

Udział limfocytów Th17 w mechanizmach immunologicznych poronienia samoistnego

The role of Th17 lymphocytes in immunologic mechanisms of spontaneous abortion

© GinPolMedProject 2 (32) 2014

Artykuł oryginalny/Original article

ANITA OLEJEK¹, IWONA GABRIEL¹, BOGDAN MAZUR²

¹ Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej w Bytomiu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Anita Olejek

² Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii w Zabrze, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wojciech Król

Adres do korespondencji/Address for correspondence:

Iwona Gabriel

Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej w Bytomiu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. S. Batorego 15, Bytom

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count	813/969
Tabele/Tables	2
Ryciny/Figures	1
Piśmiennictwo/References	14

Received: 14.05.2014

Accepted: 16.06.2014

Published: 20.06.2014

Streszczenie

Wstęp. Limfocyty T pomocnicze CD4+ można funkcjonalnie podzielić na limfocyty Th1, Th2, Treg i limfocyty Th17. Limfocyty Th17 są jedną z subpopulacji limfocytów T, które wydzielają IL-17, IL0-17F, IL-21 i IL-22. W ostatnim czasie zaproponowano nowe, uzupełnione trendy w rozumieniu podstaw immunologicznych poronienia, w których dowiedziono, że u pacjentek z nawracającymi poronieniami obserwuje się podwyższoną liczbę limfocytów Th17 we krwi obwodowej i doczesnej w porównaniu do kobiet z fizjologiczną ciążą.

Cel pracy. Celem badania była ocena odsetkowego udziału limfocytów Th17 w poronieniu pierwszego trymestru ciąży wśród kobiet z aglomeracji śląskiej.

Materiał i metoda. Badaniem objęto 52. kobiety z poronieniem w I trymestrze ciąży. Pobrane próbki krwi poddano analizie fluorocytometrycznej w Laboratorium Cytometrii Przepływowej, SPSK1 w Zabrze. Wszystkie pobrane próbki krwi były przedmiotem analizy cytometrycznej. *Wyniki.* U kobiet z poronieniem w I trymestrze ciąży stwierdzono: średni odsetek limfocytów T - 27,19%, średni odsetek limfocytów T CD4+ - 10,52% i średni odsetek limfocytów T wydzielających IL-17 - 2,69%.

Wnioski. Badania własne sugerują, że limfocyty T CD4+ pomocnicze produkujące IL-17 mogą być aktywowane w czasie poronienia samoistnego. Badanie jest pierwszym na obszarze aglomeracji śląskiej oceniającym mobilizację limfocytów Th 17 w czasie poronienia samoistnego.

Słowa kluczowe: poronienie; limfocyty Th17; I trymestr

Summary

Introduction. CD4+ T helper lymphocytes may be divided functionally into Th1, Th2, Treg and Th17 lymphocytes. The latter type is a subpopulation of T lymphocytes producing IL-17, IL0-17F, IL-21 and IL-22. Recently, new supplemented trends have been suggested for the understanding of the immunologic basis of miscarriage, where it was demonstrated that patients with recurrent miscarriages displayed an elevated number of Th17 lymphocytes in circulating blood and decidua as compared to women with physiological pregnancy.

Aim of the study. The aim of the study was an assessment of the percentage share of Th17 lymphocytes in inducing miscarriage in the first trimester of pregnancy among women in the Silesian urban agglomeration.

Material and methods. The study covered 52 women with miscarriage in the first trimester of pregnancy. The collected blood samples were subjected to fluorocytometric analysis at the Laboratory of Flow Cytometry of the Independent Public Clinical Hospital No.1 in Zabrze (Poland). All the collected blood samples underwent cytometric analysis.

Results. In women with miscarriage in the first trimester of gestation the mean rate of T lymphocytes was 27.19%, the mean rate of CD4+ T lymphocytes was 10.52%, and the mean rate of IL-17-producing T lymphocytes was 2.69%.

Conclusions. The authors' own study suggests that CD4+ T helper lymphocytes producing IL-17 may be activated during spontaneous miscarriage. The study was the first one conducted in the Silesian urban agglomeration that assessed the mobilization of Th17 lymphocytes in the course of spontaneous miscarriage.

Key words: miscarriage, Th17 lymphocytes, first trimester

WSTĘP

Ostatnie badania pozwalają poznać mechanizmy komórkowe - limfocyty Th2 i limfocyty Treg promujące zdolność do prokreacji, jak również działające antagonistycznie limfocyty Th1 i Th17. Zmniejszenie aktywacji immunologicznej i działania promujące przyjęcie immunologicznie odrębnego zarodka/płodu mogą prowadzić do utrzymania ciąży do porodu i pozwolić na urodzenie zdrowego dziecka.

Limfocyty T pomocnicze CD4+ można funkcjonalnie podzielić na limfocyty Th1, Th2, Treg i limfocyty Th17. Działanie limfocytów Th1 i Th2 jest regulowane przez limfocyty Treg poprzez TGF β i IL-10 oraz FoxP3. Limfocyty Th17 są jedną z subpopulacji limfocytów T, które wydzielają IL-17, IL0-17F, IL-21 i IL-22 [1]. Interleukina-4 może ograniczyć tworzenie się limfocytów Th17, a przeciwnie IFN α jest istotny w promowaniu produkcji limfocytów Th17 [2,3]. Chaout i wsp. [4] i Kwak-Kim i wsp. [5] udowodnili, że dla uzyskania żywej ciąży konieczna jest zmiana immunologiczna w kierunku limfocytów Th2 z ograniczeniem funkcji limfocytów Th1.

W ostatnim czasie zaproponowano nowe, uzupełnione trendy w rozumieniu podstaw immunologicznych poronienia.

Badania dowiodły, że u pacjentek z nawracającymi poronieniami obserwuje się podwyższoną liczbę limfocytów Th17 we krwi obwodowej i doczesnej w porównaniu do kobiet z fizjologiczną ciążą [6]. Dodatkowo stwierdzono u pacjentek z nawracającymi poronieniami odwrócony stosunek pomiędzy limfocytami Th17 i Treg we krwi obwodowej i doczesnej. Wydaje się, że odsetek limfocytów Th17 nie ulega zwiększeniu w czasie ciąży pomiędzy pierwszym a trzecim trymestrem [7], ale obserwuje się większą liczbę tych limfocytów w pierwszym trymestrze w doczesnej niż we krwi obwodowej.

Wydaje się prawdopodobne, że zapalenie endometrium o różnorodnym podłożu może wytworzyć autokrynne koło, które powoduje wytworzenie limfocytów Th17. W przypadku wstępowania podwyższonych poziomów TGF β , zwiększenie lokalnego stężenia IL6 może powodować przekształcenie naiwnych komórek T w limfocyty Th17 [8]. Wydaje się prawdopodobnym,

INTRODUCTION

Recent research has opened up possibilities to investigate cell mechanisms, such as the activity of Th2 and Treg lymphocytes in promoting procreative ability, and the antagonistic action of Th1 and Th17 lymphocytes. Reduced immune activation and promoting the acceptance of an immunologically distinct embryo/fetus may contribute to maintaining pregnancy until full-term delivery of a healthy child.

CD4+ T helper lymphocytes may be divided functionally into Th1, Th2, Treg and Th17 lymphocytes. The action of Th1 and Th2 lymphocytes is regulated by Treg lymphocytes by means of TGF β , IL-10 and FoxP3. Th17 lymphocytes are a subpopulation of T lymphocytes, producing IL-17, IL0-17F, IL-21 and IL-22 [1]. Interleukin 4 may restrict the production of Th17 lymphocytes while IFN α - on the opposite - is vital for promoting their production [2,3]. Chaout et al. [4] and Kwak-Kim et al. [5] demonstrated that live pregnancy requires an immune change towards Th2 lymphocytes, with the function of Th1 lymphocytes being limited.

Recently, new supplemented trends have been suggested for the understanding of immunologic basis of miscarriage.

Research demonstrated that patients with recurrent miscarriages displayed an elevated number of Th17 lymphocytes in circulating blood and decidua as compared to women with physiological pregnancy [6]. Additionally, in patients with recurrent miscarriages an inverse relationship between Th17 and Treg lymphocytes in circulating blood and decidua was discovered. The rate of Th17 lymphocytes appears not to increase between the first and the third trimester of pregnancy [7] but a higher number of those lymphocytes is found in the first trimester in the decidua than in the circulating blood.

It appears probable that endometritis of diverse etiology may create an autocrine loop, resulting in the production of Th17 lymphocytes. With elevated levels of TGF β , a local increase of IL6 level may cause naive T cells to transform into Th17 lymphocytes [8]. It seems probable that reduced activity of Treg lymphocytes and increased activity of Th17 and Th1 lymphocytes has a harmful effect on a fertilized egg cell and embryo.

że obniżona aktywność limfocytów Treg, zwiększona aktywność limfocytów Th17 i Th1 działa szkodliwie na zapłodnioną komórkę jajową i zarodek. W związku z tym interwencje zmierzające do znormalizowania tych nieprawidłowości może zmniejszyć odestek poronień. Usunięcie klinicznych infekcji endometrium jest istotne w świetle powyższych doniesień, natomiast niepewne jest czy stosowanie antybiotykoterapii ma znaczenie w przypadku subklinicznych infekcji. Antybiotykiem z wyboru wydaje się stosowanie makrolidu, który ma właściwości przeciwwzapalne i powinien zostać użyty przed następną ciążą.

CEL PRACY

Celem badania jest pogłębienie wiedzy odnośnie roli limfocytów Th17 w poronieniu pierwszego trymestru wśród kobiet aglomeracji śląskiej.

MATERIAŁ I METODY

U kobiet przyjętych do Katedry i Oddziału Klinicznego Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Bytomiu, u których stwierdzono objawy poronienia samoistnego uzyskano pisemną zgodę na przeprowadzenie badania i pobrano 5ml krwi obwodowej. Nie później niż 6. godzin od pobrania, próbki krwi poddano analizie fluorocytometrycznej w Laboratorium Cytometrii Przepływowej, SPSK1 w Zabrze. Wszystkie pobrane próbki krwi były przedmiotem analizy cytometrycznej, ale ze względu na skomplikowany proces obróbki próbek, ostatecznej analizie poddano 52 próbki.

Otrzymane dane zebrano w bazie Excel (Microsoft Office 2010). Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o program SAS Statistics (Carry, US). Za wyniki statystycznie uznano $p < 0,05$.

WYNIKI

52 próbki krwi kobiet z objawami poronienia samoistnego poddano analizie. Dane demograficzne oraz liczbę limfocytów przedstawiono w tabeli 1.

Therefore, interventions aimed at normalizing the anomalies may reduce the rate of miscarriages. In the light of the above findings, elimination of clinical endometrial infections is important, it is not clear, however, whether antibiotic therapy is significant in the case of subclinical infections. The antibiotic of choice appears to be a macrolide with antiinflammatory properties, which should be administered before the next pregnancy.

AIM OF THE STUDY

The aim of the study was to achieve deeper understanding of the role played by Th17 lymphocytes in inducing miscarriage in the first trimester of gestation among women in the Silesian urban agglomeration.

MATERIAL AND METHODS

The study included women admitted to the Faculty and Clinical Department of Gynaecology, Obstetrics and Oncological Gynaecology of the Silesian Medical University in Bytom (Poland) who displayed symptoms of spontaneous miscarriage, and who expressed their written consent to participate in the study. From each patient, a 5 ml sample of circulating blood was collected. Not later than 6 hours after the collection, the samples were subjected to fluorocytometric analysis at the Laboratory of Flow Cytometry of the Independent Public Clinical Hospital No.1 in Zabrze (Poland). All the samples were subjected to cytometric analysis but, due to their complicated processing, in the final analysis 52 samples were included.

The data were collected in Excel database (Microsoft Office 2010). For the statistical analysis, SAS Statistics (Carry US) software was applied. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

52 blood samples from women with symptoms of spontaneous miscarriage were analysed. Table 1 presents demographic data and lymphocyte count.

Tab. 1. Dane demograficzne, liczba limfocytów we krwi pępowinowej kobiet z poronieniem samoistnym w pierwszym trymestrze ciąży

	Średnia	Odchylenie standardowe	Mediana	Dolny kwartył	Górny kwartył
Limfocyty (%)	27.19	12.20	23.81	17.80	36.04
CD3 (%)	69.60	11.03	70.51	64.28	76.61
Wiek	29.12	6.20	28.50	26.00	33.00
Waga (kg)	61.88	10.73	62.00	54.50	68.00
Wzrost (cm)	166.25	5.58	167.00	164.00	170.00

Tab. 1. Demographic data, lymphocyte count in umbilical blood of women with spontaneous miscarriage in the first trimester of gestation

	Mean	Standard deviation	Median	Lower quartile	Upper quartile
Lymphocytes (%)	27.19	12.20	23.81	17.80	36.04
CD3 (%)	69.60	11.03	70.51	64.28	76.61
Age	29.12	6.20	28.50	26.00	33.00
Body weight (kg)	61.88	10.73	62.00	54.50	68.00
Height (cm)	166.25	5.58	167.00	164.00	170.00

W grupie badanej średni odsetek limfocytów T wynosił 27,19%, 10,52% limfocytów T CD4+ i 2,69% limfocytów T wydzielających IL-17. Przy użyciu testu Kruskala-Wallisa wykazano, że rozkład limfocytów T CD4+ i limfocytów T produkujących IL-17 jest normalny. Zaobserwowano zależność wieku od liczby limfocytów T wydzielających IL-17 u kobiet z poronieniami samoistnymi (tab.2).

Starsze kobiety mają niższy odsetek limfocytów T CD4+ wydzielających IL-17, jednak liczba limfocytów nie była związana z wiekiem ciążowym, w którym

In the study group, the mean percentage share of T lymphocytes was 27.19%, of CD4+ T lymphocytes - 10.52%, and of IL-17-producing T lymphocytes - 2.69%. The Kruskal-Wallis test indicated that the distribution of CD4+ T lymphocytes and IL-17-producing T lymphocytes was normal. A correlation was discovered between the age of women with spontaneous miscarriage and the level of IL-17-producing T lymphocytes (Table 2).

Older women displayed a lower share of CD4+ T lymphocytes producing IL-17 but the lymphocyte count

Tab. 2. Zależność liczby limfocytów T wydzielających IL-17 od wieku pacjentek

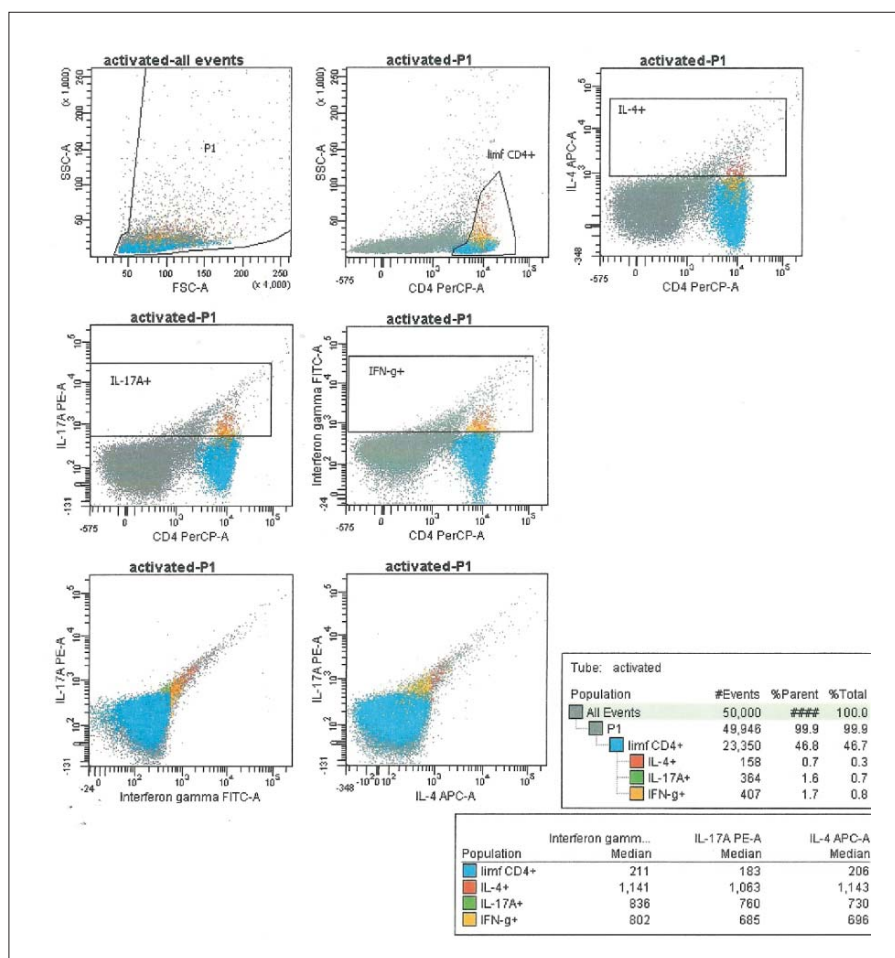
•ródło	St. sw.	Suma kwadratów	Średnia kwadratów	Wartość F	Pr. > F
Model	2	421.495979	210.747990	6.72	0.0026
Błąd	50	1537.811713	31.383913		
Razem skorygowane	52	1959.307692			

Tab. 2. Correlation between the number of IL-17-producing T lymphocytes and the patients' age

Source	St. sw.	Sum of squares	Mean squares	F value	Pr. > F
Model	2	421.495979	210.747990	6.72	0.0026
Error	50	1537.811713	31.383913		
Total corrected	52	1959.307692			

Ryc. 1. Wyniki cytometrii przepływowej krwi obwodowej pacjentki z poronieniem samoistnym wyodrębniające subpopulacje limfocytów T

Fig. 1. Results of flow cytometry of circulating blood of a patient with spontaneous miscarriage; with subpopulations of T lymphocytes



nastąpiło poronienie ($p > 0,05$). Rycina 1. przedstawia wyniki badania cytometrycznego od losowo wybranej pacjentki z poronieniem samoistnym z wyodrębnieniem limfocytów T (zielona populacja obrazuje limfocyty T CD4+ wydzielające IL-17).

DYSKUSJA

W badanej grupie, liczba limfocytów T CD4+ produkujących IL-17 (Th17) była nieznacznie wyższa w porównaniu do najnowszego opublikowanego badania z Iranu [10]. W omawianym badaniu odsetek limfocytów Th17 wynosił $1,8 \pm 1,4\%$, a w badaniach własnych $2,7 \pm 1,15\%$. Jednak, wyniki irańskiego badania, podobnie jak inne, nie były wykonywane w czasie poronienia, a jedynie u pacjentek z wywiadem poronienia samoistnego [11]. Biorąc pod uwagę powyższe, prezentowany wynik badania własnego pozwala na uchwycenie właściwej liczby różnych populacji limfocytów T CD4+. Niespodziewanie liczba limfocytów T okazała się zależeć od wieku pacjentek w badaniu.

Złożone zależności pomiędzy mechanizmami immunologicznymi matki i płodu zmieniają się z wiekiem ciąży [12,13]. Homeostaza układu immunologicznego wymaga ścisłych mechanizmów kontrolujących równowagę w zakresie pro- i przeciwzapalnych subpopulacji limfocytów T. Ta delikatna równowaga w momencie zachwiania może prowadzić do utraty ciąży. Wczesniejsze badania dowiodły, że obniżona liczba komórek Treg, przy zwiększeniu udziału limfocytów Th17 i ich deregulacja prowadzi do występowania nawracających poronień [6].

Komórki Th17 opisano, jako limfocyty T pomocniczne (CD4+), które odgrywają znaczną rolę w indukcji zapalenia przez wytwarzanie cytokin zapalnych m.in. IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-6, TNF- α i metaloproteinazy. Ostatnie badania dowiodły znaczenia tych komórek w chorobach z autoagresji, odrzucaniu przeszczepu i innych chorobach [14].

WNIOSKI

Badania własne sugerują, że limfocyty T CD4+ pomocnicze produkujące IL-17 mogą być aktywowane w czasie poronienia samoistnego. Badanie jest pierwszym w Polsce w zakresie roli limfocytów Th17 w poronieniu samoistnym.

was not related to the gestational age at which miscarriage occurred ($p > 0,05$). Fig.1 presents the results of a cytometric analysis from a randomly selected patient with spontaneous miscarriage, with isolated T lymphocytes (the green population shows CD4+ T lymphocytes producing IL-17).

DISCUSSION

In the study group, the count of CD4+ T lymphocytes producing IL-17 (Th17) was slightly higher than in the recently published Iranian study [10]. In that study, the percentage of Th17 lymphocytes was $1.8 \pm 1.4\%$, while in our study it was $2.7 \pm 1.15\%$. However, the Iranian study as well as other studies were not conducted at the time of miscarriage but solely on patients with spontaneous miscarriage in their obstetrical history [11]. Therefore, the results of our study make it possible to determine the correct share of diverse populations of CD4+ T lymphocytes. Unexpectedly, it turned out that T lymphocyte share depended on the patient's age.

Complex interdependence between the immune mechanisms of the mother and fetus changes along with the gestational age [12,13]. Homeostasis of the immune system requires strict mechanisms for controlling the balance between pro- and antiinflammatory subpopulations of T lymphocytes. The delicate equilibrium - if disturbed - may lead to miscarriage. Earlier studies demonstrated that lower numbers of Treg cells with an increased share of Th17 lymphocytes, and their deregulation, resulted in recurrent miscarriages [6].

Th17 cells have been described as T helper lymphocytes (CD4+) which play a significant role in inducing inflammations by producing inflammatory cytokines, such as IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-6, TNF- α and metalloproteinase. The latest studies confirmed the role of those cells in autoaggressive diseases, transplant rejection and other disorders [14].

CONCLUSIONS

Our study suggests that CD4+ T helper lymphocytes producing IL-17 may be activated in the course of spontaneous miscarriage. This was the first Polish study on the role of Th17 lymphocytes in spontaneous miscarriage.

Piśmiennictwo / References:

1. **Louten J, Boniface K, De Waal Malefyt R.** Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1004–1011.
2. **Afzali B, Mitchell P, Lechler RI et al.** Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2010;159:120–130.
3. **Peck A, Mellins ED.** Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147–153.
4. **Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S et al.** Th1/Th2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? *Int Arch Immunol* 2004;134:93–119.
5. **Kwak-Kim J, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI et al.** Increased T helper 1 cytokines responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18:767–773.
6. **Wang WJ, Hao CF, Yi-Lin, Yin GJ 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;84:164–170.
7. **Nakashima A, Ito M, Yoneda S, Shiozaki A et al.** Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:104–109.
8. **Ziegler SF, Buckner JH.** FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect* 2009;11:594–598.
9. **Bosnar M, Bosnjak B, Cuzic S et al.** Azithromycin and clarithromycin inhibit lipopolysaccharide-induced murine pulmonary neutrophilia mainly through effects on macrophage-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1beta. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331:104–113.
10. **Sereshki N, Gharagazloo M, Ostadi V et al.** Variation in T-helper 17 and regulatory cells during the menstrual cycle in peripheral blood of women with recurrent spontaneous abortion. *Int J Fertil Steril* 2014;8:59-66.
11. **Wang WJ, Liu FJ, Qu HM et al.** Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 2013;99:39-45.
12. **Saini V, Arora S, Yadav A, Bhattacharjee J.** Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clin Chim Acta* 2011; 412:702-708.
13. **Bansal AS.** Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64: 307-315.
14. **Hirota K, Martin B, Veldhoen M.** Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol* 2010;32:3-16.