● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هجدهم، شمارهٔ ۱، ص ۲۷-۱۶، ۱۳۸۹

مقالهٔ پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای درصد لنفوسیت‌های T CD4+CD25+ خون محیطی در زنان با سقط‌جنین مکرر و حاملگی طبیعی

جواد بهارآراء[۱]، رویا مزینی[۲]، نزهت موسوی‌فر[۳]، اکرم شیخ[۴]، مریم راستین[۵]، نفیسه طبسی[۶]، محمدامین اسلامی[۷]، علی اسلامی[۸]، محمود محمودی[۹*]

خلاصه

مقدمه: در حاملگی طبیعی انسان سلول‌های Treg, Th2, Th1 در ایجاد تعادل بین تحریک و تنظیم پاسخ‌های ایمنی و ایجاد هوموستاز نقش مؤثری دارند. سقط مکرر عمدتاً در زمینه نقص تحمل ایمونولوژیک بین مادر و جنین ایجاد می‌شود و معمولاً در سه ماهه اول بارداری اتفاق می‌افتد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات درصد لنفوسیت‌های CD4+CD25+ T خون محیطی در زنان با سقط جنین مکرر در مقایسه با زنان با حاملگی طبیعی به‌وسیله روش فلوسایتومتری می‌باشد.

روش: گروه مورد از میان زنان دچار سقط مکرر با علت نامشخص انتخاب شدند و گروه شاهد را زنان با حاملگی طبیعی تشکیل می‌دادند. این افراد از نظر آزمایشات کاریوتایپ، آنتی‌کاردیولیپین، پرولاکتین و نیز اسپرموگرام همسرشان طبیعی بودند. لنفوسیت‌های جداسازی شده از خون محیطی باآنتی‌بادی علیه مارکرهای CD3/CD4/CD25 نشان‌دار شده بارنگ‌های فلورسنت مجاور شده و پس از انکوباسیون و شستشو جهت خواندن توسط دستگاه فلوسایتومتری آماده گردیدند. سپس داده‌های گروه مورد و شاهد مورد مقایسه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها: میانگین درصد سلول‌های TCD4+CD25bright در گروه مورد نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۰). میانگین درصد سلول‌های CD4+CD25bright /CD4+ نیز در گروه مورد کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد (P=۰/۰۰۰) در حالی‌که درصد سلول‌های TCD4-CD25bright در گروه مورد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت (P =۰/۰۲۱).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد کاهش درصد سلول‌های TCD4+CD25 bright در زنان دچار سقط مکرر احتمالاً با اثرسایتوکین‌های حاصل از سلول‌های +TCD4 بر روی دسیدوا ارتباط داشته و سبب القای سقط جنین می‌شود. شاید کاهش این سلول‌ها درخون محیطی منعکس کننده کاهش آنها در جفت باشد. بررسی تغییرات سلول‌های +TCD4+CD25 می‌تواند به‌عنوان یک معیار ایمونولوژیک در بررسی وضعیت افراد با سقط مکرر عمل کند.

واژه‌های کلیدی: CD4+CD25+T cells، سقط مکرر، فلوسیتومتری

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد ۲- کارشناس ارشد سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد ۳- استادیار گروه زنان و زایمان و مرکز تحقیقات سلامت زنان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۴- کارشناس ارشد سلولی تکوینی، پژوهشکده بوعلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۵- دکترای تخصصی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۶- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۷- دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان شعبه بین المللی چابهار ۸- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۹- استاد، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** مشهد، دانشگاه علوم‌پزشکی‌مشهد، دانشکده‌پزشکی، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی

● **آدرس پست الکترونیک:** mahmoudim @mums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱/۲۲ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۹/۴/۱۷ **پذیرش مقاله :** ۱۳۸۹/۵/۶

مقدمه

بارداری تغییرمنحصر به فرد ایمونولوژیک در آنتی‌ژن‌های جنینی و تکوین جفت در رحم مادر است. کمپلکس پیچیده‌ای که جنین با وجود بیان آنتی‌ژن‌های MHC والدینی، توسط سیستم ایمنی مادر تحمل می‌گردد (۱). اگر چه مکانیزم‌های موضعی هم ممکن است جنین نیمه بیگانه (Semi-allograft) را از حمله سیستم ایمنی مادر نگهداری کنند. جهت حفظ بارداری واکنش‌های ایمونولوژیک متعددی بین مادر و جنین برقرار می‌شود، به‌طوری که به‌هم خوردن و عدم تعادل این واکنش‌ها منجر به سقط به‌ویژه در سه ماهه‌ی اول بارداری می‌گردد و از این‌رو بارداری موفق یک پارادوکس ایمنی محسوب می‌شود. سقط خودبه‌خودی جنین در زنان باردار به‌عنوان یکی ازمشکلات اساسی در جوامع بشری، به‌ویژه در کشورهایی که تداوم بنای خانواده یک اصل به‌شمار می‌رود محسوب می‌شود. 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 (Recurrent spontaneous abortion) نیازمند بررسی و درمان مناسب خواهد بود. هر چند اتیولوژی سقط مکرر ناشناخته است، ناهنجارهای آناتومیکی، ژنتیکی، عفونی، ایمونولوژیکی، اندوکرینولوژی و محیطی را درایجاد آن مؤثر می‌دانند. سقط مکرر مرتبط با تحمل ایمونولوژی مادر و جنین می‌باشد (۲). معمایی که باوجود مطالعات گستردهٔ انجام شده در طی نیم قرن اخیر هنوز پاسخ مناسب و جامعی، برای آن پیدا نشده است.

تئوری‌های ایمونولوژیک متعددی برای توجیه سقط مکررمطرح شده است که یکی از آنها تغییر وضعیت و عملکرد لکوسیت‌های افراد مبتلا به سقط می‌باشد (۳) به‌منظور ایجاد یک واکنش ایمنی، لازم است که سلول‌های اجرایی سیستم ایمنی در محل مورد نظر با آنتی‌ژن‌های خارجی وارد واکنش شوند. از طرفی پاسخ‌های ایمنی به ریز محیط‌های تنظیم کننده سیستم ایمنی بستگی دارد و برای ایجاد پاسخ ایمنی حضور انواع مختلفی از سلول‌های اجرایی مورد نیاز است که این فرایند به بیان مولکول‌های چسبان بستگی تام دارد. مهم‌ترین سلول‌ها، لنفوسیت T و ماکروفاژها می‌باشند. در پاسخ‌های ایمنی ذاتی، ماکروفاژها (یا سایر سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن) آنتی‌ژن را به‌صورت غیراختصاصی شناسایی کرده و پس از بلع آن را تخریب می‌کنند و معمولاً هیچ خاطره ایمونولوژیک ایجاد نمی‌شود. در پاسخ‌های ایمنی اکتسابی لازم است آنتی‌ژن به همراه مولکول‌های سازگاری نسجی موجود بر روی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های T اختصاصی عرضه شود.

این ایده که تنظیم‌کننده‌ها یا سرکوبگرها ممکن است در بارداری مؤثر باشند، اولین بار درسال ۱۹۷۷ توسط Chaouat مطرح شد. وی در بررسی خود مشاهده کرد که انتقال انتخابی سلول‌های طحال موش حامله رشد تومور پیوند شده را افزایش می‌دهد و اظهار داشت که شاید رشد تومور مرهون افزایش آنتی‌بادی‌ها یا سلول‌های تنظیم‌کننده یا سرکوبگرها است (۴). بعدها با دیده شدن جمعیت سلول‌های Treg مشخص گردید که این سلول‌ها از خون محیطی، تیموس، گره لنفی و بندناف نیز قابل جداشدن هستند (۵). اصطلاح Treg به گروهی از لنفوسیت‌های T با خواص تنظیمی- سرکوبی اطلاق می‌شود. حداقل سه زیر جمعیت سلول‌های+TCD4 با مکانیزم سرکوبگری به‌وسیله فنوتیپ، سایتوکاین ترشحی و منشأ بافتی‌شان متمایز می‌شوند. سلول‌های +T CD4+CD25 یکی از چهار کلاس اصلی سلول‌های +T CD4 در خون محیطی هستند و از تیموس طی فرایند انتخابی براساس ساختارفردی TCR (T-cell receptor) و یا در بافت‌های محیطی به‌وجود می‌آیند که توان پلاستیسیتی و انطباق با محیط زیست را دارند (۶). اینها دارای TCR آلفا بتا بوده و نقش متمایزی در تحمل ایمنی دارند (۷). مارکر سطحی آنها شامل موارد زیر می‌باشد:

-گیرنده IL-2Rα (CD25) (۸)

-گیرنده GITR [Gluocorticoid induced tumor necrosis factor (TNF)] (۹)

- CTLA-4 (CD152) (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4) (۱۰)

- بیان بالای CD95 در انسان و بیان کم CD45RB CD127 (۱۱).

این سلول‌ها IL10 و IL4 ترشح می‌کنند و Notch که یک پروتئین آداپتور است، سلول‌ها را به سمت سلول‌های Treg متمایز می‌کند (۱۲). این سلول‌ها نقش پاتولوژیک در بیماری‌های اتوایمیون (۱۳)، بیماری التهابی (۱۴) و تحمل پیوند دارند (۱۵). جمعیت مؤثرتنظیمی در انسان سلول‌های TCD4+ CD25 bright می‌باشند که این سلول‌ها بیش از ۹۵ درصد هموژن هستند و GITR, CD45RO (IL-2Rβ) CD122 و CD621 را بیان می‌کنند (۱۶) و از طریق TCR سلول‌های سرکوبگر CD4+,CD8+ رافعال می‌کنند. این سلول‌ها IL10 را به مقدار زیاد و IL4, IL2 و اینترفرون گاما را به مقدار کم ترشح می‌کنند. سلول‌های T CD4+ CD25dim هم که سلول‌های T فعال‌کننده می‌باشند نیز مخلوط هتروژنی از سلول‌ها می‌باشند که CTLA-4 را بیان نمی‌کنند، ولی HLA-DR و CD45RA بیشتر از CD45RO دارند و اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما را به مقدار زیاد و IL4,IL1 را به مقدار کم ترشح کرده و شبیه به سلول‌های Th1 می‌باشند که فاکتورهای توکسیک جنین نامیده می‌شوند. پاسخ سلول‌های Th1 یک پاسخ اتوایمیون سایتوتوکسیک می‌باشد که منجر به نازایی یا سقط می‌شود (۱۷). در این ارتباط تحمل ایمونولوژیک مادر به آمیزه‌ی منحصر به فردی از مواد سرکوبگر ایمنی، سایتوکین‌ها و هورمون‌ها که قبل و بعد ازلانه گزینی بلاستوسیست تولید می‌شوند، بستگی دارد. فاکتورهای سرکوبگر متعددی در بارداری تولید می‌شوند که هر یک از آنها بر روی بخش خاصی از سیستم ایمنی مادر اثر مهاری دارند. از عوامل سرکوبگر ایمنی در طی بارداری می‌توان به فاکتورهای IL4، IL10 ، فاکتور تغییردهنده رشد (TGF-β)، گیرنده‌های محلول TNF یا فاکتورتخریب توموری (tumor necrotic factor)، (فاکتوربلوک کننده القای پروژسترون (Progesterone- induced Blocking Factor: PIBF)، اینترفرون گاما، فاکتور اولیه حاملگی (Early Pregnancy Factor)، EPF و PGE (پروستاگلاندین E2) اشاره کرد. این عوامل بر روی جنبه‌های مختلف سیستم ایمنی اثر مهاری دارند که از آن جمله می‌توان به مهار تولید لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک، مهار تحریک لنفوسیت‌ها با میتوژن‌ها، مهار تولید سلول‌های LAK، مهار تولید سایتوکین‌ها، القای مرگ سلولی (apoptosis)، مهار سنتز آنتی‌بادی‌ها و عدم بیان MHC کلاس دو و مولکول‌های همراه و مهار تولید NO اشاره کرد (۱۸).

Aluvihara و همکاران برای اولین بار گزارش کردند که سلول‌های +T CD4+CD25 برای تحمل جنین آلوگرافت در موش لازم هستند و پیشنهاد کردند که سلول‌های فوق واسطه تحمل مادری می‌باشند (۱۷). اولین مشاهده این سلول‌ها در حاملگی انسان نیز با افزایش آنها در بافت دسیدوا تشریح شد (۱۹). هم‌چنین مطالعات نشان داده است در انسان وجوندگان تنظیم سیستم ایمنی توسط سلول‌های Treg صورت می‌گیرد و این سلول‌ها در تحمل محیطی و تحمل مادری نقش مهمی دارند وعدم حضور آنها باعث نقص ایمنی یا بیماری اتوایمیون یا سقط جنین می‌شود (۲۰). با در نظر گرفتن نقش ایمنومدولاتوری لنفوسیت‌های +TCD4+CD25 این مطالعه با هدف مقایسه درصد این سلول‌ها درخون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر و زنان با حاملگی طبیعی طراحی گردید.

روش بررسی

پژوهش حاضربا روش مورد-شاهد و پس از کسب مجوزهای لازم، بر روی افراد مراجعه‌کننده به بخش زنان و زایمان بیمارستان امام رضا (ع) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مرکز تحقیقات ناباروری منتصریه و مرکز درمانی ام‌البنین مشهد از تیرماه سال ۱۳۸۷ صورت پذیرفت. این مطالعه با در نظرگرفتن ملاحظات اخلاقی و پرنمودن

پرسشنامه‌ای که بدین منظور تهیه شده بود و شامل سن، بیماری زمینه‌ای، میزان WBC، پلاکت، سابقه بستری وآگاهی نسبت به پژوهش بود صورت گرفت. از بین بیماران مراجعه کننده، ۲۴ نفر با سقط مکرر (گروه مورد) که حداقل دارای سه بار سقط با علت نامشخص بوده و در هفته ۶ الی ۱۴ بارداری بسر می‌بردند انتخاب شدند. سن این افراد ۳۶-۲۰ سال بود و این افراد تا زمان انجام آزمایش مورد نظر دارو دریافت نکرده و سایر علل سقط در آنها توسط متخصصین مربوطه بررسی شده بود. وضعیت این بیماران از نظر کاریوتایپ، آنتی‌فسفولیپید آنتی‌بادی‌ها، آنتی‌کاردیولیپین آنتی‌بادی‌ها، ANA، هورمون‌های تیروئیدی و پرولاکتین طبیعی بود. هم‌چنین این بیماران مبتلا به بیماری تخمدان پلی‌کیستیک (PCOD) نبوده و اسپرموگرام همسران آنها نیز طبیعی بود. در این مطالعه از ۲۱ نفر با حاملگی طبیعی که سن آنها ۳۷-۲۰ سال بود و در سه ماهه‌ی اول بارداری به سر می‌بردند، به عنوان گروه شاهد استفاده شد. این افراد دارای فرزند بوده و سابقه سقط نداشتند. از افراد مورد مطالعه ۵ سی‌سی خون گرفته شد و در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA جمع‌آوری گردید.

جداسازی لنفوسیت‌ها

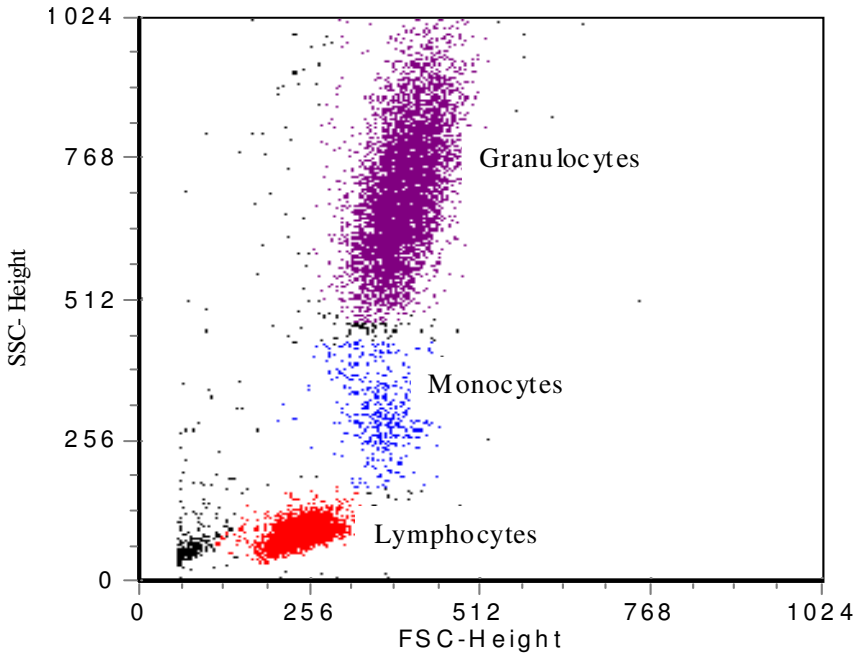
به‌منظور جداسازی لنفوسیت‌های خون محیطی از محلول فایکول (Ficol hypac, BioSera, UK) استفاده شد. به این صورت که به نسبت ۱ به ۲ به‌ترتیب فایکول و خون در لوله آزمایش به این صورت که خون در بالای فایکول قرار گرفته و با آن مخلوط نشود، ریخته شد. سپس در دور ۲۷۰۰rpm در دمای اتاق سانتریفوژ گردید و ابرلنفوسیتی بر اساس گرادیان دانسیته جدا شده، توسط نوک سمپلر به لوله آزمایش دیگر منتقل و با نسبت مساوی با محلول PBS (Phosphate buffer salin) شستشو داده شد تا کلیه مواد و پروتئین‌های اضافی از محیط خارج شوند. جهت شستشو، لنفوسیت‌های 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.

بررسی فلوسایتومتری

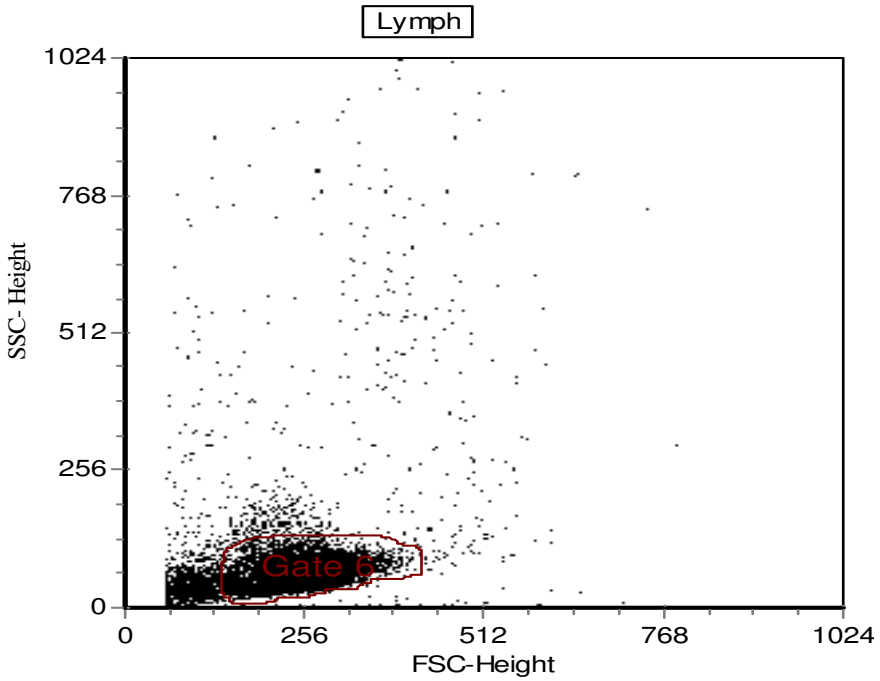
سلول‌های PBLs جداسازی شده پس از شستشوبه دو لوله منتقل شدند. بعد لنفوسیت‌های جدا شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با مشخصات زیر کونژوگه شدند:

anti CD4 (FITC) / anti CD25 (PE) / anti CD3 (CYQ)

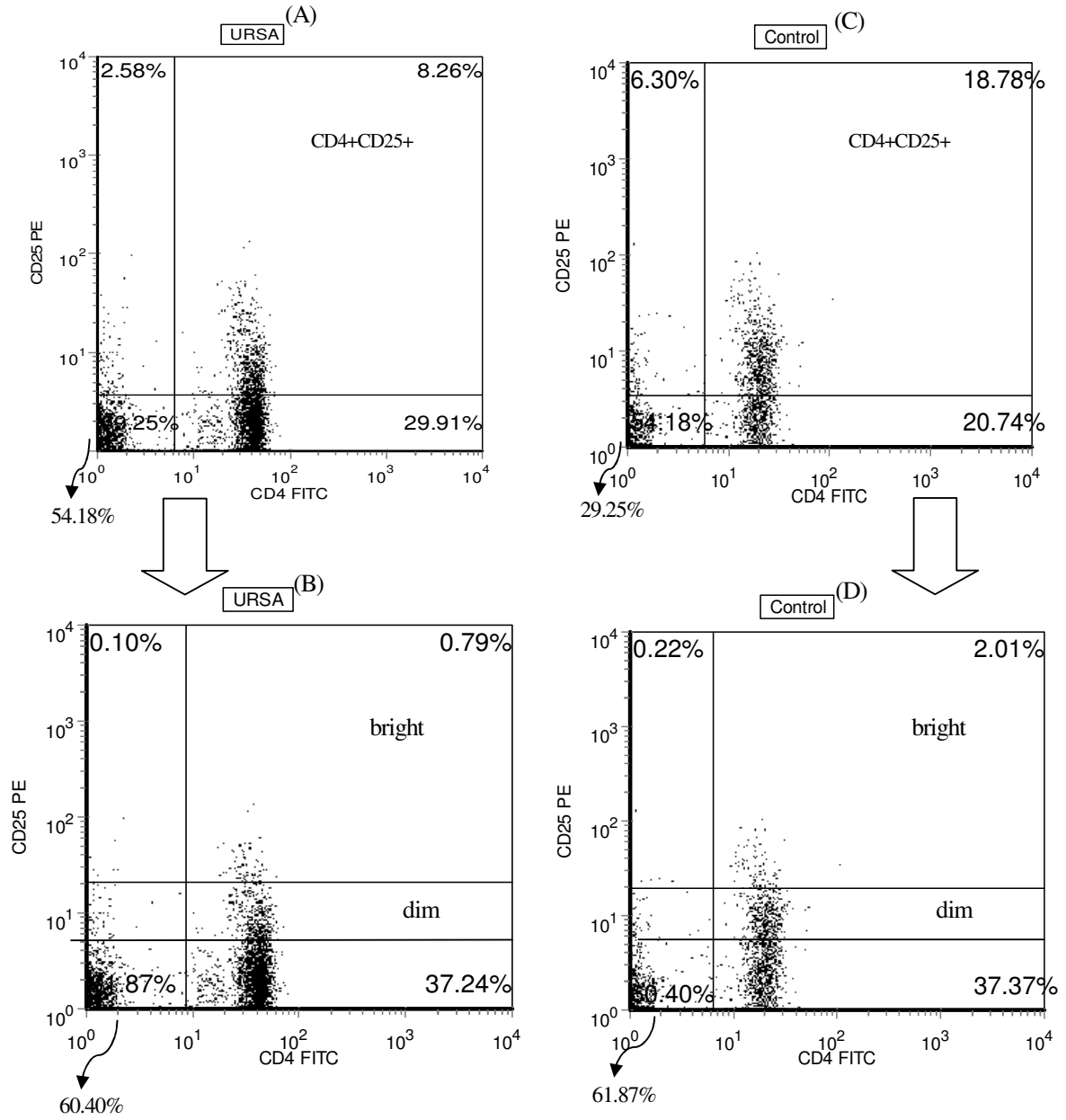
لازم به ذکر است که این آنتی‌بادی‌ها همه از شرکت IQ Products, The Netherlands) IQ) تهیه شدند. سپس لنفوسیت‌ها با مارکرهای فوق به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ درجه، انکوبه شده، سپس دو بار با ۲cc بافر PBS شستشو و نمونه‌ها آماده خواندن توسط دستگاه فلوسایتومتری(FACS calibure, Becton Dickinson, USA) شدند. نمونه‌ها پس از خوانده شدن براساس جمعیت سلولی انتخاب شده توسط نرم افزار (Becton Dickinson, USA) cell Quest آنالیز شدند. به این صورت که ابتدا توسط نمودار Forward Scatter- side scatter که اندازه و گرانولیتی سلول‌ها را مشخص می‌کند (تصویر ۱)، مجموعه لنفوسیت‌ها را انتخاب کرده (تصویر ۲) و سپس نمودار نقطه‌ای مربوط به آنتی‌بادی +CD4+CD25 ترسیم می‌شد. در پلات نقطه‌ای مربوط به سلول‌های +CD4 و +CD25 (تصویر ۳) جمعیت سلول‌هایی که از نظر هر دو مارکر +CD4 و+CD25 مثبت می‌باشند سلول‌های T تنظیمی‌بوده و در این نمودار می‌توان جمعیت سلول‌های+ CD4 و- CD25 را نیز تفکیک کرد. سلول‌های +TCD4+CD25 به دو زیر جمعیت سلولی TCD4+CD25 bright و TCD4+ CD25 dim بر مبنای منحنی هیستوگرام تفکیک می‌شدند. (تصویر ۳).



تصویر ۱. خون محیطی نمونه‌ها در دستگاه Becton Dickinson مدل FACS calibure توسط نرم افزار Cell Quest آنالیز می‌شوند. در پلات نقطه‌ای گلبول‌های سفید بر اساس اندازه FSC (Forward Scatter) و گرانولیتی (SSC) Side Scatter به روش فلوسایتومتری در یکی از بیماران سقط مکرر تفکیک شده و سه زیر مجموعه در آن مشخص گردیدند



تصویر ۲. در پلات نقطه‌ای جمعیت سلولی مورد نظر ما یعنی لنفوسیت‌های خون محیطی براساس اندازه (FSC) وگرانولیتی (SSC) به روش فلوسایتومتری در یکی از بیماران سقط مکرر مشخص و انتخاب می‌شوند.



تصویر ۳. جمعیت *سلول‌های CD4+CD25 bright, CD4+CD25 dim در لنفوسیت‌های خون محیطی در گروه شاهد (A) و گروه مورد URSA (C)*

این نمودار یک پلات نقطه‌ای می‌باشد که محور x نماینده CD4-FITC و محور y، CD25-PE می‌باشد.

لنفوسیت‌های خون محیطی جداسازی شده برای فرکانس فنوتیپی به‌وسیله فلوسایتومتری آنالیز می‌شوند. سلول‌ها $CD4^{+}CD25^{+}$ بر اساس مارکرهای Isotype Immunoglobulin G به دو زیر مجموعه‌ی سلول‌ها $CD4^{+}CD25^{dim}$, $CD4^{+}CD25^{brigh}t$ طبقه‌بندی می‌شوند.

لنفوسیت‌ها به سلول‌های $CD4^{+}$ (چهارگوش سمت راست)، سلول‌های -CD4(چهارگوش سمت چپ)، سلول‌های $CD25^{brigh}t$ (چهارگوش قسمت بالاتر)، سلول‌های $CD25^{dim}$ (چهارگوش قسمت وسط)، سلول‌های - CD25 (چهارگوش قسمت پایین‌تر) طبقه‌بندی می‌شوند(B,D ,A,C).

درصد سلول‌های $CD4^{+}CD25^{brigh}t$ T در ربع سمت راست بالا و درصد سلول‌های $CD4+CD25^{dim}$ درچهارگوش سمت راست وسط شناسایی می‌شوند (B,D).

درصد سلول‌های $CD4-CD25^{brigh}t$ T در ربع سمت چپ بالا و سلول‌های $CD4-CD25^{dim}$ درچهارگوش سمت چپ وسط شناسایی می‌شوند (B,D).

PE= R-phycoerythrin

FITC=fluorescin isothiocyanate

سپس اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم افزار SPSS (version 16; SPSS, Chicago, IL) مورد بررسی آماری قرار گرفته و نتایج نمونه‌ای بیماران و گروه شاهد با آزمون غیرپارامتریک mann-whitny بررسی شد. سطح معنی‌دار بودن P< ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در مجموع ۲۴ نفر با سقط مکرر (۶-۳) به‌عنوان گروه مورد و ۲۱ نفر با حاملگی طبیعی به‌عنوان گروه شاهد بررسی شدند. نمونه‌ها همه دارای کاریوتایپ طبیعی بوده و از نظر آماری تفاوت قابل ملاحظه‌ای در سن بارداری بین افراد با سقط مکرر وافراد با حاملگی طبیعی وجود نداشت (جدول ۱).

همان‌طور که در جداول شماره ۲و۳و۴ نشان داده شده میانگین درصد سلول‌های لنفوسیت درگروه شاهد (۳۳/۸۲۰±۱/۴۳۳) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه مورد (۲۸/۶۴۵±۲/۰۶۶) دارد (P=۰/۰۴۴). میانگین درصد سلول‌های TCD4+CD25 bright در گروه شاهد (۲/۸۷۹±۰/۲۰۶) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه مورد (۱/۸۴۴±۰/۱۴۹) دارد (P=۰/۰۰۰) که افزایش سلول‌های تنظیمی مؤثر را نشان می‌دهد. میانگین درصد سلول‌های CD4-CD25 brigh T نیز در گروه مورد (۰/۵۹۲±۰/۰۷۵) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد (۰/۸۸۷±۰/۱۲۴) نشان می‌دهد (P=۰/۰۲۱). هم‌چنین میانگین درصد سلول‌های+CD4/ TCD4-CD25dim در گروه مورد (۹/۴۶۱±۱/۰۸۶) نسبت به گروه شاهد (۷/۹۶۶±۰/۶۷۰) افزایش نشان می‌دهد. میانگین درصد مطلق سلول‌های+CD4/ T CD4+CD25bright در گروه مورد (۴/۹۰۴±۰/۶۲۵) از نظرآماری به‌صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از گروه شاهد (۷/۱۸۵±۰/۵۵۴) است (P=۰/۰۰۰). هم‌چنین میانگین درصد سلول‌های +CD25/CD4 درگروه شاهد (۳۶/۳۰۹±۲/۸۲۱) نسبت به گروه مورد (۴۱/۶۸۹± ۴/۲۱۲) کاهش نشان می‌دهد.

جدول ۱. *مشخصات دو گروه مورد و شاهد*

گروه	سن (سال)	تعداد حاملگی	تعداد سقط
مورد	۰/۸۸۷ ± ۲۸/۷۹	۰/۲۳۳ ± ۳	۰/۲۲۸ ± ۲/۸۸
شاهد	۱/۲۰۴ ± ۲۵/۹۵	۰/۱۹ ± ۲/۴۸	۰±۰
P-value	۰/۰۶	۰/۰۸۱	۰/۰۰۰

در هر جدول Mean±SEM نشان داده شده است.

آزمون انجام شده برای تعداد حاملگی و تعداد سقط آزمون ناپارامتری من- ویتنی می‌باشد.

آزمون انجام شده برای سن آزمون t-test می‌باشد.

جدول ۲. *میانگین درصد لنفوسیت‌ها در گلبول‌های سفید، و میانگین درصد سلول‌های CD3، +CD4+CD25، -CD4+CD25 در لنفوسیت‌های بیماران سقط مکرر (گروه مورد) و مقایسه آن در افراد با حاملگی طبیعی (گروه شاهد)*

گروه	Lymph (%) WBC	CD3+ (%) /Lymph	CD4+CD25- (%) Lymph	CD4+CD25+ (%) Lymph
مورد (۲٤ نمونه)	۳۳/۸۲۰±۱/۴۳۳	۷۱/۰۸±۱/۷۰۷	۳۱/۷۵۲±۱/۸۹۷	۱۱/۶۶۲± ۰/۶۵۷
شاهد (۲۱ نمونه)	۲۸/۶۴۵±۲/۰۶۶	۶۹/۸۰۹±۱/۷۶۶	۳۰/۴۸۲±۱/۵۱۲	۱۱/۱۱۱± ۰/۷۶۵
P-value	* ۰/۰۴۴	۰/۷۷۶	۰/۶۶۶	۰/۴۱۳

*P<۰/۰۵

**P<۰/۰۱

در هر جدول Mean±SEM نشان داده شده است.

جدول ۳. *میانگین درصد سلول‌های CD4+CD25 bright، CD4+CD25+dim، CD4-CD25 bright، CD4-CD25dim، CD25 در لنفوسیت‌های بیماران سقط مکرر (گروه مورد) و مقایسه آن در افراد با حاملگی طبیعی (گروه شاهد)*

گروه	CD25 (%)/Lymph	CD4+CD25bright (%)/Lymph	CD4+CD25dim (%)/Lymph	CD4-CD25 bright (%) /Lymph	CD4- CD25dim (%)/ Lymph
مورد (۲٤ نمونه)	۱۵/۷۴۸±۰/۸۳۳	۱/۸۴۳±۰/۱۴۹	۹/۸۱۸±۰/۵۵۱	۰/۵۹۲±۰/۰۷۵	۳/۵۳۱±۰/۲۸۶
شاهد (۲۱ نمونه)	۱۴/۴۹۳±۱/۰۲۹	۲/۸۷۹±۰/۲۰۶	۸/۲۳۲±۰/۷۴۷	۰/۸۸۷±۰/۱۲۴	۳/۲۰۰±۰/۲۶۱
P-value	۰/۲۴۱	**۰,۰۰۰	۰/۰۶۵	*۰,۰۲۱	۰/۵۰۹

مقادیری احتمالی که با * و ** نشان داده شده‌اند به‌ترتیب در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ و ۰/۰۱ معنادار می‌باشند.
در هر جدول Mean±SEM نشان داده شده است.

جدول ٤. *میانگین درصد سلول‌های CD4+CD25 bright، CD4+CD25+dim، CD4-CD25 bright، CD4-CD25dim، CD25 در +CD4 در لنفوسیت‌های بیماران سقط مکرر (گروه مورد) و مقایسه آن در افراد با حاملگی طبیعی (گروه شاهد)*

گروه	CD25(%)/CD4+	CD4-CD25 bright (%) /CD4+	CD4-CD25dim (%)/CD4+	CD4+CD25bright (%) / CD4+	CD4+CD25dim (%)/ CD4+
مورد (۲٤ نمونه)	۴۱/۶۸۹±۲/۲۱۲	۱/۵۸۲±۰/۲۳۴	۹,۴۶۱±۱/۰۸۶	۴/۹۰۴±۰/۶۲۵	۲۶/۰۰۷±۲/۶۸۱
شاهد (۲۱ نمونه)	۳۶/۳۱۰±۲/۸۲۱	۲/۳۰۴±۰/۳۶۰	۷/۹۶۶±۰/۶۷۰	۷/۱۸۵±۰/۵۵۴	۲۰/۳۱۹±۱/۸۲۷
P-value	۰/۳۳۹	۰/۰۵۰	۰/۴۹۵	**۰,۰۰۰	۰/۰۸۴

مقادیری احتمالی که با * و ** نشان داده شده‌اند به‌ترتیب در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ و ۰/۰۱ معنادار می‌باشند.
در هر جدول Mean±SEM نشان داده شده است.

بحث

در ایـــن مطالعـــه تغییـــرات درصـــد ســـلول‌هـــای +T CD4+CD25 درخون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر با مقایسه این جمعیت سلولی در زنان با حـاملگی طبیعـی بـا استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسـی قرارگرفـت. افزایش سلول‌هـای +TCD4+CD25 بـه‌علـت فعـال‌کـردن مکانیسم تحمل ایمنی، موجب بقای حاملگی می‌شـود. ایـن سلول‌ها گستردگی و تنوع در سلول هدف دارند ومسیرهای ناهمگنی را برای سرکوب پاسخ ایمنی کارگردانی می‌کنند که از جمله مهار تکثیر و تولید سایتوکین‌ها در سلول‌هـای +CD4+,CD8 (۲۱)، سرکوب تکثیر سلول‌هـای B و تولیـد ایمونوگلوبین‌ها (۲۲)، مهار عملکرد سایتولیتیک سلول‌های NK (۲۳)، مهار بلوغ و عملکـرد عرضـه آنتـی‌ژن توسـط سلول‌های APC و ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک (۲۴) می‌باشند. عملکرد اجرایی این سلول‌ها"وابسته بـه تمـاس" می‌باشد و توانایی فعال‌کردن مسیرهای جانبی بـه کمـک سایتوکین‌های پاراکرین و انتقال سرکوب به سـلول‌هـای دیگر را دارند (۲۵). این سلول‌ها در بافت‌های بـدن بـرای جلوگیری از تخریب ایمنی نقش دارند و بـه‌وسـیله بیـان سطحی CD25 شناسایی می‌شـوند (۱۵). Zenclussen مطـرح کرده که افزایش این سلول‌ها در موش حامله طبیعی قـادر به جلوگیری از سقط جنین است. وی افزایش سـقط را بـه کاهش بیان مولکول‌هـای حفـاظتی القـا شـده بـه‌وسـیله سلول‌های +T CD4+CD25 نسبت می‌دهد. این سلول‌ها تکثیر سلول‌های T اتولوگ را مهار می‌کنند و این سلول‌ها را برای تنظـــیم ایمنـــی فعـــال کـــرده بـــه ســـلول‌هـــای T CD4+ CD25 bright تبـدیل مـی‌کننـد (۲۶). در یـک مطالعه‌ی جامع که توسط Saito و همکاران صورت گرفتـه مشاهده شده در زنانی که سقط جنین‌های مکرر را تجربـه می‌کنند، کاهش این سلول‌ها در خون محیطـی و کـاهش توانایی سرکوب در مقایسه با زنان طبیعی وجود دارد. پس افزایش سلول‌های TCD4+CD25 bright و القای تحمل ایمنی برای بقای حاملگی لازم است (۲۷). Somerset و همکـاران نیز مطرح کردند سـلول‌هـای +TCD4+CD25 در طـی سـه ماهه‌ی اول بارداری افزایش می‌یابد و اوج آن در سه ماهـه دوم که تروفوبلاست‌های دسیدوا حداکثر رشد را دارند دیده می‌شـود (۲۸). از طرفـی در گـزارش Sasaki و همکـاران جمعیت سلول‌های TCD4+ CD25 bright در خون محیطـی و دسیدوا طی اوایل حاملگی در افراد مبتلا بـه سـقط مکـرر نسبت به افراد غیرحامله افزایش نـشان مـی‌دهـد (۲۹). در مطالعه حاضر نیز سلول‌های T CD4+CD25 bright در گـروه شاهد نسبت به گروه بیمار افزایش معنی‌داری داشت. به‌نظر می‌رسد مشکلات ایمونولوژیکی حاملگی ناشـی از تحمـل ناقص آلوگرافت‌ها می‌باشد و تشخیص نامناسب و نابه‌جای آلوآنتی‌ژن‌های جنینی به‌وسیله‌ی سیـستم ایمنـی مـادر بـا حاملگی ناموفق مرتبط است و لنفوسیت‌های آلوژن نقـش مهمـــی در تحمـــل حـــاملگی دارنـــد. گـــسترش سلول‌های +TCD4+CD25 ، بر اثر گـسترش سـلول‌هـای T اجرایی (Effectors) خودواکنشگر (Self alloreactivity) اسـت که در پاسخ به آنتی‌ژن‌های والدینی گسترش می‌یابند و یا مستقل ازآلوآنتی‌ژن‌های جنینی در اثر هورمون‌ها گسترش می‌یابند. آنتی‌ژن‌های والدینی، به‌وسیله جنین و یـا در اثـر گسترش سلول‌های +TCD4+CD25 سرکوبگر در پاسخ‌های ایجاد شده برعلیه جنین، بیان می‌شـود. کـاهش پاسـخ بـه حـاملگی مـرتبط بـا تعـداد کمتـر و نقـص عملکـردی سلول‌های +TCD4+CD25 می‌باشد که ممکن است با کاهش توانایی مهار سیستم ایمنی و پشتیبانی سیستم ایمنـی سـبب القـای سـقط جنـین شـود (۱۹). هـم‌چنـین سـلول‌هـای +TCD4-CD25 واکنش اینترفرون را علیه آلوآنتی‌ژن‌هـای مادری مهار می‌کنند و در تنظیم دقیق واکنش‌هـای ایمنـی ضدجنینی در Th1, Th2 سهیم می‌باشند و به لنفوسیت‌هـای فعال تبدیل می‌شوند (۱۴). در مجموع این نتایج نشان می‌دهد که در بارداری گسترش سلول‌های +T CD4+CD25 به‌وسیله سرکوب بالقوه پاسخ سلول‌هـای T برعلیـه آنتـی‌ژن‌هـای

آلوژنی والدینی القا می‌شود اما کاهش سلول‌های TCD4+CD25bright در سه ماهه‌ی اول بارداری باعث القای سقط در زنان باردار می‌شود. نتیجه بررسی اخیر در واقع مسائل ایمونولوژیک را به‌عنوان عامل احتمالی برای سقط و نازایی مطرح می‌کند.

با توجه به کاهش معنی‌دار سلول‌های TCD4+CD25 bright اختلال در ایجاد این سلول‌ها و یا تمایز ناکافی سلول‌های T به سلول‌های T CD4+CD25+ در رحم ممکن است ادامه بارداری را تحت تأثیر قرار دهد. از طرفی توان سلول‌های TCD4+CD25+ در هموستاز ایمنی، زمینه‌های جدیدی را در پاتولوژی تولیدمثل مطرح می‌نماید. با شناخت بیشتر مکانیسم عمل این سلول‌ها استفاده درمانی آنها در زنان با سقط‌های مکرر نیز امکان‌پذیر می‌گردد.

Comparison of the Percentages of Peripheral Blood CD4+ CD25+ T Lymphocytes in Recurrent Abortion and Normal Pregnancy

Baharara J., Ph.D.[1], Mozayani R., M.Sc.[2], Mousavifar N., M.D.[3], Sheikh A., M.Sc.[4], Rastin M., Ph.D.[5], Tabasi N., M.Sc.[6], Eslami M.[7], Eslami A.[8], Mahmoudi M., Ph.D.[9*]

1. Assistant Professor, Biology Department, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Graduate of Cellular & Developmental Biology, Biology Department, Mashhad Islamic Azad University, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor of Obstetrics & Gynecology, Women's Health Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5. Immunologist, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
6. Graduate of Animal Physiology, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
7. Medical Student, Zahedan University of Medical Sciences, chabahar Branch
8. Medical Student, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
9. Professor of Immunology, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* Corresponding author; e-mail: mahmoudim @mums.ac.ir

(Received: 11 April 2010 Accepted: 28 July 2010)

Abstract

Background & Aims: Recent evidences indicate that parts of the immunoregulation system such as CD4+CD25+Tcells (Treg) and Th2 cells and Th1 cells, play very important roles in the maintenance of pregnancy. The deficiency in proper recognition of fetal alloantigen by the maternal immune system is associated with recurrent pregnancy failure. Here, we investigate the proportional changes of CD4+CD25+Tcells in peripheral blood of women with unexplained recurrent spontaneous abortion in comparison to women with normal pregnancy by using flowcytometry.

Methods: The case group was comprised of 24 women who had at least three successive miscarriages with unexplained etiology. They had normal karyotypes, anticardiolipin and prolactin and their husbands had normal spermograms. The percentages of TCD4+CD25+cells in peripheral blood of these patients were compared with those of 21 women who had normal pregnancy with no history of pregnancy loss. Anti-CD4, anti-CD25 and anti-CD3 antibodies were added to lymphocytes isolated from peripheral blood. Then samples were incubated, centrifuged and washed. Finally cells were analyzed using FACS Caliber system and data of the two groups were compared.

Results: Mean percentage of CD4+CD25+bright T cells in peripheral blood in case group was significantly lower compared to the control group (P=0.000). Mean percentage of CD4-CD25 bright cells in the CD4+Tcell peripheral blood was significantly higher in case group campared to the control group (P=0.021).
Conclusion: Decrease of CD4+CD25 bright T cells plays a major role in tolerating conceptus antigens and cytokine and might contribute to the maintenance of pregnancy. Inadequate CD4+CD25+Tcells or their functional deficiency may link with miscarriage. Therefore, alteration of CD4+CD25+T cells can be used as an immunologic marker for monitoring of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion.
Keywords: Recurrent abortion, CD4+CD25+ T cells, Flowcytometry
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2011; 18(1): 16-27

References

1. Billington WD. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *J Reprod Immunol* 2003; 60(1):1–11.
2. 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
3. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2003; 9(2): 163-74.
4. Chaouat G, Voisin GA , Daeron M, Kanellopoulos J. Enhancing antibodies and suppressive cells in maternal anti-fetal immune reaction. *Ann Immunol (Paris)* 1977; 128(1-2): 21–4.
5. Beacher-Allan C, Viglietta V, Hafler D.A. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004; 16(2): 89 – 98.
6. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323–7.
7. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112(5): 1557–69.
8. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151–64.
9. McHugh RS, Whitters M, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4+CD25+ immunoregulatory T Cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16(2): 311–23.
10. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192(2): 303–10.
11. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1701–11.
12. Guerin L.R, Prins J.R, Robertson SR. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod* 2009; 15(5): 517 –35.
13. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T

cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345–52.
14. Wahl SM, Vazquez N, Chen W. Regulatory T cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(6):768–74.
15. Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y. Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol* 2004; 16: 119–26.
16. Beacher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004; 16(2): 89–98.
17. Aluvihare V.R, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5(3): 266–71.
18. Mosaffa N, Zamani AH, Hassan ZM. Immunobiology of normal pregnancy. Tehran, Shaheed Beheshti University press, 2003 [Persian].
19. Sasaki Y, Miyazaki S, Sakai M, Saito S. CD4+CD25+ regulatory T cells are increased in the human early pregnancy decidua and have immunosuppressive activity. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 356.
20. Darrasse-Jeze G, Klatzmann D, Charlotte F, Salomon B.L, Cohen J.L. CD4+CD25+ regulatory/ suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett* 2006; 102(1): 106–9.
21. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8 T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001; 167: 1137–40.
22. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175: 4180–3.
23. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202(8):1075–85.
24. Taams LS, Van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, Jong EC, Akbar AN, et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4CD25 regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005; 66(3): 222–30.
25. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V,Romagnani P, Maggi E, Romagnani S. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4+CD25+ human thymocytes. *Exp Med* 2002; 196(3): 379–87.
26. 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 Immuno pathol* 2007; 29(2):115–22.
27. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25 CD4 regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004; 112(1): 38–43.
28. Sasaki Y., Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidua and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory Tcells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. Basic *Sci Reprod Med* 2004; 10(5): 347–53.
29. Piccinni MP.T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Bio Med* 2006; 13(6): 840-4