TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، اردیبهشت ۱۳۹۴، دوره ۷۳، شماره ۲، صفحه‌های ۹۳ تا ۱۰۰ مقاله اصیل

بررسی تعداد سلول‌های کشنده طبیعی و بیان HLA-G1 در خون محیطی خانم‌های باردار تهدید به سقط

سعیده سادات شبیری[۱]
سعید عابدیان کناری[۱*]، زهرا رحمانی[۲]
هادی حسین نتاج[۱]، حسین آزاده[۳]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران.
۲- گروه پریناتالوژی، گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران.
۳- گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران.

* نویسنده مسئول: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع پیامبر اعظم، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
تلفن: ۳۳۵۴۳۰۸۱-۰۱۱
E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۸ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۱/۲۴

زمینه و هدف: جنین نیمه آلوژن در تماس مستقیم با سیستم ایمنی مادر قرار دارد. عدم تنظیم سیستم ایمنی، سبب دفع جنین توسط مادر می‌گردد. مولکول HLA-G1، که در القای تحمل در دوران بارداری نقش داشته، با مهار سلول‌های کشنده طبیعی، از تهاجم به سلول‌های تروفوبلاست جنینی جلوگیری می‌کند. هدف از این مطالعه، بررسی تعداد سلول‌های NK و بیان HLA-G1 در خانم‌های باردار تهدید به سقط در مقایسه با گروه کنترل بود.

روش بررسی: این مطالعه به صورت مورد- شاهدی، از بهمن ۱۳۹۲ تا مهر ۱۳۹۳ در کلینیک باغبان شهر ساری انجام شد و طی آن ۲۱ خانم باردار تهدید به سقط در مقایسه با ۲۱ خانم باردار طبیعی پیش از هفته بیستم بارداری، مورد بررسی قرارگرفتند. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد تحت مطالعه، جدا شده و درصد سلول‌های کشنده طبیعی با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، بیان HLA-G1 در دو گروه به روش Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: تعداد سلول‌های کشنده خون محیطی به‌طور معناداری بالاتر از خانم‌های باردار طبیعی بود (P=۰/۰۳). همچنین، کاهش معناداری در بیان ایزوفرم HLA-G1 در گروه تهدید به سقط نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P=۰/۰۰۴).

نتیجه‌گیری: کاهش HLA-G1 همزمان با افزایش سلول‌های NK در خانم‌های تهدید به سقط نشان‌دهنده عدم تنظیم سیستم ایمنی مادر می‌باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که در بیماران تهدید به سقط، بیان HLA-G1 همراه با درصد سلول‌های NK به‌عنوان شاخص تشخیصی مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: تهدید به سقط، HLA-G1، سلول NK.

مقدمه

بارداری، روندی فیزیولوژیک است که در آن سیستم ایمنی مادر در تماس نزدیک با بافت‌های نیمه آلوژن جنین قرار می‌گیرد، بنابراین امکان رد جنین توسط مادر در شرایط بد تنظیمی سیستم ایمنی وجود دارد.[۱] در حال حاضر، سقط یکی از اختلالات اصلی و مهم در زمان بارداری محسوب می‌شود که سبب حذف جنین در این دوران می‌گردد[۲و۳] و شیوع کلی سقط خود به خودی در حدود ۱۲٪ است که در سقط‌های بعدی این میزان به ۲۰-۱۶٪ افزایش می‌یابد.[۴-۷] از علل سقط می‌توان به مشکلات کروموزومی، اختلالات ترومبوفیلیک، اختلال در هورمون‌ها و سیستم ایمنی مادر، عفونت‌ها، مسایل رحمی و مشکلات سرویکس و موارد ناشناخته (ایدیوپاتیک) اشاره کرد.[۷و۸] دلیل بسیاری از سقط‌های خودبه‌خودی ناشناخته باقی مانده که اختلالات ایمونولوژیک می‌تواند از مهمترین دلایل سقط‌های خودبه‌خودی و مکرر محسوب شود.[۹] تهدید به سقط در ۴۰-۳۰٪ خانم‌های باردار رخ داده و نیمی از این تعداد، دچار سقط جنین

Archive of SID
www.SID.ir

می‌شوند.[۱۰] به دلیل تماس جنین با سیستم ایمنی مادر، مکانیسم‌های تعدیل ایمنی در طی بارداری اهمیت قابل توجهی دارند. یکی از عوامل مهم دفع جنین سمی آلوژنیک، مولکول ایمونوتولرانس HLA-G بوده که یک HLA نوع یک غیر کلاسیک (HLAIb) با پلی‌مورفیسم محدود می‌باشد. تاکنون ۵۰ آلل و ۱۶ پروتیین برای مولکول HLA-G شناخته شده است. این مولکول شامل ۷ ایزوفرم می‌باشد که از این تعداد، چهارم ایزوفرم (HLA-G1-G4) به‌صورت غشایی و سه ایزوفرم (HLA-G5-7) به‌صورت محلول می‌باشند.[۱۱-۱۳] علاوه بر این، HLA-G1 محلول نیز، از جدا شدن HLA-G1 متصل به غشا از طریق متالوپروتیینازها ایجاد می‌شود.[۱۴]

از بین این مولکول‌ها، HLA-G1 غشایی و همتای محلول آن (HLA-G5) بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. هر دوی این ایزوفرم‌ها، مهارکننده‌ی قوی پاسخ‌های سلول T آلوژن از طریق القای آپوپتوز +TCD8، متوقف‌کننده‌ی تکثیر سلول‌های B و T، مهارکننده سیتوتوکسیسیتی سلول‌های کشنده‌ی طبیعی (Natural killer cells, NK) و القاکننده‌ی سلول‌های T تنظیمی بوده و در بلوغ سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) نیز موثر می‌باشند.[۱۵] HLA-G در حالت طبیعی معمولا فقط در سلول‌های تروفوبلاست، بافت تیموس، پانکراس، قرنیه، ماتریکس ناخن و پیش‌سازهای اریتروییید بیان می‌شود.[۱۶]

مطالعات مختلف حاکی از نقش احتمالی این مولکول در حفاظت جنین از سیستم ایمنی مادری، ایجاد تحمل به پیوند و گریز ویروس و تومور از سیستم ایمنی می‌باشند.[۱۷-۱۹] در طی بارداری مولکول HLA-G با حملات سیستم ایمنی مادر مقابله می‌کند، که این حملات بیشتر توسط سلول‌های T و سلول‌های کشنده‌ی طبیعی مادری صورت می‌گیرد.[۱۰] HLA-G از طریق اتصال به گیرنده‌های خود از جمله ILT2, ILT4 و KIR2DL4 عملکرد مهاری خود را اعمال می‌کند. این گیرنده‌ها بیشتر در سطح سلول‌های NK، T و عرضه‌کننده آنتی‌ژن بیان شده و دارای بنیان‌های مهاری Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) می‌باشند.[۲۰و۲۱] بنابراین، توانایی این مولکول در مهار این سلول‌ها و به‌خصوص سلول‌های NK می‌تواند یکی از عوامل مهم در جلوگیری از دفع جنین توسط سیستم ایمنی مادر باشد.[۹] سلول‌های NK از سلول‌های مهم سیستم ایمنی ذاتی بوده و توانایی لیز سلول های هدف را دارد. علاوه بر این، یک منبع تولیدکننده سایتوکین‌های تنظیم‌کننده ایمنی محسوب می‌شوند.[۲۲] سلول‌های NK شباهت بسیاری به سلول‌های T داشته و در حدود ۱۰-۵٪ از لنفوسیت‌ها را شامل می‌شوند که با بیان آنتی‌ژن CD56 یا مولکول چسبنده سلول عصبی (NCAM) و فقدان CD3 شناخته می‌شوند.[۲۲و۲۳] بررسی سلول‌های NK خون محیطی در خانم‌هایی با سابقه‌ی سقط اولین بار توسط Beer و همکاران مطرح شد،[۲۴] این گروه مدعی شدند که افزایش تعداد یا فعالیت سلول‌های NK خون محیطی می‌تواند پیش‌بینی کننده سقط در خانم‌های باردار باشد.[۲۵]

این یافته توسط مطالعات دیگری نیز تایید شد،[۲۳و۲۵و۲۶] ولی برخی مطالعات این گونه نتیجه گرفتند که هرچند ممکن است تعداد سلول‌های NK افزایش یابد ولی این امر نمی‌تواند پیش‌بینی کننده‌ی نتیجه‌ی بارداری باشد.[۲۷]

بنابراین، نقش سلول‌های NK هنوز نامشخص است و نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. با توجه به این موضوع که بررسی ایزوفرم‌های مختلف HLA-G از جمله HLA-G5 HLA-G4 و HLA-G7 توسط گروه ما انجام گرفته است،[۹و۲۸] در این مطالعه تعداد سلول‌های NK و میزان بیان ایزوفرم HLA-G1 در خون محیطی خانم‌های باردار تهدید به سقط با خانم‌های باردار طبیعی مورد مقایسه قرار می‌گیرد، تا با بررسی همزمان سلول‌های NK و مولکول HLA-G1، بتوان افق تازه‌ای از تغییرات احتمالی سیستم ایمنی، شناخت برخی از مکانیسم‌های مولکولی سقط جنین و واکنش متقابل آنها، در مقایسه با گروه شاهد به دست آورد.

روش بررسی

این مطالعه مورد- شاهدی بوده و افراد مورد مطالعه از بین خانم‌های باردار که از بهمن ۱۳۹۲ تا مهر ۱۳۹۳ جهت مراقبت‌های دوران بارداری به کلینیک فوق تخصصی باغبان شهر ساری مراجعه می‌کردند، انتخاب شدند. گروه مورد شامل ۲۱ خانم باردار تهدید به سقط بوده که با لکه‌بینی و خونریزی پیش از هفته بیستم بارداری مراجعه کردند و شرایط تهدید به سقط در آنها، توسط متخصص زنان و زایمان مورد تایید قرار گرفت. گروه شاهد نیز شامل ۲۱ خانم باردار طبیعی پیش از هفته بیستم بودند. ویژگی‌های دموگرافیک افراد مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شد. معیار ورود به این مطالعه داشتن

Archive of SID
www.SID.ir

شرایط تهدید به سقط و معیار خروج از مطالعه داشتن مشکلات ایمونولوژیک و پاتولوژیک، دیابت، هرگونه عفونت، اختلالات آناتومیک رحم، تروما و مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی بود. از هر یک از بیماران ۵ ml خون محیطی گرفته شد و پیش از انجام آزمایشات دیگر، آزمایش CBC با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی XE-2100 haematology analyser (Sysmex, Kobe, Japan) انجام گردید.

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC): ۵ ml خون محیطی پس از رقیق‌سازی با بافرسالین (PBS) به آرامی روی ۲/۵ ml فایکول XE-2100 haematology analyser (Sysmex, Kobe, Japan) با وزن مخصوص ۱/۰۷۷ اضافه شد و در ۴۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس، حلقه‌ی ایجاد شده شامل سلول‌های تک‌هسته‌ای به آرامی جدا شد و با PBS در دور ۳۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. پس از دو بار شستشو سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی را به حجم ۱ ml رسانده و شمارش سلولی با لام نئوبار صورت گرفت.

فلوسایتومتری: برای سنجش شاخص‌های سطح سلولی در هر نمونه از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی CD3-FITC و CD56-PE همراه با آنتی‌بادی همسان از نظر ایزوتایپ و فلوروکروم به‌عنوان ایزوتایپ کنترل، eBioscience Inc., San Diego, CA, USA استفاده شد. در هر بار سلول‌ها شمارش شده و ۴×۱۰^{۵} سلول برای فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفت. ۵ µl از هر آنتی‌بادی به سلول‌ها اضافه شده و به مدت ۴۵ دقیقه در یخچال انکوبه شد. سپس ۲ ml بافر رنگ‌آمیزی ۵٪ (حاوی سرم جنین گاوی (FBS) در PBS به آن افزوده و به مدت ۱۰-۵ min در ۳۰۰ g سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، سلول‌ها دو بار با PBS شستشو داده شد. سپس، سلول‌ها را با PBS به حجم ۱ ml رسانده و با دستگاه فلوسایتومتری Partec PAS III flow cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) مورد سنجش قرار دادیم.

استخراج RNA و ساخت cDNA: پس از جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج ستونی (SinaClon BioScience Co., Tehran, Iran) بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. در انتها RNA در ۵۰ µl ۴۰-آب مقطر Rnase free حل شد و سپس با استفاده از دستگاه Nanodrop (Biowave II, Biochrom, UK) غلظت آن مشخص گردید. ساخت cDNA با استفاده از کیت لیوفیلیزه AccuPower®CycleScript RT PreMix (dN 6) Bioneer, Inc., Seoul, South Korea انجام گرفت. با توجه به غلظت RNA های استخراج شده، مقدار ۱-۰/۱ µg RNA

جدول ۱: ویژگی‌های دموگرافیک دو گروه مورد و شاهد

	مورد (n=۲۱) Mean±SD	**شاهد** (n=۲۱) Mean±SD	**P***
سن (سال)	۲۷/۵۷±۵/۵۸	۲۸/۴۵±۵/۷۵	۰/۶۷
وزن (kg)	۶۴/۵۲±۹/۵	۶۵/۰۹±۶/۷	۰/۸۶
هموگلوبین خون (mgl/dl)	۱۲/۳۹±۰/۸۳	۱۱/۹±۰/۷۷	۰/۱۱
هماتوکریت (درصد)	۳۳/۸±۱/۸۱	۳۴/۱۹±۱/۲۶	۰/۰۶
دفعات سقط (تعداد)	۲- ۰ بار	-	-

*سطح معناداری P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد و از آزمون Student's t-test استفاده شد.

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

طول محصول (جفت باز)	**پرایمرها**	**ژن مورد بررسی**
۸۰	5'-CTGGTTGTCCTTGCAGCTGTAG-3' 5'-CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTTCT-3'	HLA-G1
۵۹	5'-CTG AAC CAT CCA GGC CAA AT-3' 5'-GCC GTG TGG CAA TCC AAT-3'	EF1

Archive of SID

www.SID.ir

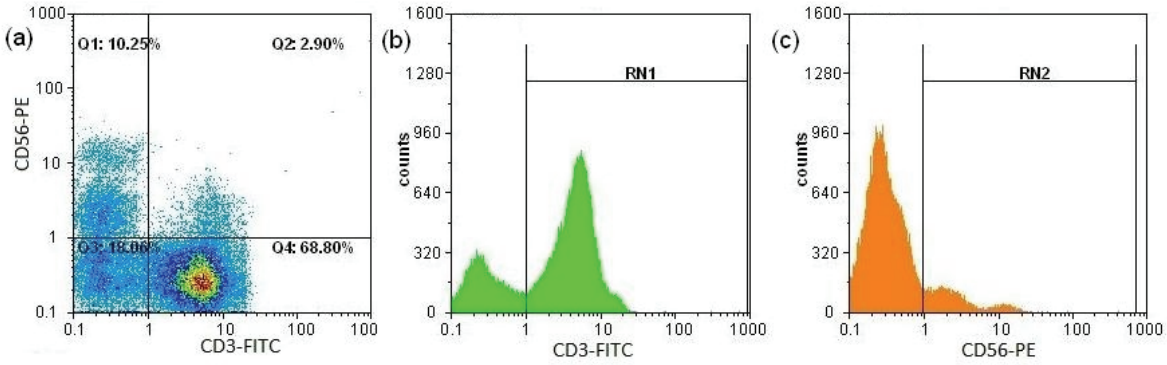
برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Real time PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی HLA-G1 در کنار EF1 (به‌عنوان کنترل داخلی) انجام گرفت (جدول ۲). برای آماده‌سازی نمونه‌ها از مخلوط سایبرگرین ۲x Bioneer, Inc., Seoul, South Korea استفاده شد. برنامه دمایی تنظیم شده برای این ایزوفرم و کنترل داخلی به صورت ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه، ۵۹ °C، ۳۰ ثانیه (اتصال پرایمر) و ۷۲ °C، ۴۵ ثانیه، بود که توسط ترموسایکلر (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) انجام شد. داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه گرفته و نتایج حاصل از هر نمونه به صورت ΔCt (CtHLAG1- CtEF1) محاسبه گردید. داده‌های حاصل با استفاده از SPSS software, version 19 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و با Student's t-test بررسی شدند. P<۰/۰۵ معنادار تلقی شد.

یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۴۲ خانم باردار انجام گرفت که از این تعداد ۲۱ خانم باردار تهدید به سقط با لکه‌بینی و خونریزی به‌عنوان گروه مورد و ۲۱ خانم باردار طبیعی پیش از هفته بیستم به‌عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند.

تعداد سلول‌های CD56+، CD3- که بیانگر سلول‌های NK می‌باشد در خانم‌های باردار تهدید به سقط به‌طور معناداری بالاتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). علاوه بر این، تعداد سلول‌های CD3+ T نیز مورد بررسی قرار گرفت، ولی تفاوت معناداری در تعداد این سلول‌ها، بین دو گروه مشاهده نشد (نمودار ۱).

میزان بیان ایزوفرم HLA-G1 در گروه مورد، کاهش معناداری نسبت به گروه شاهد داشت (P<۰/۰۵)، (جدول ۳) نشان داده شد.



نمودار ۱: a نمودار dotplot فلوسایتومتری، منحنی افقی CD3-FITC و منحنی عمودی CD56-PE می‌باشد. از بین سلول‌های لنفوسیتی سلول‌های CD56+، CD3- (چپ- بالا) به‌عنوان سلول NK و سلول‌های CD3+ (راست- پایین) به‌عنوان سلول T شناسایی می‌شوند و به نظر می‌رسد سلول‌هایی که هر دو شاخص را بیان می‌کنند، نشان دهنده‌ی سلول‌های NKT می باشند (راست- بالا). b نمودار هیستوگرام نشان‌دهنده‌ی جمعیت سلول‌های T. c نمودار هیستوگرام نشان‌دهنده‌ی جمعیت سلول‌های NK.

جدول ۳: تعداد سلول‌های NK و T و میزان بیان ایزوفرم HLA-G1 در خون محیطی خانم‌های باردار تهدید به سقط و خانم‌های باردار طبیعی

متغیر	باردار طبیعی (Mean±SD)	تهدید به سقط (Mean±SD)	P*
تعداد سلول‌های NK	۶/۹۳±۱/۹۴	۹/۸۶±۳/۹۸	**۰/۰۳
تعداد سلول‌های T	۶۴/۰۵±۷/۹۶	۶۰/۶۸±۸/۳۹	۰/۳۲
میزان بیان HLA-G1	۱/۹±۰/۷	۱/۰±۰/۴۶	**۰/۰۰۴

*سطح معناداری P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد و از آزمون Student's t-test استفاده شد. ** از نظر آماری اختلاف معنادار بود (P≤۰/۰۵). mean±SD محاسبه شد.

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه تعداد سلول‌های NK همراه با بیان ایزوفرم HLA-G1 در خانم‌های باردار تهدید به سقط که پیش از هفته بیستم بارداری دچار لکه‌بینی و خونریزی شدند (گروه مورد) در مقایسه با خانم‌های باردار طبیعی (گروه شاهد) مورد بررسی قرار گرفتند، که تفاوت معناداری در تعداد سلول‌های NK و بیان ایزوفرم HLA-G1 در دو گروه مشاهده شد.

سلول‌های NK جمعیت بالایی از لنفوسیت‌های دسیدوا را به خود اختصاص داده و نقش موثری در لانه‌گزینی طبیعی ایفا می‌کنند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که خانم‌هایی با سقط مکرر سطح بالایی از سلول‌های NK را در خون محیطی دارا هستند که این امر منجر به آسیب جدی سلول‌های تروفوبلاست از طریق فعالیت سیتوتوکسیسیتی این سلول‌ها می‌شود.[۲۳]

سلول‌های NK خون محیطی از طریق گردش خون وارد جایگاه لانه‌گزینی شده و در تماس مستقیم با سلول‌های تروفوبلاست قرار می‌گیرند. در فقدان کامل مولکول‌های HLA، سلول‌های تروفوبلاست جنینی توسط سلول‌های NK تخریب می‌شوند. سلول‌های NK موجود در دسیدوا گیرنده‌های مهاری KIR و CD94 را بروز می‌دهند ولی تنها بخشی از سلول‌های NK خون محیطی، گیرنده‌های مهاری اختصاصی HLA-G که مهارکننده‌ی فعالیت سیتوتوکسیسیتی سلول‌های NK هستند را بروز می‌دهند.[۲۹] این موضوع که چگونه سلول‌های تروفوبلاست از این تهاجم در امان می‌مانند اهمیت بالایی دارد، به‌طوریکه، در روند بارداری طبیعی ترکیب تظاهر HLA در سطح سلول‌های تروفوبلاست تغییر می‌یابد و بیان مولکول‌های HLA غیرکلاسیک از جمله HLA-G افزایش یافته و موجب مهار سیتوتوکسیسیتی NK و تهاجم به تروفوبلاست می‌شود.[۳۰]

در مطالعه حاضر درصد سلول‌های کشنده طبیعی در خانم‌های باردار تهدید به سقط افزایش داشته است، که به نظر می‌رسد از دلایل سقط جنین می‌باشد، به‌علاوه کاهش تظاهر مولکول ایمونوتولرانس HLA-G1 در گروه بیمار، سبب افزایش خطر سقط خودبه‌خودی در مقایسه با افراد سالم شده است (جدول ۳). مطالعات مختلفی در رابطه با بررسی این عوامل در طی بارداری صورت گرفته است. در مطالعاتی که پیش از این توسط گروه ما صورت گرفت، کاهش معناداری در بیان HLA-G5 و HLA-G4 در خون محیطی خانم‌های تهدید به سقط نسبت به گروه باردار طبیعی مشاهده شد ولی تفاوت معناداری در بیان ایزوفرم HLA-G7 بین دو گروه مشاهده نشد.[۲۸،۹]

همراستا با این مطالعه، Ntrivalas و همکاران با مطالعه بر روی ۴۰ خانم با سقط مکرر در برابر ۱۳ خانم سالم نشان دادند که تعداد و فعالیت سلول‌های NK در خون محیطی افراد با مشکل سقط مکرر نسبت به گروه شاهد بالاتر است.[۲۳]

در مطالعه‌ای که توسط Michou و همکاران صورت گرفت، تعداد سلول‌های NK خون محیطی در چهار گروه سقط مکرر، سقط‌های متناوب، نازا و کنترل سالم مورد بررسی قرار گرفت که در آن، سطوح بالاتری از این سلول‌ها در افراد نازا و گروه دارای مشکل سقط نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.[۲۵] مطالعه‌ی Kaider و همکاران، نیز نتایج مشابهی داشته و موید افزایش سطح سلول‌های NK خون محیطی در افراد با سابقه سقط بود.[۲۶] در مقابل، Thum و همکاران نشان دادند که هرچند تعداد سلول‌های NK در افراد مواجه با سقط افزایش می‌یابد، این امر نمی‌تواند پیش‌بینی کننده‌ی نتیجه‌ی بارداری باشد.[۲۷] بنابراین در این تحقیق، تعیین مولکول HLA-G1 در کنار سلول NK می‌تواند به‌عنوان عاملی برای پیش‌بینی سقط ایمونولوژیک جنین مطرح گردد.

در طی بارداری مولکول‌های HLAI (A,B,...) و HLAII (DR, DQ,...) به‌طور متناوب در سطح تروفوبلاست بروز پیدا می‌کنند و در مقابل بیان مولکول‌های HLA غیرکلاسیک از جمله HLA-E و HLA-G افزایش می‌یابد، ولی افزایش تعداد سلول‌های کشنده‌ی طبیعی حاضر در گردش خون مادری همراه با کاهش بیان مولکول HLA-G در شرایط تهدید به سقط می‌تواند منجر به فعال شدن سلول‌های NK و در نتیجه تهاجم به سلول‌های تروفوبلاست گردد. ایزوفرم HLA-G1 نقش موثری در مهار پاسخ سلول T آلوژن، تکثیر لنفوسیت‌ها و سیتوتوکسیسیتی NK داشته و با القای سلول‌های T تنظیمی در تعدیل ایمنی نقش دارد.[۱۵]

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش بیان این ایزوفرم در گروه تهدید به سقط نسبت به خانم‌های باردار طبیعی، می‌تواند با تغییر پروفایل سایتوکینی و تکثیر سلول‌های لنفوسیتی، سبب افزایش فعالیت سیتوتوکسیسیتی سلول‌های NK و همچنین تغییر فعالیت سلول T تنظیمی از طریق اختلال در ترشح

Archive of SID

www.SID.ir

سایتوکین‌های IL-10، TGF-ß و IL-35 گردد که نشان‌دهنده بر هم خوردن تنظیم ایمنی در این افراد می‌باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود بررسی تغییرات همزمان تعداد سلول‌های NK و بیان HLA-G در کنار سلول‌ها و مولکول‌های تنظیمی دیگر می‌تواند نقش موثری در توضیح فرآیند ایمونولوژیک مرتبط با سقط داشته باشد. بنابراین تعریف شاخص ویژه‌ای در جلوگیری از سقط جنین اهمیت به‌سزایی دارد، بنابراین، تعیین سطح بیان HLA-G1 همراه با تعیین درصد سلول‌های NK در بیماران تهدید به سقط، می‌تواند شاخص تشخیصی مهمی در پیش‌آگهی بیماری باشد.

سپاسگزاری: این مطالعه نتیجه بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد سعیده سادات شبیری در سال ۹۳-۹۲ با شماره ثبت ۱۶۸۱ می‌باشد که بدینوسیله نویسندگان، مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران اعلام می‌دارند.

References

1. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006;12(3):209-32.
2. Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol*. 2003;81:199-252.
3. Moreau P, Contu L, Alba F, Lai S, Simoes R, Orrù S, et al. HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G*0106 allele with preeclampsia and miscarriage. *Biol Reprod* 2008;79(3):459-67.
4. Knudsen UB, Hansen V, Juul S, Secher NJ. Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;39(1):31-6.
5. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989;299(6698):541-5. Erratum in: *BMJ* 1989;299(6707):1082.
6. Salat-Baroux J. Recurrent spontaneous abortions. *Reprod Nutr Dev* 1988;28(6B):1555-68.
7. van Oppenraaij RH, Jauniaux E, Christiansen OB, Horcajadas JA, Farquharson RG, Exalto N; ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Predicting adverse obstetric outcome after early pregnancy events and complications: a review. *Hum Reprod Update* 2009;15(4):409-21.
8. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genetic factors as a cause of miscarriage. *Curr Med Chem* 2010;17(29):3431-7.
9. Farzad F, Abediankenari S, Rahmani Z, Hashemi-Soteh MB, Hosseinikhah Z, Naghavian E. The role of HLA-G4 and G5 in threatened-abortion women. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013;23(106):2-10.
10. Naghavian E, Abediankenari S, Rahmani Z, Nazari Z, Chabaki M, Alizadeh A, et al. Association of HLA-G null allele polymorphism in women with threatened abortion in comparison with control. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014;23(1):2-7.
11. Abediankenari S, Ghasemi M, Eslami MB. Dendritic cell stimulation by IFN-β alters T cell function via modulation of cytokine secretion in diabetes type. *Acta Med Iran* 2009;47(5):341-7.
12. Moreau P, Carosella E, Teyssier M, Prost S, Gluckman E, Dausset J, et al. Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Hum Immunol* 1995;43(3):231-6.
13. Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 2008;29(7):313-21.
14. Amodio, G, Sales de Albuquerque R, Gregori S. New insights into HLA-G mediated tolerance. *Tissue Antigens* 2014;84(3):255-63.
15. Boura JS, Vance M, Yin W, Madeira C, da Silva CL, Porada CD, et al. Evaluation of gene delivery strategies to efficiently overexpress functional HLA-G on human bone marrow stromal cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2014;1:14041.
16. Favier B, LeMaoult J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: an update. *Tissue Antigens* 2007;69(3):207-11.
17. Abediankenari S, Ghasemi M, Kim YJ. Human leukocyte antigen-G expression on dendritic cells induced by transforming growth factor-β1 and CD4-T cells proliferation. *Iran Biomed J* 2011;15(1-2):1-5.
18. Gallegos CE, Michelin S, Trasci SB, Lobos EA, Dubner D, Carosella ED. HLA-G1 increases the radiosensitivity of human tumoral cells. *Cell Immunol* 2014;287(2):106-11.
19. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 2005;19(7):681-93.
20. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(3):369-95.
21. Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, Kurimoto E, et al. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(44):16412-7.
22. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22(11):633-40.
23. Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, et al. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 2001;16(5):855-61.
24. Beer AE, Kwak JY, Ruiz JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996;35(4):376-82.
25. Michou VI, Kanavaros P, Athanassiou V, Chronis GB, Stabamas S, Tsilivakos V. Fraction of the peripheral blood concentration of CD56+/CD16-/CD3- cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility. *Fertil Steril* 2003;80 Suppl 2:691-7.

Archive of SID
www.SID.ir

26. Kaider AS, Kaider BD, Janowicz PB, Roussev RG. Immunodiagnostic evaluation in women with reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 1999;42(6):335-46.
27. Thum MY, Bhaskaran S, Bansal AS, Shehata H, Ford B, Sumar N, et al. Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+ NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Hum Reprod* 2005;20(5):1272-6.
28. Abediankenari S, Farzad F, Rahmani Z, Hashemi-soteh MB. HLA-G5 and G7 isoforms in pregnant women. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2015;14(2):217-21.
29. King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998;4(5):480-5.
30. Yan WH, Fan LA, Yang JQ, Xu LD, Ge Y, Yao FJ. HLA-G polymorphism in a Chinese Han population with recurrent spontaneous abortion. *Int J Immunogenet* 2006;33(1):55-8.

Archive of SID

www.SID.ir

TUMJ Tehran University Medical Journal, May 2015; Vol. 73, No. 2: 93-100 General Article

Evaluation of NK cell level and HLA-G1 expression in peripheral blood in threatened-abortion

Saeideh Sadat Shobeiri M.Sc.[1]
Saeid Abediankenari Ph.D.[1*]
Zahra Rahmani M.D.[2]
Hadi Hossein Nataj M.Sc.[1]
Hossein Azadeh M.D. [3]

1- Department of Immunology, Immunogenetic Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
2- Department of Obstetrics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
3- Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
Tel: +98- 11- 33543081
E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

Abstract

Received: 30 Oct. 2014 Accepted: 27 Feb. 2015 Available online: 13 Apr. 2015

***Background*:** Pregnancy is a phenomenon that antigens of semi allogenic fetus are in direct contact with mother's immune system. Immune dysregulation can cause fetus rejection by mother's immune system responses. Human leukocyte antigen-G1, as an immunotolerant molecule has a major role to induce tolerance during pregnancy by suppression of natural killer cells through inhibitor receptors on these cells. Natural killer cells have an important role in immune surveillance and these cells can be reaction with HLA-G molecules on the trophoblast cells surface. This function prevents natural killer cell invasion against fetus trophoblast cells. The purpose of this study was determination of natural killer cells percent and human leukocyte antigen-G1 expression in peripheral blood of threatened-abortion pregnant women in comparison with control group.

***Methods*:** This case-control study was conducted from, February 2014 to October, 2014 in Baghban Clinic in Sari City, Mazandaran province. We investigated 21 threatened-abortion women with light bleeding or spotting less than twenty weeks of pregnancy in comparison with 21 normal pregnant women as control group. Peripheral blood mononuclear cell was isolated by ficoll histopaque (1.077) and natural killer cells percent were evaluated by flow cytometry. Furthermore, we assessed the human leukocyte antigen-G1 isoforms expression by real-time polymerase chain reaction (PCR) in case and control groups.

***Results*:** The results of this study was shown that natural killer cells percent in threatened-abortion pregnant women was significantly higher than normal pregnant women (P=0.03). In addition, human leukocyte antigen-G1 isoform had a lower expression in threatened-abortion pregnant women in comparison with control group (P=0.004).

Conclusion: Decreasing of human leukocyte antigen-G1 expression with increasing of natural killer cells level in threatened-abortion pregnant women is an indicator of mother's immune system dysregulation in comparison with control group. Therefore, it is concluded that in the threatened-abortion pregnant women, human leukocyte antigen-G1 expression level with natural killer cells percent as diagnostic marker must be determine.

Keywords: HLA-G1, natural killer cells, threatened-abortion.

Archive of SID
www.SID.ir