

## Effect of Lymphocyte Immunotherapy on Pro-Inflammatory Th17 Related Cytokine Levels in Women with Recurrent Spontaneous Abortion

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original research

#### Authors

Zare A.\**PhD*,  
Saremi A.<sup>1</sup> *MD*,  
Salehian P.<sup>1</sup> *MD*,  
Roomandeh N.<sup>2</sup> *MSc*,  
Naderi M.<sup>1</sup> *BSc*,  
Lashgari P.<sup>1</sup> *BSc*,  
Arasteh J.<sup>3</sup> *PhD*,  
Kokhaei P.<sup>2</sup> *PhD*

#### How to cite this article

Zare A, Saremi A, Salehian P, Roomandeh N, Naderi M, Lashgari P, Arasteh J, Kokhaei P. Effect of Lymphocyte Immunotherapy on Pro-Inflammatory Th17 Related Cytokine Levels in Women with Recurrent Spontaneous Abortion. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2018;3(2):83-90.

\*Sarem Cell Research Center, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran  
<sup>1</sup>Sarem Cell Research Center, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran  
<sup>2</sup>Cancer Research Center and Department of Immunology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran  
<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Sarem Women's Hospital, End of Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran  
Phone: +98 (21) 44670888  
Fax: +98 (21) 44670885  
ahadzr@gmail.com

#### Article History

Received: December 23, 2017  
Accepted: April 09, 2018  
ePublished: June 15, 2018

### ABSTRACT

**Aims** Alterations of Th17 cells during pregnancy have a crucial role in maintenance of fetus and the high level of these cells has been observed in women with recurrent spontaneous abortion. Immunotherapy with paternal lymphocytes is one of the effective therapeutic methods for this complication. The aim of this study was to evaluate the alteration in Th17 cytokine levels in patients with recurrent abortion after lymphocyte immunotherapy.

**Materials & Methods** In this semi-experimental study, 30 patients referred to Sarem hospital with a history of at least three recurrent abortions in 2013 were evaluated. The levels of IL-17 and IL-21 in patient serum and supernatant of cultured peripheral blood mononuclear cells were assayed before and after this treatment by using ELISA. Statistical analysis was performed with Wilcoxon test by SPSS 22.

**Findings** The levels of IL-17 and IL-21 in patient serum after immunotherapy were significantly decreased ( $p < 0.05$ ). Supernatant of cultured peripheral blood mononuclear cells after immunotherapy showed a low level of IL-21 ( $p < 0.04$ ), while this change was not significant for interleukin 17 ( $p = 0.13$ ).

**Conclusion** Lymphocyte immunotherapy reduces the level of pro-inflammatory cytokines of Th17 cells in women with recurrent spontaneous abortion.

**Keywords** Immunotherapy; Habitual Abortion; Th17 cells

### CITATION LINKS

[1] Why isn't the fetus ... [2] The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces ... [3] Reproductive ... [4] An update in recurrent spontaneous ... [5] Recurrent miscarriage: Causes, evaluation and ... [6] Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent ... [7] Recurrent pregnancy loss: A disease of inflammation ... [8] Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation ... [9] Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful ... [10] Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in ... [11] Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in ... [12] TH17 cells in development: An updated view of their molecular ... [13] The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines ... [14] Kuchroo VK. IL-17 and Th17 ... [15] The impact of Th17 cells on transplant rejection and the induction of ... [16] Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant ... [17] Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce ... [18] How do regulatory T ... [19] The balance of the immune system between T cells and NK cells in ... [20] Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable ... [21] Th17 and regulatory T cells in women with ... [22] TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and ... [23] Induction of MLR-Bf and protection of fetal ... [24] Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism ... [25] Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy ... [26] Association of human leucocyte antigen sharing with ... [27] Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage ... [28] The influence of paternal lymphocyte ... [29] Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained ... [30] Correlation between serum zinc levels and successful immunotherapy ... [31] Cytokines in recurrent pregnancy ... [32] Characteristics of immune cell changes ... [33] Natural killer cells promote immune ... [34] Alteration of TH1 and TH2 cells by intracellular cytokine ... [35] The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T ... [36] Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in ... [37] An imbalance in interleukin-17-producing T and ... [38] Intravenous immunoglobulin G modulates peripheral ... [39] The basis and value of currently used ... [40] Effect of leukocyte therapy ... [41] Comprehensive analysis of peripheral blood ... [42] Study on the relationship between Th17 cells ... [43] Genetic variations in the interleukin-21 ... [44] Th17 cells and related cytokines in unexplained ...

## اثر درمان لنفوسیتی بر سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی سلول‌های Th17 در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه‌خودی

احد زارع\* PhD

مرکز تحقیقات سلولی صرم، بیمارستان صرم، تهران، ایران

ابوطالب صرمی MD

مرکز تحقیقات سلولی صرم، بیمارستان صرم، تهران، ایران

پیروز صالحیان MD

مرکز تحقیقات سلولی صرم، بیمارستان صرم، تهران، ایران

نرگس رومنده MSc

مرکز تحقیقات سرطان و بخش ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی سمنان، سمنان، ایران

مریم نادری BSc

مرکز تحقیقات سلولی صرم، بیمارستان صرم، تهران، ایران

پیمان لشگری BSc

مرکز تحقیقات سلولی صرم، بیمارستان صرم، تهران، ایران

جواد آراسته PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز،

تهران، ایران

پرویز کوخایی PhD

مرکز تحقیقات سرطان و بخش ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی سمنان، سمنان، ایران

### چکیده

**اهداف:** تغییرات سلول‌های Th17 طی بارداری نقش مهمی در حفظ جنین دارد و سطح بالای این سلول‌ها در بیماران سقط مکرر خودبه‌خودی مشاهده شده است. درمان لنفوسیتی این بیماران با لنفوسیت‌های همسر آنها به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی موثر این عارضه مطرح شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر درمان لنفوسیتی بر سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی سلول‌های Th17 در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه‌خودی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه نیمه‌تجربی، ۳۰ بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان صرم با سابقه حداقل سه بار سقط مکرر خودبه‌خودی در سال ۱۳۹۲ بررسی شدند. سطح اینترلوکین ۱۷ و اینترلوکین ۲۱ در سرم و مایع رویبی محیط کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، به روش الیزا قبل و بعد از درمان لنفوسیتی سنجیده شد. تجزیه و تحلیل آماری با آزمون ویلکاکسون و توسط نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد.

**یافته‌ها:** میزان اینترلوکین ۱۷ و اینترلوکین ۲۱ در سرم بیماران، بعد از درمان لنفوسیتی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). میزان اینترلوکین ۲۱ در مایع رویبی سوپ کشت سلولی سلول‌های تک‌هسته‌ای بعد از درمان کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.04$ )، در حالی که این تغییر در مورد اینترلوکین ۱۷ معنی‌دار نبود ( $p = 0.113$ ).

**نتیجه‌گیری:** درمان لنفوسیتی سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی سلول‌های Th17 را در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه‌خودی کاهش می‌دهد.

**کلیدواژه‌ها:** درمان لنفوسیتی، سقط مکرر خودبه‌خودی، سلول‌های Th17

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۱۹

\*نویسنده مسئول: ahadzr@gmail.com

### مقدمه

طی بارداری، جنین با بیان آنتی‌ژن‌های پدري که برای سیستم ایمنی مادر بیگانه تلقی می‌شود، به‌عنوان نیمه‌پیوند محسوب می‌شود<sup>[1]</sup>. با گسترش ایمنی‌شناسی بارداری، اهمیت تحمل ایمنی مادر نسبت به جنین بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است و شکست این تحمل با مشکلات بارداری مانند سقط مکرر خودبه‌خودی همراه خواهد بود<sup>[2, 3]</sup>. سقط مکرر خودبه‌خودی

(RSA) به‌صورت سه یا بیش از سه سقط مکرر پیش از هفته ۲۰ بارداری تعریف می‌شود که در ۵٪ زوج‌های بارور رخ می‌دهد<sup>[4, 5]</sup>. علل متعددی مانند ناهنجاری‌های ژنتیکی و کروموزومی، اختلالات هورمونی و آناتومی، عفونت و فاکتورهای ایمنی در ایجاد این عارضه دخیل هستند<sup>[4]</sup>. حدود ۶۹٪ موارد، علت سقط مکرر ناشناخته است که نقش عوامل ایمنی به‌صورت فاکتورهای خودایمن و آلوایمیون در این زمینه بیش از علل دیگر مطرح می‌شود<sup>[6, 7]</sup>.

طبق یافته‌های پیشین، تنظیم پروفایل سایتوکاینی سلول‌های T1 کمکی به T2 کمکی (Th1/Th2) یکی از مکانیزم‌هایی است که در بقا و رشد جفت و جنین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در مقابل غالبیت ایمنی نوع Th1 در سقط مکرر خودبه‌خودی گزارش شده است<sup>[8, 9]</sup>. با توجه به این که غالبیت ایمنی نوع Th2 نیز در نمونه‌های سقط مکرر گزارش شده است، الگوی Th1/Th2 برای توضیح مکانیزم عدم رد جنین توسط سلول‌های ایمنی مادر کافی نیست<sup>[10]</sup>. در حال حاضر الگوی Th1/Th2 به‌صورت الگوی سلول‌های Th1/Th2/Th17 و سلول‌های T تنظیمی گسترش یافته است<sup>[11]</sup>.

سلول‌های Th17 رده جدیدی از سلول‌های T کمکی CD4<sup>+</sup> هستند که در خودایمنی و پاکسازی عفونت‌های مخاطی از طریق تولید اینترلوکین ۱۷A (IL-17A)، اینترلوکین ۱۷F (IL-17F) و اینترلوکین ۲۲ (IL-22) اهمیت دارند و تغییرات سلول‌های مذکور طی بارداری تأثیر به‌سزایی در حفظ جنین دارد<sup>[12-14]</sup>. از سوی دیگر، سلول‌های Th17 نقش مهمی در رد آلوگرافت ایفا می‌کند<sup>[15, 16]</sup>. جنین نیمه‌آلوژنیک، به‌عنوان آلوگرافت، به میزبان مادری خود طی بارداری حمله می‌کند، بنابراین بررسی سلول‌های Th17 در موارد سقط مکرر اهمیت به‌سزایی دارد<sup>[17]</sup>. سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-17 و IL-21 که توسط سلول‌های Th17 تولید و ترشح می‌شود، پاسخ‌های التهابی و بیان واسطه‌های التهابی را در مقابل محرک‌های مختلف القا می‌کنند. IL-21 در تمایز سلول‌های Th به زیرگروه Th17 نیز نقش دارد<sup>[18]</sup>. سطح IL-17 در خون محیطی طی بارداری طبیعی تغییری ندارد و میزان لنفوسیت‌های IL-17<sup>+</sup> دسیدوا به میزان بالاتری نسبت به لنفوسیت‌های خون محیطی هستند، اما جمعیت سلول‌های Th17 در مراحل پایانی بارداری نسبت به حالت غیربارداری کاهش قابل توجهی نشان می‌دهد. با توجه به اهمیت IL-17 در استقرار بارداری و ارتباط آن با RSA، بررسی این سایتوکاین اهمیت دارد<sup>[19]</sup>.

زنان دارای سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی در مقایسه با زنان سالم، سطح بالایی از IL-17 را بیان می‌کنند و افزایش تعداد سلول‌های Th17 در خون محیطی و دسیدوای زنان دارای سقط مکرر، نشان‌دهنده اهمیت سلول‌های مذکور در حفظ بارداری است<sup>[20, 21]</sup>. بنابراین سلول‌های Th17 کنترل‌نشده ممکن است به‌عنوان واسطه مهم التهاب و آسیب بافتی در بیماری‌های بارداری پدیدار شوند و درک مکانیزم‌های عملکردی و تنظیم آنها ممکن است به طراحی دیدگاه‌های درمانی جدید برای کنترل این بیماری کمک کند<sup>[22]</sup>.

در دهه‌های اخیر، درمان لنفوسیتی به‌عنوان یکی از درمان‌های ایمونولوژیک برای بیماران سقط مکرر به کار می‌رود. افزایش بهبود نتیجه بارداری بعد از ایمونوتراپی لنفوسیتی بیماران دارای سابقه RSA در بسیاری از مطالعات گزارش شده است<sup>[23-26]</sup>. اما مشاهدات متضادی حاکی از عدم موفقیت این شیوه درمانی بوده و میزان اثربخشی آن همچنان مورد بحث است<sup>[24-27]</sup>. یافته‌های

**درمان لنفوسیتی:** در دو نوبت متوالی و به فاصله ۴ هفته، ۲۰ میلی‌لیتر خون هیپارینه از همسر بیمار دریافت و با حفظ شرایط استریل، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) نمونه با استفاده از تکنیک فایکول جدا شد. پس از سه بار شست‌وشوی سلول‌ها با سرم رینگر و شمارش آنها با استفاده از لام نئوبار در هر نوبت تعداد  $10^6 \times 10^8 - 10^8$  سلول در یک میلی‌لیتر سرم رینگر، با دوز ۰/۵ میلی‌لیتر به‌صورت داخل جلدی روی ساعد یا بازوی بیمار تزریق شد. دومین مرحله درمان لنفوسیتی ۴ هفته پس از اولین تزریق صورت گرفت [30].

#### سنجش میزان IL-17 و IL-21 در سرم و سوپ کشت سلولی:

برای سنجش سطح سایتوکاین‌های IL-17 و IL-21 در نمونه‌های سرم و مایع رویی کشت سلولی، قبل و بعد از درمان به کمک تکنیک الیزا از کیت‌های مربوطه استفاده شد (eBioscience؛ ایالات متحده). اندازه‌گیری غلظت سایتوکاین‌ها در نمونه‌های بیماران طبق دستورالعمل کیت، به‌صورت دوتایی انجام شد. حساسیت کیت اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL-17 و IL-21 به ترتیب ۰/۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و ۸ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد. ابتدا به کمک آزمون کلموگروف-اسمیرنوف تک‌نمونه‌ای توزیع نرمال یا غیرنرمال متغیرها بررسی شد. بر اساس توزیع غیرنرمال متغیرهای IL-17 و IL-21 در سرم و سوپ کشت سلولی، با استفاده از آزمون ناپارامتری ویلکاکسون، اختلاف معنی‌دار سطح این سایتوکاین‌ها قبل و بعد از درمان ارزیابی شد. نتایج به‌صورت میانه و دامنه میان‌چارکی گزارش شد.

#### یافته‌ها

میانگین سنی بیماران  $31/37 \pm 5/67$  سال بود. غلظت سایتوکاین‌های IL-17 و IL-21 در نمونه سرم بیماران بعد از درمان در مقایسه با غلظت این سایتوکاین‌ها قبل از درمان به‌طور معنی‌داری کاهش داشت ( $p < 0/05$ ). سطح IL-17 در سوپ کشت سلولی بعد از درمان در مقایسه با قبل از درمان تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p = 0/13$ )، در حالی که غلظت IL-21 به میزان قابل توجهی بعد از درمان کاهش یافت ( $p = 0/038$ ; جدول ۱).

**جدول ۱) سطح سایتوکاین‌ها در سرم و مایع رویی کشت سلولی قبل و بعد از درمان (۳۰ بیمار)**

سایتوکاین	سرم	مایع رویی
<b>اینترلوکین ۱۷ (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)</b>		
قبل از درمان	۱/۷ (۱/۱، ۸/۱)	۳۴/۰۴ (۲۲۵/۲۲، ۵۰۰/۰۷)
بعد از درمان	۱/۵ (۱/۱، ۳/۴۷)	۲۳۹/۹۵ (۱۳۰/۰۵، ۴۴۷/۵۵)
<b>اینترلوکین ۲۱ (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)</b>		
قبل از درمان	۱۰/۸۰ (۴/۶۵، ۳۱/۳۰)	۱۱/۹۵ (۶/۰۷، ۲۴/۷۷)
بعد از درمان	۶/۶ (۴/۸۷، ۲۴/۴۷)	۸/۴۵ (۷/۲۱، ۱۶/۰۱)

#### بحث

طی بارداری، سایتوکاین‌هایی که توسط سلول‌های مادر و جنین ترشح می‌شوند، در تحمل ایمونولوژیک مادری علیه جنین نیمه‌آلوژنیک نقش دارد [31]. در حقیقت، جنین نیمه‌آلوژنیک به‌دلیل مهار واکنش‌های ایمونولوژیک میان مادر و جنین از جمله سیستم ایمنی مادر حفظ می‌شود، اما مکانیزم‌های دقیق چنین تحملی به‌درستی مشخص نیست [32]. علاوه بر این، پاسخ‌های التهابی القاشده می‌تواند منجر به رد جنین شود و مهار این پاسخ‌ها

قبلی حاکی از غالبیت سلول‌های Th2 پس از درمان لنفوسیتی است [28]، اما مطالعه اخیر پیرامون بررسی تغییرات تعداد سلول‌های Th17 و T تنظیمی (Treg) به‌دنبال درمان لنفوسیتی در زنان RSA نشان می‌دهد که نسبت سلول‌های Th17 به Treg به میزان قابل توجهی پس از درمان کاهش می‌یابد و بیانگر اهمیت درمان لنفوسیتی برای تغییر عملکرد سلول‌های Th17 به سمت حفظ بارداری است [29].

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر درمان لنفوسیتی بر سطح سایتوکاین‌های پیش‌تهابی سلول‌های Th17 در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه‌خودی انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع نیمه‌تجربی است که روی ۳۰ بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان فوق‌تخصصی صرم تهران طی تیرماه تا آبان‌ماه ۱۳۹۲ انجام شد. حجم نمونه با توجه به مطالعات مشابه و با مشاوره متخصص آمار و اپیدمیولوژی و استفاده از فرمول‌های آماری تعیین شد. بیماران پس از مراجعه به کلینیک سقط مکرر و بررسی توسط پزشک متخصص مورد ارزیابی قرار گرفتند و بیماران که علت شناخته‌شده‌ای برای موارد سقط مکرر آنها وجود نداشت، در این مطالعه قرار گرفتند. بنابراین بیماران تحت بررسی‌هایی از قبیل کاربوتایپینگ به‌منظور رد اختلالات کروموزومی، بررسی سطح هورمون‌های تیروئیدی، سطح اتوانتی‌بادی‌ها مانند آنتی‌بادی ضد فسفولیپید، آنتی‌بادی ضد کاردیولیپین و آنتی‌بادی ضد هسته، فاکتورهای انعقادی مانند پروتئین C و S، پروترومبین و هموسیستئین، مشکلات آناتومیک و رحمی قرار گرفته و نیز در صورت منفی‌بودن آزمایش سازگاری خون (کراس‌مچ) وارد مطالعه شدند. پیش از نمونه‌گیری، فرم رضایت آگاهانه که به تصویب کمیته اخلاق بیمارستان صرم رسیده بود، توسط هر یک از بیماران داوطلب تکمیل شد. این بیماران خواستار درمان لنفوسیتی شدند و سرم و همچنین مایع رویی کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی آنها قبل و بعد از درمان لنفوسیتی از نظر سطح اینترلوکین ۱۷ و ۲۱ ارزیابی شد.

**جداسازی سرم:** حدود ۵ میلی‌لیتر خون بیماران قبل و بعد از درمان، دریافت شد. به‌منظور جداسازی سرم ۲ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۱۰g سانتریفوژ و سرم به‌دست‌آمده تا جمع‌آوری کامل نمونه‌ها در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. ۳ میلی‌لیتر نمونه خون به‌منظور جداسازی و کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای به لوله هیپارینه استریل به زیر هود منتقل شد.

**جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی:** به کمک تکنیک فایکول، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی برای کشت سلولی و تهیه مایع رویی، جدا شده و پس از دو بار شست‌وشو با بافر فسفات (PBS) (پتازن؛ ایران)، شمارش سلولی و قابلیت زنده‌ماندن سلول‌ها توسط تریپان‌بلو (Sigma؛ ایالات متحده) تعیین شد.

**کشت سلولی:** پس از شمارش سلول‌های تک‌هسته‌ای، میزان  $2 \times 10^6$  سلول در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ (Sigma؛ ایالات متحده) حاوی پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۱۰۰ واحد بین‌المللی به میلی‌لیتر)، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) (Sigma؛ ایالات متحده) و ۳۰ میکرولیتر محرک PHA (Sigma؛ ایالات متحده) در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و حضور ۵٪ دی‌اکسیدکربن در فلاسک کشت سلولی ۵۰ میلی‌لیتری، به‌مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس مایع رویی کشت سلولی را به کمک سانتریفوژ جدا کرده و تا جمع‌آوری کامل نمونه‌ها در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد.

نشانه‌گر کاهش عملکرد التهابی سلول Th17 باشد (به ترتیب  $p=0.004$  و  $p=0.038$ ). به نظر می‌رسد به دنبال درمان لنفوسیتی، سطح سایتوکاین‌های مرتبط با Th17 کاهش می‌یابد که می‌تواند در کاهش پاسخ التهابی مادر نسبت به جنین موثر باشد.

در مطالعه حاضر پس از درمان لنفوسیتی سطح سایتوکاین‌های Th17 در سرم بیماران به طور قابل توجهی کاهش یافت که با مطالعات پیشین، مبنی بر کاهش نسبت سلول‌های Th17/Treg پس از درمان مطابقت دارد [29]. با توجه به کاهش معنی‌دار سایتوکاین‌های مذکور پس از درمان لنفوسیتی، به نظر می‌رسد IL-17 و IL-21 نیز می‌توانند نقش به‌سزایی در اثربخشی درمان لنفوسیتی و احتمالاً موفقیت بارداری در بیماران RSA به دنبال این روش درمانی ایفا کند.

از محدودیت‌های این مطالعه بررسی جمعیت سلولی Th17 و Treg و همچنین بررسی نسبت Th17/Treg به روش فلوسایتومتری بود که مطالعه و بررسی آن و تطبیق همزمان آن با سایتوکاین‌های مربوطه در بیماران سقط مکرر خودبه‌خودی که مورد درمان لنفوسیتی قرار می‌گیرند، پیشنهاد می‌شود.

### نتیجه‌گیری

درمان لنفوسیتی موجب کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی سلول‌های Th17 در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه‌خودی می‌شود.

**تشکر و قدردانی:** از همکاران دپارتمان سقط مکرر و گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سمنان و همچنین همکاران آزمایشگاه مرکزی بیمارستان فوق تخصصی صارم تشکر و قدردانی می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** رضایت بیماران برای شرکت در این مطالعه اخذ و فرم رضایت آگاهانه مصوب کمیته اخلاق بیمارستان صارم توسط هر یک از بیماران داوطلب تکمیل شد.

**تعارض منافع:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**سهم نویسندگان:** احد زارع (نویسنده اول)، نگارنده بحث (۲۰٪)؛ ابوطالب صارمی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۲۰٪)؛ پرویز صالحیان (نویسنده سوم)، تحلیل‌گر آماری (۱۰٪)؛ نرگس رومنده (نویسنده چهارم)، پژوهشگر اصلی (۱۰٪)؛ مریم نادری (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ پیمان لشگری (نویسنده ششم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ جواد آراسته (نویسنده هفتم)، نگارنده مقدمه (۱۰٪)؛ پرویز کوخایی (نویسنده هشتم)، نگارنده مقدمه (۱۰٪)

**منابع مالی:** مرکز تحقیقات سلولی صارم و دانشگاه علوم پزشکی سمنان منابع مالی این پژوهش را تأمین نموده‌اند.

### منابع

- 1- Erlebacher A. Why isn't the fetus rejected?. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(5):590-3.
- 2- Li X, Wang B, Li Y, Wang L, Zhao X, Zhou X, et al. The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(1):241-53.
- 3- Christiansen OB. Reproductive immunology. *Mol Immunol*. 2013;55(1):8-15.
- 4- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent

برای بارداری طبیعی اهمیت یافته و در صورت شکست تحمل به رد ایمونولوژیک جنین و در نهایت سقط منجر می‌شود [33].

شناسایی ایمونولوژی بارداری در حفظ آن اهمیت به‌سزایی دارد و تشخیص ناکافی آنتی‌ژن‌های جنینی می‌تواند منجر به سقط مکرر خودبه‌خودی شود. بر این اساس درمان‌های ایمونولوژیک متعددی برای درمان بیماران دارای این عارضه انجام می‌شود [24]. تا سال‌های اخیر، محققان بر این باور بودند که تعادل میان سلول‌های Th1 و Th2، مکانیزم تنظیم ایمنی کلیدی ایمونولوژی سلول T به‌ویژه طی بارداری است [34]. شناسایی سلول‌های Th17، توجه محققان را به سلول‌های اجرایی ایمنی، جلب کرده است. طبق مطالعه و/نگ و همکاران، سلول‌های Th17 در خون محیطی و دسیدوای زنان RSA افزایش و میزان سایتوکاین IL-17 که توسط سلول Th17 ترشح می‌شود نیز در سرم این بیماران در مقایسه با زنان سالم به‌طور قابل توجهی افزایش داشته است [35, 36]. در مطالعه حاضر، به‌منظور بررسی نقش اثر درمان لنفوسیتی بر عملکرد سلول‌های Th17، سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-17 و IL-21 در سرم و مایع رویی محیط کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با میتوزن (PHA) در بیماران دارای سابقه سقط مکرر قبل و بعد از درمان سنجیده شد.

یافته‌های اخیر تغییر در نسبت سلول‌های اجرایی ایمنی Th1/Th2/Th17 و Treg را در زنان RSA گزارش می‌کند [37]. بر اساس مطالعات متعدد، سلول‌های Th17 در ایجاد پاسخ‌های التهابی و پاسخ سیستم ایمنی مادر علیه جنین نقش دارند [35]. بنابراین درمان لنفوسیتی می‌تواند الگوی سایتوکاینی سلول‌های ایمنی را تحت تأثیر قرار دهد [38, 39]. در این راستا می‌تواند تغییر در تعادل سلولی و مکانیزم‌های تنظیمی سیستم ایمنی رخ دهد [11, 29, 34]. مطالعات متعددی به بررسی مکانیزم عملکرد و نقش درمان لنفوسیتی در درمان بیماران RSA پرداخته و برخی بهبود میزان موفقیت بارداری را به دنبال این شیوه درمانی گزارش می‌کنند [32, 40]. در مطالعه‌ای نسبت سایتوکاین‌های Th1 به Th2 به دنبال درمان لنفوسیتی به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد [41]. در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در زمینه اهمیت سلول‌های Th17 طی بارداری انجام شده است، بنابراین تغییرات سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th17 به دنبال درمان لنفوسیتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

در مطالعه‌ای نسبت سلول‌های Th17 به سلول‌های Treg پس از درمان لنفوسیتی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [29]. در مطالعه حاضر غلظت IL-17 در سرم بیماران تحت درمان لنفوسیتی، پس از درمان کاهش یافت. کیو و همکاران، میزان IL-17 در سرم و سوپ کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای بیماران RSA در مقایسه با زنان سالم بالاتر است [42]، این کاهش می‌تواند به نفع حفظ بارداری باشد و به نوعی درمان لنفوسیتی را مفید برای کاهش میزان این سایتوکاین معرفی کند.

IL-21 نیز به عنوان سایتوکاین پیش‌التهابی به میزان بالایی توسط سلول‌های Th17 تولید می‌شود و با بررسی پلی‌مورفیسم ژن مربوطه، تا حدودی آن را با RSA مرتبط می‌دانند [43]. در مقابل، بررسی بیان ژن IL-21 در زنان دارای سقط مکرر خودبه‌خودی نشان می‌دهد که سطح بیان ژن این سایتوکاین در زنان سالم در مقایسه با بیماران تفاوت معنی‌داری ندارد [44]. در مطالعه حاضر، میزان IL-21 پس از درمان لنفوسیتی به‌طور معنی‌داری نسبت به قبل از درمان در سرم و مایع رویی کشت سلولی کاهش یافت که می‌تواند

- for women with recurrent spontaneous abortion. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(2):289-98.
- 24- Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2004;269(3):161-72.
- 25- Ito K, Tanaka T, Tsutsumi N, Obata F, Kashiwagi N. Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: Analysis of anti-idiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors. *Hum Reprod.* 1999;14(3):650-5.
- 26- Beydoun H, Saftlas AF. Association of human leucocyte antigen sharing with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2005;65(2):123-35.
- 27- Takeshita T. Diagnosis and treatment of recurrent miscarriage associated with immunologic disorders: Is paternal lymphocyte immunization a relic of the past?. *J Nippon Med Sch.* 2004;71(5):308-13.
- 28- Szpakowski A, Malinowski A, Głowacka E, Wilczyński JR, Kolasa D, Dyński M, et al. The influence of paternal lymphocyte immunization on the balance of Th1/Th2 type reactivity in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Ginekol Pol.* 2000;71(6):586-92. [Polish]
- 29- 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.
- 30- Zare A, Saremi A, Hajhashemi M, Kardar GA, Moazzeni SM, Pourpak Z, et al. Correlation between serum zinc levels and successful immunotherapy in recurrent spontaneous abortion patients. *J Hum Reprod Sci.* 2013;6(2):147-51.
- 31- Saini V, Arora S, Yadav A, Bhattacharjee J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clin Chim Acta.* 2011;412(9-10):702-8.
- 32- Gao L, Zhang JP, Chen H, Zhang SN, Chen LB, Tan JP, et al. Characteristics of immune cell changes before and after immunotherapy and their clinical significance in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Genet Mol Res.* 2014;13(1):1169-78.
- 33- Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, Tian Z, et al. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(3):E231-40.
- 34- Yokoo T, Takakuwa K, Ooki I, Kikuchi A, Tamura M, Tanaka K. Alteration of TH1 and TH2 cells by intracellular cytokine detection in patients with unexplained recurrent abortion before and after immunotherapy with the husband's mononuclear cells. *Fertil Steril.* 2006;85(5):1452-8.
- 35- Wang WJ, Hao CF, Qu QL, Wang X, Qiu LH, Lin QD. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2010;25(10):2591-6.
- 36- Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lü C, Lin Q. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril.* 2008;89(3):656-61.
- 37- Lee SK, Kim JY, Hur SE, Kim CJ, Na BJ, Lee M, et al. An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3+ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2011;26(11):2964-71.
- 38- Kim DJ, Lee SK, Kim JY, Na BJ, Hur SE, Lee M, et al. spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272(2):95-108.
- 5- Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Recurrent miscarriage: Causes, evaluation and management. *Postgrad Med J.* 2015;91(1073):151-62.
- 6- Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2012;27(8):2297-303.
- 7- Kwak-Kim J, Yang KM, Gilman-Sachs A. Recurrent pregnancy loss: A disease of inflammation and coagulation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35(4):609-22.
- 8- Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1221(1):80-7.
- 9- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a TH2 phenomenon?. *Immunol Today.* 1993;14(7):353-6.
- 10- Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss?. *Hum Reprod.* 2002;17(9):2439-44.
- 11- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):601-10.
- 12- Dong C. TH17 cells in development: An updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):337-48.
- 13- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008;28(4):454-67.
- 14- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
- 15- Heidt S, Segundo DS, Chadha R, Wood KJ. The impact of Th17 cells on transplant rejection and the induction of tolerance. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(4):456-61.
- 16- Hanidziar D, Koulmanda M. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(4):411-5.
- 17- Yoshida S, Haque A, Mizobuchi T, Iwata T, Chiyo M, Webb TJ, et al. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed lung transplants. *Am J Transplant.* 2006;6(4):724-35.
- 18- Corthay A. How do regulatory T cells work?. *Scand J Immunol.* 2009;70(4):326-36.
- 19- Nakashima A, Shima T, Inada K, Ito M, Saito S. The balance of the immune system between T cells and NK cells in miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(4):304-10.
- 20- Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64(1):4-11.
- 21- Lee SK, Kim JY, Lee M, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(4):311-8.
- 22- Fu B, Tian Z, Wei H. TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol.* 2014;11(6):564-70.
- 23- Pandey MK, Agrawal S. Induction of MLR-Bf and protection of fetal loss: A current double blind randomized trial of paternal lymphocyte immunization

- before and after lymphocyte immunotherapy. *Am J Reprod Immunol.* 2012;68(2):164-74.
- 42- Liu YS, Wu L, Tong XH, Wu LM, He GP, Zhou GX, et al. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2011;65(5):503-11.
- 43- Messaoudi S, Al-Khateeb GM, Dendana M, Sater MS, Jazia KB, Nouria M, et al. Genetic variations in the interleukin-21 gene and the risk of recurrent idiopathic spontaneous miscarriage. *Eur Cytokine Netw.* 2011;22(2):123-6.
- 44- Saifi B, Rezaee SA, Tajik N, Ahmadpour ME, Ashrafi M, Vakili R, et al. Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window. *Reprod Biomed Online.* 2014;29(4):481-9.
- Intravenous immunoglobulin G modulates peripheral blood Th17 and Foxp3(+) regulatory T cells in pregnant women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(5):441-50.
- 39- Bansal AS, Bajardeen B, Thum MY. The basis and value of currently used immunomodulatory therapies in recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol.* 2012;93(1):41-51.
- 40- Gharesi Fard B, Zolghadri J, Kamali Sarvestani E. Effect of leukocyte therapy on tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2008;59(3):242-50.
- 41- Liang P, Mo M, Li GG, Yin B, Cai J, Wu T, et al. Comprehensive analysis of peripheral blood lymphocytes in 76 women with recurrent miscarriage