

مطالعه تغییر در فاگوسیتوز نوتروفیلها در طول بارداری

دکتر علیرضا زمانی __ مربی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان

دکتر احمد مسعود __ استاد ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

علی رغم ایمنی اختصاصی که حین بارداری کاهش می یابد (برای عدم دفع جنین)، قدرت فاگوسیتوز و میکروب کشی نوتروفیلها (ایمنی ذاتی) افزایش می یابد. کاهش ایمنی اختصاصی در مراحل اولیه بارداری است و با پیشرفت آن بحد طبیعی میرسد. اما تغییرات فاگوسیتوز با پیشرفت بارداری بخوبی روشن نیست. برای مطالعه این تغییرات از زنانی که در مراحل مختلف بارداری (۱۵ نفر در سه ماهه اول، ۱۵ نفر در سه ماهه دوم، و ۱۵ نفر دیگر در سه ماهه سوم) بودند استفاده شد. بعلاوه ۲۰ نفر نیز بعنوان کنترل (غیر باردار) انتخاب شدند. برای آغاز فاگوسیتوز از سوسپانسیون مخمرکشته و آپسونیزه شده به همراه نوتروفیلها استفاده شد. در اثر بلع مخمرها توسط نوتروفیلها و ایجاد انفجار تنفسی، مواد اکسیدانت آزاد میشوند که این مواد در حضور لومینول تولید نوری میکنند که مقدار آن با میزان این مواد متناسب است. نور تولید شده توسط لومینومتر (تکنیک کمیومینسانس) اندازه گیری شد. حداکثر نور ساطع شده بعنوان شاخصی از سرعت و قدرت فاگوسیتوز مورد توجه قرار گرفته است. نتایج بدست آمده نشان میدهند در سه ماهه اول و دوم بارداری فاگوسیتوز افزایش یافته ($p < 0.05$) ولی در سه ماهه سوم فاگوسیتوز افزایشی را ($p < 0.05$) نشان نمی دهد. بنظر می رسد عوامل هورمونی و سرمی مسئول چنین تغییراتی هستند.

واژه های کلیدی: کمیومینسانس - فاگوسیتوز - بارداری

آدرس مکاتبه: همدان- دانشگاه علوم پزشکی- دانشکده پزشکی- گروه پاتوبیولوژی-

کدپستی ۶۵۱۷۷ تلفن ۸-۵۶۲۹۶ داخلی ۲۳۸

مقدمه

حین بارداری، ایمنی اختصاصی، خصوصاً ایمنی سلولی تضعیف میشود. عواملی چون (Pregnancy PAG)، (associated glycoprotein α_2 -PAG)، (Pregnancy zone protein) PZP، (Trophoblastic suppressor factor) TSF، (Human chorionic gonadotropin) HCG، (Thyroid binding globulin) TBG، (Cytotoxic T-lymphocyte inhibitor factor) CTX، (Natural killer inhibitor factor) NKIF، (Afferent suppressor factor) ASF، (Factor D) FD، (Transforming growth factor- β) TGF- β ، (Follicular derived growth factor) EGF، (Ecto placental) EPC، (E2) و پروژسترون را نام برد. عوامل فوق از طریق اثر بر روی سلولهای T و ماکروفاژها باعث این اعمال میشوند. بعلاوه بین جایگزینی موفقیت آمیز جنین و تولید مواد فوق رابطه مستقیم وجود دارد. در صورت آزاد نشدن مواد فوق الذکر بارداری منجر به سقط خواهد شد (۴،۵،۷،۸،۹،۱۱).

در زنان باردار تعداد لکوسیتها و نوتروفیلها بیشتر از افراد غیر باردار بوده، کیموتاکسی آنها کاهش یافته و کمپلمان نیز از طریق آلترناتیو فعال است. بعلاوه حین بارداری تحت تأثیر عوامل خاصی همانند افزایش هورمون تیروکسین، هورمونهای جفتی، هورمونهای تخمدان و hCG فاگوسیتوز افزایش می یابد (۱،۱۳). ولی با پیشرفت بارداری عوامل فوق نیز به مرور کاهش می یابند و بنظر میرسد که افزایش فاگوسیتوز نیز فقط

در ماههای اولیه بارداری اتفاق افتد و بمرور زمان بحد طبیعی افراد غیر باردار برسد. ولی متأسفانه تا کنون مطالعه ای در این زمینه صورت نگرفته است و اگر یکی دو مطالعه هم بوده نتایج آنها با هم متناقض هستند (۶). بنابر این ما این فعالیت را در ۳ ماهه اول، دوم و سوم مورد مطالعه قرار دادیم. نوتروفیلها از نظر تعداد بسیار فراوان هستند و بطور متوسط ۷۰-۶۰ درصد کل لکوسیتهای خون محیطی را تشکیل میدهند. این سلولها بعد از تولید در مغز استخوان و گذشت مدت زمانی کوتاه فعالیتهای فاگوسیتوزی و ضد میکروبی خود را شروع می کنند. اکثراً نوتروفیلها دارای هسته ۳-۵ قسمتی هستند. نوتروفیلها در اثر تحریک باعث ایجاد انفجار تنفسی، فعال شدن شنت هگزوزمنو فسفات (HMS)، مصرف اکسیژن، و در نهایت تولید بنیانهای چون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن، اکسیژن منفرد و می شود. بعلاوه انفجار تنفسی در نوتروفیلها به همراه افزایش مصرف اکسیژن، تولید سوپر اکسیژن و پخش نور است. در تکنیک کمیومینسانس روند تولید نور مشابه فلورسانس است ولی با این تفاوت که در آن مواد مسئول تولید نور انرژی آزاد شده توسط مواد شیمیائی را جذب نور تابش میکند (کمیومینانس طبیعی). برای تقویت این نور میتوان از مواد مختلفی چون لومینول (5-amino-2,3 dihydro-1,4-phthalazindione) استفاده کرد که یک ماده سنتتیک است و در اثر اکسیداسیون توسط مواد اکسیدانت یا رادیکالهای آزاد تولید نور می کند. با اندازه گیری حداکثر نور تولید شده در طی واکنش میتوان از آن برای سنجش ترکیبات اکسید کننده استفاده کرد. طول موج نور ساطع شده ۴۲۵ نانومتر است (۲). که آن را دستگاه لومینومتر بر حسب *mv* (میلی ولت) اندازه گیری می کند. از طریق کنترل میزان نور تولید شده توسط لومینومتر می توان پیشرفت روند فاگوسیتوز، نقایص پروسه آپسونیزاسیون و اختلال عملکرد لکوسیتی در یک فرد را مطالعه کرد. بنظر می رسد

کمیلومینانس تشدید شده توسط لومینول یک تکنیک آنالیتیک مؤثر برای مطالعه فاگوسیتوز در افراد سالم باشد. هدف تحقیق بررسی تغییرات فاگوسیتوز در طول بارداری است.

روش کار

در این تحقیق از روش کمیلومینسانس نوتروفیلیا استفاده شد. محرک نوتروفیلیا مخمر نانوائی (Baker's yeast) آپسونیزه شده توسط سرم تازه افراد سالم (۵ الی ۶ نفر) با گروه خونی AB (Fresh AB pooled serum) بود. برای تشدید نور ساطع شده (توسط نوتروفیلیا) از لومینول استفاده شد (۱۰۱۲). نمونه های این تحقیق شامل زنان بارداری که (۱۵ نفر در سه ماهه اول ۱۵ نفر در سه ماهه دوم و ۱۵ نفر در سه ماهه سوم) که به درمانگاه پره ناتال و آزمایشگاه بیمارستان میرزا کوچک خان تهران مراجعه کرده بودند، گروه شاهد نیز شامل خانمهایی سالم (۲۰ نفر) که در سن باروری بوده و دارای سیکل قاعدگی طبیعی بودند (جدول ۲). برای جدا کردن نوتروفیلیا حدود ۵ الی ۱۰ میلی لیتر خون توسط سرنگ ۲۰ ml هپارینه از هر نفر کشیده شد. سپس هم حجم خون داخل همان سرنگ، دکستران ۶٪ (با وزن ملکولی ۵۰ تا ۱۵۰ هزار وزن / حجم در نرمال سرم) اضافه شد. بعد از مخلوط کردن محتویات داخل آن سرنگ در حرارت اتاق طوری قرار داده میشد که نوک سوزن به سمت بالا قرار گیرد. پس از گذشت ۴۵ دقیقه، قسمت بالای سرنگ که سرشار از لکوسیت بود با دقت و کج کردن سر سوزن بداخل لوله پلاستیکی خالی میشد. سپس لوله های پلاستیکی به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ دور سانتیفریوژ شد. در مرحله بعدی محلول روئی با ساکشن بیرون کشیده می شد. وجود گلبولهای قرمز احتمالی با محلول لیز کننده از بین رفت و بعد از چندین بار شستشو، سلولهای لکوسیت آماده بودند. در انتها با

استفاده از لام نئوبار و توجه به شکل نوتروفیل و نفوسیت ها، درصد هر کدام از آنها مشخص شد. سپس سوسپانسیونی از نوتروفیلیا با غلظت ($10^6 \times 5$) عدد نوتروفیل در هر میلی لیتر تهیه شد. نفوسیتها نیز در محیط وجود دارند ولی غلظت آنها در نظر گرفته نشده است. این سوسپانسیون بایستی حداکثر در مدت چند ساعت اول مورد استفاده قرار گیرد. چون طول عمر نوتروفیلیا محدود است. برای کنترل درصد سلولهای ائوزینوفیل و بازوفیل نیز که جزو نوتروفیلیا جدا شده بودند از رنگ آمیزی رایت - گیمسا استفاده شد و مقدار آنها از کل سلولهای PMN کسر شد تا اینکه مقدار خالص نوتروفیلیا به غلظت مورد نظر ($10^6 \times 5$) برسد (۳). برای تهیه مخمر آپسونیزه شده، مخمر را در بافر PBS ریختیم و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش حرارت دادیم تا اینکه غیرفعال شوند بعد از این مدت آنرا ۳ بار با بافر PBS شستشو دادیم. در نهایت سوسپانسیونی از مخمرها با غلظت ($10^8 \times 2$) مخمر در هر میلی لیتر PBS تهیه شد. برای آپسونیزاسیون مخمرها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سرم تازه AB با ۹۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد. عمل فوق باید درست قبل از انجام آزمایش، محلول ذخیره آن را با حل کردن ۱/۷۷mg لومینول دریک میلی لیتر DMSO (Dimethyl Sulphoxide) تهیه کردیم (10^{-2} M) سپس قبل از آزمایش محلول را به نسبت ۱ به ۱۰۰ (10^{-4} M) یا به (10^{-5} M) بافر رقیق کردیم تا محلول کار تهیه شود. در هر آزمایش از یک یا دو بافر نرمال نیز نمونه گیری شد و مراحل جداسازی نوتروفیلیا و انجام آزمایش بر روی آنها همراه با نمونه بیماران انجام شد. تا به این ترتیب شرایط و نحوه آزمایش برای افراد طبیعی و بیمار یکسان باشد. برای انجام آزمایش مواد، سلولها و مخمر آپسونیزه شده را طبق جدول شماره ۱ در کوتهای پلاستیکی یکبار مصرف مخصوص دستگاه لومینومتر ریخته و پس از

قرار دادن در محفظه مخصوص دستگاه لومینومتر شدت نور تولید شده را برحسب میلی ولت در فواصل زمانی یک دقیقه به یک دقیقه ثبت شد.

معرفها	نمونه	شاهد A	کنترل	شاهد B
محلول کار لومینول	۷۰۰ μ l	۷۰۰ μ l	۷۰۰ μ l	۷۰۰ μ l
سوسپانسیون مخمر آپسونیزه شده با سرمهای گروه خونی AB	۲۰۰ μ l	-----	۲۰۰ μ l	-----
بافر PBS	-----	۲۰۰ μ l	-----	۲۰۰ μ l
نوتروفیل‌های حاصل از نمونه ها (۵ × ۱۰ ^۶)	۱۰۰ μ l	۱۰۰ μ l	-----	-----
نوتروفیل‌های حاصل از افراد کنترل (۵ × ۱۰ ^۶)	-----	-----	۱۰۰ μ l	۱۰۰ μ l

جدول شماره ۱- روش انجام آزمایش کمی لومینانس

نمونه ها	تعداد	میانگین سنی	SD	میانگین N-CL/mv	SD
سه ماهه اول	۱۵	۲۹/۳	۶/۵	۲۵۴	۶۵/۳
سه ماهه دوم	۱۵	۲۸/۴	۶/۳	۲۰۶	۷۲/۶
سه ماهه سوم	۱۵	۳۴	۶/۳	۱۶۶	۴۸/۷
خانمهای باردار (کل)	۴۵	۳۰/۷	۶/۶	۲۰۹/۱	۷۱/۶۶
افراد کنترل	۲۰	۳۱/۸	۶	۱۵۲/۶	۴۹/۴

جدول شماره ۲- پراکندگی سنی نمونه ها و افراد کنترل

نتایج

سه ماهه دوم نیز (با $p < ۰/۰۵$) فاگوسیتوز (N-CL) افزایش یافته است. در صورتی که در سه ماهه سوم (با $p < ۰/۰۵$) چنین ادعائی را نمی توان داشت. بعلاوه افزایش N-CL در سه ماهه اول چشمگیرتر از سه ماهه دوم است.

جدول شماره ۳، ۴ و ۵ به همراه نمودارهای ۱ و ۲ میانگین N-CL را بر حسب میلی ولت نشان میدهند. مقایسه این داده ها با یکدیگر و استفاده از آزمونهای آنالیز واریانس و t-Test نشان میدهند که اولاً: فاگوسیتوز در زنان باردار نسبت به افراد کنترل افزایش یافته است. ثانیاً: در سه ماهه اول (با $p < ۰/۰۱$) و در

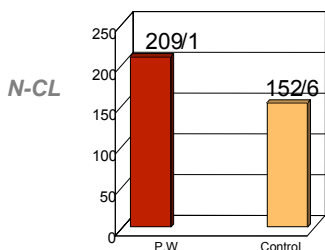
شماره	سن	طول بارداری	(N-CL/mv)
۱	۳۲	ماه هفتم	۲۰۷
۲	۳۵	ماه هفتم	۱۲۲
۳	۳۹	ماه هشتم	۱۹۶
۴	۳۸	ماه هشتم	۱۵۳
۵	۴۱	ماه هشتم	۳۰۱
۶	۳۵	ماه هشتم	۱۳۸
۷	۴۴	ماه هشتم	۹۰
۸	۳۶	ماه هشتم	۱۴۲
۹	۲۵	ماه نهم	۱۷۰
۱۰	۳۸	ماه نهم	۱۷۴
۱۱	۳۵	ماه نهم	۱۷۹
۱۲	۳۷	ماه نهم	۱۵۳
۱۳	۲۵	ماه نهم	۱۱۶
۱۴	۲۲	ماه نهم	۱۸۱
۱۵	۳۰	ماه نهم	۱۶۹

جدول شماره ۵- ارزیابی کمی فاگوسیتوز نوتروفیلها برای خانمهای باردار در سه ماهه سوم (TT)

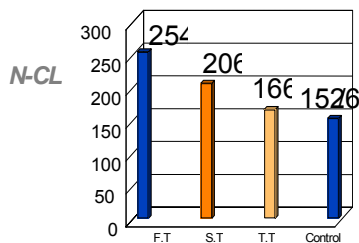
شماره	سن	طول بارداری	(N-CL/mv)
۱	۳۴	ماه اول	۴۰۱
۲	۲۳	ماه اول	۱۹۶
۳	۲۶	ماه اول	۳۳۸
۴	۳۶	ماه اول	۲۵۱
۵	۳۲	ماه دوم	۲۶۰
۶	۳۴	ماه دوم	۲۰۸
۷	۱۸	ماه دوم	۲۴۳
۸	۳۱	ماه دوم	۲۸۳
۹	۳۲	ماه دوم	۱۸۸
۱۰	۱۷	ماه دوم	۱۴۵
۱۱	۲۴	ماه دوم	۲۴۱
۱۲	۳۹	ماه سوم	۳۱۱
۱۳	۳۱	ماه سوم	۲۵۷
۱۴	۲۸	ماه سوم	۳۶۱
۱۵	۳۴	ماه سوم	۲۴۰

جدول شماره ۳- ارزیابی فاگوسیتوز نوتروفیلها برای خانمهای باردار در سه ماهه اول (FT)

نمودار شماره ۱- میانگین N-CL در گروه کنترل و P.W



نمودار شماره ۲- میانگین N-CL در گروه کنترل و TT, ST, FT



شماره	سن	طول بارداری	(N-CL/mv)
۱	۲۹	ماه چهارم	۱۰۶
۲	۱۹	ماه چهارم	۲۲۰
۳	۳۱	ماه چهارم	۱۲۹
۴	۲۹	ماه چهارم	۱۸۱
۵	۲۷	ماه چهارم	۲۶۷
۶	۳۸	ماه پنجم	۱۰۰
۷	۲۹	ماه پنجم	۳۲۱
۸	۲۲	ماه پنجم	۳۰۹
۹	۲۰	ماه پنجم	۱۸۱
۱۰	۲۵	ماه پنجم	۱۵۹
۱۱	۲۳	ماه پنجم	۲۲۰
۱۲	۴۰	ماه ششم	۱۹۲
۱۳	۳۵	ماه ششم	۱۸۱
۱۴	۳۳	ماه ششم	۳۲۶
۱۵	۳۱	ماه ششم	۲۰۳

جدول شماره ۴- ارزیابی کمی فاگوسیتوز نوتروفیلها برای خانمهای باردار در سه ماهه دوم (ST)

بحث

همانطور که مشاهده شد N-CL (فاگوسیتوز) در مراحل اولیه بارداری افزایش قابل توجهی را نشان میدهد. ولی با پیشرفت بارداری N-CL بحد طبیعی (افراد غیر باردار) می رسد. چونکه خود ایمنی اختصاصی سرکوب است (۱۳، ۱۲، ۱۱). این افزایش را نمی توان بعلت کمک آن (سلولهای Th) به ایمنی ذاتی و فاگوسیتها دانست. پس بایستی عوامل دیگری دخیل باشند. در ضمن میدانیم کمپلمان در زنان باردار از طریق آلترناتیو فعال است (۳). و هورمون hCG بعد از جایگزینی تخم و در سه ماهه اول افزایش یافته و به اوج خود می رسد، که سپس کاهش می یابد و در انتهای حاملگی به کمترین مقدار خود میرسد. پس میتوان گفت عوامل هورمونی و سرمی را در این افزایش فاگوسیتوز دخیل دانست که آنها از دو طریق باعث این عمل میشوند.

الف- افزایش گیرنده ها (رستپورها) بر روی نوتروفیلها و دیگر فاگوسیتها
ب- افزایش فعالیت مسیره های MPO, HMS و متابولیت هائی چون H₂O₂ و غیره .

ولی بنظر نمی رسد که این افزایش قدرت فاگوسیت ها تأثیر چندانی بر مقاومت افراد در مقابل عفونتها داشته باشد. چون کموتاکسی نوتروفیلها در بارداری مختل است (۱۳، ۲). و بنظر می رسد یکی از عوامل عفونتهای دستگاه تناسلی - ادراری در حین بارداری همین کاهش کموتاکسی باشد. البته لازم است مطالعات بیشتری درباره سیستم ایمنی و فاگوسیت های افرادی که دچار چنین عفونتهائی هستند صورت گیرد.

سپاسگزاری

مؤلفین از کلیه اساتید، مسئولین و کارکنان گروه ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران و بیمارستان میرزا کوچک خان تهران جهت همکاری آنان در اجرای طرح تقدیر و تشکر می کنند .

References

1. Bio. Orbit company 1990. Luminescent analysis. Application note 100
2. Bjorksten, B. Poly morphonuclear leukocyte function during pregnancy. Scanned. Y. immunol. 1978; 8:257-262
3. Colbern and Main Immunology of the maternal-placental interface in normal pregnancy. Seminar in perinatology. 1991; 15(3): 196-205
4. Coulam. Carolyn. B Immunological obstetrics. 1992; First edition
5. Hynes. M.K. Shepley Cytokine production in first trimester chorionic villi. Cell immune 1993.
6. King, H. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. Immunol. Today. 1991; 12(12): 432-435.
7. Kordon. Drouva, S. V Gonadotropin regulation oestrogens and immune system. Horn Res. 1992; 37(sup.3): 11-15
8. Lahita, R.G The effect of sex hormones on the immune system in pregnancy. Am. Journal of Repro. Immunol. 1992; 28: 136-137.
9. Mitchell The role of The phagocyte in host - - parasite interactions. Am. Journal. Obst. Gynecol. 1970; 108(5): 687-697
10. Saji The fetus as an allograft. Am. Journal. Obstet . Gynecol. 1992; 251-256.
11. Shibaya Study on nonspecific immunity in pregnant persons Is Journal Of Repr immune. (AJRI). 1991; 26: 76-81.
12. William's. Cunningham, F. G. William's obstetrics. 1993; 19th edition.