

MODULASI IMUN HUMORAL DAN SELULER: *ANTISPERMA ANTIBODIES (ASA)*, *INTERFERON γ (IFN γ)*, *INDOLEAMINE 2,3 DIOXYGENASE (IDO)*, DAN SEL T REGULATOR PADA PEREMPUAN DENGAN INFERTILITAS TIDAK TERJELASKAN YANG MENDAPATKAN *PATERNAL LYMPHOCYTE IMMUNIZATION (PLI)*

Modulation of humoral and cellular immune: Antisperm antibodies (ASA), interferon γ (IFN γ), indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), and T regulatory cells in women with unexplained infertility who gets Paternal Lymphocyte Immunization (PLI)

Nani Sari Murni¹, Indra Gusti Mansur², Mohamad Sadikin³, Ichramsyah A. Rahman⁴

AFFILIATIONS

1. Program Studi Kesehatan Masyarakat, STIK Bina Husada, Palembang, Indonesia
2. Rumah Sakit Ibu dan Anak (RSIA) Sayyidah, Jakarta, Indonesia
3. Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia
4. Rumah Sakit Ibu dan Anak (RSIA) Budhi Jaya, Jakarta, Indonesia

ABSTRACT

Antisperm antibody (ASA) is one of the immunological factors that play a role in unexplained infertility. About 10-30% of infertile couples are caused by ASA. ASA is thought to be lowered by paternal lymphocyte immunization (PLI), but the immune mechanism that occurs in the body is unclear. This research aims to understand the immune mechanism after PLI in women with unexplained infertility by analyzed ASA, IFN γ , IDO, and Treg cells populations. This research using observational analysis, conducted in X Jakarta Hospital from June 2018 to April 2019. Samples were 12 unexplained infertility women with ASA>1:128. Samples were examined ASA titers using the husband's sperm auto-agglutination test (HSAaT) method. Tregs were evaluated using flow cytometry. IFN γ and IDO was determined using an ELISA. The data were analyzed using the Mann-Whitney and Spearman tests. Results show that PLI can reduce ASA. Treg cells percentage ratio increased after 3 times PLI by 20% and 6 times PLI by 50%, but the increase was not significant. An increase of high IFN γ is followed by an increase in the IDO ratio post/early research and an increase in the percentage of the Treg cell population. The results of this study can be considered as a diagnostic use as well as one of the benchmarks in identifying unexplained causes of infertility, IVF failure, and increasing the success of IVF, can also be used as a prognostic for pregnancies with a history of recurrent miscarriage so that subsequent pregnancies are better.

KEYWORDS:

Antibody, Infertility, Treg, IFN γ , IDO

ABSTRAK

Antibodi antisperma (ASA) merupakan salah satu faktor imunologi yang berperan pada infertilitas yang tidak ter jelaskan. Sekitar 10-30% pasangan infertil disebabkan oleh ASA. ASA diduga dapat diturunkan dengan paternal lymphocyte immunization (PLI), namun mekanisme imun yang terjadi di dalam tubuh belum jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mekanisme imun pada perempuan infertilitas yang tidak ter jelaskan setelah diberikan PLI melalui analisis ASA, IFN γ , IDO, dan populasi sel Treg. Desain penelitian adalah observasional analitik. Penelitian dilakukan di RS X Jakarta dari Juni 2018 sampai dengan April 2019. Sampel sejumlah 12 perempuan infertilitas tidak ter jelaskan dengan ASA >1:128. Pengukuran ASA menggunakan metode husband's sperm auto-agglutination test (HSAaT). Populasi sel Treg diukur dengan flowsitometer. IFN γ dan IDO diukur menggunakan ELISA. Data dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney dan Spearman. Hasil penelitian didapatkan bahwa PLI dapat menurunkan ASA. Rasio persentase sel Treg meningkat setelah 3 kali PLI sebesar 20% dan 6 kali PLI sebesar 50%, namun kenaikan tersebut tidak bermakna. Kenaikan IFN γ yang tinggi diikuti oleh kenaikan rasio IDO post/pre dan kenaikan persentase populasi sel Treg. Hasil penelitian ini dapat dipertimbangkan sebagai penggunaan diagnostik, salah satu tolok ukur dalam mengidentifikasi penyebab infertilitas yang tidak ter jelaskan, meningkatkan keberhasilan IVF, serta digunakan sebagai prognostik kehamilan dengan riwayat keguguran berulang agar kehamilan berikutnya menjadi lebih baik.

KATA KUNCI:

Antibodi, Infertilitas, Treg, IFN γ , IDO



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

CORRESPONDING AUTHOR:

Dr. Nani Sari Murni, SKM, M.Kes.
yauqi0809@gmail.com

PENDAHULUAN

Paternal Lymphocyte Immunization (PLI) awalnya dilakukan pada tahun 1981 untuk mengatasi kasus-kasus klinis seperti keguguran berulang dan meningkatkan keberhasilan In-Vitro Fertilization (IVF) di beberapa negara seperti India, Jepang, China, Inggris, serta berbagai negara lainnya, yang bertujuan untuk meningkatkan terjadinya kehamilan dan tingkat lahir hidup (Pandey and Agrawal 2004; Takeshita, 2004; Wu *et al.*, 2014; Abdolmohammadi-vahid *et al.*, Cacalcante *et al.*, 2015; Cacalcante *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2015).

Masalah imunologi terjadi karena adanya respon imun. Kehamilan merupakan suatu cabaran pada sistem imun ibu. Pada kehamilan, respon imun dipicu oleh masuknya spermatozoa sebagai benda asing (antigen) dan adanya fetus pada tubuh ibu. Pengenalan imunologi pada kehamilan sangat penting untuk menjaga gestasi (Chen, Liu and Sytwu, 2012). Respon imun ibu berperan dalam kegagalan sebelum dan setelah implantasi. Sistem imunitas ibu harus mentoleransi adanya fetus untuk mempertahankan kehamilan (Linscheid and Petroff, 2013).

Faktor imunologi yang berperan pada infertilitas yang tidak menjelaskan salah satu indikasi yang muncul adalah adanya antibodi antisperma (ASA). Terbukti bahwa ASA merupakan salah satu penyebab infertilitas dan keguguran (Linscheid and

Petroff, 2013). Sekitar 10-30% pasangan infertil disebabkan oleh ASA (Restrepo and Cardona-Maya, 2013). ASA berdampak pada fertilitas, sebelum atau setelah proses fertilisasi. ASA menghambat pergerakan sperma, kapasitas, fertilisasi, dan menghambat implantasi embrio (Linscheid and Petroff, 2013). Penelitian di India pada 109 pasangan yang mengalami infertilitas menunjukkan bahwa 52,12% ASA pada infertilitas primer dan 39,47% ASA pada infertilitas sekunder (Linscheid and Petroff, 2013). Penanganan untuk menurunkan titer ASA yang telah dilakukan adalah dengan PLI.

Metaanalisis kasus keguguran berulang pada 18 studi yang melibatkan 1.738 pasien, yakni kelompok yang diberikan PLI sejumlah 739 pasien dan kelompok kontrol 999 pasien menunjukkan bahwa PLI bermakna terhadap kemajuan angka kelahiran hidup pada kasus keguguran berulang (OR 4,67, 95% CI 3,70-5,90) (Liu *et al.*, 2016). Efikasi PLI untuk perempuan infertilitas idiopatik 43-73%. Penelitian lain menunjukkan bahwa efikasi PLI 38% pada keguguran spontan berulang dan 12% pada infertilitas idiopatik (Wilczyński *et al.*, 2012). Penelitian pada 749 pasien dengan keguguran berulang yang berobat sejak Oktober 2009 s.d Juni 2013 di China, 89,7% berhasil hamil setelah dilakukan PLI dengan hasil yang bermakna secara statistik (Chen *et al.*, 2016). Berdasarkan studi terdahulu sebagaimana dijelaskan diatas,

keberhasilan PLI dalam mengatasi kasus-kasus klinis dan juga pemberian PLI sebagai upaya untuk menurunkan ASA telah terbukti, namun mekanisme respon imun yang terjadi belum jelas.

IFN γ adalah salah satu sitokin yang berperan dalam kegagalan implantasi dan keguguran berulang (Ono *et al.*, 2017). IFN γ juga merupakan penginduksi enzim metabolisme asam amino triptopan yang bersifat sebagai imunomodulator yakni indolamin 2,3 dioksigenase (IDO). IDO diinduksi oleh IFN γ dalam jumlah besar terutama pada makrofag dalam keadaan inflamasi dan sel dendritik sehingga menghasilkan IDO dengan metabolit-metabolitnya. Metabolit bekerja pada sel T efektor dan sel T regulator (Treg) (Cody, 2009). Kerjasama antara sel Treg dan IDO akan menginduksi toleransi untuk terjadinya kehamilan (Saito *et al.*, 2007). Sistem imun ibu membutuhkan toleransi untuk terjadinya konsepsi. Tidak hanya keseimbangan Th1/Th2 yang berperan dalam kehamilan, namun juga sel Treg yang mengatur peran penting dalam kehamilan (Ghaebi *et al.*, 2017). Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui mekanisme imun yang terjadi setelah pemberian PLI pada perempuan dengan infertilitas yang tidak ter jelaskan dengan melakukan analisis terhadap ASA, IFN γ , IDO, dan populasi sel Treg CD4+CD25+Foxp3+.

METODE

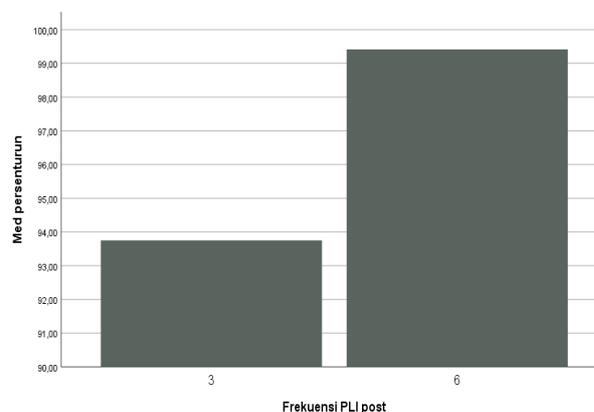
Desain penelitian ini adalah analitik observasional. Penelitian dilaksanakan di Rumah Sakit Ibu dan Anak Sayyidah, Jakarta, pada bulan Juni 2018 s.d bulan April 2019. Sampel dalam penelitian ini adalah 12 perempuan dengan infertilitas tidak ter jelaskan dengan titer ASA tinggi (>1:128) sebagai subyek penelitian. Teknik pengambilan sampel menggunakan *purposive sampling* dengan kriteria inklusi yaitu usia responden 25-35 tahun, mengalami infertilitas yang tidak ter jelaskan minimal 3 tahun dengan pasangan yang sama, dan bersedia menjadi responden dengan menandatangani surat persetujuan setelah penjelasan (*informed consent*) sebagai responden. Subyek penelitian dilakukan dua kali pengambilan darah, yakni di awal dan setelah 3 kali PLI. Pengukuran ASA menggunakan *Husband's Sperm Auto-agglutination Test* (HSAaT) yakni tes pengukuran titer ASA menggunakan serum istri dan sperma suaminya sendiri. Prinsip pengerjaannya serupa prinsip kerja ELISA (Indra Gusti Mansur, V.N.Indriani, 2010). Pengukuran sitokin IFN γ dan IDO menggunakan ELISA. Pengukuran populasi sel Treg CD4+CD25+Foxp3+ menggunakan flowsitometri dengan *FoxP3 staining kit of Biotech and Device* (BD) dengan nomor katalog 555748 untuk CD4, 555751 untuk CD25, dan 560098 untuk FoxP3. Serum IFN γ diukur menggunakan ABCAM ELISA kit nomor katalog ab108863. Serum IDO

diukur menggunakan RnD ELISA kit nomor katalog DY6030-05. Pengukuran menggunakan ELISA dan flowsitometri dilakukan di Laboratorium Terpadu FKUI, sedangkan HSAaT dilakukan di Laboratorium Andrologi RS X Jakarta. Analisis data menggunakan uji Mann-Whitney dan korelasi Spearman karena diperoleh distribusi data yang tidak normal sehingga menggunakan uji non-parametrik. Kriteria signifikansi berdasarkan nilai P yakni jika nilai $P \leq \alpha$ (0,05) maka hasil analisis statistik disimpulkan bermakna, namun sebaliknya jika nilai $P > \alpha$ (0,05) maka hasil analisis statistik disimpulkan tidak bermakna. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan nomor: 0437/UN2.F1/ETIK/2018. *Informed consent* ditujukan kepada setiap subyek penelitian yang bersedia menjadi responden dan diambil sampel darahnya

HASIL DAN PEMBAHASAN

PLI menurunkan ASA pada perempuan infertil

Untuk mengetahui frekuensi PLI yang berpengaruh terhadap persentase penurunan ASA dilakukan analisis sebagaimana pada grafik dibawah ini:



Grafik 1. Median persentase turunya titer ASA berdasarkan frekuensi PLI pada perempuan dengan infertilitas yang tidak terjelaskan di RS X Jakarta tahun 2018

Pada grafik 1 menunjukkan bahwa median persentase turunya ASA lebih besar pada responden yang telah melakukan 6 kali PLI (99,5%) dibandingkan responden yang melakukan 3 kali PLI (93,9%), sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin sering PLI dilakukan maka semakin besar terjadinya penurunan titer ASA. Hal ini sesuai dengan hipotesis bahwa PLI dapat menurunkan ASA.

Hasil analisis menunjukkan bahwa PLI dapat menurunkan ASA. Hal ini sejalan dengan teori yang menjelaskan bahwa PLI menstimulasi aktivasi dan respon sistem imun ibu (Abdolmohammadi-vahid *et al.*, 2016). PLI merupakan imunoterapi aktif yang dilakukan dengan prosedur memasukkan sel mononuklear suami dengan cara injeksi ke dalam kulit istri untuk menstimulasi toleransi pada istri. PLI sebagai imunoterapi terbukti menstimulasi respon imun spesifik humoral yakni ASA. Dalam penelitian ini dapat dibuktikan bahwa PLI dapat menurunkan ASA.

Indikasi PLI adalah pada perempuan dengan titer ASA tinggi, yakni diatas 1:128 Pemberian PLI menstimulasi terjadinya toleransi imun. Toleransi sistem imun maternal dibutuhkan untuk mencegah penolakan dan kerusakan yang dapat menimbulkan infertilitas dan keguguran yang dimediasi oleh imun dan indikasi faktor imunologi, antara lain oleh *antisperm antibodies* (ASA). PLI yang merupakan imunoterapi aktif akan menstimulasi sistem imun maternal sehingga meningkatkan pengenalan imun untuk kehamilan berikutnya (Abdolmohammadi-vahid *et al.* 2016) (Günther *et al.*, 2018).

Stimulasi toleransi imun oleh PLI yang dibuktikan dengan turunnya ASA, sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa limfosit sebagai immunogen akan menstimulasi respon imun ibu, terutama antibodi humoral (Abdolmohammadi-vahid *et al.* 2016). Sebagaimana teori juga menjelaskan bahwa reseptor antigen pada sistem imun adaptif yang disandi oleh gen yang dibentuk oleh pengaturan kembali somatik pada segmen gen selama perkembangan limfosit, akan menghasilkan reseptor yang unik pada setiap klon limfosit T dan B. Hanya terdapat dua reseptor spesifik pada sistem imun adaptif (Ig dan TCRs), tetapi karena keragaman mereka, sel-sel tersebut dapat mengenali jutaan antigen yang berbeda (Abbas *et al.*, 2012).

Efek ASA dapat terjadi awalnya saat sperma berkumpul di vagina kemudian terjadi efek

pengikatan sperma (*sperm-binding effect*) yang dikenal dengan ASA. Hal ini menyebabkan sperma menjadi sulit menembus mucus serviks. Meskipun tidak terjadi aglutinasi pada sperma, namun efek fagositosis oleh makrofag dapat terjadi melalui tuba fallopii ke rongga peritoneum. Makrofag menuju organ limfoid perifer, dimana terjadi fagositosis sperma dengan mengaktifkan sel T dan sel B. Hal inilah yang menunjukkan salah satu respon imun. Perempuan yang terpapar antigen sperma, antibodinya tidak langsung menyebabkan infertilitas, namun perempuan yang rentan terhadap kondisi ini akan mengalami respon imun yang berlebihan. Hal ini berhubungan dengan adanya kegagalan atau respon pada faktor immunosupresif. Perempuan dengan ASA yang tinggi signifikan menghambat fertilisasi *in vitro* (Abbas *et al.*, 2012). Dalam penelitian ini telah terbukti bahwa PLI dapat menurunkan ASA untuk mengatasi respon imun yang berlebihan dalam tubuh maternal tersebut.

Pada perempuan dengan ASA yang tinggi dapat terjadi kegagalan mentoleransi sperma sehingga menjadikan sperma tereliminasi. ASA berdampak pada berbagai proses sebelum dan setelah fertilisasi, seperti aglutinasi sperma dan motilitas sperma, penetrasi mukus serviks, kapasitas, reaksi akrosom, pengikatan zona pellusida dan penetrasi, pengikatan oolemma, fusi sperma-oosit, dan implantasi embrio. Mekanisme

pengaturan imun ini berdasarkan sistem imun mukosa yang aktif dan sensitif pada jaringan serviks dan vagina, yang berdampak pada fertilitas. ASA yang melapisi sperma menyebabkan fagositosis pada saluran reproduksi perempuan (Brazdova, 2014).

Penelitian tentang keberhasilan PLI dalam meningkatkan kehamilan telah banyak dilakukan, antara lain penelitian yang dilakukan pada 749 pasien dengan keguguran berulang yang berobat sejak Oktober 2009 hingga Juni 2013 di China yang mendapatkan hasil yang bermakna secara statistik dan 89,7% berhasil hamil setelah dilakukan PLI (Chen *et al.*, 2016). Imunomodulasi sangat diperlukan pada awal kehamilan karena jika terjadi disregulasi pada awal kehamilan maka kemungkinan terjadinya keguguran adalah 50% yakni sekitar 1-3% pasangan yang ingin memiliki anak mengalami keguguran berulang (Günther *et al.*, 2018).

Suatu penelitian yang mengevaluasi efikasi PLI terhadap kehamilan berikutnya pada 202 perempuan setelah perempuan tersebut mengalami keguguran berulang didapatkan angka keberhasilan 80,7% terhadap kehamilan berikutnya. PLI mampu memperbaiki *outcome* kehamilan (Brazdova, 2014). Penelitian lain menyimpulkan bahwa pasangan dengan riwayat keguguran berulang mengalami kehamilan yang baik dengan PLI. Usia ibu yang lebih tua dan kehadiran antibodi anti tiroglobulin

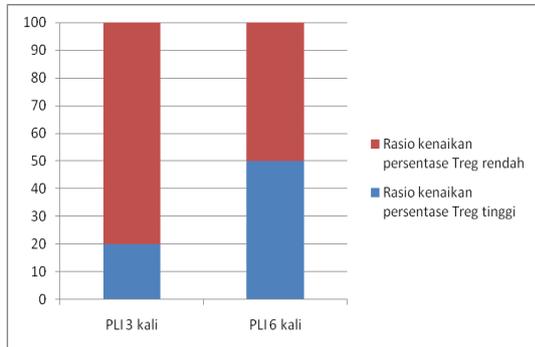
dan antinuklear adalah faktor risiko keguguran baru setelah perawatan dengan PLI (Cavalcante *et al.*, 2012). Suatu uji klinis yang dilakukan secara random pada perempuan yang mengalami keguguran berulang didapatkan bahwa 67% berhasil hamil setelah diberikan PLI dibandingkan yang hanya diberikan normal saline atau tidak diterapi (Pandey *et al.*, 2004).

Setelah berbagai penelitian terdahulu yang mendapatkan hasil bermakna terhadap keberhasilan PLI dalam mengatasi kasus keguguran berulang dan meningkatkan kemungkinan terjadinya kehamilan, maka pada penelitian ini mampu membuktikan bahwa median persentase turunnya ASA lebih besar pada responden yang telah melakukan 6 kali PLI (99,5%) dibandingkan responden yang melakukan 3 kali PLI (93,9%), sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin sering PLI dilakukan maka semakin besar terjadinya penurunan titer ASA; PLI dapat menurunkan ASA untuk terjadinya toleransi maternal.

Peningkatan populasi sel Treg setelah penurunan ASA pada perempuan infertilitas tidak terjelaskan yang mendapatkan PLI

Analisis data pada 12 responden untuk melihat perbedaan antara rasio kenaikan populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ post/awal penelitian pada kelompok yang telah 3 kali PLI dan kelompok yang telah 6 kali PLI dilakukan dengan mengkategorikan rasio kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ akhir/awal penelitian

menggunakan median, sehingga kelompok kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ rendah (<median) dan kelompok kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tinggi (>median). (Grafik 2).



Grafik 2. Kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ terhadap frekuensi PLI setelah terjadinya penurunan ASA pada perempuan dengan infertilitas tidak terjelaskan.

Pada grafik 2 diatas menunjukkan hasil bahwa rasio kenaikan persentase sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ yang tinggi setelah 6 kali PLI lebih besar (50%) dibandingkan setelah 3 kali PLI (20%). Namun, setelah dilakukan uji mann-whitney untuk mengetahui perbedaan rerata persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ antara kelompok yang telah 3 kali PLI dan kelompok yang telah 6 kali PLI, didapatkan nilai p 0,329 (p>0,05) (Tabel 1).

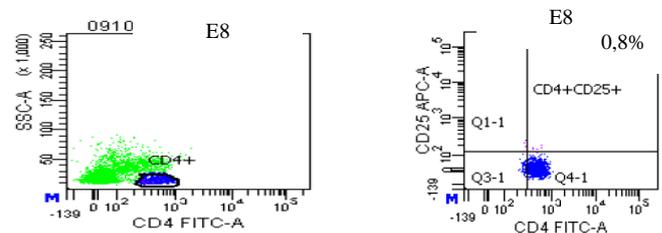
Tabel 1. Perbedaan Rerata Persentase Populasi Sel Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dengan Frekuensi PLI setelah Penurunan ASA

Frekuensi PLI	n	Mean rank	p
3 kali	5	4,80	0,329
6 kali	6	7,00	

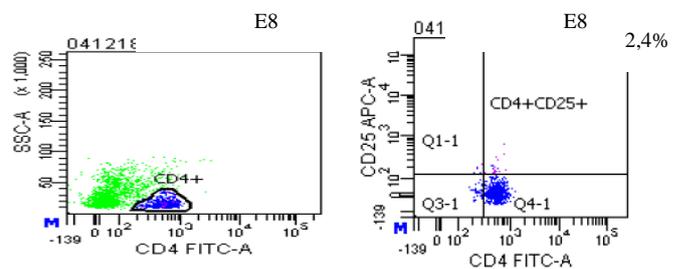
Uji Mann-Whitney

Pada tabel 1 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan rerata persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ setelah PLI 3 kali dan 6 kali (p 0,329), namun mean rank pada PLI 6 kali lebih

tinggi dibandingkan 3 kali PLI. Berdasarkan hasil analisis maka disimpulkan terdapat kenaikan rasio populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ setelah PLI, namun kenaikan rasio populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ belum ditemukan pengaruhnya secara bermakna terhadap frekuensi PLI. Grafik 2 mendasari simpulan bahwa secara substansi terlihat trend kenaikan rasio populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ setelah PLI. Gambaran sitometri populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pada salah satu subyek sebagaimana gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Analisis sitometri pada populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pada perempuan dengan infertilitas tidak terjelaskan yang mendapatkan PLI sebelum terjadi penurunan ASA



Gambar 2. Analisis sitometri pada populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pada perempuan dengan infertilitas tidak terjelaskan yang mendapatkan PLI setelah terjadi penurunan ASA

Peningkatan populasi sel Treg setelah PLI menunjukkan bahwa terjadi toleransi imun setelah diberikan PLI. Responden dalam penelitian ini telah dikondisikan selama mendapatkan PLI sesuai prosedur PLI pada SOP tempat penelitian, yakni menghindari makanan yang memicu antibodi

melalui pemeriksaan respon imun terhadap makanan, dan menghindari terpaparnya sperma (selama menjalani PLI, coitus harus menggunakan kondom).

Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian terdahulu pada kejadian keguguran berulang yang menunjukkan bahwa PLI dapat meningkatkan proporsi sel Treg CD4⁺CD25⁺ pada darah perifer sehingga meningkatkan toleransi imun maternal, yang selanjutnya dapat meningkatkan kemungkinan kehamilan (Abdolmohammadi-vahid *et al.*, 2016) (Yang *et al.*, 2017). Hasil penelitian ini juga sejalan dengan hasil penelitian terdahulu bahwa beberapa tipe sel T dihubungkan dengan patogenesis keguguran spontan berulang yang tidak diketahui penyebabnya (*unexplained recurrent spontaneous abortion/URSA*), termasuk sel Th1/Th2/Th17/Treg. PLI adalah metode yang tepat untuk pasien URSA. Setelah PLI didapatkan keseimbangan sel Th1/Th2 dan peningkatan sel Treg. Setelah imunoterapi, didapatkan peningkatan persentase sel Treg pada *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) pasien URSA. Kondisi ini bermanfaat untuk terjadinya kehamilan (Wu *et al.*, 2014) (Yuan *et al.*, 2015).

Hasil penelitian ini sejalan dengan teori yang menjelaskan bahwa sel Treg berperan sebagai imunoregulator dan menginduksi toleransi imun. Sel Treg menghambat proliferasi dan produksi sitokin oleh CD4⁺ dan CD8⁺, produksi

immunoglobulin oleh sel B, aktifitas sitotoksik dari sel NK, dan maturasi sel dendritik. Hal inilah yang menimbulkan terjadinya toleransi oleh sel Treg (Chaplin, 2010) (Saito *et al.*, 2010). Temuan tentang peranan sel Treg dalam terjadinya kehamilan dimulai pada tahun 1970an (Koch and Platt, 2007). Sel Treg memblok sel T efektor maternal sehingga mengurangi respon patologis dari antigen paternal. Sel T CD4⁺ mengalami penurunan pada trimester 2 dan 3, sedangkan sel T CD8⁺ menurun pada trimester 3. Median presentase sel Treg pada perempuan yang hamil lebih tinggi dibandingkan dengan perempuan yang tidak hamil (Alijotas-reig *et al.*, 2014).

Sel Treg pada penelitian ini menggunakan penanda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Hal ini sesuai dengan teori bahwa 5-10% dari sel T CD4⁺ adalah sel Treg yang diekspresikan oleh CD25⁺FoxP3⁺. Sel Treg yang diidentifikasi dengan ekspresi FoxP3 mempunyai peran penting dalam keberhasilan gestasi dan implantasi (Yang *et al.*, 2017). Peningkatan sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pada kehamilan normal berperan dalam implantasi dan pemeliharaan embrio dalam tubuh ibu. Sistem imun ibu membutuhkan toleransi untuk terjadinya konsepsi semi-allogeneik. Sel Treg mengatur allo-reaktif sel Th1 (Alijotas-reig *et al.*, 2014). Sel Treg berkembang di timus atau di jaringan perifer setelah mengenali antigen diri dan menekan aktivasi limfosit spesifik untuk antigen diri tersebut

yang dapat berbahaya. Sel Treg adalah CD4⁺ dan mengekspresikan banyak CD25, rantai α reseptor IL2 serta mengekspresikan juga faktor transkripsi FoxP3 yang diperlukan untuk perkembangan dan fungsi sel tersebut. Mutasi gen yang menyandi FoxP3 menyebabkan penyakit autoimun multiorgan sistemik, menunjukkan pentingnya sel T regulator FoxP3⁺ untuk pemeliharaan toleransi diri. Kelangsungan hidup dan fungsi sel Treg tergantung pada sitokin IL2. IL2 mempunyai peran yang berlawanan yakni meningkatkan respon imun dengan merangsang proliferasi sel T, dan menghambat respon imun dengan menjaga sel Treg fungsional. Sitokin TGF β juga berperan dalam pengembangan sel Treg, dengan merangsang ekspresi faktor transkripsi FoxP3. Sel Treg dapat menekan respon imun melalui beberapa mekanisme yakni: 1) sebagian sel Treg memproduksi sitokin (misalnya IL10, TGF β) yang menghambat aktivasi limfosit, sel dendritik, dan makrofag; 2) Sel Treg mengekspresikan CTLA-4 yang dapat menghambat atau menghilangkan molekul B7 yang dibuat oleh APC sehingga APC ini tidak mampu memberikan kostimulasi melalui CD28 dan mengaktifkan sel T; 3) sel Treg berdasarkan tingginya IL2 dapat mengikat dan memakai faktor pertumbuhan sel T yang penting ini sehingga mengurangi ketersediaan sitokin tersebut untuk sel T yang memberikan respon (Alijotas-reig *et al.*, 2014) (Chaouat *et al.*, 2007).

Pembentukan dan pemeliharaan kehamilan merupakan cabaran bagi sistem kekebalan tubuh ibu karena harus bertahan terhadap patogen dan mentoleransi alloantigen paternal yang diekspresikan dalam jaringan janin. Sel Treg berperan dominan dalam pemeliharaan toleransi imunologis dengan mencegah respons imun dan autoimun terhadap antigen sendiri. Meskipun mekanisme lokal berkontribusi pada penghindaran janin dari serangan kekebalan tubuh, dalam beberapa tahun terakhir ini telah diamati bahwa sel Treg sangat penting dalam meningkatkan kelangsungan hidup janin untuk menghindari penolakan terhadap patogen semi-allogeneik paternal oleh sistem kekebalan tubuh ibu. Beberapa penelitian fungsional menunjukkan bahwa infertilitas yang tidak dapat dijelaskan, keguguran dan pre-eklampsia sering dikaitkan dengan defisit pada jumlah dan fungsi sel Treg. Jumlah sel Treg yang meningkat akan bertahan lama setelah melahirkan dan mengembangkan memori kekebalan tubuh melawan antigen paternal. Sel Treg memori ini berkembang dengan cepat selama kehamilan berikutnya. Namun, di sisi lain, ada beberapa bukti yang menunjukkan penurunan jumlah sel Treg yang jelas setelah regulasi. Faktor yang lain seperti sitokin, adipokin, hormon kehamilan dan cairan mani memiliki aktivitas sebagai imunoregulator dan mempengaruhi keberhasilan kehamilan dengan meningkatkan

jumlah dan aktivitas sel Treg (Chaouat *et al.*, 2007).

Peningkatan sel Treg diperlukan dalam toleransi maternal karena frekuensi sel Treg yang berkurang dapat mengakibatkan keguguran berulang dan preeklampsia (Chaouat *et al.*, 2007). Hal ini telah dibuktikan pada suatu penelitian pada 23 perempuan yang mengalami keguguran pada trimester pertama kehamilan dan 31 perempuan yang dapat melanjutkan kehamilannya setelah 12 minggu (kehamilan yang berhasil) diperoleh hasil pengukuran bahwa mean sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3 adalah $0,72 \pm 0,52\%$ pada perempuan yang berhasil melanjutkan kehamilannya dibandingkan dengan perempuan yang mengalami keguguran dengan mean $0,37 \pm 0,29\%$ (Winger and Reed, 2011). Penelitian lainnya, pada 22 perempuan sehat yang tidak hamil menyimpulkan bahwa ada hubungan antara sel FoxP3⁺, FoxP3^{low}, dan CD4⁺FoxP3⁺ dengan sel CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{dim}, CD4⁺CD25^{bright}. Sel FoxP3⁺, FoxP3^{low}, dan CD4⁺FoxP3⁺ berkorelasi positif dengan sel T CD3⁺ dan CD3⁺CD4⁺, namun berkorelasi negatif dengan sel NK CD3⁺CD56⁺ dan CD3⁺CD56^{dimer}. Sel T reg CD4⁺FoxP3^{high} berkorelasi positif dengan CD3⁺CD4⁺TNF α ⁺ (p 0,014) dan berkorelasi negatif dengan sel T CD3⁺CD8⁺IL10⁺ (p 0,001). Sel CD8⁺FoxP3⁺ berkorelasi positif dengan sel CD3⁺CD4⁺IL10⁺ (p 0,007) dan berkorelasi negatif dengan sel CD3⁺CD8⁺TNF α ⁺ (p 0,008). Hal ini

dapat disimpulkan bahwa subpopulasi sel T regulator FoxP3 memiliki interaksi imun yang unik yang diatur oleh limfosit (Winger and Reed, 2011).⁵⁹ Bertambah atau supresi dari Th1 pada endometrium diobservasi pada kegagalan implantasi berulang. Menurunnya jumlah dan fungsi sel Treg menyebabkan bertambahnya sel Th1 pada beberapa kasus. Suatu studi mengungkap bahwa sel Treg berperan dalam respon imun yang protektif melalui peningkatan respon Th1 atau Th17. *Unexplained infertility* primer dihubungkan dengan penurunan ekspresi mRNA FoxP3 dalam jaringan endometrium (Saito *et al.*, 2010) (Zhu *et al.*, 2010).

Hubungan yang berbanding terbalik antara jumlah sel Th17 dan sel Treg diobservasi pada darah perifer dan desidua pada kasus abortus spontan berulang yang tidak diketahui penyebabnya (*unexplained recurrent spontaneous abortion*). Setelah dilakukan PLI, *receptor soluble* IL6 (sIL6R) dan serum IL6 menurun dan jumlah sel Treg meningkat. IL6 berperan penting sebagai trans-sinyal untuk keseimbangan sel Th17/sel Treg (Saito *et al.*, 2010). Penelitian pada 110 perempuan di Rumah Sakit ST. Olavs Universitas Trondheim bulan Juni 2008-Mei 2010 didapatkan bahwa kadar IL6 dalam serum pada kehamilan 10 minggu dengan median 1,4 (0,8-2,1) pg/ml (Lee *et al.*, 2011).

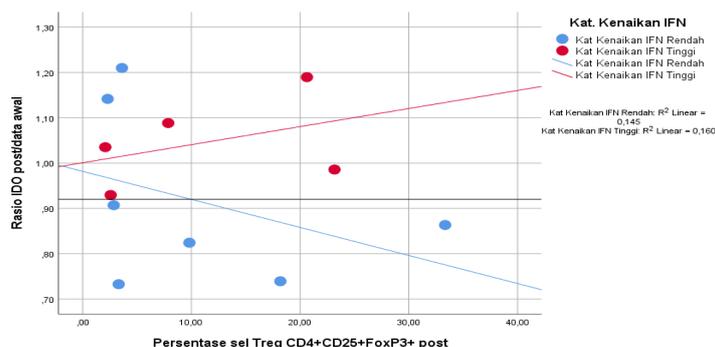
Hormon estrogen selama kehamilan berperan dalam menstimulasi jumlah sel Treg. Jumlah sel Treg meningkat pada fase folikuler saat siklus menstruasi (Saito *et al.*, 2010) (Zhu *et al.*, 2010). Setelah dipelajari lebih lanjut diketahui bahwa sel B, sel NK, dan sel T mengalami perubahan pada siklus menstruasi. Proporsi sel T CD3⁺ (p 0,04) dan CD3⁺CD4⁺ (p 0,002) meningkat pada fase folikuler dibandingkan pada fase luteal. Progesteron menstimulasi Th2, menurunkan sitokin inflamasi dan menahan respon allogeneik untuk bertahannya fetus (Chen *et al.*, 2012). Regulasi neuroendokrin pada respon imun selama siklus menstruasi merupakan hal penting dalam implantasi embrio dan kehamilan (Lee *et al.*, 2010).

Teori dan hasil-hasil penelitian terdahulu membuktikan bahwa sel Treg berperan sebagai imunoregulator dan menginduksi toleransi imun. Peningkatan sel Treg menandai terjadinya toleransi maternal untuk mendukung terjadinya kehamilan. Dalam penelitian ini juga ditemukan hasil bahwa terdapat kenaikan rasio populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ setelah PLI, sejalan dengan hipotesis, namun kenaikan rasio populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ belum ditemukan pengaruhnya secara bermakna terhadap frekuensi PLI. Belum ditemukannya pengaruh secara bermakna kemungkinan disebabkan kelemahan dalam penelitian ini yakni tidak memperhitungkan siklus menstruasi pada subyek saat pengambilan sampel

darah, sebagaimana dijelaskan diatas bahwa regulasi neuroendokrin selama siklus menstruasi mempengaruhi respon imun. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut dengan memperhatikan hal tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian ini dan penelitian terdahulu maka disimpulkan bahwa terdapat kenaikan rasio populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ setelah PLI namun kenaikan rasio populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ belum ditemukan pengaruhnya secara bermakna terhadap frekuensi PLI.

Terdapat korelasi antara kadar IDO, IFN γ , dan populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ setelah penurunan ASA pada perempuan dengan infertilitas tidak terjelaskan yang mendapatkan PLI



Grafik 3. Korelasi IDO, IFN γ , dan populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ setelah penurunan ASA pada perempuan dengan infertilitas tidak terjelaskan tahun 2018

Pada grafik 3 menunjukkan hasil bahwa 100% kenaikan IFN γ yang tinggi diikuti oleh kenaikan rasio IDO akhir/awal penelitian dan kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ namun jika kenaikan IFN γ rendah maka terjadi penurunan rasio IDO akhir/awal penelitian dan

hanya 28,6% kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Hasil uji korelasi sebagaimana dibawah ini:

Tabel 2. Korelasi rasioIDO post/awal penelitian dengan kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pada kelompok kenaikan IFN γ rendah

		Populasi Sel Treg
RasioIDO	r	-0,380
akhir/awal	p	0,200
penelitian	n	7

Uji korelasi Spearman

Pada tabel 2 menunjukkan bahwa nilai signifikansi 0,200 pada variabel populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dan rasioIDO akhir/awal penelitian pada kelompok kenaikan IFN γ rendah, hal ini menunjukkan bahwa korelasi tidak bermakna dan arah korelasi negatif (r -0,380). Pada kelompok kenaikan IFN γ rendah, jika terjadi peningkatan rasioIDO akhir/awal penelitian maka akan diikuti oleh penurunan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Hal ini berbanding terbalik pada kelompok kenaikan IFN γ tinggi sebagaimana tabel di bawah ini:

Tabel 3. Korelasi rasioIDO akhir/awal penelitian dengan kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pada kelompok kenaikan IFN γ tinggi

		Populasi Sel Treg
RasioIDO akhir/awal	r	0,400
penelitian	p	0,252
	n	5

Uji korelasi Spearman

Pada tabel 3 menunjukkan bahwa nilai signifikansi 0,252 pada variabel populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dan rasioIDO akhir/awal penelitian pada kelompok kenaikan IFN γ tinggi, hal ini menunjukkan bahwa korelasi tidak bermakna dan arah korelasi positif (r 0,400). Pada kelompok

kenaikan IFN γ tinggi, jika terjadi peningkatan rasioIDO akhir/awal penelitian maka diikuti pula oleh peningkatan persentase populasi Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Adanya keterkaitan antara IFN γ ,IDO, dan Treg sebagaimana hasil analisis dalam penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian terdahulu bahwa sel Treg menginduksiIDO dalam sel dendritik. Sel dendritik berperan pertama kali dalam melakukan respon imun. Sel dendritik sangat heterogen dan menjadi bagian stimulasi yang mengaktifkan sel T, dan sel dendritik tolerogenik mengekspresikan CD8^a danIDO. Saat sel dendritik teraktivasi maka akan menginduksi sel Th1 dan mensekresi sitokin proinflamasi. Reaksi berlawanan terjadi pada sel Th2 yang melakukan respon humoral (Jürgens *et al.*, 2009).

Sel Treg menginduksiIDO dalam sel dendritik. Sebagian dimediasi melalui interaksi *Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4* (CTLA4) yang diekspresikan oleh Treg dan CD80/86 yang diekspresikan oleh sel dendritik.IDO juga diinduksi oleh IFN γ .IDO diinduksi dalam jumlah besar terutama pada makrofag dalam keadaan inflamasi. Senyawa penginduksinya adalah IFN γ .IFN γ memacu makrofag/sel dendritik menghasilkanIDO dengan metabolit-metabolitnya. Metabolit bekerja pada sel T efektor dan sel Treg.IDO dibawah kontrol transkripsi IFN γ mengkatalisasi dan membatasi degradasi triptofan. Triptofan

adalah stimulus yang penting bagi proliferasi sel T efektor. Jika triptofan dibatasi maka akan terjadi apoptosis (Chang *et al.*, 2017; Koch and Platt, 2007).IDO berperan penting dalam menginduksi apoptosis yang diaktivasi oleh sel T efektor, seperti Th1 dan Th17 (Yang *et al.*, 2017). IFN γ berperan ganda, di satu sisi melepaskan sitokin proinflamasi namun di sisi lain menginduksi IDO untuk mengurangi inflamasi (Jürgens *et al.*, 2009).

Berdasarkan hasil penelitian dan hasil penelitian terdahulu maka disimpulkan bahwa terdapat korelasi antara kadar IFN γ , IDO, dan populasi sel Treg. Kenaikan IFN γ yang tinggi diikuti oleh kenaikan rasio IDO post/awal penelitian dan kenaikan persentase populasi sel Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa PLI dapat menurunkan ASA. Terdapat peningkatan persentase sel Treg setelah 6 kali PLI (50%) dibandingkan 3 kali PLI (20%), namun kenaikan rasio populasi sel Treg belum ditemukan pengaruhnya secara bermakna terhadap frekuensi PLI. Kenaikan IFN γ yang tinggi diikuti oleh kenaikan rasio IDO akhir/awal penelitian dan kenaikan persentase populasi sel Treg. Hasil penelitian ini dapat dipertimbangkan sebagai penggunaan diagnostik, salah satu tolok ukur dalam mengidentifikasi penyebab infertilitas yang tidak menjelaskan, meningkatkan keberhasilan IVF,

serta digunakan sebagai prognostik kehamilan dengan riwayat keguguran berulang agar kehamilan berikutnya menjadi lebih baik.

PERSANTUNAN

Terima kasih kepada Kementerian Keuangan; Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemendikbudristek) melalui Beasiswa Unggulan Dosen Indonesia-Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (BUDI-LPDP) tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdolmohammadi-vahid, S., Danaii, S. Hamdi, K., Jadidi-Niaragh, F., Ahmadi, M., and Yousefi, M. 2016. Novel Immunotherapeutic Approaches for Treatment of Infertility, *Biomed Pharmacother.* 84. Pp: 1449-59.
- Abbas. A.K., Andrew, H.L., and Pillai, S. 2012. *Cellular And Molecular Immunology.* 5th Ed. Elsevier Saunders. USA
- Alijotas-reig, J., Llurba, E. and Gris, J.M. 2014. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: A new challenging role for regulatory T cells. *Placenta.* 35(4). Pp: 241-8.
- Brazdova, A. 2014. Study of immunological properties of sperm and seminal plasma antigens: antiseminal and anti-sperm antibodies in female immune infertility : characterization of targeted proteins. *Theses.* Université Pierre et Marie Curie-Paris.
- Cavalcante, M., Cavalcante, C., Galvão, R., Matheus, P., Sarno, M., Batista, S., and Barini, R. 2012. Pregnancy outcome of couples treated for recurrent miscarriages with paternal lymphocyte immunization. *J. Reprod. Immunol.* 94.
- Cavalcante, M.B., Costa, F.S., Araujo Júnior, E., and Barini, R. 2015. Risk factors associated with a new pregnancy loss and perinatal outcomes in cases of recurrent miscarriage treated with lymphocyte immunotherapy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 28(9). Pp: 1082-6.
- Cavalcante, M.B., Sarno, M., Araujo Júnior, E., Da Silva Costa, F., and Barini, R. 2017.

- Lymphocyte immunotherapy in the treatment of recurrent miscarriage: systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 295(2). Pp: 511-8.
- Chang, R.Q., Li, D.J., and Li, M.Q. 2018. The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol.* 79(4). p: e12786.
- Chaouat, G., Ledée-Bataille, N., and Dubanchet, S. 2007. Immune cells in uteroplacental tissues throughout pregnancy: a brief review. *Reprod Biomed Online.* 14(2). Pp: 256-66.
- Chaplin, D.D. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 125(2 Suppl 2). Pp: S3-S23.
- Chen, J.L., Yang, J.M., Huang, Y.Z., and Li, Y. 2016. Clinical observation of lymphocyte active immunotherapy in 380 patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Int Immunopharmacol.* 40. Pp: 347–50.
- Chen, S.J., Liu, Y.L., and Sytwu, H.K. 2012. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin Dev Immunol.* 258391. Pp: 1–10.
- Koch, C.A., and Platt, J.L. 2007. T cell recognition and immunity in the fetus and mother. *Cell Immunol.* 248(1). Pp: 12–17.
- Ghaebi, M., Nouri, M., Ghasemzadeh, A., Farzadi, L., Jadidi-Niaragh, F., Ahmadi, M., and Yousefi, M. 2017. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomed Pharmacother.* 88. Pp: 61–73.
- Mansur, I.G., Indriani, V.N., and Rachman I. A. 2010. Husband's Sperm Auto-agglutination Test (HSAaT) as a spesific method to measure antisperm antibody. *J. Reprod. Immunol.* 86. p: 4096.
- Jürgens, B., Hainz, U., Fuchs, D., Felzmann, T., and Heitger, A. 2009. Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood.* 114(15). Pp: 3235–43.
- Lee, S.K., Kim, J.Y., Jang, B.W., Hur, S.E., Na, B.J., Lee, M., Fukui, A., Gilman-Sachs, A., and Kwak-Kim, J. 2011. Foxp3 high and Foxp3 low Treg cells differentially correlate with T helper 1 and natural killer cells in peripheral blood', *Hum Immunol.*72 (8). Pp: 621–6.
- Günther, V., Alkatout, I., Junkers, W., Maass, N., Ziemann, M., Görg, S., and von Otte, S. 2018. Active Immunisation with Partner Lymphocytes in Female Patients Who Want to Become Pregnant -Current Status. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 78(3). Pp: 260–73.
- Lee, S., Kim, J., Jang, B., Hur, S., Jung, U., Kil, K., Na, B., Lee, M., Choi, Y., Fukui, A., Gilman-Sachs, A., and Kwak-Kim, J.Y. 2010. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. *J Immunol.* 185(1). Pp: 756–62.
- Liang, X., Qiu, T., Qiu, L., Wang, X., Zhao, A., and Lin, Q. 2015. Female third party lymphocytes are effective for immunotherapy of patients with unexplained primary recurrent spontaneous abortion: A retrospective analysis of outcomes. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 20(6). Pp: 428–37.
- Linscheid, C. and Petroff, M. G. 2013. Minor Histocompatibility Antigens and the Maternal Immune Response to the Fetus During Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 69 (4). Pp: 304–14.
- Liu, Z., Xu, H., Kang, X., Wang, T., He, L., and Zhao, A. 2016. Allogenic Lymphocyte Immunotherapy for Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion: A Meta-Analysis. *Am J Reprod Immunol.* 76(6). Pp: 443–53.
- Pandey, M.J. and Agrawal, S. 2004. 'Induction of MLR-Bf and protection of fetal loss: A current double blind randomized trial of paternal lymphocyte for women with recurrent spontaneous abortion. *Int Immunopharmacol.* 2(4). Pp: 289–98.
- Pandey, M.K., Thakur, S., and Agrawal, S. 2004. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 269(3). Pp: 161-72.
- Restrepo, B., and Cardona-Maya, W. 2013. Antisperm antibodies and fertility association. *Actas Urol Esp.* 37(9). Pp: 571–8.
- Saito S, Shima T, Nakashima A. Shiozaki A, Ito M, and Sasaki Y. 2007. What is the role of regulatory T cells in the success of

- implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet.* 24 (9). Pp: 379–86.
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., and Ito, M. 2010. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 63(6). Pp: 601–10.
- Takeshita, T. 2004. Diagnosis and Treatment of Recurrent Miscarriage Associated with Immunologic Disorders: Is Paternal Lymphocyte Immunization a Relic of the Past. *J Nippon Med Sch.* 71 (5). Pp: 308–13.
- Ono, Y., Nagai, M., Yoshino, O., Koga, K., Nawaz, A., Hatta, H., Nishizono, H., Izumi, G., Nakashima, A., Imura, J., Tobe, K., Fujii, T., Osuga, Y., & Saito, S. 2018. CD11c+ M1-like macrophages (M Φ s) but not CD206+ M2-like M Φ are involved in folliculogenesis in mice ovary. *Sci Rep.* 8(1). P: 8171.
- Wilczyński, J.R., Radwan, P., Tchórzewski, H., and Banasik, M. 2012. Immunotherapy of Patients with Recurrent Spontaneous Miscarriage and Idiopathic Infertility: Does the Immunization-Dependent Th2 Cytokine Overbalance Really Matter? *Arch Immunol Ther Exp.* 60 (2). Pp: 151–60.
- Winger, E.E. and Reed, J.L. 2011. Low circulating CD4 +CD25 +Foxp3 + T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. *Am J Reprod Immunol.* 66(4). Pp: 320–8.
- Wu, L., Luo, L.H., Zhang, Y.X., Li, Q., Xu, B., Zhou, G.X., Luan, H.B., and Liu, Y. S. 2014. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy. *Reprod Biol Endocrinol.* 12(74). Pp: 1–9.
- Yang, H., Qiu, L., Di, W., Zhao, A., Chen, G., Hu, K., and Lin, Q. 2009. Proportional change of CD4 D CD25 D regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril.* 92(1). Pp: 301–5.
- Yuan, M.M., Du, M.R., Wang, M.Y., Duan, Z.L., Meng, Y., Jin, L.P., Li, M.Q., and Li, D.J. 2015. Combination of CD4+CD25+CD127-regulatory T cells with MLC-BE and BE-Ab2: an efficient evaluation of the therapy of paternal lymphocyte induced immunization in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 8(4). Pp: 4022-32.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W.E. 2010. Differentiation of effector CD4+ T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 28. Pp: 445-89.