

## بررسی اثر تعدیل‌کنندگی ایمنی سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون انسان بر روی Natural Killer T Cells (NKT Cells) خون محیطی زنان مبتلا به سقط جنین مکرر خود به خودی با علت ناشناخته

فهیمة خادم<sup>۱</sup>، نفیسه اسمعیل<sup>۲</sup>، عباس رضایی<sup>۳</sup>، بهناز خانی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** سقط جنین مکرر خود به خودی با علت ناشناخته (Unexplained recurrent spontaneous abortion یا URSA) یکی از مشکلات ایمنولوژیکی در طی بارداری است و نقش پاتولوژیک ایمنی سلولی در این بیماران گزارش شده است. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون جفت انسان (Human aortic endothelial cells یا hAECs) دارای توانایی تعدیل‌کنندگی پاسخ‌های ایمنی می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات تعدیل‌کنندگی ایمنی این سلول‌ها بر روی بیان نشانگر فعالیت CD107a بر سطح سلول‌های NKT خون محیطی بیماران مبتلا به URSA بود.

**روش‌ها:** سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell یا PBMCs) از خون ۱۴ بیمار مبتلا به URSA با استفاده از شیب غلظت فایکول جدا شدند. بعد از کشت هم‌زمان PBMCs با hAECs در ۳ نسبت مختلف، سلول‌های NKT (Natural killer T cells یا NKT cells) با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-CD3 و Anti-CD56 شناسایی شدند و میانگین درصد بیان نشانگر CD107a بر سطح سلول‌های NKT با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مربوط و روش فلوسیتومتری ارزیابی گردید.

**یافته‌ها:** میانگین درصد بیان نشانگر CD107a در سطح سلول‌های NKT در نسبت‌های ۱ به ۱ ( $P = 0.031$ ) و ۵ به ۱ ( $P = 0.043$ ) کشت هم‌زمان PBMCs با hAECs، به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت.

**نتیجه‌گیری:** بر طبق نتایج به دست آمده، می‌توان گفت که شاید یکی از مکانیسم‌های سلول‌های hAEC جهت اعمال اثرات تعدیل‌کنندگی ایمنی خود بر روی سایر سلول‌های ایمنی، اثر بر فعالیت سیتوتوکسیک سلول‌های NKT است که خود نقش تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی را دارند. از طرفی، مطالعات گسترده‌تری در مورد نقش تعدیل‌کنندگی این سلول‌ها در بیماران مبتلا به RSA بر روی سلول‌های NKT و سایر سلول‌های ایمنی مؤثر در RSA لازم است تا بتوان این سلول‌ها را به عنوان یک روش درمانی پیشنهاد کرد.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون، سقط خود به خودی، سلول‌های کشنده‌ی طبیعی T، آنتی ژن CD107a

**ارجاع:** خادم فهیمة، اسمعیل نفیسه، رضایی عباس، خانی بهناز. بررسی اثر تعدیل‌کنندگی ایمنی سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون انسان بر روی Natural Killer T Cells (NKT Cells) خون محیطی زنان مبتلا به سقط جنین مکرر خود به خودی با علت ناشناخته. مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۴): ۳۳۶-۳۳۱

می‌شود (۱). عوامل القاکننده سقط جنین هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند، اما بر اساس مطالعات موجود، تصور می‌شود که ناهنجاری‌های کروموزومی، ژنتیکی، آناتومیک، هورمونی، جفتی، اختلالات انعقادی، عفونت‌ها، سبک زندگی افراد و عوامل ایمنولوژیک در پاتوژنز این بیماری نقش داشته باشند (۲). با این وجود، در بیش از نیمی از موارد،

### مقدمه

سقط جنین مکرر خود به خودی (Recurrent spontaneous abortion یا RSA)، یکی از رایج‌ترین عوارض ایجاد شده در طی بارداری می‌باشد که با از دست رفتن سه یا بیش از سه بارداری پی در پی در سه ماهه‌ی نخست بارداری (تا قبل از هفته‌ی بیستم بارداری) مشخص

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد. گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه زنان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق، شامل ۱۴ خانم بود که به تشخیص پزشک متخصص زنان و زایمان مبتلا به URSA بودند و روش نمونه‌گیری به شکل غیر احتمالی آسان بود.

## خون‌گیری و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

(Peripheral blood mononuclear cell یا PBMC): ابتدا ۱۰ سی‌سی خون وریدی از بیماران مبتلا به URSA گرفته شد و در لوله‌های حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری شد. جهت جداسازی PBMC از روش شیب چگالی فایکول استفاده گردید.

## جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون از جفت انسانی:

مجموعه‌ی کامل و واحد جفت طی عمل سزارین انتخابی (Elective) در هفته‌ی ۳۷-۴۰ بارداری از مادران سالم تهیه شد. در شرایط استریل اتفاق عمل، پرده‌ی آمنیون از کوریون جداسازی شد و تحت شرایط استریل کامل با حفظ زنجیره‌ی سرمایی در محیط Roswell Park Memorial Institute (RPMI) سرد (۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین - استرپتومایسین) به آزمایشگاه منتقل شد. پرده‌ی آمنیون به میزان ۲-۳ مرتبه، توسط بافر Phosphate buffered saline (PBS) سرد با pH معادل ۷/۲ شستشو شد. سپس، به قطعات کوچک برش داده شد و سه مرتبه با محلول تریپسین/EDTA ۰/۰۵ درصد و هر مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. جهت خنثی‌سازی فعالیت آنزیم تریپسین از Fetal bovine serum (FBS) استفاده شد. سوسپانسیون‌های سلولی حاصل از ۳ مرحله‌ی هضم آنزیمی پرده‌ی آمنیون با هم مخلوط شدند. در انتها، سلول‌ها توسط لام نئوبار زیر میکروسکوپ شمارش شدند و میزان زنده بودن آن‌ها توسط رنگ تریپان‌بلو بررسی شد.

## کشت هم‌زمان hAECs با PBMCs های جدا شده از

پرده‌ی آمنیون توسط لام نئوبار شمارش شدند و در ۳ مقدار مختلف  $10^4 \times 10^6$ ،  $10^5 \times 3$  سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای و  $10^5 \times 15$  سلول در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (DMEM/F12) (Gibco) شامل ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco) در شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد  $CO_2$  کشت داده شدند. PBMCهای جدا شده از خون محیطی بیماران توسط لام نئوبار شمارش شدند و جهت ایجاد نسبت‌های ۱:۵، ۱:۱ و ۵:۱ با hAECs،  $10^5 \times 3$  سلول PBMC سوسپانسیون در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco) حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco) به هر

حتی بعد از بررسی دقیق تمامی علت‌ها، هیچ توضیح قابل ملاحظه‌ای برای علت ایجاد RSA یافت نمی‌شود که این دسته از بیماران تحت عنوان بیماران با سقط جنین مکرر خود به خودی با علت ناشناخته (Unexplained recurrent spontaneous abortion یا URSA) معرفی می‌شوند (۳).

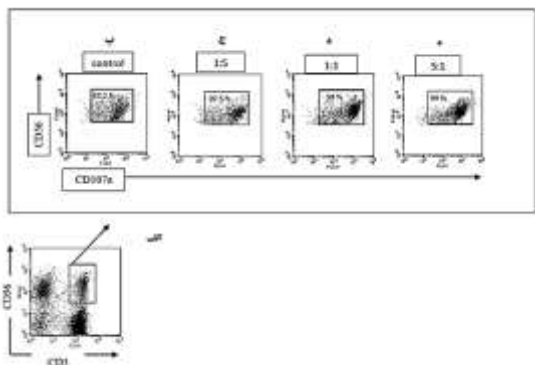
مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیماری URSA دارای خصوصیات یک بیماری آلوایمیون است و به طور عمده با شکست تورلانس ایمونولوژیک بین مادر و جنین مرتبط است (۴). بر اساس مطالعات صورت گرفته، تغییر در سلول‌های ایمنی (لنفوسیت‌های T، ماکروفاژ، Natural killer T cells یا NKT cells و نیز NK) در خون محیطی و دسیدوا، نقش مهمی در از دست رفتن بارداری دارد (۵). بنابراین، به نظر می‌رسد که انواعی از لنفوسیت‌ها با فعالیت عملکردی متفاوت و سیتوکاین‌هایشان در حفظ بارداری سهیم می‌باشند. یکی از انواع لنفوسیت‌ها، سلول‌های NKT می‌باشند. سلول‌های NKT جمعیت کوچکی از سلول‌های T می‌باشند که نشانگرهای سلول‌های NK را نیز بیان می‌کنند. این سلول‌ها، منبع عمده‌ی مدیاتورهای ضد التهابی و پیش‌التهابی می‌باشند و موجب تنظیم عملکرد سیستم ایمنی ذاتی و اکسپازی می‌گردند (۶). سلول‌های NKT در دسیدوا انسان و موش یافت می‌شوند و ممکن است نقش مهمی را در مرحله‌ی لانه‌گزینی جنین و تحمل ایمونولوژیک بین مادر و جنین ایفا کنند (۷).

غشای آمنیون، داخلی‌ترین لایه از غشاهای جنینی است. بر طبق مطالعه‌ی صورت گرفته، سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون انسانی (Human amniotic epithelial cells یا hAECs) قادر به ترشح عواملی هستند که می‌توانند موجب مهار پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکسپازی شوند (۸). بر اساس مطالعات انجام شده، این سلول‌ها با ترشح سرکوبگر ایمنی همانند Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) و Prostaglandin E2 (PGE2) می‌توانند باعث تحریک پاسخ لنفوسیت‌های T helper 2 (Th2) و سیتوکاین‌های آن‌ها شوند (۹). سلول‌های hAEC دارای سطوح بیان پایین Human leukocyte antigen (HLA) کلاس I و فقدان آنتی‌ژن‌های HLA کلاس II می‌باشند (۱۰).

بر خلاف سلول‌های بنیادی دیگر، این سلول‌ها فاقد قابلیت تومورزایی می‌باشند که این ویژگی، باعث برتری این سلول‌ها نسبت به سایر سلول‌های بنیادی، جهت کاربردهای بالینی می‌گردد (۱۱). با توجه به قابلیت‌های ذکر شده، به نظر می‌رسد که سلول‌های hAEC به عنوان یک درمان احیا کننده مطرح می‌باشند و با توجه به این که تغییرات ایمونولوژیک انواع لنفوسیت‌ها ممکن است در اتیوپاتوزن URSA دخالت داشته باشد، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر سلول‌های hAEC بر روی فعالیت سلول‌های NKT خون محیطی زنان مبتلا به URSA در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

## بحث

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سلول‌های hAEC دارای اثرات تعدیل کنندگی ایمنی می‌باشند. این سلول‌ها همانند سایر سلول‌های مشتق شده از جفت، به دلیل داشتن منشأ جنینی از طریق مکانیسم‌هایی از سیستم ایمنی مادری فرار می‌کنند و با ترشح عواملی و اکشن‌های ایمنی مادری بر علیه جنین را سرکوب می‌کنند (۱۲).



شکل ۲. اثرات Human aortic endothelial cell (hAECs) بر میزان بیان نشانگر CD107a در سطح سلول‌های (CD<sub>56</sub><sup>+</sup>/CD<sub>3</sub><sup>+</sup>) NKT بیماران Unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) پس از ۳ روز کشت هم‌زمان با یکدیگر

اندازه‌گیری میزان بیان نشانگر CD107a در سطح سلول‌های NKT Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) موجود در (CD<sub>56</sub><sup>+</sup>/CD<sub>3</sub><sup>+</sup>) مجاور شده با hAECs با استفاده از روش فلوسیتومتری. انتخاب سلول‌های NKT توسط دو نشانگر CD<sub>56</sub> و CD<sub>3</sub> (الف). میانگین درصد بیان نشانگر CD107a در نمونه‌ی شاهد (ب). میانگین درصد بیان نشانگر CD107a در ۳ دز مختلف: ۵:۱ (ج)، ۱:۱ (د) و ۱:۵ (ه).

مطالعات انجام شده بر روی مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که استفاده از این سلول‌ها به عنوان یک درمان در بیماری‌های التهابی نظیر اختلالات نورولوژیکی، Multiple sclerosis بیماری‌های کبدی و آسیب‌های ریوی باعث تعدیل پاسخ‌های ایمنی پاتولوژیک می‌گردد (۱۳).

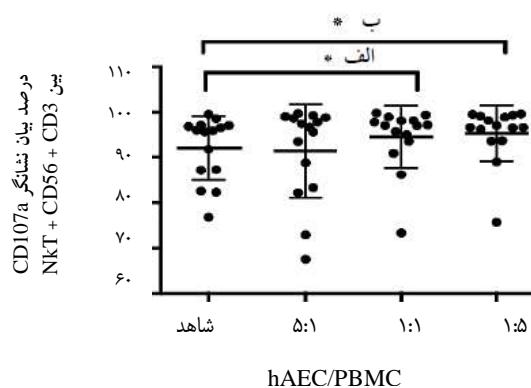
مطالعات اخیر نشان داده‌اند که وضعیت ایمنی بیماران URSA نسبت به زنان با باروری طبیعی متفاوت بوده و عدم تنظیم صحیح سلول‌های ایمنی و سیتوکاین‌ها در پس زده شدن جنین نقش مهمی دارند. حضور اتوآنتی‌بادی‌هایی نظیر Antiphospholipid antibodies (APA) و Antithyroid antibodies (ATA) و نقش پاتولوژیک ایمنی سلول‌ها، سلول‌های NK و NKT در بیماران RSA گزارش شده است (۱۴-۱۵).

بر طبق ویژگی‌های تعدیل کنندگی ایمنی سلول‌های hAEC مطالعه‌ی حاضر با هدف کشت هم‌زمان hAEC با PBMC بیماران

چاهک حاوی hAEC اضافه و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد به مدت ۳ روز کشت داده شدند. کشت PBMC بدون وجود hAEC هم‌زمان با نمونه‌های هم‌کشت شده به عنوان شاهد انجام شد. **بررسی میزان بیان نشانگر CD107a در سطح سلول‌های NKT با روش فلوسیتومتری:** بعد از گذشت ۳ روز، چاهک‌های مورد و شاهد با مقدار ۱۵۰ واحد در هر میلی‌لیتر اینترلوکین-۲ تحریک شدند. محتویات چاهک‌ها به درون لوله‌های فلوسیتومتری منتقل شد و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه با شتاب ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی خارج شد و به ته نشست سلولی باقی مانده، مقدار ۵ میکرولیتر Anti-CD3-FITC، Anti-CD56-PE-Cy5 و Anti-CD107a-PE اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال و در تاریکی انکوبه شد. سپس، ۳ مرحله شستشو با PBS با pH معادل ۷/۲ انجام شد و میزان بیان نشانگرها در سطح سلول‌های NK با دستگاه فلوسیتومتری بررسی شد.

## یافته‌ها

**اثرات سلول‌های اپی تلیال پرده‌ی آمینون انسانی (hAECs) بر روی میزان بیان نشانگر CD107a در سطح سلول‌های NKT بعد از ۳ روز هم‌کشتی:** میانگین درصد بیان CD107a در سطح سلول‌های NKT (CD<sub>56</sub><sup>+</sup>/CD<sub>3</sub><sup>+</sup>) در هر سه دز هم‌کشتی hAEC/PBMC و شاهد محاسبه شد. نتایج نشان دادند که درصد متوسط بیان CD107a به طور معنی‌داری در نسبت ۱:۱ (P = ۰/۰۳۱) و ۱:۵ (P = ۰/۰۴۳) (hAEC/PBMC) نسبت به شاهد PBMC (به تنهایی) در سطح سلول‌های (CD<sub>56</sub><sup>+</sup>/CD<sub>3</sub><sup>+</sup>) NKT افزایش داشت (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱. میانگین درصد بیان نشانگر CD107a: مقایسه‌ی تک‌تک نسبت‌های هم‌کشت شده‌ی Human aortic endothelial cell/Peripheral blood mononuclear cell (hAEC/PBMC) با نمونه‌ی شاهد مقایسه‌ی نسبت ۱:۱ با نمونه‌ی شاهد (P = ۰/۰۳۱) (قسمت الف). مقایسه‌ی نسبت ۱:۵ با نمونه‌ی شاهد (P = ۰/۰۴۳) (قسمت ب)

سلول‌های NKT می‌باشند، با این وجود مکانیسم زمینه‌ای عملکرد این سلول‌ها به درستی شناخته نشده است. با توجه به نتیجه‌ای که در این مطالعه به دست آمد، شاید بتوان این طور بیان کرد که ممکن است این افزایش بیان نشانگر CD107a در سطح سلول‌های NKT کشت شده با hAEC ناشی از عملکرد تنظیمی این دو سلول باشد.

همچنین، این یافته ممکن است نشان دهنده‌ی این موضوع باشد که شاید سلول‌های hAEC فعالیت سرکوب‌کنندگی و تعدیل‌کنندگی ایمنی خود را به واسطه‌ی القای فعالیت سیتوتوکسیک در سلول‌های NKT انجام می‌دهند. با این وجود، هنوز اطلاعات محدودی در زمینه‌ی نقش سیتوتوکسیک سلول‌های NKT و اثرات تنظیمی سلول‌های hAEC در بیماران RSA وجود دارد و مطالعات بیشتری جهت بررسی اثرات سلول‌های hAEC بر روی فعالیت سیتوتوکسیک سلول‌های NKT در بیماران مبتلا به RSA مورد نیاز است.

### تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر، برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۴۱۰۱۲، مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام گردید. بدین وسیله، از تمام افرادی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مبتلا به URSA و بررسی اثر تعدیل‌کنندگی این سلول‌ها بر روی بیان نشانگر CD107a در سطح سلول‌های NKT این بیماران انجام شد. نشانگر CD107a، نشانگر دگرانوله شدن لنفوسیت‌ها مانند سلول‌های NK، TCD8+ و NKT می‌باشد (۱۶). این نشانگر، به دنبال تحریک در سطح سلول‌های ذکر شده بیان می‌شود که بیان این نشانگر با تولید سیتوکاین و تجزیه‌ی سلول هدف همراه است (۱۷).

در این مطالعه، مشاهده شد که بیان نشانگر CD107a بعد از مجاورت PBMC با hAEC در سطح سلول‌های NKT بیماران URSA به طور قابل توجهی افزایش یافت. سلول‌های NKT به واسطه‌ی تولید سیتوکاین‌های التهابی و ضد التهابی دارای عملکرد تنظیمی می‌باشند. نقش تنظیمی سلول‌های NKT در بیماری‌های خود ایمن نظیر Multiple sclerosis، دیابت نوع I، لوپوس اریتماتوز سیستمیک و آرتریت روماتوئید نشان داده شده است (۲۰-۱۸).

Zhou و همکاران، طی مطالعه‌ای نشان دادند که در بیماران تحت درمان با روش In vitro fertilization (IVF) سطح افزایش یافته‌ی سلول‌های  $(CD_{56}^{+}/CD_{3}^{+}/CD_{16}^{+})$  NKT با نتیجه‌ی بهتر درمان مرتبط می‌باشد (۲۱). Van den Heuvel و همکاران نیز نشان دادند که کاهش در تعداد سلول‌های  $(CD_{56}^{+}/CD_{3}^{+})$  NKT در پاسخ به درمان Intravenous immunoglobulin (IVIG) با یک بارداری موفق در زنان نابارور مرتبط است (۲۲). اگر چه شواهد به دست آمده، نشان دهنده‌ی نقش تعدیل‌کنندگی ایمنی مرتبط با بارداری

### References

1. Yang H, Qiu L, Di W, Zhao A, Chen G, Hu K, et al. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril* 2009; 92(1): 301-5.
2. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 272(2): 95-108.
3. Wu L, Luo LH, Zhang YX, Li Q, Xu B, Zhou GX, et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12: 74.
4. Perricone R, Di Muzio G, Perricone C, Giacomelli R, De Nardo D, Fontana L, et al. High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55(3): 232-9.
5. Wang WJ, Hao CF, Yi L, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol* 2010; 84(2): 164-70.
6. Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res* 2011; 343(1): 43-55.
7. Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, Exley M, Balk SP, Racke FK, et al. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21): 13741-6.
8. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3): 900-7.
9. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23(3): 144-50.
10. Bailo M, Soncini M, Vertua E, Signoroni PB, Sanzone S, Lombardi G, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004; 78(10): 1439-48.
11. Insausti CL, Blanquer M, Garcia-Hernandez AM, Castellanos G, Moraleta JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning* 2014; 7: 53-63.
12. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhning HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta:

- outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008; 26(2): 300-11.
13. Murphy S, Lim R, Dickinson H, Acharya R, Rosli S, Jenkin G, et al. Human amnion epithelial cells prevent bleomycin-induced lung injury and preserve lung function. *Cell Transplant* 2011; 20(6): 909-23.
  14. Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Pregnancy and autoimmunity: a common problem. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012; 26(1): 47-60.
  15. Yi HJ, Kim JH, Koo HS, Bae JY, Cha SW, Yang KM. Elevated natural killer cell levels and autoimmunity synergistically decrease uterine blood flow during early pregnancy. *Obstet Gynecol Sci* 2014; 57(3): 208-15.
  16. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* 2006; 27(5-6): 495-502.
  17. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004; 294(1-2): 15-22.
  18. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 297-336.
  19. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, Illarionov PA, et al. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J Exp Med* 2007; 204(5): 1131-44.
  20. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L, Lehuen A. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol* 2013; 171(1): 8-19.
  21. Zhou J, Zhao X, Wang Z, Wang J, Sun H, Hu Y. High circulating CD3+CD56+CD16+ natural killer-like T cell levels predict a better IVF treatment outcome. *J Reprod Immunol* 2013; 97(2): 197-203.
  22. van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(5): 447-59.

## The Immunomodulatory Effects of Human Amniotic Epithelial Cells on Peripheral Blood Natural Killer T (NKT) Cells in Women with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion (URSA)

Fahimeh Khadem<sup>1</sup>, Nafiseh Esmail<sup>2</sup>, Abbas Rezaei<sup>3</sup>, Behnaz Khani<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) is the most common immunological complication during pregnancy. The evidence of in-vitro assays has shown that immune cells are responsible for embryotoxicity. In recent years, it has been found that cells such as human amnion epithelial cells (hAECs) have the potency to modulate immune responses in vitro and in vivo. This study aimed to investigate the immunomodulatory effects of human amnion epithelial cells on expression of CD107a marker on natural killer T (NKT) cells in the peripheral blood of the women with unexplained recurrent spontaneous abortion.

**Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from 14 patients. After co-culture of human amnion epithelial cells with peripheral blood mononuclear cells, natural killer T cells were identified using anti-CD56 and anti-CD3 monoclonal antibodies (mAb); and the expression of CD107a marker on natural killer T cells was investigated using specific mAb analyzed by flow cytometry.

**Findings:** The expression of CD107a marker was significantly upregulated on natural killer T cells following incubation with human amnion epithelial cells ( $P = 0.031$  in 1:1 ratio;  $P = 0.043$  in 5:1 ratio).

**Conclusion:** Our results suggest human amnion epithelial cells have immune regulatory effects on activation and cytotoxicity of natural killer T cells. Potential therapeutic application of human amnion epithelial cells for dysregulated immunity of natural killer T cells in patients with recurrent spontaneous abortion should be investigated in the future.

**Keywords:** Amnion, Epithelial cells, Spontaneous abortion, Natural killer T-cell, CD107a antigen

**Citation:** Khadem F, Esmail N, Rezaei A, Khani B. **The Immunomodulatory Effects of Human Amniotic Epithelial Cells on Peripheral Blood Natural Killer T (NKT) Cells in Women with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion (URSA).** J Isfahan Med Sch 2018; 36(474): 331-6.

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Nafiseh Esmail, Email: nafesm5@gmail.com