بررسی عملکرد لنفوسیتهای گرانوله در دوسیدوای انسانی

مهری غفوریان بروجردنیا

استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه اهواز.

چکیده

لکوسیتها تقریب ۲۶ تا ۳۶ درصد سلول‌های استروما را در دسیدوای سه ماهه اول حاملگی تشکیل می‌دهند که تقریب ۷۵ ٪ از آنها مربوط به لنفوسیت‌های گرانوله اندومتریومی (eGL) با فنوتیپ غیرمعمول شبیه سلول‌های کشنده طبیعی (NK) می‌باشد. تا کنون نقش‌های متفاوتی برای eGL پیشنهاد شده است ولی هنوز نقش اساسی این سلولها در نگهداری حاملگی طبیعی به خوبی مشخص نشده است. در مطالعه حاضر فعالیت مهار ایمونولوژیکی در مایع کشتی حاصل از ده نمونه دوسیدوای سه ماهه اول حاملگی طبیعی که به دو صورت سوسپانسیون سلولی کامل و سلول‌های eGL خالص شده از سوسپانسیون سلولی مربوط تهیه شده بود با استفاده از روش PHA-induced Lymph proliferation مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از روش آماری Student's t test نشان داد که اگر چه فعالیت مهار ایمونولوژیکی حاصل از سلول‌های eGL بیشتر از سوسپانسیون سلولی است ولی اختلاف قابل توجهی مشاهده نشد. بنظر میرسد یکی از عملکردهای سلول‌های eGL ایجاد خاصیت مهار ایمونولوژیکی در محیط رحمی می‌باشد ولی این فعالیت تا چه اندازه برای بقاء واحد جفتی جنینی اساسی است نیاز به تحقیقات بیشتری در حاملگی‌های پاتولوژیکی دارد.

واژه‌های کلیدی: لنفوسیتهای گرانوله، دوسیدوار، مهار ایمونولوژیکی.

آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، بخش ایمونولوژی.

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

دسیدوای انسانی (Decidua) بافت مخاطی رحمی مادر است که درتماس با سلولهای تروفوبلاست جفت میباشد. این بافت در سه ماهه حاملگی حاوی تعداد زیادی لکوسیت میباشد که با روش‌های ایمونوهیستوشیمیایی مشخص شده تقریباً ۳۶-۲۶٪ سلولهای استروما را تشکیل میدهد. سه نوع اساسی جمعیت لکوسیتی در این بافت تشخیص داده شده است که شامل ماکروفاژها، لنفوسیتهای T و لنفوسیتهای بزرگ گرانوله (endometrial Granulated Lymphocytes) با فنوتیپ غیرمعمول شبیه سلولهای کشنده طبیعی ($CD56^{+}CD16^{-}CD3^{-}$) می‌باشد. لنفوسیتهای B گرانولوسیتهای پلی مرفونوکلئر و سلولهای کشنده طبیعی (Natural killer,Nk) کلاسیک با درصد پایینی در این بافت حضور دارند(۱).

eGL تقریباً۷۵٪ از لکوسیتهای دسیدوا را در سه ماهه اول حاملگی تشکیل می‌دهد اما تعدادشان در نیمه دوم حاملگی به طور قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند. این جمعیت لکوسیتی قویا مارکر CD56 را که یک مارکر مخصوص سلولهای NK است بر سطح خود بیان میکنند ولیکن فاقد مارکر CD16 که بر روی اکثر سلولهای NK خون محیطی حضور دارد، می‌باشد. اکثر این سلولها مارکر CD2 را که مخصوص لنفوسیت‌های T است دارند(۳،۲). عملکرد لنفوسیت‌های گرانوله در کنترل حاملگی طبیعی بخوبی مشخص نشده است. حضور فراوان این سلولها در دسیدوای سه ماهه اول حاملگی و حضور لنفوسیتهای گرانوله شبیه آنها در گونه های دیگر موثر بودن این سلولها در نگهداری و مراقبت حاملگی نقش دارد(٤،٣). تا کنون عملکردهای متفاوتی برای این سلولها پیشنهاد شده است که از آن جمله میتوان به فعالیت کشندگی طبیعی(٥)، سیتوتوکسیسیتی بر علیه تروفوبلاست(٦)مهار ایمونولوژیکی اشاره کرد(۷). مطالعات فراوان تا کنون نشان داده‌اند که بافت دسیدوای انسانی و موش آزمایشگاهی فاکتورهای محلولی را تولید میکنند که میتوانند فعالیت مهار ایمونولوژیک را در اوایل دوران بارداری سبب شوند (۱۱-۸). احتمال دارد این فعالیت سبب محافظت جنین از حمله سیستم ایمونولوژیکی مادر شود و در نتیجه از سقط خودبخودی جنینی جلوگیری کند(۱۲،۱۳).

تا کنون سلولهای متفاوتی در دسیدوای انسانی به عنوان سلولهایی که نقش مهارکنندگی دارند، مطرح شده است. در این تحقیق فعالیت مهار ایمونولوژیکی سوسپانسیون سلولی حاصل از دسیدوای سه ماهه اول حاملگی در مقایسه با این فعالیت در سلولهای eGL خالص شده از سوسپانسیون سلولی مربوط مطالعه شده است تا مشخص شود آیا eGL میتواند به عنوان یک سلول اساسی تولید کننده فاکتور مهاری در دسیدوای سه ماهه اول حاملگی در نظر گرفته شود.

مواد و روشها

بافتها و روش های کشت بافتی

ده نمونه از بافت دسیدوای انسانی بدنبال سقط درمانی در سه ماهه اول حاملگی‌های طبیعی گرفته شد و در شرایط استریل بدو طریق زیر در آزمایشگاه کشت داده شد:

۱- سوسپانسیون سلولی: بافت دسیدوا بعد از اینکه به قطعات کوچکی بریده شد تحت تاثیر آنزیم بصورت سوسپانسیون تک سلولی درآمد که با کلرور آمونیم اینکوبه گردید و سپس با غلظت یک میلیون در میلی لیتر RPMI ١٦٤٠ همراه با ۱۰٪ سرم گوساله جنینی در سه فلاسک کشت سلولی در سه زمان ٤٨،٢٤و٧٢ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ٥٪CO2 کشت داده شد.

۲- eGL های خالص شده: سلولهایeGL که مارکر CD56 را داشتند توسط سیستم مغناطیسی جداکنندگی Mini MACS(Milteny) با استفاده از آنتی‌بادی

Downloaded from http://www.jri.ir

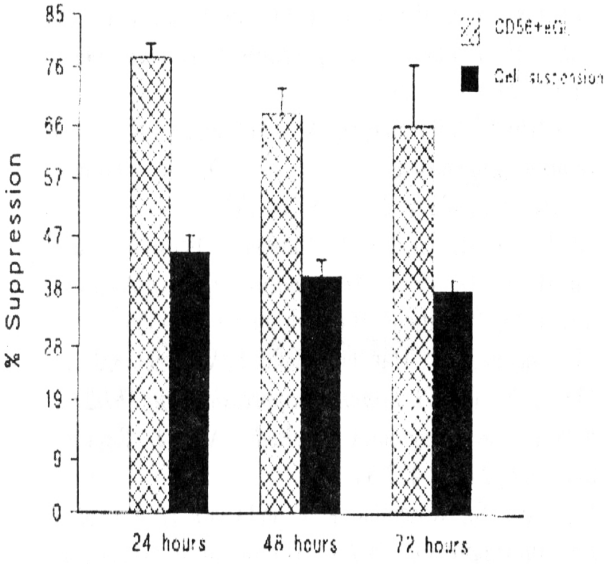
مونوکلونال NKHI(Coulter) از قسمتی از سوسپانسیون سلولی اولیه از هر نمونه جدا گردید. دستگاه فلوسیتومتری (Becton Dickinson) درصد خلوص سلول‌های eGL را بیش از ۹۵٪ نشان داد سلول‌های eGL خالص شده سپس با غلظت یک میلیون در میلی لیتر RPMI ۱۶۴۰ همراه با ۱۰٪ سرم گوساله جنینی در سه فلاسک در سه زمان ۲۴و۴۸و۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO2 کشت داده شد.

روش آزمایش

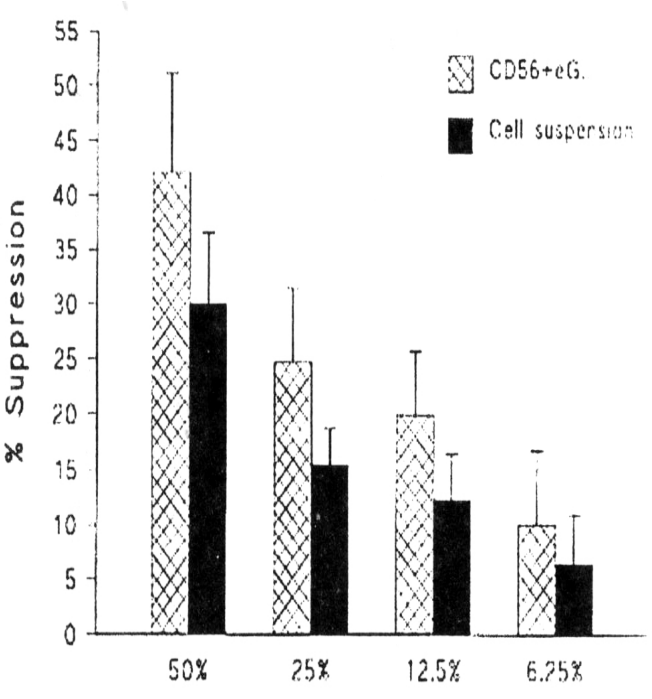
جهت سنجش فعالیت مهار ایمونولوژیکی محلولهای کشت بافتی تهیه شده از سوسپانسیون سلولی و eGLهای خالص شده از روش PHA-induced lymphoproliferation در پلیت‌های ۹۶ تایی مطابق رفرنس استفاده گردید(۱۴). در این تست از PHA به عنوان میتوژن و از خون افراد داوطلب مرد و زن جهت جداسازی لنفوسیت ها استفاده و برای هر نمونه در هر دو روش چهار غلظت متفاوت ۵۰٪ و۲۵٪و ۱۲٪و ۵/۶٪ تهیه گردید. هر کدام از غلظت ها در سه حفره میکروپلیت مورد آزمایش قرار گرفت و سپس با استفاده از میانگین و انحراف معیار درصد فعالیت مهارکنندگی آنها محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت از روش آماری Student's T test جهت مقایسه استفاده گردید.

نتایج

ده نمونه از دسیدوای ابتدای حاملگی بکار برده شد تا بین فعالیت ایمونولوژیکی سوسپانسیون سلولی و eGLهای خالص شده حاصل از آن مقایسه بعمل آید. با توجه به اینکه تعداد سلولهای eGL خالص شده محدود برای سلولهای eGL بجزء برای یک نمونه در ۲۴ ساعت کشت داده شد. فعالیت مهار ایمونولوژیکی مایع کشتی کل سوسپانسیون سلولی با مایع حاصل از eGL در غلظت ۵۰٪ با هم مقایسه گردید. نتایج نشان



شکل ۱: مقایسه فعالیت مهار ایمونولوژیکی بین مایع‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته سلول‌های eGL خالص شده با سوسپانسیون سلولی در سه ماهه اول حاملگی در غلظت‌های متفاوت



شکل ۲: مقایسه فعالیت مهار ایمونولوژیکی بین مایع‌های حاصل از کشت سلول‌های eGL خالص شده با سوسپانسیون سلولی در سه ماهه اول حاملگی در زمان‌های متفاوت

Downloaded from http://www.jri.ir

داد (شکل ۱) اگر چه فعالیت مهار ایمونولوژیکی حاصل از eGL بیشتر از کل سوسپانسیون سلولی بود ولی اختلاف قابل توجیه مشاهده نشد(P=۰/۳۱) فقط در یک نمونه (شکل ۲) که میزان سلولهای eGL بالا بود اختلاف قابل توجهی در میزان فعالیت مهار ایمونولوژیکی آن با سوسپانسیون سلولی مربوط بعد از ۲٤و٤٨و٧٢ ساعت مشاهده گردید(به ترتیب با P=/۰۰۳۱ ،p=۰/۰۰۳،p=۰/۰۳۸).

بحث

مکانیزم‌های ایمونولوژیکی محافظت کننده واحد جفت از دفع شدن موضوع بسیاری از تحقیقات کنونی را در بر می‌گیرد. از آنجائی که بافت دسیدوا در رحم مادر در تماس مستقیم با واحد جفت جنینی است، احتمال دارد که این بافت نقش مهمی در مکانیزم ایمونولوژیکی بین مادر و جنین در In vivo ایفا کند. همانطور که در مقدمه اشاره شد مطالعات متعددی نشان میدهد که بافت دسیدوای انسانی و موش آزمایشگاهی فاکتورهای محلولی را ترشح میکند که قادرند تکثیر لنفوسیتها را در مقابل میتوژنها مانند PHA و Con A و یا در واکنش کشت مخلوط لنفوسیتی (MLR) مهار کنند. ولی چه سلولی و چه مولکولی نقش اساسی دارد هنوز کاملا مشخص نیست. در مطالعه حاضر مشخص شد اکثر مایع‌های کشتی حاصل از eLG خالص شده، فعالیت مهار ایمونولوژیکی دارند و قادرند تکثیر لنفوسیتها را در مجاورت میتوژن PHA مهار کنند. اما این فعالیت افزایش قابل توجهی نسبت به مایع کشتی حاصل از کل سوسپانسیون سلولی را نشان نداد. البته فقط در یک نمونه افزایش قابل ملاحظه‌ای مشاهده گردید که شاید دلیل آن بالا بودن درجه خلوص eLG درآن نمونه باشد. در این زمینه دکتر Bulmer و همکاران گزارشی شبیه این تحقیق را ارائه دادند، البته آنها از روش دیگری برای تخلیص eLG استفاده کردند که امکان آلودگی با سلولهای دیگر را بیشتر داشت(۱۵). گزارشات دیگری مبنی بر فعالیت مهار ایمونولوژیک سلولهای $CD3^-$ $CD16^-$ $CD56^+$ در رحم انسانی در دسترس است(۱٦). سلولهای گرانوله در دسیدوای موش آزمایشگاهی که شبیه سلولهای eLG در دسیدوای انسانی است فعالیت مهار ایمونولوژیکی از خود نشان میدهد(۱۷). دکتر Haller و همکاران نشان دادند که سلولهای T در فعالیت مهار ایمونولوژیکی مایع کشتی حاصل از کل سوسپانسیون سلولی شرکت نمی‌کند بلکه این فعالیت مربوط به ماکروفاژها، سلولهای زمینه‌ای دسیدوا، سلولهای اپی‌تلیال و سلولهای CD56 مثبت میباشد. بنابراین بنظر میرسد eLG به تنهایی در فعالیت مهار ایمونولوژیکی دردسیدوای انسانی شرکت میکند ولی سلولهای دیگر هم در این فعالیت نقش دارند. بررسی‌های فراوانی برای تشخیص مولکول‌هایی که فعالیت مهار ایمونولوژیکی در دسیدوای سه ماهه اول حاملگی ایجاد می‌کنند انجام شده است که از جمله میتوان به پروستاگلندین‌ها TGFß,PP14 اشاره کرد(۲۰ و۱۹و۱۸). یکی از مولکولهای مهمی که سلول eLG تولید میکند سیتوکاین TGFß میباشد. دکتر Clark و همکاران گزارش کردند که نوعی از لنفوسیتها که نه سلول T هستند و نه سلول B در دسیدوای موش حامله مولکول مهارکننده‌ای ترشح میکنند که عمل اینترلوکین ۲ را بلاکه میکند. این مولکول توسط آنتی‌بادی ضد TGFß خنثی میشود(۲۱). دکتر Clark و همکاران همچنین نشان دادند که لنفوسیتهای بزرگ گرانوله که سلولهای $CD3^-$ $CD16^-CD56^+$ هستند مولکول TGFß که عمدتاً از نوع است را دسیدوای انسانی ترشح میکنند(۲۲). مطالعات بیشتری در زمینه نقش مهار ایمونولوژیکی سلول TGFß و دیگر مولکول‌های مترشحه از آن در حاملگی‌های پاتولوژیکی مانند سقط خودبخودی لازم است تا نقش این سلول و مولکول‌های مربوط به آن در بقاء واحد جفتی جنینی بهتر مشخص شود.

Downloaded from http://www.jri.ir

References

1- Bulmer J.N., Morrison L., Longfellow M., and Ritson A. (1991). Leukocytes in human deciduas: Investigation of surface markers and function, Colloque INSERM, 212:189-196.
2- Starkey P.M., Sargent I.L., and Redman C.W.G. (1988) Cell populations in human early pregnancy deciduas; Characterizion and isolation of lymphocytes by folwcytometry large granular Immunology, 65:129-134.
3- Bulmer J.N., Morrison L., Longefellow M., Ritson A., and Pace D. (1991). Granulatedlymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies, Hum. Reprod., 6:791-798.
4- Stewart I.J., (1991). Granulated metrial gland cells: pregnancy specific leukocytes J., Leuk Biol, 50:198-207.
5- King A., Birkby I.L., Starkey P.M., and Redman, C.W. (1991). Cytotoxic activity against trophoblastand choriocarcinoma cells of large granular lymphocytes from human early pregnancy deciduas, Cell Immunol, 132:140-149.
6- Clark D.A., Vince G., Flanders K.C., Hirte H., and Starkey P. (1994). CD 56 lymphoid cells inhuman first trimester pregnancy deciduas as a source of novel transforminggrowthfactor-b2-relate dimmuno-suppressive factor, Hum. Reprod., 9:2277.
7- Nakayama E., Asono S., Kodo and Miwa, S.J., (1985). Suppression of the mixed lymphocyte Reaction by cells human first pregnancy endometrium., J Reprod. Immunol. 8:25-31.
8- Ghafourian Boroujernia M., and Bulmer J.N., (1995). Immunosuppression in the human uterus, Immunology, 89 (Suppl.1), 157.
9- Haller H., Gudelj L., Rubesa G., Petrovic O., and Rukavina D. (1993). Suppressive effect ofdecidual leucocytes, periodicum Biologorum, 95:327:333.
10- Chaouoat G., Tranchot-Diallo J., Volumenie J.L., Menu E., (1997). Immune suppression and Th1/Th2 balance in pregnancy revised. Am J. Repord. Immunol., 37(6):427-34.
11- Daya S., Rosenthal K.L., and Clark D.A. (1987) Immunosuppressor factor (s) produced bydecidua-associated suppressor cell: a proposed mechanism for fetal allograft survival, Am. J. Obs & Gyn. 156: 344-350.
12- Lea R.G., Underwood J., Falanders K.C., Hirte H., Banwatt D., Finotto S., Ohno I., Daya S., Harley C. Michel M., Mowbray J.F., and Clark D.A.(1995). A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is transforming growth factor b2-production by “suppressor cells” in uterine tissue near the placental attachment site A.J., Reprod Immunol. 34:52-64.

Downloaded from http://www.jri.ir