

A progeszteron-függő immunmoduláció NK aktivitást gátló hatása a cytokin termelés és az arachidonsav metabolizmus befolyásolásán keresztül valósul meg

Ph.D. értekezés tézisei

Írta: Dr. Pár Gabriella

PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet
Témavezető: Prof. Szekeres-Barthó Júlia

Pécs, 2001.

BEVEZETÉS

A terhesség során az anya szervezetében fejlődésnek induló magzat fele részben apai, az anya számára idegen antigéneket hordoz. Joggal vetődik fel a kérdés, hogy a magzati szövet miért nem lökődik ki? A terhesség fennmaradását számos immunológiai mechanizmus befolyásolja, így a cytokin termelés mintázatának megváltozása, a természetes ölüsejt (natural killer, NK) aktivitás csökkenése, lokális immunszuppresszív faktorok termelődése.

Munkacsoportunk a progeszteron-függő immunológiai szabályozás szerepét vizsgálja. Szekeres és munkatársai kimutatták, hogy terhesek lymphocytáiban specifikus progeszteron kötő helyek alakulnak ki, melyek expressziójának szabályozása nem hormon-, hanem aktiváció-függő. A terhesség során a progeszteron receptorok (PR) kifejeződésért a magzati krónikus alloantigén stimuláció a felelős. A PR-al rendelkező lymphocyták megfelelő hormonkínálat mellett egy immunmodulátor és anti-abortív hatású fehérjét az ún. progeszteron indukálta blokkoló faktort (PIBF) termelnek, mely szisztémás és lokális hatásai révén járul hozzá a magzat védelméhez. Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy a habituálisan vetélő nők, illetve a spontán terhesség megszakadás klinikai tüneteit mutató asszonyok perifériás vérében szignifikánsan alacsonyabb a PIBF pozitív sejtek aránya, mint az egészséges terhesek perifériás vérében. Ismert, hogy a PIBF in vitro körülmények között gátolja a lymphocytákban az arachidonsav felszabadulást, az NK sejtek aktivitását és egerekben anti-abortív hatású.

Az NK aktivitás fontos szerepet játszik a terhesség spontán megszakadásában. Terhes egerek uterusában a resorbeálódott magzatok helyén NK sejt infiltráció mutatható ki. Normál humán terhességekben az NK sejtek

aktivitása szignifikánsan alacsonyabb mint a nem terhes egyekben, míg a habituálisan vetélő nőknél illetve a szülést közvetlen megelőzően emelkedett NK aktivitás tapasztalható.

Műndezek alapján feltételezhető, hogy a PIBF az NK aktivitást gátló hatása révén a terhesség fennmaradásának fontos tényezője. Nem tisztázott, milyen mechanizmus révén fejt ki a PIBF, NK aktivitást csökkentő hatását, így jelen munkánkban a progeszteron függő immunmoduláció cytookin termelésre és az arachidonsav metabolizmusra kifejtett hatását vizsgáltuk.

CÉLKITŰZÉSEK ÉS EREDMÉNYEK

1. A PIBF anti-abortív hatásában szerepet játszó mechanizmusok Balb/c egerekben (1. számú publikáció)

Ismert hogy magas NK aktivitású lépsejtek transzferjével terhes egerekben abortusz indukálható. Munkacsoportunk korábban kimutatta hogy egyidejű PIBF kezeléssel a fokozott NK aktivitás abortív hatása kivédhető. Ezen adatok indirekt bizonyítékul szolgálnak a PIBF szerepére a normál terhesség fenntartásában. Jelen kísérletek célja annak vizsgálata volt, hogy a normál eger terhesség alatt fiziológiásan termelődött PIBF hatásának semlegesítése előidézi-e abortuszt, és ha igen, milyen mechanizmusok játszanak ebben szerepet

Kimutattuk hogy az endogén PIBF aktivitás semlegesítése egerekben a terhesség megszakadásához vezet. Mind a progeszteron receptorok (PR) blokkolása, mind az anti-PIBF kezelés a resorptiós arány és az NK aktivitás növekedését okozta. Az anti-PIBF kezelés azonban nem minden esetben eredményezte a terhesség megszakadását, az egerek 23 %-a nem reagált. A kezelésre nem reagáló, normál resorptiós arányt mutató egerek lépsejtei szignifikánsan alacsonyabb NK aktivitást fejtettek ki. Pozitív korrelációi mutatunk ki az NK aktivitás és a magzati halálozás között.

Az NK és az NC (natural cytotoxic) aktivitás feltehetőleg a leglényegesebb effektor mechanizmus a magzat és az anya közötti immunológiai kapcsolatban. Kísérleteinkben az állatok egy csoportját a PIBF-et neutralizáló ellenanyag mellett anti-NK (anti-NK1.1, PK136 moAb) és anti-NC (1C4 moAb) ellenanyaggal is kezeltük, annak megállapítása

céljából, hogy az NK ill. NC aktivitás fokozódása szerepet játszik-e az anti-PIBF abortív hatásában.

Eredményeink azt mutatják hogy a PIBF neutralizálásának abortív hatását az egyidejű anti-NK monoklonális ellenanyagokkal történő kezelés kivédi. Az anti-NK kezelés mind a resorptiós arányt, mind az implantációs helyek számát normalizálta. Az anti-NC kezelés –ami a természetes cytotoxicus sejteket neutralizálja- szintén kivédi az anti-PIBF indukálta resorptiót. Adataink arra utalnak hogy mind az NK és NC aktivitás szerepet játszik Balb/c egerek terhességének megszakadásában, illetve hogy a progeszteron-függő immunmoduláció anti-abortív hatását az NK és NC aktivitás gátlásán keresztül fejtí ki. Aktív PIBF jelenléte szükséges a terhesség fenntartásához, annak hiánya (PR-ok blokkolása) vagy inaktiválása (anti-PIBF kezelés) az abortív hatású NK és NC aktivitás emelkedéséhez vezet.

2. A PIBF hatása a cytokin termelésre, kapcsolat a cytokin termelés, NK aktivitás és a terhesség megszakadása között (2. számú publikáció)

A terhesség Th2-szerű jelenség, azaz normális lefolyású gesztáció során a Th2 subpopulációba tartozó T helper sejtek működése kerül túlsúlyba és a Th2 típusú cytokinek irányába tolódik el az immunológiai egyensúly. Mindezek következtében az immunoglobulin termelés fokozott, a celluláris választási készség, különösen az NK aktivitás csökkent mértékű lesz.

Nem teljesen tisztázott, milyen mechanizmus révén fejtí ki a PIBF, NK aktivitást csökkentő hatását. Ismerve a cytokinek NK aktivitást szabályozó szerepét, illetve hogy a PIBF in vitro körülmények között fokozza a mitogén

aktivált lymphocytaik IL-3, IL-4 és IL-10 termelését, jelen munkánkban megvizsgáltuk hogy a progeszteron függő immunológiai szabályozás in vivo milyen cytokinek révén járul hozzá a terhesség sikeréhez. Az anti-PIBF ellenanyaggal oltott terhés Balb/c egerek mitogén aktivált lépsejtjeinek felüliszóiban szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk az IL-10 koncentrációit a normál nyúlsvárvával kezelt kontrollhoz képest. Ugyanakkor a progeszteron-függő immunmoduláció gátlása után (a PR-ok blokkolásával, vagy a PIBF specifikus ellenanyaggal történő neutralizálásával) jelentősen megnőtt az IFN- γ -t expresszáló lépsejtek aránya. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a PIBF hiánya megváltozott cytokin termelést okoz és egyrészt fokozódik a Th1 típusú cytokin, a potens NK sejt aktiváló IFN- γ termelődése, másrészt csökken az IL-10 termelés, mely fontos szerepet játszik a Th1-es sejtek cytokin termelésének gátlása által a terhességre jellemző Th2 súlyozott immunstátusz fenntartásában. Pozitív korrelációi találhatunk az NK aktivitás, a resorptiós arányok és a lépsejtek IFN- γ -termelése között, az IL-10 termelés pedig fordított arányosságot mutatott a magzati károsodás mértékével.

Az anti-PIBF IgG kezelés következtében bekövetkező kedvezőtlen Th1/Th2 cytokinegyensúly eltolódás anti-NK kezeléssel kivédhetőnek bizonyult. A különböző anti-NK ellenanyagok elérté mértékben csökkentették az IFN- γ expressziót. Ezen eredmények arra utalnak hogy a progeszteron-függő immunmoduláció gátlása során megnövekedett Th1-es cytokinek termelését az NK sejtek a felelősek.

A lépsejtek IL-10 expressziója az egyidejű anti-NK kezelés hatására mintegy háromszorosára növekedett az anti-PIBF IgG-vel kezelt csoporthoz képest. Ezen utóbbi eredmények is azt igazolják, hogy a Th1 illetve Th2 típusú

cytokinek bonyolult szabályozó hálózaton keresztül egymás termelődését képesek gátolni, s így vezethet az NK sejtek aktivitásának semlegesítése – valószínűleg az IFN- γ termelés csökkenése révén – az IL-10 termelés fokozódásához még PIBF hiánya esetén is.

Mindenzen adatok alapján feltételezhetjük, hogy a PIBF a cytokin termelés mintázatának megváltoztatása révén befolyásolja a celluláris immunitást. A PIBF hatására az immunológiai egyensúly Th2 irányba tolódik el, s így csökken az IFN- γ illetve fokozódik az IL-10 termelés, mely csökkenti mértékű NK aktivitást eredményez, s így hozzájárul a terhesség sikeréhez.

3. A PIBF IL-12 termelést gátló hatása az arachidonsav metabolizmus befolyásolásán keresztül valósul meg (5. és 6. számú publikáció)

In vitro körülmények között az arachidonsav és a prosztaglandin F2 \square (PGF2 α) koncentráció függően fokozza az NK aktivitást, míg a PGE2 α csökkenti azt. Laboratóriumunk korábbi adatai szerint a szülés megindulása során, az NK aktivitás növekedésével egyidejűleg a lymphocyták PGE2 α érzékenysége csökken, azok cytotoxikus aktivitását fokozó PGF2 α érzékenysége nő, ami arra utal hogy a prosztaglandinok szerepet játszanak az NK aktivitás szülés alatti fokozódásában.

Ismert hogy az IL-12 fokozza a cytotoxikus NK aktivitást, így megvizsgáltuk a prosztaglandin szintézis induktív LPS hatását egészséges terhesek lymphocytáinak IL-12 termelésére. Kimutattuk hogy az LPS kezelés szignifikánsan megnövelte az IL-12 pozitív sejtek százalékos arányát. Ismert hogy a cyclooxygenáz gátló, indomethacin kezeléssel a cytotoxikus aktivitás

gátolható, így megvizsgáltuk az indomethacin illetve a quinaquine (foszfolipáz A2 gátló) hatását az LPS indukálta IL-12 termelésre. Mind a foszfolipáz A2, mind a cyclooxygenáz gátlása koncentráció-függően kvédte az LPS IL-12 termelést fokozó hatását, így valószínűsíthető hogy az LPS a prosztaglandin szintézis fokozása révén indukál IL-12 termelést.

Korábban sikerült összefüggést kimutatnunk a PGF2 α szintek, a lymphocyták progeszteron kötő kapacitása és cytototoxicitása között. Mivel a PIBF egyik hatása az arachidonsav felszabadulás gátlása, így lehetséges hogy a PIBF az NK aktivitást az arachidonsav metabolizmus befolyásolásán keresztül gátolja. Bár a PIBF foszfolipáz A2 gátló képességét még nem vizsgáltuk, feltételezhető hogy a PIBF a cyclooxygenáz és lipoxigenáz enzimek szintje feletti fejt ki hatását, hiszen az NK cytotoxicitást blokkoló hatása exogén arachidonsav jelenlétében kivédhető.

Jelen munkánkban megvizsgáltuk hogy az endogén termelődött PIBF neutralizálása illetve az egyidejű (prosztaglandin szintézist gátló) indomethacin vagy quinaquine kezelés hogyan befolyásolja normál terhesek lymphocytáinak IL-12 termelését. A PIBF hatásának semlegesítése az IL-12 termelés szignifikáns növekedéséhez vezetett. A prosztaglandin szintézis egyidejű gátlása az anti-PIBF kezelés IL-12 termelést fokozó hatását semlegesítette.

A fenti in vitro kísérleti körülmények között kapott adatok összhangban vannak azon vizsgálat eredményeivel, melyben fenyegető terhességmegszakadás klinikai tüneteit mutató magas NK aktivitású, alacsony progeszteron kötő kapacitású lymphocytákkal rendelkező terhesek acetyl-salicilisav kezelése a lymphocyták NK aktivitásának csökkenéséhez és a terhesség sikeres kihordásához vezetett.

Mіндеzen eredmények alapján levonható az a következtetés hogy a PIBF a prosztaglandin szintézis gátlóhoz hasonlóan, azonban az arachidonsav metabolizmus más pontján beavatkozva gátolja az IL-12 termelést és ezáltal csökkenti az NK aktivitást.

ÖSSZEFOGLALÁS

A terhesség normál lefolyását biztosító mechanizmusok egyike a progeszteron függő immunológiai szabályozás. A progeszteron immunmoduláló hatásai egy mediátorfeletje a Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) közreműködésével valósulnak meg.

Munkánkban kimutattuk, hogy az egér terhességében fiziológiásan termelődött PIBF hatásának semlegesítése az NK aktivitás fokozódását és a terhesség megszakadását okozza, míg az NK aktivitás egyidejű gátlásával az anti-PIBF kezelés abortív hatása kivédhető.

Megállapítottuk hogy a PIBF a cytokin termelés mintázatának megváltoztatása révén befolyásolja a celluláris immunitást. Hatására a Th1/Th2 cytokinek aránya a Th2-es cytokinek termelésének irányába tolódik el, s így csökken az IFN- γ illetve fokozódik az IL-10 termelés. Pozitív korrelációt találtunk az NK aktivitás, a magzati halálozás és a lépsejtek IFN- γ termelése között. Kimutattuk hogy a progeszteron-függő immunmoduláció gátlása során megnövekedett Th1-es cytokinek termelésért az NK sejtek a felelősek.

Egészséges terhes nők lymphocytáiban az LPS kezelés a prosztaglandin szintézis fokozása révén megnövelte az IL-12 pozitív sejtek százalékos arányát. A PIBF hatásának semlegesítése az IL-12 termelés növekedéséhez vezetett. Az

anti-PIBF kezeléssel egyidejű prosztaglandin szintézis gátlás az anti-PIBF IL-12 termelést fokozó hatását semlegesítette. A fentiek alapján a következő mechanizmus feltételezhető: egészséges terhesek lymphocytáinak progeszteron kötése PIBF szintézisét eredményezi mely gátolja az arachidonsav felszabadulását, s ezen keresztül a lymphocyták IL-12 termelését, csökkenti NK aktivitást és normál lefolyású terhességet eredményezve.

A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK:

1. Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay Gy, Smart YC, Volgyi Z. The anti-abortion effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell. Immunol.* 1997 May 1; 177 (2): 194-9.
 2. Szekeres-Bartho J, Par G, Szereday L, Smart YC, Achatz I. Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1997 Sep; 38(3): 176-82.
 3. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Polgar B, Par G, Faust Zs, Palkovics T, Szereday L. The role of gamma/delta T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy : a review. *Am J Reprod Immunol.* 1999 Jul; 42 (1): 44-48.
 4. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Polgar B, Par G, Faust Zs, Palkovics T and Szereday L: Nonspecific Immunological Mechanisms and Hormones in Reproductive Immunology, S.K. Gupta (Ed) Copyright 1999 Narosa Publishing House
 5. Par G, Bartok B, Szekeres-Bartho J. Cyclooxygenase is involved in the effects of progesterone-induced blocking factor on the production of interleukin 12. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Jul; 183 (1):126-30.
 6. Par G, Geli J, Kozma N, Varga P, Szekeres-Bartho J. Phospholipase A2 is involved in the progesterone-dependent regulation of the IL-12 expression by pregnancy lymphocytes. (submitted)
 7. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T and Szereday L. Progesterone as an immunomodulatory molecule *Int Immunopharm.* 2001; 1: 1037-48.
- Egyéb közlemények :**
1. Pár A, Paál M, Horányi M, Par G, Gasztonyi B, Szekeres B. J., Mózsik Gy. Role of viral and host factors in the pathogenesis of Hepatitis C Virus

infection and in the response to interferon treatment. *Periodicum Biologorum* 1998. Vol. 100. No. 4. 515-519.

2. Pár A, Paál M, Horányi M, Szekeres-Barthó J, Kádás I, Hegedus G, Gasztonyi B. Pár G, Mózsik Gy: A hepatitis C vírus (HCV) infekció patogeneziséét és az antivirális terápiára való válaszkapességet befolyásoló virális és gazda tényezők vizsgálata. *Magy. Belorv. Arch.* 52: 9-14 (1999)
3. Par G, Rukavina D, Podack ER, Horányi M, Szekeres-Bartho J, Hegedus G, Paál M, Mózsik Gy, Par A. Decrease in CD3-negative-CD8⁺ and V δ 2/V γ 9 TcR⁺ lymphocyte counts and low perforin expression is associated with impairment of natural killer cell activity in chronic hepatitis C virus infection. (submitted)

Kongresszusi Részvétel :

1994. okt. Magyar Immunológiai Társaság XXIV. Kongresszusa, Szolnok
A PIBF anti-abortív hatása egerekben az NK aktivitás gátlásán keresztül valósul meg
Dombay Gy, Mihók M, Pár G, Volgyi Z, Szekeres-Barthó J. (poszter)
1995. okt. Magyar Immunológiai Társaság XXV. Kongresszusa, Debrecen
A progesteron-függő immunmoduláció gátlása egerekben a cytokin termelés megváltozásán keresztül vezet az NK aktivitás fokozódásához és a terhesség megszakadásához
Dombay Gy, Pár G, Szereday L, Volgyi Z, Szekeres-Barthó J. (poszter)
1996. dec. First Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania, Adelaide, Ausztrália
The anti-abortion effect of progesterone induced blocking factor in mice
G. Pár, Gy. Dombay, Z. Volgyi, J. Szekeres-Barthó, C.Y. Smart (poszter)
1997. okt. Magyar Immunológiai Társaság XXVII. Kongresszusa, Szeged
A progesteron-függő immunmoduláció hatása a terhesség alatt cytokinek közvetítésével valósul meg
Pár G, Dombay Gy, Szekeres-Barthó J, Smart YC. (előadás)
1998. szept. Fourth Meeting of Alps Adria Society for Immunology of Reproduction, Opafija, Horvátország
Role of viral and host factors in the pathogenesis of Hepatitis C Virus infection and in the response to interferon treatment
Pár G, Pár A, Paál M, Horányi M, Gasztonyi B, Szekeres B. J., Mózsik Gy. (előadás)
1998. okt. Magyar Immunológiai Társaság XXVIII. Kongresszusa, Harkány

A PIBF NK aktivitást gátló hatása az arachidonsav metabolizmus befolyásolásán keresztül valósul meg Pár G, Bartók B, Szekeres-Barthó J. (előadás)

1999, máj. International Conference of the International Society for Analytical Cytology, Future Trends In Quantitative Cytology, Hortobágy. Phenotyping of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis C. G. Pár, A. Pár, Zs. Faust, J. Szekeres (poszter)

1999, okt. Basel Liver Week, Basel, Svájc.
Phenotyping of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis C and the effect of interferon treatment. G. Pár, A. Pár, Zs. Faust, J. Szekeres-Barthó (poszter)

1999, okt. European Meeting of Immunology and Reproduction, Róma
Cyclooxygenase is involved in the effect of Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) on IL-12 production. G. Pár, B. Bartók, J. Géli, J. Szekeres-Barthó (előadás)

2000, ápr. 35th-Meeting of European Association of the Study of the Liver (EASL), Rotterdam, Hollandia
Decrease in CD3-CD8 and Vgamma9/Vdelta2 -TCR+ T cell count and low perforin expression is associated with an impairment of NK cell activity in Hepatitis C Virus Infection. G. Pár, A. Pár, D. Rukavina, M. Horányi, J. Szekeres, G. Hegedűs, M. Paál, Gy. Mózsik (poszter)

2000. máj. MIT és a MAKIT vezetőségének X. Továbbképzése, Salgóbánya
A progesteron receptor feladata az immunregulációban Pár G.(előadás)

2000, jun. Sixth Meeting of Alps Adria Society for Immunology of Reproduction, Pécs.
Arachidonic acid metabolism is involved in the IL-12 expression of pregnancy lymphocytes. G. Pár, J. Géli, N. Kozma, J. Szekeres-Barthó (poszter)

2000. okt. Magyar Immunológiai Társaság XXX. Kongresszusa, Budapest
A hisztamin szerepe a reprodukcióban Pár G, Kozma N, Szekeres-Barthó J, Buzás E, Falus A. (előadás)

2001. ápr. 36th-Meeting of EASL, Prága, Csehország
Decreased IL-18 production of peripheral blood mononuclear cells in hepatitis C virus infection G. Pár, A. Pár, M. Horányi, J. Szekeres-Barthó, G. Hegedűs, Gy. Mózsik (poszter)

2001. jun. 21. I. Becton Dickinson Symposium, Budapest
Celluláris immunitás vizsgálata hepatitis C fertőzésben Pár G, Szekeres-Barthó J, Paál M, Hegedűs G, Horányi M, Mózsik Gy, Pár A. (előadás)