

مقایسه فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی زنان باردار سالم و مبتلا به دیابت بارداری

نویسندگان: زهرا جباری^۱، احیاء گرشاسبی^{۲*}، محمدرضا جلالی ندوشن^۳،
صدیقه حنطوش‌زاده^۴، شهره جلالی^۵ و طوبی غضنفری^{۶*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- استاد گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴- دانشیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، ایران

۵- استادیار گروه آمار حیاتی، دانشکده توان‌بخشی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۶- استادگروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: Garshasbi@shahed.ac.ir

* نویسندگان مسئول: احیاء گرشاسبی

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

طوبی غضنفری

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ویکم-شماره ۱۱۱
تیر ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت حاملگی (GDM) به صورت عدم تحمل گلوکز با شدت متفاوت است که اولین بار در دوران بارداری آغاز شده یا تشخیص داده می‌شود. ایمونوپاتولوژی این بیماری به خوبی شناخته نشده است. ایمنی سلولی متفاوت به ویژه تعداد لکوسیت و زیررده‌ها در این بیماری گزارش شده است. با توجه به اهمیت سیستم ایمنی و به ویژه سلول‌های تک‌هسته خون محیطی (PBMC) در پاتوژنز دیابت بارداری، مطالعه حاضر با هدف مقایسه فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته خون محیطی زنان باردار سالم و مبتلا به دیابت بارداری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: طی یک مطالعه مورد-شاهدی، از ۳۷ زن باردار سالم و ۳۷ زن مبتلا به دیابت بارداری، نمونه خون جمع‌آوری شد و سلول‌های تک‌هسته خون محیطی جداسازی شدند؛ سپس این سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، در حضور و عدم حضور میتوزن (PHA) کشت داده و در نهایت با استفاده از روش MTT فعالیت حیاتی دو گروه سنجیده و اندکس تحریکی دو گروه مقایسه شدند و با آزمون آماری پیرسون و اسپیرمن، همبستگی متغیرها بررسی شدند.

نتایج: میان دو گروه از نظر سن، شاخص توده بدنی و سن حاملگی، تفاوتی معنی‌دار وجود نداشت. درصد اندکس تحریکی گروه مبتلا به دیابت بارداری و باردار سالم به ترتیب عبارت بود از $23/6 \pm 3/7$ و $31/5 \pm 3/2$. تفاوتی معنی‌دار در اندکس تحریکی (SI) سلول‌های PBMC زنان مبتلا به دیابت بارداری و باردار سالم مشاهده نشد ($P=0.89$).

نتیجه‌گیری: فعالیت حیاتی سلول‌های PBMC زنان مبتلا به دیابت بارداری در سه ماهه سوم بارداری با بارداری طبیعی، تفاوتی معنی‌دار نداشت.

واژگان کلیدی: دیابت بارداری، فعالیت حیاتی، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۰۳/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۲۷

مقدمه

دیابت حاملگی (GDM)^۱، عدم تحمل گلوکز با شدت متفاوت است که اولین بار در دوران بارداری آغاز شده یا تشخیص داده می‌شود (۱)؛ شیوع آن بسته به جمعیت مورد مطالعه و تست‌های تشخیصی از ۱ تا ۱۴ درصد است (۲). براساس مطالعه گرشاسبی و همکاران در سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۴ شیوع GDM را در تهران ۶/۸ درصد بارداری‌ها تخمین زده‌اند (۳). دیابت بارداری، شرایط پاتولوژیک است که بروز عوارض را در مادر و جنین افزایش می‌دهد. از جمله در نوزاد سبب ماکروزومی، هیپوگلیسمی، هیپوکلسمی، زردی، هیپرتروفی قلبی، چاقی، سندرم زجرتنفسی و تولد نوزاد مرده می‌شود. دیابت بارداری، خطر ایجاد پلی‌هیدروآمنیوس، هایپر تانسیون، پیلونفریت و زایمان به روش سزارین را افزایش می‌دهد (۴). ریسک ابتلا به دیابت تیپ دو در زنان مبتلا به دیابت بارداری ۶ تا ۶۲ درصد افزایش دارد و ریسک چاقی و ابتلا به دیابت تیپ دو در بزرگسالی در نوزادان این بیماران، بیشتر است (۵)؛ همچنین چاقی و استرس اکسیداتیو، ریسک ابتلا به دیابت بارداری را افزایش می‌دهد (۶ و ۷).

به‌رغم اینکه مدت زیادی از شناسایی این بیماری می‌گذرد، علت اصلی بروز این بیماری به‌طور کامل شناخته شده نیست. مقاومت به انسولین و التهاب، به‌عنوان دو مسیر مهم در پاتوژنز دیابت بارداری و دیابت تیپ دو شناخته شده‌اند (۸). پیشرفت دیابت بارداری با اختلال‌های متابولیک، عروقی و پاسخ‌های التهابی در گردش خون مادر، طی بارداری همراه است (۹) و این التهاب می‌تواند در پاتوفیزیولوژی ارتباط دیابت بارداری و ابتلا به دیابت تیپ دو در بزرگسالی نقش داشته باشد.

سازوکارهایی متعدد به‌عنوان عوامل دخیل در مقاومت به انسولین پیشنهاد شده‌اند که شامل ترکیبی از تغییرها در عملکرد اندوکرین بافت چربی، تغییرهای هورمونی و سایتوکاینی هستند (۱۰). در مقایسه با

بارداری طبیعی، GDM با افزایش بیشتر مقاومت به انسولین همراه است (۱۱). شواهد اخیر نشان می‌دهند که التهاب ویژگی اصلی سندرم مقاومت به انسولین است (۱۲). بیشتر مطالعات انجام‌پذیرفته در این زمینه به مقایسه سطح سایتوکاین‌های التهابی پرداخته‌اند (۱۳-۱۹)؛ نتایج تعدادی از این مطالعات، تفاوت در سطح سایتوکاین‌ها از قبیل TNF- α ، IL-6 ... و آدیپوکاین‌ها را در زنان مبتلا به دیابت بارداری در مقایسه با زنان باردار سالم گزارش کرده‌اند، برخی از سایتوکاین‌های التهابی از جمله TNF- α از طریق تداخل در سیگنالینگ انسولین، مقاومت به انسولین را در پی داشته، در پاتوژنز دیابت بارداری نقش دارند (۲۰).

مطالعات انسانی انجام‌گرفته در بیماران مبتلا به دیابت بارداری و همچنین مطالعات مدل‌حیوانی در رت‌های ویستارد باردار دیابتی، الگوی ایمنی سلولی متفاوتی را نسبت به بارداری طبیعی گزارش کرده‌اند.

نتایج این مطالعات به تفاوت در تعداد لنفوسیت تام، لنفوسیت‌های فعال، TCD4، TCD8، Treg، $\gamma\delta$ ، ماکروفاژ و منوسیت و تفاوت در سایتوکاین‌های Th1 و Th2 اشاره کرده‌اند (۲۱ تا ۲۳) و نشان‌دهنده نقش احتمالی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در این بیماری است که به‌احتمال در ایجاد شرایط التهاب و عدم تحمل گلوکز نقش دارند؛ نتایج یکی از این مطالعات از کاهش تکثیر لنفوسیت T در رت‌های باردار دیابتی حکایت دارد (۲۴) اما تاکنون در انسان، مطالعه‌ای در زمینه فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC)^۲ بیماران مبتلا به دیابت بارداری گزارش نشده است.

علاوه بر این، مطالعات پیشین تفاوت در مقادیر آدیپوسایتوکاین‌ها و عملکرد اندوکرین بافت چربی را نیز در زنان مبتلا به دیابت بارداری در مقایسه با زنان باردار سالم گزارش کرده‌اند (۲۵ و ۲۶). میزان فعالیت و سرعت تکثیر سلول‌ها ممکن است تحت تأثیر هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها، میتوژن‌ها،

^۲- Peripheral Blood Mononuclear Cell

^۱- GDM :Gestational Diabetes Mellitus

جمع‌آوری نمونه خون و جداسازی سلول

از همه افراد شرکت‌کننده در این تحقیق، ۳ میلی‌لیتر خون وریدی ناشتا در لوله فالكون هپارینه استریل جمع‌آوری شد؛ سپس خون را با PBS رقیق و به آرامی روی فایکول با نسبت ۱ به ۱ اضافه کردند و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۸۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به صورت هاله‌ای وسط پلاسما و فایکول جدا شدند و در گام‌های بعدی، دو مرحله با PBS (GIBCO) و RPMI1640 شستشوداده شدند.

تحریک و کشت سلول‌های PBMC

سلول‌های PBMC جدا شده را به محیط RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و پنی‌سیلین اضافه کرده، شمارش سلول‌ها با لام نتوبار انجام پذیرفت. برای بررسی زنده‌بودن سلول‌ها از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و بررسی میکروسکوپ نوری استفاده شد. برای کشت سلول، پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به کار گرفتند؛ سپس تعداد 1×10^6 در میلی‌لیتر سلول در ۳ خانه با میتوزن (۵ میکرولیتر ۳ PHA و GIBCO) و ۳ خانه بدون میتوزن به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند.

تست MTT

به منظور اندازه‌گیری فعالیت حیاتی شامل تکثیر و فعالیت سلول‌ها از روش MTT (۳-۴) و ۵ دی‌متیل تیازول تیازولیل (۲ و ۵ دی‌فنیل ۲-ترازولیوم برومید) استفاده شد. ابتدا محلول MTT (غلظت ۵ mgr/ml در نرمال سالین) تهیه و با فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شد، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون پلیت از انکوباتور خارج و در شرایط استریل ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۱/۱۰ حجم کل محیط) به هر خانه اضافه شد و کشت به مدت ۴ ساعت دیگر ادامه یافت. نمک ترازولیوم توسط میتوکندری فعال سلول به کریستال‌های بنفش‌رنگ فورمازان احیامی‌شود، پس از ۴ ساعت کشت، پلیت سانتریفوژ شد و مایع رویی پلیت به‌طور کامل، خارج و به سلول‌های ته پلیت ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی (۳ درصد) اضافه شد و با پیتاژ، کریستال‌ها

شرایط پاتولوژیک و متابولیک غیرطبیعی قرار گیرد. با توجه به اهمیت نقش سیستم ایمنی در پاتوژنز دیابت بارداری و اختلال در ایمنی سلولی در این بیماری، سنجش فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در این بیماران، امری لازم به نظر رسید؛ از این رو، این مطالعه برای اولین بار به مقایسه فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی زنان مبتلا به دیابت بارداری و باردار سالم پرداخته است.

مواد و روش‌ها

پس از اخذ موافقت کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شاهد، یک مطالعه مورد - شاهدهی با ۷۴ خانم باردار شامل ۳۷ زن مبتلا به دیابت بارداری به‌عنوان گروه شاهد و ۳۷ زن باردار سالم به‌عنوان گروه کنترل، در هفته ۲۸ تا ۳۶ بارداری، از دی ماه ۱۳۹۱ تا دی ماه ۱۳۹۲ انجام پذیرفت. نمونه‌گیری به صورت تصادفی و از میان زنان باردار مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهید مصطفی خمینی و ولیعصر (عج) صورت گرفت.

تشخیص دیابت بارداری با انجام تست تحمل گلوکز (OGTT)^۱ با ۷۵ گرم گلوکز خوراکی براساس توصیه انجمن دیابت آمریکا در سال ۲۰۱۲ انجام پذیرفت (۲۷)؛ براساس این استاندارد در صورتی که، هریک از مقادیر گلوکز پلاسما بیش از مقادیر زیر باشد، دیابت بارداری تشخیص داده می‌شود: ناشتا $\leq 92 \text{ mgr/dL}$ ، ۱ ساعت بعد $\leq 180 \text{ mgr/dL}$ و ۲ ساعت بعد $\leq 153 \text{ mgr/dL}$. افراد شرکت‌کننده در این مطالعه تحت درمان با انسولین نبوده، تحت درمان با رژیم غذایی بودند. معیارهای خروج از مطالعه شامل «دیابت» از پیش تشخیص داده‌شده، سابقه هرگونه بیماری، مصرف دارو، عفونت و ... بود. پس از اخذ رضایت از افراد شرکت‌کننده در مطالعه، اطلاعات دموگرافیک و مامایی بیماران از قبیل سن، سن بارداری و نمایه توده بدنی به صورت پرسش‌نامه جمع‌آوری و از اطلاعات بالینی پرونده بیماران استفاده شد.

^۱ - Oral Glucose Tolerance Test

به‌طور کامل حل شدند (کریستال‌های بنفش‌رنگ فورمازان قادر نیستند از غشای سلول خارج شوند و با اضافه کردن ایزوپروپانول اسیدی از سلول خارج می‌شوند)؛ سپس به سرعت به دستگاه الیزا ریدر منتقل شده، جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

محاسبات آماری

تمامی اطلاعات به دست آمده در نرم‌افزار SPSS تحلیل شد. آزمون T دوطرفه و تحلیل واریانس برای مقایسه میانگین مقادیر به دست آمده در دو گروه به کار گرفته شد. همبستگی متغیرهای مطالعه به روش SPSS و آزمون آماری همبستگی پیرسون و اسپیرمن سنجیده و سطح معنی دار $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها
اطلاعات دموگرافیک افراد شرکت کننده در تحقیق (سن، هفته بارداری، وزن، قد، شاخص توده بدنی و قند خون ناشتا) در جدول ۱ ارائه شده است، میانگین قند خون ناشتا (FBS) در دو گروه دیابتی و کنترل به ترتیب عبارت بود از: $100/97$ و $81/76$ که در دو گروه، تفاوتی معنی دار داشت ($P=0/0$)، در گروه دیابتی قند خون ناشتا، رابطه‌ای مستقیم با سن افراد شرکت کننده داشت، تفاوتی معنی دار در متغیرهای سن افراد، سن بارداری و نمایه توده بدنی دو گروه یافت نشد.

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیک گروه مبتلا به دیابت بارداری و باردار سالم

متغیر	باردار سالم (تعداد=۳۷)	مبتلا به دیابت بارداری (تعداد=۳۷)	P value
سن مادر (سال)	$30/25 \pm 4/5$	$31 \pm 4/62$	۰/۴۶
سن بارداری (هفته)	$30/92 \pm 3/43$	$31/52 \pm 3/4$	۰/۴۵
نمایه توده بدنی ابتدای بارداری (کیلوگرم بر مترمربع)	$24/63 \pm 4/2$	$25/87 \pm 3/29$	۰/۱۷
نمایه توده بدنی زمان نمونه‌گیری (کیلوگرم بر مترمربع)	$28/36 \pm 4/5$	$29/93 \pm 3/85$	۰/۱۱۶
گلوکز ناشتا (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	$81/76 \pm 20/73$	$100/97 \pm 18/6$	$\$/000$

مقایسه بر مبنای آزمون t انجام گرفته است و مقدار $p \leq 0/05$ از نظر آماری، معنی دار است.

* مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین داده شده‌اند.

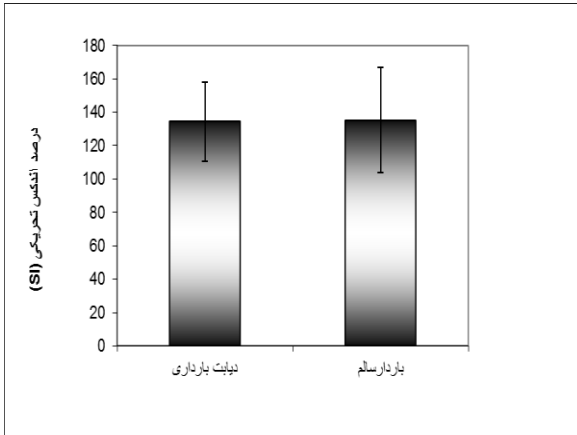
$\$/$ میان گروه مبتلا به دیابت بارداری و سالم، اختلافی معنی دار مشاهده شد ($P=0/0$).

میانگین درصد جذب نوری سلول‌های PBMC را نشان می‌دهد. تفاوتی معنی دار در اندکس تحریکی سلول‌های PBMC زنان مبتلا به دیابت بارداری در مقایسه با زنان باردار سالم مشاهده نشد.

میانگین درصد جذب نوری حاصل از احیای MTT توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی دو گروه زنان باردار سالم و مبتلا به دیابت بارداری، در مجاورت میتوزن و بدون حضور میتوزن، پس از ۴۸ ساعت کشت در جدول ۳ ارائه شده است. نمودار ۱،

۱۰۰ X جذب نوری سلول‌های تحریک نشده/جذب نوری سلول‌های تحریک شده: $4(\%)$ SI^۱

¹ - SI: Stimulation index



نمودار ۱. درصد اندکس تحریکی سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی زنان باردار سالم و مبتلا به دیابت بارداری، متعاقب اثر میتوزن PHA در تست MTT

سلول‌ها به تعداد 1×10^6 در میلی لیتر در پلیت ۹۶ خانه، در حضور و عدم حضور میتوزن کشت داده شدند و براساس جذب نوری سلول‌های تحریک شده و نشده، درصد اندکس تحریکی محاسبه شد. مقدار $p \leq 0.05$ از نظر آماری، معنی دار است.

جدول ۲. میانگین جذب نوری ناشی از احیای MTT متعاقب ۸ ساعت کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) در حضور و عدم حضور میتوزن، در دو گروه باردار سالم و مبتلا به دیابت بارداری

فعالیت حیاتی	دیابت بارداری	کنترل
میانگین درصد جذب نوری سلول‌های تحریک نشده	$25/2 \pm 7$	$30/2 \pm 10$
میانگین درصد جذب نوری سلول‌های تحریک شده	$33/2 \pm 8$	$39/8 \pm 11$
P value	0.0003^S	0.0001^{SS}

مقایسه بر مبنای آزمون t انجام گرفته است. مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین داده شده‌اند و $p \leq 0.05$ از نظر آماری، معنی دار است.
^S در گروه زنان مبتلا به دیابت بارداری، در میانگین درصد جذب نوری سلول‌های تحریک شده و نشده بر اثر میتوزن، تفاوتی معنی دار مشاهده شد.
^{SS} در گروه زنان باردار سالم، در میانگین درصد جذب نوری سلول‌های تحریک شده و نشده بر اثر میتوزن، تفاوت معنی داری مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری

به رغم اینکه مدت زیادی از شناسایی دیابت بارداری به عنوان یکی از اختلال‌های بارداری می‌گذرد، تاکنون عوامل دخیل در بیماری‌زایی آن به خوبی شناخته نشده‌اند. مطالعات پیشین، نقش سیستم ایمنی را از قبیل نقش التهاب و سایتوکاین‌های التهابی در ایجاد مقاومت به انسولین در پاتوژنز دیابت بارداری اثبات کرده‌اند. تعدادی از مطالعات، اهمیت و نقش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را در دیابت بارداری گزارش کرده‌اند؛ نتایج این مطالعات از این حکایت دارند که بیماران مبتلا به دیابت بارداری دارای الگوی ایمنی سلولی متفاوتی نسبت به زنان باردار سالم هستند، اما تاکنون سنجش فعالیت حیاتی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به دیابت بارداری گزارش نشده است. با توجه به اهمیت این پاسخ در وضعیت‌های کلینیکی مختلف در این مطالعه، فعالیت

حیاتی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی زنان مبتلا به دیابت بارداری با زنان باردار سالم مقایسه شد. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که اندکس تحریکی (SI) سلول‌های PBMC زنان مبتلا به دیابت بارداری نسبت به باردار سالم، تفاوتی معنی دار نداشت. در این مطالعه تفاوتی معنی دار در شاخص توده بدنی، سن و سن بارداری دو گروه وجود نداشت. نتایج مطالعات پیشین، نشانگر این نکته‌اند که زنان مبتلا به دیابت بارداری، جمعیت سلول T (CD4, CD8) متفاوتی نسبت به زنان باردار سالم هستند، لاپولا^۱ و همکاران به این نتیجه رسیدند که بیماران GDM نسبت به زنان باردار سالم، دارای لنفوسیت تام بیشتر و لنفوسیت‌های TCD8 بیان‌کننده $\gamma\delta$ بیشتری هستند و بیماران تحت درمان با انسولین، دارای سطح پایین‌تر CD4 و سطح بالاتر CD8

¹ - Lapolla

مطالعه گیورموچ^۳ و همکاران، تنها مطالعه‌ای است که تاکنون بلاستوژن لئوسیت T را در دیابت بارداری گزارش کرده‌است؛ در این مطالعه، بلاستوژن لئوسیت‌های T در رت‌های باردار دیابتیک و نوزادان ماکروزوم آنها به کمک تیمیدین نشاندار سنجیده شده‌است. یکی از نتایج این مطالعه نشان‌دهنده کاهش تکثیر لئوسیت‌های T تحریک‌شده با میتوزن در رت‌های دیابتیک و نوزادان ماکروزوم آنها در مقایسه با گروه کنترل بود (۲۴) که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر، متفاوت است. احتمال دارد تفاوت نتایج به دلیل تفاوت در نمونه مورد آزمایش در دو مطالعه باشد، مطالعه گیورموچ و همکاران روی لئوسیت‌های T رت‌های باردار که توسط STZ دیابتی شدند انجام‌گرفته‌است؛ این در حالی است که مطالعه حاضر بر سلول‌های تک‌هسته خون محیطی انسان انجام‌شده‌است. درکل از یافته‌های این تحقیق می‌توان چنین نتیجه‌گرفت که به‌احتمال، فعالیت تحریکی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به‌تنهایی، در پاتوژنز دیابت بارداری نقش‌ندارد؛ البته تأیید این موضوع، مستلزم انجام مطالعات دیگر با تعداد بیشتر شرکت‌کننده، در دوره‌های مختلف بارداری از قبیل سه ماهه اول و سه ماهه دوم است؛ همچنین با توجه به نقش مهم سایتوکاین‌ها در پاتوژنز دیابت بارداری، بررسی الگوی سایتوکاینی و ارتباط آن با وضعیت بیماری ضروری به‌نظر می‌رسد و انجام مطالعاتی با هدف سنجش فعالیت حیاتی سلول‌های PBMC در کنار فاکتورهای دیگر از جمله تعداد لئوسیت تام و درصد زیررده‌های لئوسیت T، مونوسیت، ماکروفاژ، سایتوکاین‌ها، آدیپوسایتوکاین‌ها، هورمون‌ها و فاکتورهای رونویسی به یافتن اتیولوژی و ایمونوپاتولوژی این بیماری کمک می‌کنند.

نسبت به مادران دیابتی تحت رژیم غذایی و گروه کنترل بوده‌اند اما تفاوتی در مقادیر سایتوکاین نیافتند (۲۱). لاپولا و همکاران، تعداد لئوسیت‌های تام را در سرم بیماران دیابتی با کمک فلوسایتومتری اندازه‌گیری کردند درحالی‌که در مطالعه حاضر از روش MTT برای سنجش فعالیت حیاتی استفاده‌شده‌است و روش انجام دو مطالعه، متفاوت است.

در مطالعه‌ای که محمود^۱ و همکاران با استفاده از روش فلوسایتومتری دو رنگ انجام‌دادند به این نتیجه رسیدند که بیماران GDM، دارای CD4(+), CD29(+), CD4(+), CD25(+), CD4(+), CD45RO بیشتری نسبت به زنان باردار سالم هستند (۲۲).

همچنین ریچاردسون^۲ و همکاران سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی زنان باردار سالم و مبتلا به دیابت بارداری را در هفته ۳۵ تا ۳۸ بارداری پس از کشت، به کمک روش FACS مقایسه کردند؛ نتایج این مطالعه از این حکایت‌داشت که زنان مبتلا به دیابت بارداری دارای منوسیت-ماکروفاژ، لئوسیت T فعال‌شده، Tmemory و Treg بیشتری نسبت به زنان باردار طبیعی هستند (۲۳)؛ این در حالی است که روش مورد استفاده و سن بارداری دو مطالعه تفاوت دارد.

با توجه به تفاوت در فن و روش انجام تحقیق، نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر مطالعات انجام‌پذیرفته در زنان مبتلا به دیابت بارداری، چندان قابل‌مقایسه نیست؛ همچنین اختلاف نظرهای موجود در پژوهش‌های مشابه می‌تواند با تفاوت در ویژگی افراد شرکت‌کننده از جمله سن بارداری، شدت بیماری، تفاوت در نوع نمونه (سرم، پلاسما یا مایع روی کشت) و تفاوت در روش پژوهش (فلوسایتومتری، MTT LTT و ...) همراه باشد؛ همچنین شاخص توده بدنی، سیگاری بودن و نژاد از دیگر عواملی هستند که سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

³- Guermouche

¹ - Mahmoud

² -Richardson

دیابت بارداری بود که تحت درمان با انسولین نباشند.

از تمامی بیماران شرکت کننده در این مطالعه کمال
قدردانی به عمل می آید.

منابع

1. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* . 2008; 31:S55–S60.
2. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Physical Therapy..* 2008;88(11):1254–64.
3. Garshasbi A, Faghihzadeh S, Naghizadeh MM, Ghavam M. Prevalence and risk factors for gestational diabetes mellitus in Tehran. *Journal of Family and reproductive health Care.* 2008;2(2):75–80.
4. Singh SK, Rastogi A. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic syndrome.* 2008;2(3):227–34.
5. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational Diabetes and the Incidence of Type 2 Diabetes A systematic review. *Diabetes care.* 2002;25 (10): 1862–8.
6. Garshasbi A, Solbi Z, Faghihzade S, Naghizade M. Effects of Increase in Body Mass Index Category during Pregnancy on Pregnancy Outcome. *Medical Daneshvar.* 2008; 16 (77) 16 (77) :33-40
7. Abdolsamad H, Zamani Bonab M, Goodarzi MT, Soltanian A, Radi Sh, Ahmadi F. Comparative evaluation of salivary antioxidants in gestational diabetes and healthy pregnant women. *Medical Daneshvar.* 2011; 18 (94) 18 (94) :1-8
8. Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, et al. - previous gestational diabetes mellitus. *International journal of Endocrinology.* 2012 ; 549748.
9. Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B. C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. *Journal of clinical endocrinology & metabolism.* 2003;88(8):3507–12.
10. Kleiblova P, Dostalova I, Bartlova M, Lacinova Z, Ticha I, Krejci V, et al. Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus. *Molecular and cellular endocrinology .* 2010;314(1):150–6.
11. Richardson AC, Carpenter MW. Inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America .* 2007;34(2):213–24.
12. Öztekin Ö. New insights into the pathophysiology of gestational diabetes mellitus: possible role of human leukocyte antigen-G. *Medical hypotheses.* 2007;69(3):526–30.

لازم به توضیح است از جمله محدودیت ها و دشواری های این پژوهش، دسترسی به بیماران مبتلا به

تقدیر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد است که با حمایت مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی دانشگاه شاهد انجام شده است. در پایان

13. McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A, Alford FP. Do adiponectin, TNF α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metabolism Research and Reviews.* 2006 ;22(2) :131–8.
14. Georgiou HM, Lappas M, Georgiou GM, Marita A, Bryant VJ, Hiscock R, et al. Screening for biomarkers predictive of gestational diabetes mellitus. *Acta diabetologica.* 2008;45(3):157–65.
15. Ategbo J-M, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, et al. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *Journal of clinical endocrinology & metabolism.* 2006; 91(10):4137–43.
16. Kuzmicki M, Telejko B, Szamatowicz J, Zonenberg A, Nikolajuk A, Kretowski A, et al. High resistin and interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus. *Gynecological endocrinology.,* 2009; 25(4):258–63.
17. Winkler G, Cseh K, Baranyi É, Melczer Z, Speer G, Hajós P, et al. Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2002;56(2):93–9.
18. Salmi AA, Zaki MN, Zakaria R, Nor Aliza GA, Rasool HA. Arterial stiffness, inflammatory and pro-atherogenic markers in gestational diabetes mellitus. *Vasa.* 2012;41(2):96–104.
19. Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Csakany GM, Speer G, Kovacs M, et al. The pathophysiological influence of leptin and the tumor necrosis factor system on maternal insulin resistance: negative correlation with anthropometric parameters of neonates in gestational diabetes. *Gynecological Endocrinology.* 2002;16(6):453–60.
20. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology.* 2004;25(1):4–7.
21. Lapolla A, Dalfrà MG, Sanzari M, Fedele D, Betterle C, Masin M, et al. Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine.* 2005;31(4):280–7.
22. Mahmoud F, Abul H, Omu A, Haines D. Lymphocyte Sub-populations in Gestational Diabetes. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2005;53(1):21–9.
23. Richrdson A, Cao L, Catlow D, Carpenter M, Sharma S, undefined others. Abnormal cellular immune function in patients with gestational

- diabetes mellitus (GDM). *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2005;193(6):S93.
24. Guermouche B, Yessoufou A, Soulimane N, Merzouk H, Moutairou K, Hichami A, et al. n-3 Fatty Acids Modulate T-Cell Calcium Signaling in Obese Macrosomic Rats. *Obesity research*. 2004;12(11):1744–53.
25. Hossein-nezhad A, Mirzaei K, Maghbooli Z, Rahmani M, Larijani B. Resistin, adiponectin and visfatin; can adipocytokines predict gestational diabetes mellitus and early post partum metabolic syndrome. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders*. 2010;9(6).
26. Maghbooli J, Hoseinnejad A, Khoshnati M, Arzaghi SM, Rahmani M, Larijani B. Serum Leptin concentration in gestational diabetes mellitus patients. *Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders*. 2006;6(1):57–66.
27. Association AD. Standards of medical care in diabetes–2012. *Diabetes Care*. 2012;35:S11.

Comparison of peripheral blood mononuclear cells viability in healthy pregnant women and patients with gestational diabetes mellitus

Zahra Jabari¹, Ahia Garshasbi^{2*}, Mohammad Reza Jalali Nadoushan³, Sedigheh HantushZadeh⁴, Shohreh Jalaei⁵, Tooba Ghazanfari^{6*}

1. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
3. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
4. Department of Obstetrics and Gynecology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Department of Physical Therapy, Faculty of Rehabilitation, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

E-mail: Garshasbi@shahed.ac.ir, tghazanfari@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as glucose intolerance of variable severity with onset or first diagnosis during pregnancy. Immunopathology of GDM is not well known. Different parameters of cellular immunity, particularly leukocyte count and subset have been reported. Considering the importance of the immune system, particularly peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the pathogenesis of gestational diabetes, the aim of this study was to investigate the viability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with GDM in comparison with healthy pregnant women.

Materials and Methods: During a case -control study, 37 pregnant women with GDM and 37 healthy pregnant women in gestational age 28-36 week were recruited. Fasting venous blood was collected from all subjects. PBMC was separated from ficoll density-gradient centrifugation. Cells were suspended in culture medium RPMI 1640, 10% FBS and cultured in the absence and presence of PHA in 96-well plate (1×10^6 cells/ml) at 37 °C and 5% CO₂ for 48 h. Cell viability was assessed with MTT assay. Stimulation index was calculated and compared between groups.

Results: There was no significant difference for age, body mass index, and gestational week in the two groups. Stimulation index of PBMC in GDM and control groups were 134.37 ± 23.6 and 135.2 ± 31.5 , respectively. There was no significant difference for stimulation index of PBMC in GDM women compared to their matched control subjects.

Conclusion: These results show that there was no significant difference in peripheral blood mononuclear cell's viability in GDM women as compared to healthy pregnant women.

Keywords: Gestational diabetes mellitus, Cell viability, Peripheral blood mononuclear cell