

دو فصلنامه طب جنوب

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال پنجم، شماره ۲، صفحه ۱۲۸-۱۲۴ (اسفند ۱۳۸۱)

فعالیت سلولهای کشنده طبیعی در زنان مبتلا به سقط مکرر و خودبخود بدون توجیه؛ قبل و بعد از ایمونوتراپی

اسکندر کمالی سروستانی*^۱، بهروز غارثی فرد^۲، ژاله ذوالقدری^۳

^۱ دانشیار ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

^۲ کارشناس ارشد ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

^۳ استادیار زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

چکیده

یکی از روشهای ایمونوتراپی در سقط مکرر و خودبخود بدون توجیه، ایمن سازی میتلایان با گلوبولهای سفید خون محیطی شوهر میباشد. مکانیزم اثر بخشی این روش درمانی بخوبی مشخص نشده است. در این پژوهش تعداد ۱۸ بیمار مبتلا به سقط مکرر، خودبه خود بدون توجیه با سلول های تک هسته ای خون محیطی شوهر خود بصورت تزریق درون عروقی، زیر جلدی و بین جلدی ایمن شدند. فعالیت سلول های کشنده طبیعی نیز با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. میانگین فعالیت سلولهای کشنده طبیعی بیماران $49/3 \pm 17/70$ درصد قبل از درمان و $46/3 \pm 10/9$ درصد بعد از درمان بود ($P > 0/05$). بنابراین ایمونوتراپی با سلول های تک هسته ای خون محیطی نقشی در کاهش میزان فعالیت سلول های کشنده طبیعی در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخود و بدون توجیه ندارد.

واژگان کلیدی: سقط، ایمونوتراپی، سلولهای کشنده طبیعی، سلولهای تک هسته ای خون

مقدمه

سقط مکرر و خوبخود (Recurrent Spontaneous Abortion) به حداقل سه سقط جنین متوالی در قبل از هفته بیستم بارداری اطلاق می‌گردد (۱). فاکتورهائی چون ناهنجاریهای رحمی، کارکرد نامناسب سیستم غدد درون ریز، ناهنجاری کروموزومی و عوامل عفونی به عنوان دلایل بروز سقط مکرر و خوبخود جنین در نظر گرفته شده اند (۲). سقط مکرر و خوبخود بدون توجیه (Unexplained RSA) به حالتی اطلاق میگردد که عملکرد نامناسب سیستم ایمنی مادر علت آن بوده و در این حالت هیچیک از ناهنجاری های فوق الذکر دخالت ندارند. در ارتباط با عملکرد نامناسب سیستم ایمنی مادر، میتوان به عدم تولید IgG بلوکان، عدم تعادل در نسبت سلولهای Th1 به Th2، نقص در تولید فاکتور منع کننده القائی با پروژسترون توسط لنفوسیتهای CD8+ و فعالیت بیش از اندازه سلولهای کشنده طبیعی (NK cells) اشاره کرد (۳-۵). در ارتباط با سلولهای کشنده طبیعی، گزارشات متعدد نشان دهنده افزایش تعداد و فعالیت این سلول ها در خون محیطی زنان مبتلا به سقط مکرر و خوبخود بدون توجیه در مقایسه با افراد طبیعی می باشد (۶-۷). از طرفی در درمان این بیماران از روش هایی چون تزریق داخل عروقی ایمونوگلوبولین (۸) و تجویز لوکوسیت های شوهر (۹) استفاده گردیده و تأثیر این روش های درمانی بر کاهش فعالیت سلول های کشنده طبیعی بیماران نیز گزارش شده است (۱۰-۱۲). لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی فعالیت سلول های کشنده طبیعی در زنان مبتلا به سقط مکرر و بدون توجیه قبل و بعد از ایمونوتراپی توسط سلولهای تک هسته ای خون محیطی شوهر می باشد.

مواد و روش کار

الف) گروه مورد مطالعه: در این مطالعه ۱۸ بیمار مبتلا به سقط مکرر و بدون توجیه با متوسط سن 29.7 ± 0.5 سال (۳۹-۱۹ سال) قبل و پس از ایمونوتراپی با

لوکوسیت های خون محیطی شوهر مورد مطالعه قرار گرفتند. به هنگام بررسی هیچیک از بیماران باردار نبوده و هیچیک سابقه بارداری موفق بیشتر از بیست هفته از شوهر خود را نداشته اند. تمامی بیماران از نظر عدم وجود عفونت های میکروبی (توکسوپلازما، روبلا و سیتومگالو ویروس)، ناهنجاریهای کروموزومی، ناهنجاریهای آناتومیک، ناهنجاری های هورمونی و آنتی بادی ضد کاردیولیپین مورد بررسی قرار گرفته و در صورت طبیعی بودن بررسی های فوق الذکر در مطالعه وارد شده اند. جهت بررسی حضور آنتی بادی های سرمی علیه گلبول های سفید شوهر از تست WBC کراس ماچ استفاده شد. در این رابطه کلیه بیماران، فاقد آنتی بادی سرمی علیه گلبول های سفید شوهر خویش بودند.

ب) WBC کراس ماچ: پس از جدا کردن سلولهای تک هسته ای خون محیطی شوهر هر بیمار به کمک فایکول، در هر چاهک پلیت ترازاکی سه هزار عدد سلول به همراه یک میکرولیتر از سرم بیمار ریخته و بمدت یک ساعت انکوبه شد. پس از آن سه میکرولیتر سرم خرگوش به عنوان منبع کمپلمان اضافه شده و مجدداً یک ساعت انکوبه گردید. نهایتاً دو میکرولیتر از محلول ۲٪ رنگ اتوزین اضافه شده و درصد سلولهای لیز شده به کمک میکروسکوپ معکوس مشخص می گردید. آزمایشات بصورت تریپلیک انجام شده و به عنوان کنترل مثبت از سرم ضد لنفوسیتی استفاده شده است. در صورت لیز بیش از ۲۰٪ از سلولهای شوهر، نتیجه تست مثبت ارزیابی شده و در این حالت ایمونیزاسیون متوقف می گردید.

ج) ایمونوتراپی: پس از جدا سازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی شوهر بر روی فایکول و شستشوی آنها، تعداد صد تا دویست میلیون سلول در سه میلی لیتر نرمال سالین استریل غوطه ور شده و دو میلی لیتر از آنها بصورت درون عروقی و نیم میلی لیتر بصورت زیر جلدی و نیم میلی لیتر بصورت بین جلدی تزریق می گردید. نتیجه تزریقات پس از گذشت چهار هفته از هر تزریق به کمک تست

قبل از شروع درمان $49/3 \pm 17/7$ درصد و پس از درمان $67/3 \pm 10/9$ درصد می باشد؛ این اختلاف از نظر آماری معنی دار نمی باشد. از هفت بیمار که پس از درمان پیگیری شدند، دو بیمار، بارداری موفق داشته اند، فعالیت سلولهای کشنده طبیعی بیش از ۲۰٪ نسبت به قبل از درمان در این دو نفر کاهش نشان داده است ولی در پنج بیمار پیگیری شده دیگر، بارداری موفق نداشته اند و عموماً فعالیت سلولهای کشنده طبیعی تغییر نکرده یا افزایش نشان داد. میانگین فعالیت سلولهای NK بیماران در حضور سرم قبل و بعد از درمان نیز از لحاظ آماری تفاوت قابل ملاحظه ای را نشان نمی دهد (میانگین فعالیت $68 \pm 23/7$ در صد در حضور سرم قبل از درمان و میانگین فعالیت $69/5 \pm 25/3$ در صد در حضور سرم پس از درمان).

بحث

علت سقط مکرر خودبخود و بدون توجیه جنین را عدم پاسخگویی مناسب سیستم ایمنی مادر به آنتی ژن های پدري موجود در جفت می دانند (۱۳). بنابراین بنظر می رسد عدم پاسخگویی سیستم ایمنی مادر به آلوآنتی ژنهای پدري را می توان با تجویز آنتی ژن های پدري از راهی غیر از رحم تصحیح کرد. بر همین اساس یکی از روش های مورد استفاده در ایمونوتراپی سقط مکرر خودبخود و بدون توجیه، تجویز لوکوسیت های شوهری به بیمار می باشد (۹). تحریک سیستم ایمنی مادر با آلوآنتی ژنهای پدري موجب مهار سلولهای کشنده طبیعی می گردد و از آنجا که فعالیت بیش از اندازه سلولهای کشنده طبیعی با آسیب به تروفوبلاست و عروق خونی آن موجب سقط جنین می گردد (۱۴)، این روش درمانی میتواند به درمان این بیماران بیانجامد. بر همین اساس در این مطالعه اثرات ایمن سازی با سلولهای تک هسته ای خون محیطی شوهر بر فعالیت سلولهای کشنده طبیعی زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخود و بدون توجیه جنین، مورد بررسی قرار گرفته است.

WBC کراس ماچ بررسی می شد. در صورت منفی بودن کراس ماچ، ایمونوتراپی در هفته پنجم تکرار می گردید.

د) بررسی فعالیت سلولهای کشنده طبیعی: جهت بررسی فعالیت سلولهای کشنده طبیعی از روش MTT استفاده شده است. در این روش صدهزار عدد از سلولهای تک هسته ای خون محیطی بیماران در مجاورت پنجاه هزار عدد سلول K562 (سلولهای هدف) به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در درون انکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شده و پس از آن ده میکرولیتر از محلول MTT (شرکت Boehringer Mannheim، آلمان) اضافه و مجدداً بمدت چهار ساعت در انکوباتور حاوی Co_2 نگهداری می شد. نهایتاً صد میکرولیتر از محلول حل کننده (Solubilizer) اضافه شده و سپس میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر و با فیلتر مرجع ۷۷۰ نانومتر خوانده می شود. جهت جلوگیری از تکثیر سلولهای هدف K562، ابتدا به ازاء هر یک میلیون سلول هدف در هر میلی لیتر، پنجاه میکرولیتر از مایتومیسین با غلظت نیم میلی گرم در میلی لیتر اضافه شده و پس از نیم ساعت انکوباسیون، سلولهای K562 سه بار شسته شده و نهایتاً در تست MTT بکار گرفته میشوند. جهت تعیین میزان فعالیت سلولهای NK از فرمول (1-TMR-X100)R/TM استفاده می گردد:

در این فرمول TM میزان جذب سلولهای هدف مایتومیسین خورده، R میزان جذب سلولهای تک هسته ای خون محیطی بیمار و TmR میزان جذب به هنگام کشت مخلوط سلول هدف و سلول تک هسته ای بیمار می باشد.

بمنظور بررسی اثر سرم بر فعالیت سلولهای کشنده طبیعی، در حفرات جداگانه ای میزان بیست میکرولیتر از سرم بیمار قبل از شروع درمان یا پس از اتمام درمان اضافه شده و فعالیت سلولهای NK مطابق روش فوق بررسی می گردید.

نتایج

از طرفی در مطالعات قبلی، نقش فاکتورهای سرمی در بیماری سقط مکرر خودبخود و بدون توجیه بررسی شده است (۱۸). برای مثال میتوان به عدم وجود فاکتورهای سرمی مهار کننده کشت مخلوط لنفوسیتی در این بیماران اشاره کرد (۱۸). بمنظور بررسی احتمال تغییر در فاکتورهای سرمی پس از ایمونوتراپی و تأثیر آنها بر فعالیت سلولهای کشنده طبیعی در این مطالعه فعالیت سلولهای کشنده طبیعی در حضور سرم قبل و پس از درمان نیز مورد بررسی قرار گرفت. عدم وجود تفاوت آماری در این حالت، میتواند نشان دهنده عدم وجود و یا عدم تغییر در میزان فاکتورهای سرمی مؤثر بر فعالیت سلولهای کشنده طبیعی در خلال ایمونوتراپی این بیماران باشد.

در کل بر اساس نتایج حاصله بنظر می رسد که کاهش فعالیت سلولهای کشنده طبیعی به تنهایی نمایانگر دلیل بهبود بیماری پس از ایمونوتراپی در کلیه بیماران نمی باشد و بایستی فاکتورهای دیگر ایمنولوژیک چون تعداد سلولهای کشنده طبیعی و تولید سیتوکاین های التهابی را نیز مدنظر قرار داد.

تشکر و قدردانی

اعتبار لازم جهت انجام این تحقیق از طرح پژوهشی شماره ۷۹-۸۷۸ مربوط به دانشگاه علوم پزشکی شیراز تأمین شده است. از همکاری آقایان حمیدرضا زارع و مهران ضیائی در انجام تست های آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می گردد.

در برخی از مطالعات انجام گرفته بر روی تأثیر ایمن سازی با لوکوسیت های شوهری در مبتلایان به سقط مکرر خودبخود و بدون توجیه کاهش فعالیت سلولهای کشنده طبیعی (۱۰) یا کاهش تعداد سلولهای کشنده طبیعی (۱۵) پس از ایمن سازی گزارش شده است. در این تحقیق تفاوت آماری بین فعالیت سلولهای کشنده طبیعی قبل و پس از درمان بیماران مشاهده نگردید. علت تفاوت در نتایج حاصله را میتوان با دلایل مختلفی توضیح داد. اول آنکه ظاهراً پاسخگویی بیماران به درمان متفاوت بوده و در این بین میزان فعالیت سلولهای کشنده طبیعی برخی از بیماران پس از تجویز لوکوسیت های شوهری کاهش و در برخی دیگر بدون تغییر یا حتی افزایش نشان میدهد. جالب آنکه در دو نفر از بیماران پیگیری شده که درمان موفقیت آمیز نداشته اند، میزان فعالیت سلولهای کشنده طبیعی افزایش یا بدون تغییر باقی مانده است. لذا کاهش فعالیت سلولهای کشنده طبیعی همیشه نشان دهنده درمان موفقیت آمیز نمی باشد و میتوان نتیجه گیری کرد که علت ایمنولوژیک سقط مکرر خودبخود و بدون توجیه چنین در بیماران مختلف متفاوت است. در این رابطه میتوان به احتمال وجود ناهنجاری های دیگر سیستم ایمنی چون عدم تعادل در فعالیت سلولهای Th1 به Th2 اشاره کرد (۴). در تأیید این نظریه، در برخی از مطالعات انجام شده تفاوت فعالیت سلولهای کشنده طبیعی در بیماران مبتلا به سقط مکرر و بدون توجیه با زنان طبیعی رد شده است (۱۶-۱۷).

REFERENCES :

1. Edmons DK, Lindsy KS, Williamson E, et al. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 1982;38:447-53.
2. Dyya S. Habitual abortion. In: Copeland L, Jarrel J, McGregor JA, eds. *Textbook of Gynecology*, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993,204-20.
3. Rocklin RE, Kitzmiller JL, Carpenter CE, et al. Maternal -fetal relation. Absence of an immunologic blocking factor from the serum of women with chronic abortions. *N Engl J Med* 1976;295:1209-13.
4. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, et al. Circulating cytokines and CD 30 in normal pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Report* 2000;15:2011-17.
5. Check JH, Arwitz M, Gross J, et al. Lymphocyte immunotherapy increases serum level of progesterone induced bloking factor (PIBF). *Am J Repord Immunol* 1997;37:17-20.
6. Kwack JYH, Reaman KD, Gliman-Sachs A, et al. Un-regulated expression of CD45+,CD56+,CD16+ and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses. *Clin Immunol Newsletter* 1995;15:17-22.

7. Coulam CB, Goothman C, Roussev RG, et al. Systemic CD56+ cells can predict preganancy outcome. *Am J Report Immunol* 1995;33:40-46.
8. Morikawa M, Yamada H, Kato EH, et al. Massive intravenous treatment in women with four or more recurrent spontaneous abortions of unexplained etiology. Down regulation of NK cell activity and subsets. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:399-404.
9. Daya S, Gunby J. The effectiveness of allogeneic leukocyte immunization in unexplained primary recurrent spontaneous abortion. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:294-302.
10. Kwak JY, Gilman SA, Moretti M, et al. Natural Killer cells cytotoxicity and paternal lymphocyte immunization in women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:352-8.
11. Dupont E, Moriaux M, Lambermont M, et al. Re-evaluation of immunomodulator treatments for recurrent abortions. *Rev Med Brux* 1998;19:69-72.
12. Ruiz JE, Kwak JYH, Baum L, et al. Effect of intravenous immunoglobulin G on natural killer cell cytotoxicity in vitro in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 1996;31:125-41.
13. Chaouat G, Clatk DA, Wegmann TG. Genetic aspects of the CBA/2 and B10x. A models of murine pregnancy failure and its prevention by lymphocyte immunization. In: Beard RW, Sharp F, eds. *Early pregnancy failure: mechanisms and treatment* Ashton-Under Lyne (UK): Peacock Press, 1998, 89-102.
14. Clark DA, Chaouat G, Morgil R, et al. Prevention of spontaneous abortion in DBA/2 mated CBA/J mice by GM-CSF involves CD8+T cell-dependent suppression of natural effector cell cytotoxicity against trophoblast target cells. *Cell Immunol* 1994;154:143-52.
15. Szpakowski A, Malinowski A, Zeman K, et al. The influence of paternal Lymphocyte immunization on percentage of peripheral blood CD16+/CD56+ cells in women with primary recurrent apontaneous abortion. *Ginekol Pol* 2001;72:1063-8.
16. Morikawa M, Yamada H, Kato EH, et al. Nk cell activity and subsets in women with a history of spontaneous abortion. Cause, number of abortions, and subsequent pregnancy outcome. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52:163-7.
17. Souza SS, Ferriani RA, Santos CM, et al. Immunological evalution of patients with recurrent abortion. *J Reprod Immunol* 2002;56:111-21.
18. Malinowski A, Wilczynski J, Zeman K, et al. Immunological characteristics of nonpregnant women with unexplained recurrent spontaneous abortion who underwent paternal lymphocytes immunization. *Zentralbl Gynakol* 1998;120:493-502.