DOI: 10.48305/jims.2022.16312

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۶۱/هفته‌ی اول اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵ تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۲/۷

بیان پذیرنده‌های NKG2D در سطح لنفوسیت‌های $CD3^+$ و $CD56^+$ در نمونه خون بیماران پره‌اکلامپسی و تأثیر سیلیمارین بر فعالیت این سلول‌ها در محیط کشت

علیرضا عندلیب[۱]، نفیسه اسمعیل[۲]، الهه زارعان[۳]، گلزار احمدی[۴]، فهیمه حسینی نسب[۵]، محدثه طغیانی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: افزایش تعداد و عملکرد سلول‌های NK و سایتوکاین‌ها در آندومتریوم و خون محیطی زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی گزارش گردیده است. NKG2D، یکی از پذیرنده‌های سطح سلولی به عنوان شاخص فعالیت به ویژه در NK و سایر لنفوسیت‌ها شناخته شده است. سیلیمارین از فلاونوئیدهای گیاهی است که به عنوان عامل تعدیل ایمنی با تأثیر مهاری بر سلول‌های NK روند و شدت بیماری را کاهش دهد. در این مطالعه، تأثیر محلول سیلیمارین بر عوامل ایمنی‌شناسی مؤثر در پره‌اکلامپسی در محیط کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: نمونه‌ها از خون بیماران پره اکلامپسی و باردار و غیرباردار سلامت با جداسازی لنفوسیت‌ها به روش گرادیان غلظت با فایکول و استفاده از روش فلوسیتومتری میزان بیان NKG2D در سطح سلول‌های $CD3^- CD56^+$ و $CD3^+$ بررسی شد. همچنین، از غلظت‌های متفاوت سیلیمارین در محیط کشت سلولی و بررسی میزان بیان NKG2D در لنفوسیت‌ها و میزان تولید IFNγ در محیط کشت سلولی با روش الیزا ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در گروه پره‌اکلامپسی، فراوانی لنفوسیت‌های $CD3^- CD56^+$ و نیز بیان NKG2D در سطح لنفوسیت‌های $CD56^+$ افزایش داشت. در حالی که، میزان بیان NKG2D لنفوسیت‌ها در محیط کشت در گروه پره‌اکلامپسی تحت تأثیر سیلیمارین، کاهش یافت. سیلیمارین در محیط کشت سلول‌های PBMCs، حتی در حضور تحریک با IL-2، تولید IFNγ را به طور معنی‌داری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: افزایش تعداد سلول‌های NK و میزان فعالیت آن‌ها با سنجش پذیرنده NKG2D و نیز افزایش تولید بیشتر IFNγ در نمونه‌های بیماران پره‌اکلامپسی، به خوبی زمینه‌های عوامل ایمنی‌شناسی بیماری را بیان می‌کند. اثربخشی سیلیمارین در محیط کشت سلولی و تعدیل عوامل التهابی، لزوم طراحی مدل‌های بالینی مصرف کنترل شده‌ی سیلیمارین در بیماران در معرض خطر را ضروری می‌کند.

واژگان کلیدی: پره‌اکلامپسی؛ سیلیمارین؛ سلول‌های NK؛ T؛ NKG2D

ارجاع: عندلیب علیرضا، اسمعیل نفیسه، زارعان الهه، احمدی گلزار، حسینی نسب فهیمه، طغیانی محدثه. **بیان پذیرنده‌های NKG2D در سطح لنفوسیت‌های $CD3^+$ و $CD56^+$ در نمونه خون بیماران پره‌اکلامپسی و تأثیر سیلیمارین بر فعالیت این سلول‌ها در محیط کشت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۶۱): ۱۰۲-۹۵

مقدمه

سیستم ایمنی، در روند حاملگی طبیعی نقش مهمی دارد. به طوری‌که در طول حاملگی، تغییر در تعادل سلول‌های ایمنی و عملکرد آن‌ها مشاهده می‌شود. نقش سلول‌های کشنده‌ی طبیعی NK (Natural killer cells) به عنوان یکی از مهم‌ترین سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی مؤثر در کنترل عفونت‌ها، تنظیم هموستاز بدن و برهم‌کنش سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی در حفظ بارداری طبیعی مشخص شده است (۱، ۲).

پره اکلامپسی، سندروم اختصاصی در حاملگی است که

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

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

۳- دانشیار، گروه زنان و زایمان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۵- کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علیرضا عندلیب: استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: andalib@med.mui.ac.ir

۵-۳ درصد بارداری‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. رونـد بیمـاری‌زایی پره اکلامپسی هنوز به خوبی مشخص نشده، ولی بروز پرفشاری خون مادر، آسیب عروقی و پاسخ‌های ایمنـی نـامطلوب از ویژگی‌هـای آن بشمار مـی‌رود (۳، ۴). از جملـه تغییـرات ایجـاد شـده در پاسـخ‌های ایمنی، ناهنجاری در تنظیم سلول‌های NK خون محیطی و بافت رحم می‌باشد که ممکن اسـت توضـیح دهنـده‌ی سـقط‌های مکـرر و عـدم موفقیت در لانه‌گزینی و یا پره اکلامپسی باشد (۵).

افزایش NK در خون محیطی و در رحـم مـادران مبـتلا بـه پـره اکلامپسی گزارش شده است (۶). این افزایش با تولید سـایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها در آندومتریوم و نیز در خون همراه است (۱، ۶). هر چند که سلول‌های NK رحم از سلول‌های خون محیطی منشأ می‌گیرند، اما تکثیر، تمایز و ویژگی‌های آن‌ها در رحـم متفـاوت از سـلول‌های NK خون محیطی است. با این وجود همبستگی بین سلول‌های NK خـون محیطی و بافت رحم نیز گزارش شده است (۷).

فعالیت و یا عدم عملکرد سلول‌های NK با ارزیـابی گیرنـده‌های اختصاصـی NK قابلیـت بررسـی دارد. بـرای مثـال پذیرنـده‌ی Natural Killer Group 2D (NKG2D) یکـی از ملکول‌هـای شاخص فعالیت در سلول‌های NK است کـه روی سـلول‌های NKT، Tγδ و $CD8^{+}\alpha\beta$ T نیـز بیـان می‌گـردد (۸، ۹). درگیـری پذیرنـده‌ی NKG2D روی سلول‌های NK با لیگانـد مربوطـه‌اش، نشـانگر فعـال شدن ویژگی سیتوتوکسیسیتی سلول‌های NK می‌باشد (۱۰).

در بیماران پره اکلامپسی این فرضیه مطرح است که تروفوبلاست و سلول‌های استرومال آندومتر که لیگاندهای پذیرنـده‌ی NKG2D را بیان می‌کنند، احتمالاً با سلول‌های NK برخورد نموده و باعث فعالیت سلول‌های NK بافت رحم و نیـز خـون محیطـی می‌گردنـد (۱۱، ۱۲) همچنـین بـه دنبـال فعالیـت سیتوتوکسـیک سـلول‌های NK و تولیـد سایتوکاین‌های التهابی مانند اینترفرون گاما (Interferonγ) توسط این سلول‌ها در روند شرایط برای پره اکلامپسی مؤثر می‌باشد (۱۳).

اهمیت IFNγ تولید شده از NK و لنفوسیت‌های T در آنژیـوژنز و لانه‌گزینی جنین نشان داده شده است. به طـوری کـه IFNγ باعـث غالب شدن پاسخ‌های ایمنی «نوع یک» در فرد مستعد پـره اکلامپسـی می‌شـوند (۱۴). بنـابراین بـه کـارگیری عوامـل تنظیم‌کننـده و یـا کاهش‌دهنده‌ی پاسخ‌های ایمنی «نوع یک» در دوره‌ی بارداری ممکـن اسـت از رونـد پاسـخ‌های «نـوع یـک» و ایجـاد زمینـه‌ی لازم بـرای پاسخ‌های التهابی در پره اکلامپسی یا سقط جنین جلوگیری کند (۱۵).

فلاونوئیدها، ترکیباتی طبیعی مشـتق شـده از گیاهـان هسـتند کـه برخی از اعضای آن‌ها مانند سیلیمارین با ویژگی‌هـای آنتی‌اکسـیدانی، تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی و ضـد التهـابی شـناخته می‌شـوند. اثـرات تنظیم‌کنندگی سیلیمارین در بعضی از سلول‌های ایمنی گـزارش شـده است (۱۶). برای مثال اثر سیلیمارین بر کاهش پاسخ‌های مونوسـیت‌های مشتق شده از خون محیطی خانم‌های پره اکلامپسی گزارش شـده اسـت و این کاهش فعالیت منوسیتی همراه با کاهش تولید محصولات اسـترس اکسیداتیو نظیـر INOs (Inducible nitric oxide synthase) در ایـن سلول‌ها است (۱۶، ۱۷). از آن‌جایی که پاسخ‌های ایمنی بـه واسـطه‌ی سلول‌های مختلف سیستم ایمنی و فرآورده‌های حاصل از آن‌ها ایجـاد می‌شود، بنابراین در مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثـرات تنظیم‌کننـده‌گی سیلیمارین بر بیان پذیرنده‌ی NKG2D در سطح سـلول‌های $CD56^{+}$ و لنفوسیت‌های $CD3^{+}$ در محیط آزمایشگاهی و نیز ارزیابی موقعیـت NK در سـلول‌های تـک هسـته‌ای خـون محیطـی (PBMCs) خـون مبتلایان به پره اکلامپسی پرداخته‌ایم.

روش‌ها

افراد مطالعه: در سال ۱۳۹۷، از ۳ خانم مبـتلا بـه پـره اکلامپسـی، ۳ خـانم باردار سالم و ۳ خانم غیر باردار سالم، در محـدوده‌ی سـنی ۳۷-۲۵ سـال، در بیمارستان شهید بهشتی اصفهان، نمونـه‌ی خـون توسـط همکـار بـالینی طرح، تهیه گردید. تشخیص پره اکلامپسی با توجه به شـاخص‌های بـالینی و آزمایشگاهی توسط متخصص زنان و زایمان انجـام گرفـت. بیمـاران بـا فشـارخون حـداقل ۹۰/۱۴۰ میلی‌متـر جیـوه و پروتئینـوری بـالای ۳۰۰ میلی‌گرم در مرحله‌ی تشخیص اولیه بدون اقـدام بـه درمـان دارویـی، وارد مطالعه شدند (۴، ۱۸، ۱۹). شرایط ورود خانم‌هـای بـاردار بـه مطالعـه شامل بارداری تک قلو و در هفته ۲۸-۲۴ بارداری بود. مـواردی کـه دارای سابقه‌ی بیماری خود ایمن، سـندروم آنتـی فسـفولیپید، فشـارخون مـزمن، بیماری کلیوی، دیابت، عفونت در دوره‌ی بارداری و یا سـقط قبلـی بودنـد به تشخیص متخصص زنان و زایمان همکار طـرح وارد مطالعـه نشـدند و نمونه از خانم‌های غیر باردار سـالم مراجعه‌کننـده‌ی دوره‌ای بـه متخصـص زنان به صورت داوطلبانه اهـدا گردیـد (۱۸). رضـایت آگاهانـه‌ی کتبـی از تمامی افرادی که وارد مطالعه شـدند اخـذ شـد. ایـن طـرح تحقیقـاتی بـه شـماره‌ی ۳۹۷۰۵۲ و کـد اخـلاق IR.MUI.MED.REC.1397.065 در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأیید و ثبت گردید.

آماده‌سازی محلول سـیلیمارین: محلـول سـیلیمارین (از شـرکت سـیگما USA) در حضـور DMSO (Dimethyl sulfoxide) بـه عنوان حلال در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار تهیه و در دمای ۲۰- درجـه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس رقت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مـولار از سیلیمارین ایجاد گردید و به چاهک‌های حاوی PBMCs در محیط کشـت RPMI1640 حـاوی ۱۰ درصـد FBS (Fetal bovine serum) اضـافه شـد. در ایـن مقالـه فقـط نتـایج حاصـل از تـأثیر غلظـت ۱۰۰ میلی‌مولار از سیلیمارین بر روی PBMCs در محیط کشت، ارائه شده و نتایج سایر غلظت‌ها جهت اختصار نوشتار بیان نشده است.

کشت سلولی: ۱۰ میلی‌لیتر از خون وریدی افرادی که وارد مطالعه شدند، دریافت شد و در آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان PBMCs به روش گرادیان غلظت با فایکول (Lymphodex, Sweden) جداسازی شدند. سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده به تعداد $1x10^6$ سلول در هر چاهک در محیط RPMI1640 (PAN Biotec, Germany) حاوی ۱۰ درصد FBS (GIBCO, USA) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (GIBCO, USA) کشت داده شدند. به هر چاهک حاوی سلول برای مدت ۲۴ ساعت، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر (Unit/mL) سایتوکاین IL-2 اضافه گردید و سپس عصاره‌ی سیلیمارین با غلظت‌های بیان شده، به چاهک‌ها افزوده شد و برای مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. چاهک‌های کنترل مثبت و منفی به ترتیب شامل PBMCs در حال کشت در حضور IL-2 و (DMSO به عنوان دارونما) در نظر گرفته شدند. تمامی آزمایشات حداقل سه مرتبه تکرار گردید.

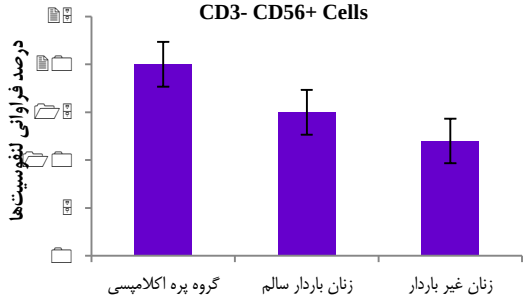
در نمونه‌ی PBMCs جدا شده از افراد مورد مطالعه، سلول‌های NK به عنوان سلول‌های CD3- CD56+ و سایر لنفوسیت‌ها به عنوان سلول‌های CD3+ با استفاده از مارکر anti-CD3 ارزیابی شدند. ضمن اینکه پذیرنده‌ی NKG2D روی سلول‌های CD3- CD56+ و سلول‌های CD3+ ارزیابی شد. شناسایی هر یک از مارکرهای سطح این سلول‌ها با اضافه نمودن anti-CD3 کنژوگه با FITC، anti-CD56 کنژوگه با PE-CY5 در جمعیت سلولی PBMCs اعمال شد و خوانش مارکرهای سطحی توسط دستگاه فلوسایتومتری FACScalibur و با استفاده از نرم‌افزار Cell Quest (Becton Dickinson, SanTose CA, USA) انجام گرفت. آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل در سنجش‌ها برای اطمینان از اختصاصیت آنتی‌بادی‌ها و حذف اتصالات غیراختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آنتی‌بادی‌های مصرف شده، ساخت شرکت Biolegend, UK بود. در هر خوانش، تعداد $۲x۱۰^۴$ سلول توسط دستگاه، شمارش و آنالیز شد. آنالیز نتایج به دست آمده از دستگاه فلوسایتومتری با استفاده از نرم‌افزار FlowJo صورت گرفت. به طوری‌که پس از انتخاب جمعیت سلول‌های NK (CD3- CD56+)، متعاقباً سنجش پذیرنده NKG2D در سطح این سلول‌ها انجام شد.

برای سنجش IFNγ از سوپ رویی سلول‌های PBMCs در محیط کشت و کیت الیزا (Peprotech, UK) طبق دستورالعمل کیت، استفاده شد. با سیستم خوانش الیزا، داده‌ها جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

تجزیه تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد و برای مقایسه‌ی میانگین‌های دو گروه از آزمون Independent t-test و از آزمون ANOVA برای مقایسه‌ی بین بیش از دو گروه استفاده گردید و نتایج کمتر از ۰/۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین فراوانی سلول‌های CD3- CD56+ در جمعیت PBMCs در گروه پره اکلامپسی به میزان ۱/۴ ± ۲۰/۴ درصد، در گروه خانم‌های باردار ۱/۴۸ ± ۱۴/۶ درصد، و در گروه غیر باردار به میزان ۰/۶ ± ۱۲/۲ درصد ارزیابی شد. اختلاف معنی‌دار تنها بین گروه پره اکلامپسی و گروه زنان غیر باردار مشاهده شد (P = ۰/۰۰۳) (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار میانگین درصد لنفوسیت‌های خون محیطی با مارکر CD3- CD56+ در سه گروه مورد مطالعه

درصد پذیرنده‌ی NKG2D در سلول‌های CD3+ در گروه پره اکلامپسی برابر با ۳/۶۵ ± ۷۸/۲۶ درصد، در گروه خانم‌های باردار سالم، برابر با ۳/۹۱ ± ۷۹/۷ درصد و در گروه خانم‌های غیر باردار برابر با ۲/۷۸ ± ۷۳/۵۳ درصد بود. اگرچه تفاوت معنی‌داری از نظر میزان بیان پذیرنده‌ی NKG2D بین سه گروه وجود نداشت (P > ۰/۰۵)، با این حال یک روند افزایشی در میزان NKG2D در سطح سلول‌های CD3+ در گروه پره اکلامپسی مشاهده گردید (جدول ۱).

درصد بیان پذیرنده‌ی NKG2D در سلول‌های CD56+ در گروه پره اکلامپسی برابر با ۲/۴ ± ۹۷/۰۶ درصد، در گروه خانم‌های باردار سالم برابر با ۰/۷۶ ± ۹۸/۷۶ درصد و در گروه خانم‌های غیر باردار به میزان ۲/۰۸ ± ۹۱/۶ درصد ارزیابی شد که تفاوت آماری بین گروه غیر باردار و دو گروه پره اکلامپسی و باردار مشاهده گردید (P = ۰/۰۴).

تیمار PBMCs با سیلیمارین در محیط کشت (غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار) و سنجش NKG2D در ۳ گروه مورد مطالعه پس از ۴۸ ساعت، نشان داد که میزان بیان پذیرنده‌ی NKG2D از گروه پره اکلامپسی در سلول‌های CD3- CD56+ برابر با ۳/۶۹ ± ۸۶/۰۵ درصد و در گروه بدون تیمار برابر با ۲/۴ ± ۹۷/۰۶ درصد بود.

جدول ۱. توزیع فراوانی سلول‌های واجد مارکر +NKG2D در سلول‌های +CD3 و +CD56 در PBMCs نمونه‌های خون افراد قبل و بعد از تیمار با سیلیمارین به روش فلوسایتومتری

مارکرهای سلولی	باردار مبتلا به پره اکلامپسی	باردار مبتلا به پره اکلامپسی	باردار سالم	باردار سالم	غیر باردار سالم	غیر باردار سالم
در جمعیت PBMC	بدون تیمار	تیمار با سیلیمارین	بدون تیمار	تیمار با سیلیمارین	بدون تیمار	تیمار با سیلیمارین
CD3+ NKG2D+	۷۸/۲۶ ± ۳/۶۵	۷۵/۱۸ ± ۵/۱۷	۷۹/۷۳ ± ۳/۹۱	۷۸/۵۳ ± ۴/۷۸	۷۳/۵۳ ± ۲/۷۸	۶۹/۶۵ ± ۸/۲۳
P	۰/۴۴۶		۰/۷۵۳		۰/۴۸۲	
CD56+ NKG2D	۹۷/۰۶ ± ۲/۴	۸۶/۰۵ ± ۳/۶۹	۹۸/۷۶ ± ۰/۷۶	۹۰/۱۷ ± ۴/۳۷	۹۱/۶ ± ۲/۰۸	۷۸/۶۲ ± ۶/۳۲
P	۰/۰۱۲۳		۰/۰۲۸۵		۰/۰۲۷۸	

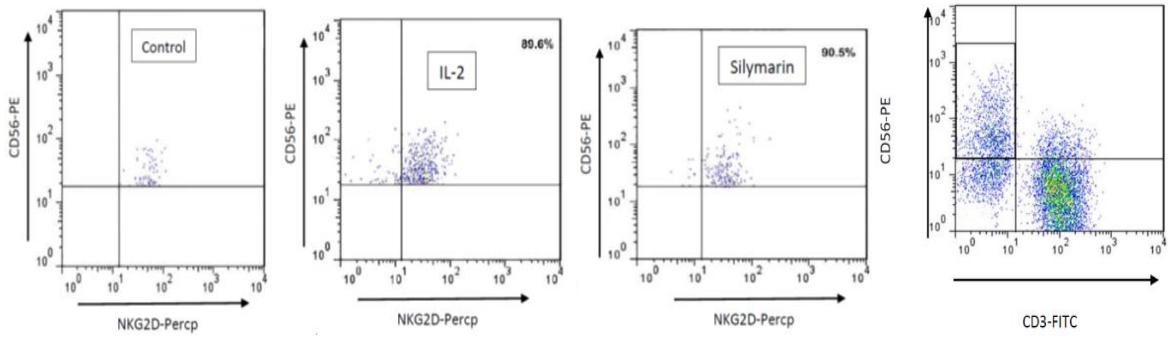
این اختلاف بین گروه‌های مورد مطالعه معنی‌دار بود (P = ۰/۰۱۲). در حالی‌که میزان بیان NKG2D در لنفوسیت‌های CD3- CD56+ بعد از تیمار PBMCs محیط کشت با سیلیمارین در گروه خانم‌های باردار برابر با ۴/۳۷ ± ۹۰/۱۷ درصد و در گروه شاهد و تیمار نشده برابر ۰/۷۶ ± ۹۸/۷۶ درصد بود که از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار بود (جدول ۱) (P = ۰/۰۲۸).

به علاوه، میزان بیان NKG2D در گروه لنفوسیت‌های +CD3 در نمونه‌های PBMCs اخذ شده از پره اکلامپسی تیمار شده با سیلیمارین، ۵/۱۷ ± ۷۵/۱۸ درصد و در گروه بدون تیمار برابر با ۳/۶۵ ± ۷۸/۲۶ بود که تفاوت آماری مشاهده نگردید (P = ۰/۴۴).

میزان بیان NKG2D در سلول‌های +CD56- CD3- در گروه غیر باردار و بدون تیمار با سیلیمارین، دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود (P = ۰/۰۲۷). همچنین میزان بیان آن در گروه لنفوسیت‌های +CD3 در گروه بدون تیمار و در گروه تیمار شده با سیلیمارین تفاوت آماری مشاهده نگردید (P = ۰/۴۸). داده‌های فوق نشان داد که فراوانی سلول‌های NK (+CD56- CD3-) در گروه بیماران پره اکلامپسی روند افزایشی نسبت به گروه‌های شاهد دارد. همچنین در گروه بیماران پره اکلامپسی، پذیرنده‌ی NKG2D که نشانه‌ای بر فعالیت سلول‌های NK است، دارای روند افزایشی در سطح هر دو نوع سلول +CD56- CD3- و +CD3 بود. اگرچه تفاوت آماری در مواردی مشاهده نگردید. تیمار سلول‌های فوق با سیلیمارین پس از ۴۸ ساعت نشان از اثر تعدیل‌کنندگی سیلیمارین در جهت کاهش رسپتورهای NKG2D بیان شده روی سلول‌های NK و سلول‌های CD3- داشت که نشان‌دهنده‌ی اثر مهاری آن بر فعالیت این گروه از لنفوسیت‌ها در شرایط محیط کشت سلولی بود (جدول ۱ و شکل ۲).

پس از کشت سلول‌های PBMCs و گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت، میزان IFNγ در مایع محیط کشت آن‌ها اندازه‌گیری شد. در این راستا مقدار IFNγ سنجش شده در گروه پره اکلامپسی برابر با ۵ ± ۱۴۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر، در گروه باردار طبیعی، ۹ ± ۸۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر و در گروه شاهد برابر با ۳ ± ۷۴ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. بر این اساس، میزان IFNγ در گروه پره اکلامپسی بیشتر از سایر گروه‌ها بود (P ≤ ۰/۰۵). همچنین به دنبال تیمار PBMCs در محیط کشت با سیلیمارین، میزان تولید IFNγ در مایع محیط کشت، کاهش یافت (جدول ۲).

در جدول ۲، میانگین مقادیر تولید IFNγ در شرایط آزمایشگاهی و تیمارهای متفاوت و اثر سیلیمارین به صورت کمیتی نشان داده شده است. داده‌ها در این گزارش مربوط به نتایج اثر ۱۰۰ میلی‌مولار سیلیمارین است و سایر غلظت، جهت اختصار ارایه نشده است.



شکل ۲. داده‌های حاصل سنجش مارکرهای CD56+/PE و CD3+/FITC در PBMCs و نیز جمعیت سلول‌های NKG2D /Percp و CD56-PE و اثر IL-2 و سیلیمارین در پلات‌های داده‌های حاصل از فلوسایتومتری

جدول ۲. داده‌های حاصل از تیمار PBMCs در محیط کشت و سنجش IFNγ پیکوگرم در میلی‌لیتر در شرایط متفاوت تیمار با سیلیمارین در مایع محیط کشت سلولی به روش الیزا

تولید مقادیر IFN در سوپ محیط کشت PBMCs	پره اکلامپسی I	باردار سالم II	غیر باردار سالم III	P
بدون تیمار	۱۴۸ ± ۵	۸۲ ± ۹	۷۴ ± ۲/۵	II&III = ۰/۲۱۲
				I&III = ۰/۰۰۰۱
تیمار با سیلیمارین	۵۳ ± ۸	۶۰ ± ۹	۴۵ ± ۸/۶	
P مقایسه‌ی با تیمار و بدون تیمار	۰/۰۰۰۱	۰/۰۴۰۲	۰/۰۰۵	
PBMCs+ IL-2	۲۱۲ ± ۹	۱۹۸ ± ۱۲	۲۰۵ ± ۱۸	
IL-2 و سیلیمارین	۶۷ ± ۳/۷	۷۵ ± ۱۱	۹۴ ± ۱۱	
درصد تغییرات کاهشی در اثر تیمار با سیلیمارین	۳۱۶ درصد	۲۶۴ درصد	۲۱۸ درصد	

سلول‌های PBMCs به دست آمده از افراد در گروه‌های مختلف با IL-2 تیمار شدند و میزان تولید IFNγ در گروه پره اکلامپسی برابر با ۹ ± ۲۱۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر، در گروه باردار سالم برابر با ۱۲ ± ۱۹۸ و در گروه غیر باردار سالم، ۱۸±۲۰۵ سنجش شد. میزان IFNγ تولید شده در محیط کشت PBMCs جدا شده از افراد ۳ گروه در تیمار با سیلیمارین و تحریک سلول‌ها با IL-2 و متعاقباً تیمار تحت اثر سیلیمارین و میزان تغییرات تولید IFNγ در جدول ۲ آمده است.

میزان IFNγ در تجربیاتی که سیلیمارین به محیط کشت PBMCs در حضور IL-2 اضافه شده بود. در محیط کشت باعث کاهش تولید ۳۱۶، 264 و ۲۱۸ درصدی از IFNγ در سوپ محیط کشت PBMCs به ترتیب در گروه‌های پره اکلامپسی، باردار طبیعی و نمونه‌های غیر باردار سالم شده است که نشان‌دهنده‌ی قدرت مهارکنندگی سیلیمارین برای فعالیت لنفوسیت‌ها در محیط کشت بود (تقریباً ۲-۳ برابر) (P = ۰/۰۰۰۱) (جدول ۲).

بحث

در این بررسی، درصد جمعیت سلولی NK در خون محیطی خانم‌های مبتلا به پره اکلامپسی نسبت به گروه غیر باردار سالم و باردار طبیعی افزایش داشت که با نتایج مطالعات قبلی هماهنگی دارد (۱۴، ۲۰). علاوه بر این، نتایج این مطالعه، افزایش میزان فعالیت سلول‌های NK که با میزان بیان پذیرنده‌ی NKG2D در سطح این سلول‌ها و میزان تولید IFNγ در محیط کشت قابل ارزیابی است را نشان داد که مشابه با نتایج مطالعه‌ی Park و همکاران بود (۶).

همچنین، در بارداری‌های منجر به سقط با زمینه‌ی ایمنی‌شناسی نیز حضور چنین مکانیسم‌هایی از سیستم ایمنی گزارش شده است (۷). بنابراین افزایش فراوانی سلول‌های NK، افزایش بیان پذیرنده‌های NKG2D بر روی سلول‌های CD3+ و CD56+ CD3- و افزایش تولید IFNγ در نمونه‌های گروه بیمار نسبت به گروه‌های سالم به خوبی زمینه‌های ایمنی‌شناسی در روند بیماری پره اکلامپسی را نشان می‌دهد.

در محیط آزمایشگاهی، تیمار سلول‌های PBMCs حاصل از نمونه‌ی زنان باردار مبتلا به پره اکلامپسی و زنان باردار سالم و گروه غیر باردار سالم با محلول سیلیمارین در محیط کشت و سپس سنجش پذیرنده‌های سطح سلولی، میزان تأثیر این نوع فلاونوئید را بر کاهش بیان پذیرنده‌های NKG2D در سطح سلول‌های CD3- CD56+ را نشان داد. به نظر می‌رسد طراحی مدل‌هایی که به بررسی مصرف کنترل شده‌ی سیلیمارین در بیماران دارای ریسک افزایش فعالیت NK می‌پردازد به داده‌هایی مشابه و احتمالاً کاربردی منجر گردد. در حال حاضر از داروهای سرکوب‌گر سیستم ایمنی برای مهار فعالیت‌های سلول‌های ایمنی در این بیماران استفاده می‌شود که علاوه بر هزینه‌بر بودن، دارای عوارض جانبی شدیدی هستند (۴، ۱۸، ۲۱). بنابراین استفاده از ترکیبات و روش‌های جدید در این زمینه بسیار ضروری است.

از آن‌جایی که استفاده از سیلیمارین باعث کاهش تکثیر PBMCs از طریق اثر بر چرخه‌ی سلولی و کاهش عملکرد mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) در سلول‌های T گزارش شده است (۲۱)، بنابراین می‌تواند یکی از ترکیبات مؤثر در این زمینه باشد.

بر خلاف تجربه‌ی آزمایشگاهی ما، Bachmayer و همکاران، تفاوتی در میزان پذیرنده‌ی NKG2D در سطح سلول‌های NK بیماران پره اکلامپسی و گروه شاهد پیدا نکردند (۱۴)، درحالی که نتایج گزارش شده توسط Wallace و همکاران در مورد NKG2D بر روی NK بافت رحمی نسبت به گروه سالم متفاوت بوده است و با نتایج حاصل از بیان گیرنده‌های خون محیطی با سنجش فلوسایتومتری ما همخوانی داشت (۲۲).

برای بررسی اثر سیلیمارین بر ممانعت از تحریک TCD4+ و

مسیر سلولی MAP (mitogen-activated protein kinase) کیناز کارهای مشابهی در دو مطالعه‌ی جدا از هم انجام شده است (۲۳، ۲۴). به نظر می‌رسد کاهش پذیرنده‌ی NKG2D بر روی سلول‌های NK با تولید گرانزیم B و پرفورین در این سلول‌ها رابطه داشته باشد و اثر سیلیمارین در کاهش آنزیم‌های سیتوتوکسیک لنفوسیت‌ها می‌تواند از پاسخ‌های سلول‌های ایمنی به لیگاندهای ناشناخته در بیماری‌های مشابه پره اکلامپسی مؤثر باشد. همانگونه که در تجربیات آزمایشگاهی، کاهش میزان تولید IFNγ از سلول‌های PBMCs در اثر تیمار با سیلیمارین مشاهده گردید.

در تجربیات Morishima و همکاران، اثر سیلیمارین بر کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی مشاهده شد (۲۳). همچنین در مطالعه‌ی Navabi و همکاران، در شرایط آزمایشگاهی تیمار سلولی با سیلیمارین مرتبط با کاهش تولید IFNγ از سلول‌های Th1 تیمار شده بود (۲۵).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشانگر افزایش بیان NKG2D و تولید IFNγ در نمونه‌های خون خانم‌های دچار پره اکلامپسی می‌باشد و از طرفی کاهش این دو متغیر پس از تیمار با سیلیمارین می‌تواند در بررسی بیشتری بر روی سایر پذیرنده‌های سلول‌های NK و یا سلول‌های T در بیماران پره اکلامپسی صورت پذیرد و در صورت حصول نتایج مطلوب، مطالعه در طرح‌های بالینی گسترش یابد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر طبق طرح تحقیقاتی با شماره‌ی ۳۹۷۰۵۲ و کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1397.065 در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأیید و ثبت گردید. محققین از همکاری و کمک‌های آن معاونت سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Rambaldi MP, Weiner E, Mecacci F, Bar J, Petraglia F. Immunomodulation and preeclampsia. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2019; 60: 87-96.
2. Andalib A, Rezaie A, Oreizy F, Shafiei K, Baluchi S. A study on stress, depression and NK cytotoxic potential in women with recurrent spontaneous abortion. Iran J Allergy Asthma Immunol 2006; 5(1): 9-16.
3. Granger JP, LaMarca BB, Cockrell K, Sedeek M, Balzi C, Chandler D, et al. Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia. Methods Mol Med 2006; 122: 383-92.
4. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. Lancet 2010; 376(9741): 631-44.
5. Kobayashi H, Ichikawa M, Akasaka J, Tsunemi T, Sado T. Immune-related pathophysiological causes relevant to a subset of patients with preeclampsia (Review). World Acad Sci J 2019; 1(2): 59-66.
6. Park DW, Lee HJ, Park CW, Hong SR, Kwak-Kim J, Yang KM. Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages. Am J Reprod Immunol 2010; 63(2): 173-80.
7. Fukui A, Funamizu A, Fukuhara R, Shibahara H. Expression of natural cytotoxicity receptors and cytokine production on endometrial natural killer cells in women with recurrent pregnancy loss or implantation failure, and the expression of natural cytotoxicity receptors on peripheral blood natural killer cells in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss. J Obstet Gynaecol Res 2017; 43(11): 1678-86.
8. Costello RT, Fauriat C, Sivori S, Marcenaro E, Olive D. NK cells: innate immunity against hematological malignancies? Trends Immunol 2004; 25(6): 328-33.
9. Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. J Immunol 2006; 176(6): 3585-92.
10. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Pillars Article: Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. Science. 1999. 285: 727-729. J Immunol 2018; 200(7): 2231-3.
11. Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. Immunology 2009; 128(1): 1-6.
12. Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V, et al. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. J Immunol 2009; 183(1): 340-51.
13. Liu M, Zhen X, Song H, Chen J, Sun X, Li X, et al. Low-dose lymphocyte immunotherapy rebalances the peripheral blood Th1/Th2/Treg paradigm in patients with unexplained recurrent miscarriage. Reprod Biol Endocrinol 2017; 15(1): 95.
14. Bachmayer N, Sohlberg E, Sundström Y, Hamad RR, Berg L, Bremme K, et al. Women with pre-eclampsia have an altered NKG2A and NKG2C receptor expression on peripheral blood natural killer cells. Am J Reprod Immunol 2009; 62(3): 147-57.
15. Esmaeil N, Anaraki SB, Gharagozloo M, Moayedi B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. Int Immunopharmacol 2017; 50: 194-201.
16. Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, et al. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women.

Free Radic Res 2013; 47(4): 268-75.
17. Gazák R, Walterová D, Kren V. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. Curr Med Chem 2007; 14(3): 315-38.
18. Gabbe S, Nieby JR, Simpson JL. Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies. Arch Fam Med 1998; 7(4): 386.
19. von Dadelszen P, Menzies J, Magee LA. The complications of hypertension in pregnancy. Minerva Med 2005; 96(4): 287-302.
20. Hidaka Y, Amino N, Iwatani Y, Kaneda T, Mitsuda N, Morimoto Y, et al. Changes in natural killer cell activity in normal pregnant and postpartum women: increases in the first trimester and postpartum period and decrease in late pregnancy. J Reprod Immunol 1991; 20(1): 73-83.
21. Gharagozloo M, Javid EN, Rezaei A, Mousavizadeh K. Silymarin inhibits cell cycle progression and mTOR activity in activated human T cells: therapeutic implications for autoimmune diseases. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2013; 112(4): 251-6.
22. Wallace AE, Whitley GS, Thilaganathan B, Cartwright JE. Decidual natural killer cell receptor expression is altered in pregnancies with impaired vascular remodeling and a higher risk of pre-eclampsia. J Leukoc Biol 2015; 97(1): 79-86.
23. Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Paschal DM, Apodaca MC, Liu Y, et al. Silymarin inhibits in vitro T-cell proliferation and cytokine production in hepatitis C virus infection. Gastroenterology 2010; 138(2): 671-81, 681.e1-2.
24. Gharagozloo M, Jafari S, Esmaeil N, Javid EN, Bagherpour B, Rezaei A. Immunosuppressive effect of silymarin on mitogen-activated protein kinase signalling pathway: the impact on T cell proliferation and cytokine production. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2013; 113(3): 209-14.
25. Navabi F, Shaygannejad V, Abbasirad F, Vaez E, Hosseininasab F, Kazemi M, et al. Immunoregulatory effects of silymarin on proliferation and activation of Th1 cells isolated from newly diagnosed and IFN-ß(1b)-treated MS patients. Inflammation 2019; 42(1): 54-63.

DOI: *10.48305/jims.2022.16312*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 661, 1st Week, May 2022**

Received: 08.06.2021 Accepted: 15.01.2022 Published: 27.04.2022

Expression of NKG2D Receptors in CD3+ and CD56+ Cells in Blood Samples of Pre-eclampsia Patients and the Effect of Silymarin on Their Activity in Vitro

Ali Reza Andalib[1], Nafiseh Esmaeil[2], Elahe Zarean[3], Golzar Ahmadi[4], Fahimeh Hosseininasab[5], Mohadeseh Toghyani[5]

Original Article

Abstract

Background: Increased NK cells or their cytokine activity in endometrium and peripheral blood of mothers with pre-eclampsia have been reported. NKG2D is a cell surface receptor that can be used to detect NK cell and lymphocytic activity. Plant flavonoids such as silymarin has immunomodulatory effects and potentially inhibit the disease progression. Therefore, an in vitro experiment was designed to investigate the immunomodulatory effects of silymarin in pre-eclampsia.

Methods: Blood samples from preeclamptic and pregnant and non-pregnant women were analyzed by Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using Ficoll-Paque. Flow cytometry was used for marker assay including NKG2D expression on CD56+CD3- and CD3+ cells. Also, different concentrations of silymarin were applied, andNKG2D expression on the cells were considered, and IFNγ production in the cell culture medium were evaluated using ELISA.

Findings: CD3-CD56+ cells and NKG2D receptor expression were augmented in PBMCs in the pre-eclampsia group (P = 0.03). However, treatment of PBMCs with silymarin solutions decrease NKG2D markers on the lymphocytes. PBMCs treated cells by silymarin in culture medium indicates reduce IFNɣ production even in the presence of IL-2 stimulation by 2-3 folds (P = 0.0001).

Conclusion: Increase in NK cell population, NKG2D receptor expression and IFNɣ production play a crucial role in the samples of preeclamptic patients, and well express involvement of immunological factors of the disease. The effectiveness of silymarin in cell culture medium and modulation of inflammatory factors necessitate the design of clinical model for using silymarin in patients by risk of increased NK activity in pre-eclampsia patients.

Keywords: Pre-eclampsia; Silymarin; NK cell; T cell; NKG2D

Citation: Andalib AR, Esmaeil N, Zarean E, Ahmadi G, Hosseininasab F, Toghyani M. **Expression of NKG2D Receptors in CD3+ and CD56+ Cells in Blood Samples of Pre-eclampsia Patients and the Effect of Silymarin on Their Activity in Vitro.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(661): 95-102.

1- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- MSc, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ali Reza Andalib, Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: andalib@med.mui.ac.ir