

## Comparison of Cytokines Levels Released from Th17 and Regulatory T Cells in Patients with Recurrent Spontaneous Abortions and Healthy Women

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original research

#### Authors

Roumandeh N.<sup>1</sup> MSc,  
Saremi A.<sup>2</sup> MD,  
Sanaye Naderi M.<sup>3</sup> BSc,  
Younesi B.<sup>4</sup> BSc,  
Arasteh J.<sup>5</sup> PhD,  
Zare A.\* PhD

#### How to cite this article

Roumandeh N, Saremi A, Sanaye Naderi M, Younesi B, Arasteh J, Zare A. Comparison of Cytokines Levels Released from Th17 and Regulatory T Cells in Patients with Recurrent Spontaneous Abortions and Healthy Women. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2018;2(3):93-97.

\*"Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Cell Research Center (SCRC)" Sarem Women's Hospital" and "Asthma and Allergy Immunology Research Center, Tehran University of Medical Sciences", Tehran, Iran

<sup>1</sup>"Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran" and "Immunology Department, Medicine Faculty, Semnan University of Medical Sciences, Semnan", Iran

<sup>2</sup>"Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR)" and "Sarem Cell Research Center (SCRC)", Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

<sup>5</sup>Biology Department, Basic Sciences Faculty, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Sarem Women's Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111

Phone: +98 (21) 44670888

Fax: +98 (21) 44670432

zare-a@alumnus.tums.ac.ir

#### Article History

Received: February 9, 2017

Accepted: June 27, 2017

ePublished: August 15, 2018

### ABSTRACT

**Aims** Unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) might be caused by an immunological rejection of fetus due to the immune dysregulation during pregnancy. It is supposed that the balance between Th17 and regulatory T cells (Treg) is one of the immune system regulatory mechanisms for pregnancy. The objective of the present study was to evaluate the Treg and Th17 cytokines in the women with URSA compared to healthy women.

**Materials & Methods** This case-control study was carried out on 30 women with a history of three or more URSA (case group) and 28 normal healthy women with at least one successful delivery (control group) in Sarem women hospital (Tehran, Iran). The levels of IL-17, IL-21, IL-10 and TGF- $\beta$  were measured in the serum samples by ELISA method and compared between two groups. The data were analyzed by Mann-Whitney U test and Spearman's rank correlation coefficient using SPSS 22 software.

**Findings** The level of IL-17 in the case group was significantly higher than the control group ( $p < 0.001$ ). Also, the level of TGF- $\beta$  in the control group was significantly higher than URSA patients ( $p = 0.001$ ). The serum level of IL-17 showed a positive correlation with TGF- $\beta$  in URSA group ( $r = 0.554$ ;  $p = 0.002$ ). There were no significant differences in IL-21 and IL-10 levels between two groups ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion** The level of IL-17 in patients with URSA is higher than normal healthy women, however, the concentration of TGF- $\beta$  in women with URSA is lower than healthy women; these findings show that Th17 immunity and regulatory T cell-mediated immune regulation are involved in the pathogenesis of URSA.

**Keywords** Abortion, Habitual; Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion; Regulatory T Cell; Th17 Cells

### CITATION LINKS

[1] Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to ... [2] Decidual CD4+CD25+CD127dim/- regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous ... [3] An update in recurrent spontaneous ... [4] Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory ... [5] TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and ... [6] Proportional changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in maternal peripheral blood during pregnancy and labor atterm ... [7] Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of ... [8] Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in ... [9] The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent ... [10] Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion ... [11] An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3(+) regulatory T cells in women with idiopathic recurrent ... [12] Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: Implications for human ... [13] Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous ... [14] Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous ... [15] T cell tolerance towards the fetal ... [16] Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a ... [17] Variations in T-helper 17 and regulatory T cells during the menstrual cycle in peripheral blood of women with recurrent spontaneous ... [18] Cytokines in recurrent pregnancy ... [19] Th17 and regulatory T cells in women with recurrent ... [20] Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous ... [21] Changes of CD4+ CD25high regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion ... [22] Th17 cells and related cytokines in unexplained ... [23] Elevated serum level of IL-35 associated with the maintenance of maternal-fetal immune tolerance in normal ...

## بررسی سطح سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th17 و T تنظیمی در بیماران سقط مکرر خودبه‌خودی

نرگس رومنده MSc

"پژوهشکده سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران" و "گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران"

ابوطالب صارمی MD

"مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم" و "پژوهشکده سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم"، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران

مریم صنایع نادری BSc

مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران

بهنام یونسی BSc

بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران

جواد آراسته PhD

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

احد زارع\* PhD

"پژوهشکده تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم" و "مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران"، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** سقط مکرر خودبه‌خودی با علت ناشناخته (URSA) ممکن است به‌دنبال رد ایمونولوژیک جنین به‌علت اختلال در تنظیم سیستم ایمنی، طی بارداری رخ دهد. تعادل بین سلول‌های Th17 و Treg یکی از مکانیزم‌های تنظیم ایمنی بارداری محسوب می‌شود. هدف مطالعه حاضر، ارزیابی سطح سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th17 و T تنظیمی در بیماران دارای سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی با علت ناشناخته (URSA) در مقایسه با زنان سالم بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۳۰ بیمار زن با سابقه سه یا بیش از سه سقط مکرر با علت ناشناخته به‌عنوان گروه مورد و ۲۸ زن سالم دارای حداقل یک زایمان موفق به‌عنوان گروه کنترل در بیمارستان صارم شهر تهران بررسی شدند. سطوح سرمی IL-17، IL-21، IL-10، و TGF- $\beta$  به روش ELISA سنجیده شد و بین دو گروه مقایسه شد. داده‌ها با استفاده از آزمون من‌ویتنی و ضریب همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن در نرم‌افزار SPSS 22 تجزیه و تحلیل شدند. **یافته‌ها:** سطح IL-17 در گروه بیماران URSA به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل بالاتر بود ( $p < 0.001$ )، در حالی که سطح TGF- $\beta$  در گروه کنترل از بیماران دارای سابقه URSA بالاتر بود ( $p = 0.01$ ). در گروه مورد، غلظت سرمی IL-17 همبستگی مثبتی با غلظت سرمی TGF- $\beta$  نشان داد ( $r = 0.554$ ;  $p = 0.002$ ). میزان IL-10 و IL-21 بین دو گروه، تفاوت معنی‌داری نداشت.

**نتیجه‌گیری:** سطح IL-17 در زنان دارای سابقه URSA بالاتر از زنان سالم و سطح TGF- $\beta$  پایین‌تر از زنان سالم است که نشان می‌دهد ایمنی نوع Th17 و تنظیم ایمنی با واسطه سلول T تنظیمی، با پاتوژنز URSA ارتباط دارد.

**کلیدواژه‌ها:** سقط مکرر خودبه‌خودی با علت ناشناخته، Treg، Th17

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۷

\*نویسنده مسئول: zare-a@alumnus.tums.ac.ir

### مقدمه

بارداری موفق در نتیجه حفظ تحمل سیستم ایمنی مادر نسبت به جنین رخ می‌دهد. عدم تنظیم سیستم ایمنی مادر با مشکلات بارداری همراه بوده و به سقط منجر می‌شود[1]. شواهد نشان می‌دهند که سقط خودبه‌خودی مکرر (RSA) با پاسخ‌های التهابی و شکست تحمل ایمونولوژیک همراه است[2]. سه یا بیش از سه سقط مکرر پیش از هفته بیستم بارداری، سقط مکرر خودبه‌خودی گفته می‌شود. علت این عارضه در بسیاری از موارد ناشناخته است، اما فاکتورهای

متعددی در آن نقش دارند که می‌توان به ناهنجاری‌های ژنتیکی، اختلالات هورمونی، ناهنجاری جفت و رحم، عفونت و فاکتورهای ایمونولوژیک اشاره کرد[3]. در میان عوامل ایمونولوژیک، مکانیزم‌های متعدد تحمل محیطی در حفظ جنین دخیل هستند که از آن جمله می‌توان به حضور سلول‌های T تنظیمی (Treg) در بافت دسیدوا و خون محیطی، در دوران بارداری اشاره نمود[4]. از سوی دیگر، سلول‌های التهابی Th17 که سایتوکاین IL-17 را ترشح می‌کنند با رد آلوگرافت و حذف تولرانس همراه هستند. شواهد روبه‌رشدی وجود دارد که سلول‌های T تنظیمی و Th17 در برقراری و حفظ بارداری، به‌ترتیب به‌عنوان سلول‌های اجرایی و تنظیمی عمل می‌کنند و اختلال در تعداد و عملکرد آنها ممکن است منجر به شکست لانه‌گزینی و اختلالات بارداری شود[5].

طی بارداری، سلول‌های T تنظیمی به‌تدریج در سه‌ماهه اول و سه‌ماهه دوم افزایش و سپس در سه‌ماهه سوم بارداری و پس از زایمان کاهش می‌یابند[6]. در یک مطالعه اخیر نشان داده است که فعالیت مهاری سلول‌های T تنظیمی نیز در زنان باردار نرمال، به‌طور قابل توجهی در سه‌ماهه اول و دوم بارداری افزایش یافته، اما به‌طور قابل توجهی در سه‌ماهه سوم بارداری در مقایسه با زنان غیرباردار با کاهش همراه است[7]. همچنین، نسبت پایین‌تر سلول‌های Th17 به سلول‌های T تنظیمی و سطح پایین‌تر سلول Th17 طی بارداری نسبت به زنان غیرباردار، گزارش شده است[8]. یافته‌های متناقضی نیز پیرامون تعداد سلول‌های Th17 در خون محیطی طی بارداری وجود دارد، در حالی که سطح سرمی IL-17 به‌میزان قابل توجهی در زنان دارای سابقه RSA بالا است[9، 10]. مطالعات متعددی کاهش سلول‌های T تنظیمی در خون محیطی یا دسیدوای زنان با RSA را نشان داده‌اند[10-14].

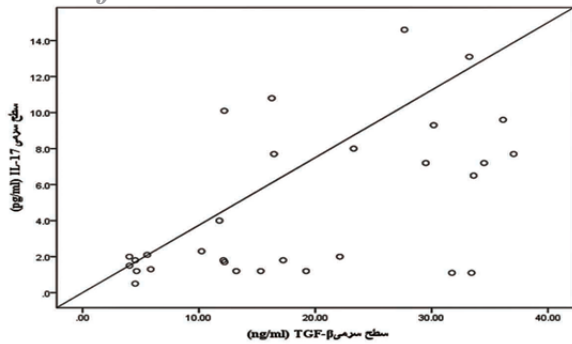
سلول‌های Th17 ارتباط نزدیکی با سلول‌های Treg دارند و براساس یافته‌ها، میزان سلول‌های Treg به‌طور منفی با میزان سلول‌های Th17 و سطح سرمی IL-17 به‌طور مثبت با سلول‌های Th17 نسبت سلول‌های Th17 به Treg، مرتبط است[14]. بنابراین، سلول‌های T تنظیمی بیان IL-17 را مهار می‌کنند و عملکرد مهاری سلول‌های Treg روی سلول‌های Th17 ممکن است در زنان با سقط مکرر خودبه‌خودی، کاهش یابد.

علاوه بر این، مشاهده شده که سایتوکاین‌های ترشح شده از Th17 موجب رد آلوگرافت در دوران بارداری می‌شوند، در حالی که سایتوکاین‌های مترشحه از Treg در حفظ تولرانس به جنین دخیل هستند و ممکن است در بهبود نتیجه بارداری موثر باشند[14، 15]. در پژوهشی میان رد جنین و کاهش فراوانی سلول‌های Treg ارتباط مشاهده شده است[16]. همچنین عدم تعادل سلول‌های Th17 به Treg در URSA دخیل است[17]. با توجه به نقش تعادل سایتوکاینی در کنترل پاسخ ایمنی مادر نسبت به آنتی‌ژن‌های جنین طی بارداری، بررسی سایتوکاین‌های دخیل در این فرآیند حایز اهمیت است.

هدف مطالعه حاضر، ارزیابی سطح سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th17 و T تنظیمی در بیماران با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی با علت ناشناخته (URSA) در مقایسه با زنان سالم بود.

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به‌صورت یک پژوهش مورد-شاهدی، روی دو گروه از مراجعه‌کنندگان به بیمارستان صارم شهر تهران انجام گرفت. گروه مورد ۳۰ بیمار با سابقه سه یا بیش از سه سقط مکرر خودبه‌خودی بود. بیماران پس از بررسی وضعیت کاربوتایپ، آنتی‌بادی آنتی‌فسفولیپید، آنتی‌کاردیولیپین، ANA، آنتی‌بادی آنتی‌تیروئید، عفونت‌های



نمودار ۱) همبستگی سطح سرمی IL-17 و TGF-β در بیماران دارای سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی با علت ناشناخته (۳۰ نفر) در بیمارستان صارم شهر تهران

### بحث

در پژوهش حاضر، به‌منظور بررسی میزان فعالیت سلول‌های Th17، سایتوکاین‌های IL-17 و IL-21 و سلول‌های Treg، سایتوکاین‌های IL-10 و TGF-β در سرم بیماران URSA و زنان سالم ارزیابی شد. سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های ایمنی مادری و جنینی در تولرانس سیستم ایمنی مادر علیه جنین نیمه‌آلوژنیک طی بارداری دخیل هستند [18]. عملکرد سلول‌های اجرایی نظیر Th17 توسط سلول‌های Treg تنظیم می‌شود و تعادل میان سلول‌های اجرایی و سلول‌های Treg در حفظ بارداری و لانه‌گزینی نقش بسزایی دارد [19]. مطالعات اخیر میزان بالایی از سلول‌های Th17 را در خون محیطی و دسیدوای زنان URSA در مقایسه با زنان سالم گزارش کرده‌اند [10، 14]. بنابراین، پاسخ ایمنی التهابی با واسطه سلول‌های Th17 با سقط مکرر خودبه‌خودی در ارتباط است.

بسیاری از محققان بر این باور بوده‌اند که تعادل میان سلول‌های Th1 و Th2، مکانیزم ایمنولوژیک کلیدی در تنظیم ایمنی سلول T، به‌ویژه طی دوره بارداری است. به‌دنبال شناسایی سلول‌های T تنظیمی، مکانیزم تنظیم ایمنی موضوع اصلی تحقیقات ایمنولوژیک شده و شناسایی سلول‌های Th17، توجه ما را به یک سلول اجرایی ایمنی، معطوف کرده است. تعادل بین سلول‌های Th17 و Treg در پاتوفیزیولوژی شکست بارداری، نقش بسزایی دارد و عدم تعادل بین آنها ممکن است منجر به شکست لانه‌گزینی و اختلالات بارداری شود [9، 10]. براساس مطالعه ونگ و همکاران، سلول‌های Th17 در خون محیطی و دسیدوای زنان URSA افزایش می‌یابد که با تعداد سلول‌های Treg رابطه عکس دارند [9]. میزان IL-17 که توسط سلول‌های Th17 ترشح می‌شود نیز در سرم این بیماران در مقایسه با زنان سالم به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین، در خون محیطی بیماران RSA سطح پایینی از سلول‌های T تنظیمی مشاهده شده که به‌طور قابل توجهی با افزایش سلول‌های Th17 همراه است، علاوه بر این، توانایی سلول‌های Treg این بیماران در مهار سلول‌های Th17 کاهش یافته است [20، 9].

برخی مطالعات نیز بر تغییر نسبت سلول‌های Th17/Treg تمرکز کرده و بیانگر عملکرد سلول‌های Th17 در مقابل حفظ تولرانس مادری و در نتیجه رد جنین هستند [14]. افزون بر این، یافته‌ها نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های T تنظیمی در بارداری نرمال در مقایسه با بیماران دارای سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی بالاتر است که در حفظ تولرانس بارداری اهمیت دارد [21]. یافته‌های جدید تغییر در نسبت سلول‌های اجرایی ایمنی Th1/Th2/Th17 و Treg را در زنان RSA گزارش کرده‌اند که الگوی Th1/Th2 را به سمت Th17/Treg سوق

میکروبی (CMV، EBV، HIV، HBV، TORCH)، ناهنجاری‌های آناتومیک و اختلالات هورمونی وارد مطالعه شدند. افراد گروه کنترل ۲۸ زن سالم بدون سابقه سقط و دارای حداقل یک فرزند زنده بودند. پیش از نمونه‌گیری، فرم رضایت آگاهانه مصوب کمیته اخلاق بیمارستان صارم، توسط هر یک از بیماران داوطلب تکمیل شد.

از هر یک از افراد دو گروه، ۲ سی‌سی خون گرفته شد و نمونه‌های سرم تا زمان جمع‌آوری کامل نمونه‌ها، در فریزر ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌منظور سنجش سطح سایتوکاین‌های سلول‌های Th17 شامل IL-17 و IL-21 و سایتوکاین‌های Treg شامل IL-10 و TGF-β در نمونه‌های سرم از تکنیک ELISA با کیت‌های مربوطه استفاده شد (eBioscience، ایالات متحده). اندازه‌گیری غلظت سایتوکاین‌ها در نمونه‌های بیماران مطابق دستورالعمل کیت، به‌صورت دوتایی انجام شد. حساسیت کیت اندازه‌گیری برای سایتوکاین‌های IL-17 و IL-21 به ترتیب ۸ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و ۰/۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، سایتوکاین‌های IL-10 و TGF-β به ترتیب ۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و ۱۵۶/۳ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود.

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 22 استفاده شد. توزیع نرمال داده‌ها به‌کمک آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. به‌منظور بررسی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مطالعه‌شده و با توجه به توزیع غیرنرمال داده‌های IL-10، IL-17، IL-21 و TGF-β در سرم بیماران و گروه کنترل، از آزمون ناپارامتریک من‌ویتنی استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین غلظت سرمی IL-17 با غلظت TGF-β در سرم بیماران از ضریب همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن استفاده شد.

### یافته‌ها

میانگین سنی در گروه بیماران ۳۱/۰۳±۵/۳۲ سال و در گروه کنترل ۳۳/۷۱±۵/۰۵۴ سال بود. غلظت سایتوکاین‌های IL-17 در نمونه سرم بیماران دارای سابقه URSA در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ( $p < 0/001$ ). همچنین سطح سرمی TGF-β در گروه بیماران به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، کمتر بود ( $p = 0/001$ ). سطح IL-10 و IL-21 در سرم بیماران در مقایسه با زنان سالم تفاوت معنی‌داری نشان نداد (به ترتیب  $p = 0/08$  و  $p = 0/02$ )؛ (جدول ۱).

جدول ۱) میانگین آماری (حداکثر- حداقل) غلظت سرمی سایتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های Th17 و T تنظیمی در بیماران دارای سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی با علت ناشناخته (۳۰ نفر) و زنان سالم (۲۸ نفر) در بیمارستان صارم شهر تهران

سایتوکاین	میزان غلظت سرمی	سطح معنی‌داری
IL-17 (pg/ml)		
گروه بیماران URSA	۲/۰۵ (۱/۲۷-۷/۷۷)	* < 0/001
گروه کنترل	۰/۴۰ (۰/۰۰-۰/۹۷)	
IL-21 (pg/ml)		
گروه بیماران URSA	۸/۱۵ (۵/۵-۱۷/۸۷)	* 0/08
گروه کنترل	۲/۷۹ (۰/۰۰-۱۳/۵۰)	
IL-10 (pg/ml)		
گروه بیماران URSA	۳/۹۰ (۲/۳۷-۶/۶۵)	* 0/02
گروه کنترل	۴/۸۵ (۳/۸۷-۶/۰۱)	
TGF-β (ng/ml)		
گروه بیماران URSA	۱۶/۳۵ (۹/۱۳-۳۰/۵۷)	* < 0/001
گروه کنترل	۲۶/۴۱ (۲۰/۲۴-۴۲/۳۰)	

به‌علاوه، در گروه بیماران، غلظت سرمی IL-17 دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری با غلظت TGF-β در سرم بیماران بود ( $r = 0/554$ )؛ ( $p = 0/002$ )؛ (نمودار ۱).

## نتیجه گیری

سطح IL-17 در زنان دارای سابقه URSA بالاتر از زنان سالم و سطح TGF- $\beta$  پایین تر از زنان سالم است که نشان می دهد ایمنی نوع Th17 و تنظیم ایمنی با واسطه سلول T تنظیمی، با پاتوژن URSA ارتباط دارد.

**تشکر و قدردانی:** از همکاران آزمایشگاه جنرال بیمارستان فوق تخصصی صارم کمال تشکر و قدردانی را داریم.

**تأییدیه اخلاقی:** فرم رضایت آگاهانه مصوب کمیته اخلاق بیمارستان صارم، توسط هر یک از بیماران داوطلب تکمیل شد.

**تعارض منافع:** تعارض منافی وجود ندارد.

**منابع مالی:** مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم و پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول های بنیادی صارم منابع مالی این پژوهش را تامین کرده است.

**سهم نویسندگان:** نرگس رومنده (نویسنده اول)، نگارنده مقاله / پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۲۰٪)؛ ابوطالب صارمی (نویسنده دوم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۲۵٪)؛ مریم صنایع نادری (نویسنده سوم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ بهنام یونسی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ جواد آراسته (نویسنده پنجم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر کمکی / تحلیل گر آماری / نگارنده بحث (۱۰٪)؛ احد زارع (نویسنده ششم)، نگارنده مقاله / روش شناس / پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۲۵٪)

## منابع

- 1- Tripathi S, Guleria I. Role of PD1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. *Biomed J.* 2015;38(1):25-31.
- 2- Bao SH, Wang XP, De Lin Q, Wang WJ, Yin GJ, Qiu LH. Decidual CD4+CD25+CD127dim/- regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;155(1):94-8.
- 3- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272(2):95-108.
- 4- Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunol.* 2004;112(1):38-43.
- 5- Fu B, Tian Z, Wei H. TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol.* 2014;11(6):564-70.
- 6- Xiong H, Zhou C, Qi G. Proportional changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in maternal peripheral blood during pregnancy and labor atterm and preterm. *Clin Invest Med Med.* 2010;33(6):E422.
- 7- Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toermer A, Meuer S, et al. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia?. *Clin Immunol.* 2008;129(3):401-12.
- 8- Santner Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 2009;183(11):7023-30.
- 9- Wang WJ, Hao CF, Qu QL, Wang X, Qiu LH, Lin QD. The

می دهد و افزایش قابل توجه نسبت سلول های Th17 به سلول های Treg در خون محیطی بیماران RSA در مقایسه با گروه کنترل را نشان داده اند [11]. براساس مطالعات پیشین، سلول های Th17 و Treg به عنوان دو زیرگروه از لنفوسیت های Th با عملکرد متضاد در بارداری نرمال، به ترتیب در ایجاد پاسخ های التهابی و ممانعت از ایجاد پاسخ سیستم ایمنی مادر علیه جنین نقش دارند و کاهش تعداد سلول های Treg در مقابل افزایش سلول های Th17 در بیماران RSA نیز آن را تأیید می کند. به علاوه، سلول های Treg در بارداری نرمال می توانند تولید IL-17 توسط سلول های Th17 را کاهش دهند، در حالی که سطح IL-17 در خون محیطی بیماران RSA افزایش نشان می دهد. بنابراین سلول های Treg در حفظ تولرانس بارداری اهمیت بسزایی دارند و کاهش عملکرد مهاری و تعداد این سلول ها ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز سقط مکرر ایفا کند [9].

یکی از راه های تعیین میزان فعالیت سلول های Th از جمله Th17 و Treg، سنجش سایتوکاین های مترشحه از این سلول ها است. سایتوکاین ها به عنوان پلی پپتیدهای دخیل در کنترل موضعی و سیستمیک پاسخ ایمنی و التهابی نقش دارند که عمدتاً توسط سلول های سیستم ایمنی تولید و ترشح می شوند [18].

نتایج پژوهش حاضر بیانگر سطح بالای IL-17 در سرم بیماران URSA در مقایسه با گروه کنترل بود، اما سطح سرمی IL-21 در دو گروه تفاوت معنی داری نداشت. در بررسی سرشکی و همکاران نیز مشخص شد که سطح IL-17 در بیماران با این عارضه در مقایسه با گروه کنترل بالاتر است [17]. در مطالعه ای مشابه، بیان ژن IL-17 و IL-21 بررسی شد که براساس آن، بیان ژن IL-17 در بیماران URSA سطح افزایش یافته ای نسبت به زنان باردار نرمال داشت، در حالی که میزان بیان ژن IL-21 در این بیماران از نظر آماری اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشت [22].

از سوی دیگر، سطح TGF- $\beta$  به عنوان سایتوکاین مترشحه از سلول های Treg، در سرم بیماران نسبت به گروه کنترل سطح پایین تری نشان داد که این یافته نقش سلول Treg در حفظ تولرانس بارداری را نشان می دهد. در مطالعه حاضر، برخلاف اغلب مطالعات پیشین، کاهش معنی داری در سطح سرمی IL-10 بیماران در مقایسه با زنان سالم مشاهده نشد. با این وجود، این یافته ها با مطالعه یو و همکاران همسو است که عدم تفاوت قابل توجه سطح IL-10 در سرم بیماران URSA در مقایسه با زنان سالم را گزارش کرده اند [23]. بنابراین طی بارداری، الگوی سایتوکاینی Th17 ممکن است به آنتی ژن های جنینی و شکست تولرانس حاملگی منجر شود و در مقابل، افزایش TGF- $\beta$  می تواند عاملی موثر در حفظ این تولرانس و موفقیت بارداری محسوب شود.

در پژوهش حاضر غلظت سرمی IL-17 در بیماران URSA، همبستگی مثبت و معنی داری با غلظت TGF- $\beta$  در سرم این بیماران داشت. در بررسی لی و همکاران نیز مشخص شده است که سلول های T<sup>+</sup>IL-17 در زنان URSA نسبت به زنان دارای بارداری نرمال افزایش یافته است و همبستگی مثبتی میان نسبت سلول Th17/Treg با سایتوکاین های نوع Th1 وجود داشت [11].

براساس نتایج این مطالعه و با توجه به نقش پیش التهابی سایتوکاین های نوع Th17 و نقش تنظیمی TGF- $\beta$ ، می توان از این سایتوکاین ها به عنوان فاکتوری برای بررسی و یا حتی پیش بینی موفقیت یا عدم موفقیت بارداری در بیماران URSA استفاده کرد که اهمیت برقراری تعادل Th17/Treg را بیش از پیش مشخص می کند.

- in newly pregnant women with a history of failure. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66(4):320-8.
- 17- Sereshki N, Gharagozloo M, Ostadi V, Ghahiri A, Roghaei MA, Mehrabian F, et al. Variations in T-helper 17 and regulatory T cells during the menstrual cycle in peripheral blood of women with recurrent spontaneous abortion. *Int J Fertil Steril.* 2014;8(1):59-66.
- 18- Saini V, Arora S, Yadav A, Bhattacharjee J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Int J Clin Chemist.* 2011;412(9-10):702-8.
- 19- 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.
- 20- Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lu 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.
- 21- Mei S, Tan J, Chen H, Chen Y, Zhang J. Changes of CD4+ CD25<sup>high</sup> regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2244-7.
- 22- 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.
- 23- Yue CY, Zhang B, Ying CM. Elevated serum level of IL-35 associated with the maintenance of maternal-fetal immune tolerance in normal pregnancy. *Plos One.* 2015;10(6):e0128219.
- 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.
- 10- 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.
- 11- 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.
- 12- Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: Implications for human reproduction. *J Immunol.* 2007;178(4):2572-8.
- 13- Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(5):347-53.
- 14- 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.
- 15- Piccinni MP. T cell tolerance towards the fetal allograft. *J Reprod Immunol.* 2010;85(1):71-5.
- 16- Winger EE, Reed JL. Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk