تحقیق بیشتری نیاز دارد(۲۲). بدنبال فعال شدن سلولهای کشنده طبیعی قادر به تولید سیتوکاین‌های مختلف شامل IFNγ، TNFα، GM-CSF و IL-1 می‌باشند(۲۴-۲۳). حضور این سیتوکاین‌های گوناگون در دسیدوا گزارش شده است و بنظر می‌رسد که سلولهای مختلف مسئول ترشح این سیتوکاین‌ها باشند (۲۷-۲۵). گزارش شده است که کلونهای مختلف لنفوسیتی $CD3^+$ و $CD3^-$ در دسیدوا سه ماهه اول بارداری TGF β ، IFN γ و TNFα را ترشح می‌کنند. در صورتیکه کلون‌های لنفوسیتی $CD3^-$ از eGL مشتق شده‌اند، مقدار زیادتری TGFβ ترشح می‌کنند(۱۹). سلولهای eGL بدنبال جدا شدن از دسیدوا سه ماهه اول بارداری قادر به تولید سیتوکاین‌های GM-CSF,M-CSF,ILF,G-CSF، IFNγ و TNFα می‌باشد(۲۵). تولید

1- Lymphokine Activated Killer cells

Downloaded from http://www.jri.ir

سیتوکین‌های IL-2, TNFα, IFNγ علیه سلولهای جفت در حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به سقط نشان داده شده است(۲۸). سلولهای تروفوبلاست که بطور طبیعی نسبت به لیزشدن توسط سلولهای NK مقاوم هستند، می‌توانند بوسیله فعال‌شدن سلولهای NK درپی تماس باTNFαو IL-2 از بین بروند(۲۹). فعالیت سیتوتوکسیسیتی سلولهای NK بوسیله TGFβ دو نیز مهار نمی‌شود(۳۰). ۷۰-۶۰ 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 ترفوبلاستی، ایمنی سلولی TH1 دارند(۳۲-۳۱). مقادیر بیشتر TNFα، IFNγ 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 α بطور نامتعادل در زنان مبتلا به سقط مکرر ناشی از فعالیت زیادTH1 نسبت به سلول‌های ترفوبلاست گزارش شده است(۳٤). احتمال دارد بهم خوردن تعادل سیتوکین‌های ناشی از TH1وTH2 در فعال‌شدن 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 نحوهٔ 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 درنهایت 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.

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.

Downloaded from http://www.jri.ir

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., Fakoohri R., Baines M.G. Resumption of CBA/J × DBA/2 mouse conspectuses in CBA/J uteri correlates with faultier of the feto-placental 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, 4 th 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- decidual 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- decidual 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 purfied $CD56^+$ lymphocytes on killing of natural killer and lymphokin-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 ctytoxicity. 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 laternal mobility of a membrane

Downloaded from http://www.jri.ir

33- Reghapathy 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.
protein in murine embryos: apotential 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.

Downloaded from http://www.jri.ir