

**A terhesség immunológiai felismerése és következményes  
immuno-endokrin mechanizmusok**

Ph.D. értekezés tézisei

Írta: Dr. Kelemen Katalin

**POTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet**

**Témavezető: Prof. Szekeres-Barthó Júlia**

**Pécs, 1997.**

## BEVEZETÉS

A "reproduktív immunológia" tárgya az az összetett szabályozási folyamat, amely lehetővé teszi, hogy az immunológiai szempontból allograftnak számító magzat titléljen és zavartalanul fejlődjön a potenciálisan veszélyes anyai környezetben.

A terhesség során a sejt immunreakciók átmeneti csökkenése (1) és a humorális immunitás túlsúlya alakul ki (2). Ezt jelzi, hogy a fertőzések (3) és dagasztos betegségek (4) gyakorisága megnő a terhesség alatt. Az autoimmun körkerek lefolyása is sajátos változásokat mutat: a rheumatoid arthritis, amelyben a celluláris autoimmunitás dominál, javul a terhesség alatt, míg a főként humorális pathomechanizmusú SLE súlyosbodik, sőt, gyakran az első fellebbbanását a terhesség provokálja (5).

A celluláris immunreakciók közül a magzatra legnagyobb veszélyt jelentő NK aktivitás az egészséges terhesség során már igen korán csökken (6), amely kedvező a beágyazódás és a magzati fejlődés szempontjából.

Munkacsoportunk a progeszteron-függő immunszabályozás terhesség alatt játszott szerepét vizsgálja. Leírtuk, hogy az egészséges terhesség során az anyai lymphocyták progeszteron receptorokat fejtenek ki (7). A progeszteron receptorok megjelenése a krónikus alloantigén stimuláció következtében (8), amely a magzati antigének anyai immunológiai hatásai egy 34 kDa-os fehérje, a Progeszteron Indukáló Blokkoló Faktor (PIBF) közvetítésével valósulnak meg. A PIBF sokrétű immunológiai hatással rendelkezik: gátolja az NK aktivitást, gátolja a prosztaglandin szintézist és egerekben anti-abortív hatást fejt ki (9).

A PIBF citokinek közvetítésével hat, képes az aktivált lymphocyták citokin termelését TH2 túlsúly irányában eltolni (10).

## CÉLKITŰZÉSEK

### 1. A terhesség korai felismerése az anyai immunrendszer által

A fenti előzmények alapján vizsgálni kívántuk, hogyan jön létre a magzat immunológiai felismerése az anyai immunrendszer által. Feltevéleztük, hogy a megtermékenyítést petesejt képzés jelzést kibocsátani, amelynek hatására az anyai lymphocyták citokin termelése átprogramozódik a TH2 citokin túlsúly irányában. Irodalomból ismert, hogy a megtermékenyítést petesejt lymphocytákra szuppresszív hatást fejt ki (11). Kísérletünkben IVF-ből származó különböző miniatűr vizsgáltuk az aktivált lymphocyták IL-10 termelésére. Az IL-10, a TH2 típusú citokinek egyik legfontosabb képviselője, amely gátolja a TH1 típusú sejtek aktivitását, így a celluláris immunreakciókat (12). Az aktivált lymphocytákat

- petesejteket és spermiumokat tartalmazó tápfolyadék
- folliculáris folyadék
- kontroll tápfolyadék

jelenlétében inkubáltuk 48 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után vizsgáltuk a lymphocytákban az IL-10 mRNA termelését reverz transzkriptáz és PCR segítségével, a sejtek felülírásójából pedig ELISA módszerrel meghatároztuk az IL-10 felhártya mennyiségét.

Eredményeink azt mutatták, hogy a megtermékenyített petesejt jelenlétében a lymphocyták IL-10 termelése szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest és ez a jelenség a mRNA és a felhártya szintjén egyaránt megnyilvánult.

A megtermékenyített petesejt tehát képes olyan jelzést kibocsátani, amelynek hatására az anyai lymphocyták citokin termelése megváltozik és az Interleukin 10 termelés fokozódik. Ez a jelenség feltehetően szerepet játszik a terhesség immunológiai felismerésében.

## 2. Citokinek szerepe a PIBF immunmoduláló és anti-abortív hatásában

A PIBF ismert hatásai az NK aktiválás csökkentése és az anti-abortív hatás. Vizsgálni kívántuk, milyen citokinek játszanak szerepet a fenti hatások kialakulásában. PIBF jelenlétében az aktivált lymphocyták több TH2 típusú citokint, elsősorban több IL-10-et termelnek. Feltehetően, hogy a PIBF az IL-10 közvetítésével csökkenti az NK aktiválást.

Terhes egereken végeztett *in vivo* kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az endogén PIBF neutralizálás a resorbók számának megnövekedését, magas NK aktiválást és a lépesejtek csökkenő IL-10 termelését eredményezte.

A fenti eredményeket kiegészítettük emberi lymphocytákon végzett *in vitro* vizsgálatokkal. A normál terhességből származó lymphocyták PIBF-et termelnek és alacsony NK aktiválást mutatnak. Anti-PIBF és anti-IL-10 kezelés *in vitro* növeli az NK aktiválást. Anti-PIBF hatását az exogén IL-10 hozzáadása ellensúlyozza. Viszont, anti-IL-10 kezelés mellett a kívánthoz bevitelt PIBF képes volt az NK aktiválás csökkentésére, vagyis a PIBF NK aktiválást csökkentő hatása nemcsak tisztán az IL-10 közvetítésével valósult meg. Kimutattuk, hogy a PIBF gátolja az aktivált lymphocyták Interleukin 12 termelését is.

Immuncitokémia segítségével meghatároztuk a PIBF expresszióját egészséges terhesek, valamint fenyegelt koraszülés tüneteit mutató terhesek lymphocytáiban. Ugyanezen csoportokban mértük a TNF $\alpha$  szintjét a szérumban, az L929 egér fibroblast sejtekre kifejtett citotoxikus hatás meghatározása alapján. Egyidejűleg detektáltuk az IL-12 kifejeződését is a lymphocytákon immuncitokémiával.

Eredményeink azt mutatták, hogy a TNF $\alpha$  szintje szignifikánsan magasabb volt a fenyegelt koraszülés tüneteit mutató terhesek csoportjában, mint egészséges terheseknél. A PIBF expressziója a lymphocytákon ezzel fordított arányosságot mutatott. A patológiás terhesséknél az IL-12 expresszió aránya szignifikánsan magasabb volt.

## 3. PIBF hatása a B sejtek aszimmetrikus antitest termelésére

Vizsgálni kívántuk, van-e a PIBF-nek direkt hatása a B sejtek antitest termelésére, különös tekintettel az aszimmetrikus vagy nem-precipitáló antitestek arányára.

A nem-precipitáló antitestek létezése több mint 50 éve ismert (13). Minden emlős immunszérum tartalmaz egy jellegzetes antitest populációt, amely az antigénnel nem képes precipitátumot létrehozni, azonban azonos specifikációs normál ellenanyagok jelenlétében "co-precipitál". A nem precipitáló ellenanyagok szerkezete aszimmetrikus az egyik Fab régióban jelenlévő manózbán gazdag szénhidrátcsoport jelenlétének köszönhetően (14). A szénhidrát csoport gátolja az antitest kapcsolódását az antigénnel, így nem alakul ki térháló szerkezet, vagyis precipitáció. Az ilyen ellenanyagok nem képesek az immunológiai effektor funkciók közvetítésére, mint a komplement fixálás, fagocitózis, antitest dependens citotoxicitás. Az antigénhez azonban kötődnek, így mindegy versengenek az antigénnel az azonos specifikációs ellenanyagokkal, vagyis blokkoló ellenanyagként hatnak.

Az aszimmetrikus ellenanyagok az IgG populációhoz tartoznak, annak kb. 10%-át teszik ki, ez az arány azonban bizonyos körülmények között emelkedhet, akár 50%-ot is elérhet. Terhesség alatt az aszimmetrikus ellenanyagok aránya jelentősen emelkedik, és a placenátról leoldható antitestek nagy része is ebbe a csoportba tartozik (15). Ez alapján feltehetően volt, hogy e potenciális blokkoló ellenanyagok fontos szerepet tölthetnek be a magzat immunológiai védelmében. Feltehetően, hogy a PIBF hatással lehet a B sejtek által termelt aszimmetrikus ellenanyagok arányára. Kimutattuk, hogy a PIBF jelenlétében hybridoma sejtek által termelt aszimmetrikus ellenanyagok aránya szignifikánsan magasabb volt, mint PIBF nélkül.

Öszehasonlíthottuk egészséges terhesek és patológiás terhesek, valamint nem terhes egyének szérumában az aszimmetrikus ellenanyagok arányát. A teljes IgG szint mérése immundiáízis technikával, míg az aszimmetrikus ellenanyagok meghatározása ELISA-val történt. Az egészséges terhesek szérumában az aszimmetrikus antitestek aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a habitális vetélők ill. a nem terhes egyének szérumában. Egyenes arányosságot találtunk a PIBF expresszió lymphocytákon meghatározott mértéke és a szérum aszimmetrikus antitest aránya között.

Egér kísérletekben kimutattuk a kapcsolatot a progeszteron-függő immunológiai szabályozás és az aszimmetrikus ellenanyagok termelődése között. Normál terhes egereket szérumban mért aszimmetrikus ellenanyagok arányát az RU 486-tal (egy ismert progeszteron antagonistával), illetve anti-PIBF-fel kezelt terhes egereket szérumában mért értékhez hasonlíthottuk. A normál terhes egereket szérumban 4-szer több aszimmetrikus ellenanyagot találtunk, mint az RU 486-tal illetve az anti-PIBF-fel kezelt állatok szérumában. Adataink arra utalnak, hogy a progeszteron receptorok blokkolása a PIBF termelődés csökkenésén keresztül vezet az aszimmetrikus ellenanyagok arányának csökkenéséhez.

Bizonyítottuk, hogy az aszimmetrikus ellenanyagok effektor funkciót nem hordoznak. Öszehasonlíthottuk az izolált aszimmetrikus anti-TNF $\alpha$  antitestek effektor funkcióját konvencionális anti-TNF $\alpha$  ellenanyagokéval. A kísérlet során a TNF $\alpha$  L929 sejtekre kifejtett citotoxikus hatást megpróbáltuk gátolni az izolált aszimmetrikus szerkezettel, ill. normál anti-TNF $\alpha$  antitestekkel. Azt tapasztaltuk, hogy az izolált aszimmetrikus antitestek nem gátolták a citotoxikus hatást, ezzel szemben az ugyanolyan koncentrációban adott normál antitestek eredményesen neutralizálták a TNF $\alpha$  hatását.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Kimutattuk, hogy a megtermékenyített petesejt jelenlétében az aktivált lymphocyták szignifikánsan több Interleukin 10-et termelnek. A petesejt tehát olyan információt közöl az anyai immunrendszerrel, amely a lymphocyták citokintermelését megváltoztatja, TH2 típusúvá eredményez.

Elemezzük egyes citokinek szerepét a PIBF immunmoduláló és anti-abortív hatásában. Megállapítottuk, hogy a PIBF NK aktivitást csökkentő hatása részben az IL-10 közvetítésével, részben az IL-12 termelés gátlásával valósul meg.

Kimutattuk, hogy a PIBF expressziójának mértéke szignifikánsan alacsonyabb a patológiás terhések csoportjában mint egészséges terheseknél. Az alacsony PIBF expressziót fokozott NK aktivitás, a szérumban mérhető magas TNF $\alpha$  szint és a lymphocyták fokozott IL-12 expressziója kíséri.

Megállapítottuk, hogy a PIBF fokozza a B sejtek által termelt aszimmetrikus antitestek arányát. Az aszimmetrikus antitestek termelődése a progesteron-függő immunszabályozás befolyása alatt áll. Az aszimmetrikus ellenanyagok nem hordoznak immunológiai effektor funkciót, blokkoló hatású ellenanyagként fontos szerepet játszhatnak a magzat immunológiai védelmében.

## HIVATKOZÁSOK

1. Santoli, D., Trinchieri, G., Zmijewsky, C.M. and Koprowsky, H. IIIA related control of spontaneous and antibody-dependence-mediated cytotoxic activity in humans. *J. Immunol.* 1976, 117, 765-770.
2. Paavonen, T., Andersson, L.C. and Adlercreutz, H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in Pokeweed Mitogen-stimulated cultures. *J. Exp. Med.* 1981, 154, 1935-1945.
3. Pickard, R.E. Varicella pneumonia in pregnancy. *Am. J. Obstet Gynecol.* 1968, 100, 504-506.
4. Gleicher, N., Cohen, C.J. and Deppe, G. Familial malignant melanoma of the female genitalia. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1979, 34, 1-15.
5. Varner, M.W. Autoimmune disorders in pregnancy. *Semin. Perinatol.* 1991, 15, 238-250.
6. Okamura, K., Furukaga, K., Nakakuki, M., Yamada, K., Suzuki, M. Natural killer cell activity during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984, 149, 396-399.
7. Szekeres-Bartho, J., Szekeres, Gy., Debre, P., Aultman, B. and Chaouat, G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 1990, 125, 273-283.
8. Szekeres-Bartho, J., Reznikoff-Elievant, M.F., Varga, P., Pichin, M.F., Varga, Z., Chaouat, G. Lymphocytic progesterone receptors in normal and pathological human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 1989, 16, 239-247.
9. Szekeres-Bartho, J., Kilar, F., Falkay, G., Csernus, V., Torok, A. and Pasa, A.S. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Progesterone treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandine synthesis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 1985, 9, 15-18.
10. Szekeres-Bartho, J. and Wegmann, T.G. A progesterone dependent immunomodulatory protein alters the TH1/TH2 balance. *J. Reprod. Immunol.* 1996, 31, 81-95.

11. Daya, S. and Clark, D.A. Immunosuppressive factor (or factors) produced by human embryos in vitro. *N. Eng. J. Med.* 1986, 315, 24, 1551-1552.
12. Fiorentino, D.F., Bond, M.W. and Mosmann, T.R. Two types of mouse helper T cell IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J. Exp. Med.* 1989, 170, 2081-2095.
13. Heidelberger, M. and Kendall, F.E. A quantitative theory of the precipitine reaction. III. The reaction between crystalline egg albumin and its homologous antibody. *J. Exp. Med.* 1935, 62, 697.
14. Margni, R.A. and Binaghi, R. Purification and properties of non-precipitating antibodies. *Immunology*, 1972, 22, 557.
15. Malan Borrel, I., Gentile, T., Angelucci, J., Pivdori, J., Carmen Guala, M., Binaghi, R.A. and Margni, R.A. IgG asymmetric molecules with antipaternal activity isolated from sera and placenta of pregnant human. *J. Reprod. Immunol.* 1991, 20, 129-140.

#### A JELELT SAJÁT KÖZLEMÉNYEI

1. Early recognition of pregnancy by the maternal immune system. Kelemen, K., Paldi, A., Timneberg, H., Torok, A. and Szekeres-Bartho, J. (Bírálat alatt)
2. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. Szekeres-Bartho, J., Faustl, Zs., Varga, P., szereday, L. and Kelemen, K. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1996, 35, 348-351.
3. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. Kelemen, K., Bognar, I., Paal, M. and Szekeres-Bartho, J. *Cell. Immunol.* 1996, 167, 129-134.
4. Interaction of progesterone- and cytokine-mediated immunomodulatory mechanisms in favor of successful gestation. Szekeres-Bartho, J., Wegmann, T.G., Kelemen, K., Bognar, I., Faustl, Zs. and Varga, P. *Regional Immunology*, 1994, 6, 315-319.