

# **IMPLANTÁCIÓS ZAVAROK IMMUNOLÓGIAI HÁTTERE**

**Dr. Mikó Éva**

**Ph.D. Értekezés**

**Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézet**

**Program- és témavezető: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia**

**Pécs**

**2009**



## BEVEZETÉS

A terhesség során megfigyelhető anyai immunregulációs folyamatok természetes modellként szolgálnak a transzplantáció során mesterségesen elérni kívánt toleranciamechanizmusoknak. Ugyan a magzati antigének 50%-a apai eredetű, és egyértelműen bizonyított, hogy ezek az antigének felismerésre kerülnek, az anya immunrendszere tolerálja a szemiallogén magzatot. Miközben a méhben a magzat számára előnyös lokális változások zajlanak, az anyai immunrendszernek emellett az estelegesen fellépő fertőzések kivédését is biztosítani kell. Ezért egy törekeny egyensúly jön létre az anya és magzatának ellentétes érdekeit egyaránt figyelembe véve.

Miután a magzat a terhesség során nem kerül közvetlen kapcsolatba az anya szervezetével, a trophoblast képviseli a méhlepény magzati oldalát. A chorionbolyhokat borító sokmagvú syncytiotrophoblast-sejtek közvetlenül érintkeznek az intervillózus üregeken átfolyó anyai vérrel. A deciduális sejtekkel direkt kontaktust teremtő extravillózus cytotrophoblast-sejtek alkotják a trophoblast invazív subpopulációját és egy igen speciális HLA antigén-kombinációt fejeznek ki felszínükön: HLA-G-t, HLA-E-t és kis mennyiségben HLA-C-t. A HLA-G és HLA-E ún. nem klasszikus első osztályú molekulák, polymorphizmusuk korlátozott és a sejtfelszínen alacsony számban jelennek meg. A HLA-C klasszikus polymorph első osztályú molekula, ezáltal a fetomaternalis határon az apai antigének is reprezentáltak. Miután a klasszikus HLA-antigének többségét egyik trophoblast populáció sem expresszálja, a magzati antigének prezentációja többnyire nem-MHC korlátozott módon zajlik. A deciduális trophoblast-inváziót, továbbá a spirális artériák átalakulását részben a bevándorolt anyai immunsejtek kontrollálják, amelyek képesek felismerni a szemiallogén magzatot és ezáltal hozzájárulnak a terhesség zavartalan lefolyásához.

A deciduában három viszonylag kis lymphocyta-populáció szignifikáns mértékben felhalmozódik és kiemelkedően fontos szerepet játszik az implantáció, placentáció és a korai magzati fejlődés folyamataiban. Az NK sejtek, a  $\gamma/\delta$  T sejtek és az iNKT sejtek sok közös jellemzővel bírnak:

- mindegyik sejtípus képes az antigének felismerésére MHC restrikció nélkül.
- a természetes és szerzett immunitás között fontos áthidaló szerepük van, mivel mind immunreguláló (pl. citokintermelés), mind cytotoxicus funkciókra képesek.
- mind a három sejtfeleség speciális szöveti eloszlást mutat: az NK sejtek a deciduában halmozódnak szignifikáns mértékben, a  $\gamma/\delta$  T sejtek a deciduában és a

mucosalis felszíneken, az iNKT sejtek pedig a májban, a csontvelőben és a deciduában.

- a célsejteket képesek szekretoros (perforin/granzym mediálta) úton és nem szekretoros (Fas-ligand közvetítette apoptózis) úton elpusztítani.
- mindegyikük expresszál a felszínén NK gátló és aktiváló receptorokat.

A cytotoxikus aktivitás a lymphocyta felszínén kifejeződő NK aktiváló és gátló receptorok ligandkötése által kiváltott intracelluláris szignálok eredményeképpen jön létre. Az NK receptorok szerkezetük alapján 3 nagy családba sorolhatóak: Immunoglobulin (Ig)-like receptor (KIR) szupercsalád, amely klasszikus MHC-1 molekulákat ismer fel; a nem klasszikus HLA-antigénekhez kötődő C-típusú lectin szupercsalád; továbbá az ún. „natural cytotoxicity” receptorcsalád, melyeknek ligandjait eddig nem sikerült azonosítani.

A trophoblast által kifejezett magzati antigének deciduális felismerése hozzájárul az implantáció és a trophoblast-invázió kontrolljához. A deciduális NK sejtek, iNKT sejtek és  $\gamma/\delta$  sejtek nem polymorph HLA-G és HLA-E molekulákhoz történő kapcsolódása Th-2 típusú citokinek szekréciójához vezet. Ugyanakkor a trophoblaston expresszálódó apai eredetű HLA-C molekulák klasszikus gyulladáshoz váltanak ki lokálisan, amely a szöveti struktúra fellazulásával megkönnyíti a trophoblast-inváziót, a gyulladáshoz vezető folyamatok során termelődött IFN- $\gamma$  pedig katalizálja a spirális artériák átalakulását.

Az implantációs folyamatokban bekövetkezett zavarok megnyilvánulhatnak korai, tünetmentes vetélés formájában vagy olyan szülészeti kórképekben, amelyekben a koraterhes időszak zavartalan és a klinikai tünetek később, a terhesség előrehaladtával jelentkeznek. A habituálisan vetelő nők esetében számos vizsgálat igazolta a deciduális lymphocyták túlzott mértékű aktivitását és a periférián is kimutatható volt a Th1-es típusú dominancia.

Pre-eklampsziában a kisebb mértékű trophoblast-invázió következtében elégtelen a placentáció és a spirális artériák fejlődése zavart szenved. A terhesség előrehaladtával az egyre növekvő magzat igényei megkövetelik a placenta vérellátásának fokozódását, ami azonban ebben az esetben csak az anyai keringés károsodásával biztosítható.

## CÉLKITŰZÉSEK

*Célunk a pathológiás terhes nők perifériás vérében megfigyelt immunológiai jellemzők összehasonlítása volt egészséges terhes nők és nem terhes egyének értékeivel.*

1.  $\gamma\delta$  T sejtek sajátosságait vizsgáltuk meg fenyegető koraszülés jeleit mutató nőkben, egészséges terhesekben és nem terhes nőkben.
2.  $\gamma\delta$  T sejtek és regulátor T sejtek sajátosságait vizsgáltuk pre-eklampsziás nőkben, egészséges terhesekben és nem terhes nőkben.
3. iNKT sejtek sajátosságait vizsgáltuk pre-eklampsziás nőkben, egészséges terhesekben és nem terhes nőkben.

Munkánk során elsősorban a sejtek cytotoxicus perforinexpressziójára, pro-inflammatorikus IFN- $\gamma$  expressziójára, apoptotikus kapacitására (Fas/CD95 expresszió, annexin V pozitivitás), aktiváltságára (CD69+) és NK sejt receptor expressziós mintázatára fókuszáltunk.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Vizsgált csoportok*

Összesen 251 nőt vontunk be a vizsgálatokba. A donorok klinikai adatait az alábbi táblázat foglalja össze:

<b>Csoportok</b>	<b>Egészséges terhes (n=124)</b>	<b>Pre-eklampszia (n=41)</b>	<b>Fenyegető koraszülő (n=24)</b>	<b>Nem terhes nő (n=62)</b>
<b>Életkor</b> (átlag)	28.16	26.3	27.8	29,6
<b>Terhességi kor</b> (átlag $\pm$ SEM)	32.43 (24-41)	35.2 (29-41)	30.33 (24-37)	-
<b>Paritás</b> (átlag $\pm$ SEM)	0.85 (0-3)	0.30 (0-2)	0.21 (0-1)	-
<b>Előző vetélések száma</b> (átlag $\pm$ SEM)	0.30 (0-3)	0.11 (0-1)	0.47 (0-4)	-

### *Lymphocyták izolálása perifériás vénás vérből*

Mononukleáris sejteket izoláltunk heparinizált vénás vérből Ficoll Paque gradiens segítségével. A sejteket kétszer mostuk RPMI 1640 mediumban majd számoltuk és koncentrációjukat  $1 \times 10^6$ /ml-re állítottuk be.

### *MiniMACS $\gamma\delta$ T sejt szeparálás*

Perifériás mononukleáris sejtekből V $\delta$ 2+ T sejteket MiniMACS immunmágneses gyöngyök segítségével szeparáltuk a gyártó útmutatója szerint. A sejteket PBS-sel mostuk, majd 10 millió lymphocytát anti-V $\delta$ 2 monoclonal ellenanyaggal jelöltünk. Az jelölés után sejteket mostuk és anti-egér IgG mikrogyöngyökkel inkubáltuk. Az immunmágnesesen jelölt sejteket mágneshez kötött MiniMACS oszlopra rétegeztük. Az oszlopot többször átmostuk, majd eltávolítottuk a mágnesegységről. Az oszlophoz előzőleg mágnesesen kötődött sejteket az oszlop dugattyús átöblítésével egy csőbe gyűjtöttük. Az így nyert sejtuszpenzió összetételét flow cytometriás mérésel ellenőriztük. Az izolált sejtek 75-80 %-a V $\delta$ 2 T sejt volt.

### *A lymphocyták jelölése és flow cytometriás analízise*

50  $\mu$ l heparinizált vénás vért ugyanennyi 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 médiummal hígítottunk majd a fluorochrommal konjugált monoklonális antitesttel szobahőmérsékleten jelöltük. A felszíni jelölés után a vörös vértesteket lizáltuk és a sejteket paraformaldehid-oldatban fixáltuk.

A perforin tartalmozó sejtek azonosítására a felszínen jelölt sejteket permeabilizáltuk, majd fluorochrommal konjugált anti-humán perforin monoklonális antitesttel jelöltük. A jelölés után a sejteket paraformaldehid-oldatban fixáltuk.

A citokint tartalmazó sejtek azonosítására 500  $\mu$ l heparinizált vénás vért 1:1 arányban hígítottunk 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 médiummal. A citokintermelés fokozásának céljából a sejteket brefeldin A-val, phorbol myristyl acetáttal és ionomycinnel stimuláltuk. A mintákat 4 óráig inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó környezetben. A stimuláció után a sejteket felszínen jelöltük, majd permeabilizáltuk és fluorochrommal konjugált anti-humán monoklonális citokin-ellenanyaggal jelöltük. Végül a sejteket mostuk és paraformaldehid-oldatban fixáltuk.

A flow cytometriás analízisig minden mintát sötétben, 4 °C-on tároltunk. A jelölt sejteket FACSCalibur flow cytométerrel a CellQuest szoftverprogram segítségével mértük és analizáltuk.

#### *Apoptotikus V $\delta$ <sup>2+</sup> T sejtek meghatározása annexin V jelöléssel*

A mágnesgyönggyel szeparált V $\delta$ <sup>2+</sup> lymphocytákat annexikötő-pufferben reszuszpendáltuk és biotinizált annexin V-tel jelöltük. A jelölés után a sejteket mostuk majd streptavidin-APC-vel és propidium iodiddal inkubáltuk. A mintákat FACSCalibur flow cytométerrel analizáltuk. A csak annexin V-tel és a csak propidium iodiddal jelölődött sejteket vizsgáltuk. Az apoptotikus sejtek annexinnel festődnek, míg a nekrotikus sejtek propidium iodid pozitívak.

### **EREDMÉNYEK**

**1/a:** Meghatároztuk a keringő V $\delta$ <sup>2+</sup> és V $\delta$ <sup>1+</sup> T sejtek arányát egészséges terhesekben, fenyegető koraszülés jeleit mutató nőkben és nem terhesekben. A kontroll nem terhes csoporthoz képest mindkét  $\gamma/\delta$  T sejt populáció szignifikáns emelkedést mutatott egészséges terhesekben. Ugyanakkor fenyegető koraszülés esetén a V $\delta$ <sup>2+</sup> T sejtek aránya szignifikánsan magasabb, míg a V $\delta$ <sup>1+</sup> T sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges terhesek adataihoz viszonyítva.

**1/b:** A fenyegető koraszülés jeleit mutató nők perifériás V $\delta$ <sup>2+</sup> T sejtjeinek NKG2A gátló NK receptor expressziója szignifikáns mértékben csökkent mind az egészséges terhesek, mind a nem terhesek értékeihez képest.

**1/c:** Egészséges terhes nőkben szignifikánsan magasabb az apoptotikus Annexin V<sup>+</sup> V $\delta$ <sup>2+</sup> T sejtek száma, mint fenyegető koraszülés jeleit mutató nőkben.

**2/a:** Pre-eklampsziás és nem terhes nőkben szignifikánsan magasabb az intracellulárisan perforint illetve IFN- $\gamma$ -t tartalmazó V $\delta$ <sup>2+</sup> T lymphocyták aránya, mint egészséges terhesség esetén.

**2/b:** A V $\delta$ <sup>2+</sup> t sejtek felszíni Fas (CD95) expressziója pre-eklampsziában szignifikáns mértékben csökkent.

**2/c:** Különböző NK sejt receptorok expresszióját vizsgálva a három populációban azt találtuk, hogy nem terhesek és egészséges terhesek értékeihez képest pre-eklampsziában a

V $\delta$ 2+ T sejtek NKG2A (gátló receptor) expressziója szignifikánsan csökken, míg az NKG2C-t kifejező (aktiváló receptor) sejtek száma szignifikánsan emelkedik. A két receptor co-expressziója (NKG2A/NKG2C) a pre-eklampsziás V $\delta$ 2+ T sejtek felszínén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a másik két vizsgált csoporttal összehasonlítva.

**2/d:** A TIM-3+ V $\delta$ 2+ T sejtek száma pre-eklampsziás nőkben szignifikáns mértékben csökkent. A TIM-3 (T cell immunoglobulin mucin 3) molekula a szövetkárosító immunválaszok negatív szabályozójaként ismert.

**2/e:** Pre-eklampsziában a regulátor T sejtek (CD4+/CD25<sup>bright</sup>) száma nem terhes egyénekhez képest szignifikáns mértékben csökkent. Aktivációt követően a T sejtek felszínén fokozottan expresszálódik a CTLA-4 molekula (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4) A regulátor T sejtek CTLA-4 expressziója a beteg csoportban szignifikánsan megemelkedik.

**3/a:** A perifériás iNKT sejtek szignifikánsan nagyobb aránya aktivált (CD69 expresszió) pre-eklampsziás nőkben mint a másik két vizsgált populációban.

**3/b:** Pre-eklampsziás és nem terhes nőkben szignifikánsan magasabb az intracellulárisan perforint illetve IFN- $\gamma$ -t tartalmazó iNKT lymphocyták aránya, mint egészséges terhesség esetén.

**3/c:** Egészséges terhesekben szignifikánsan magasabb a Fas+ (CD95+) iNKT sejtek száma nem terhesek és pre-eklampsziás betegek értékeihez képest.

**3/d:** Különböző NK sejt receptorok expresszióját vizsgálva a három populációban azt találtuk, hogy míg az iNKT sejtek NKG2D aktiváló receptor-expressziója nem mutat eltérést a csoportok között, az NKG2A expresszió, továbbá az NKG2A/NKG2D co-expresszió iNKT sejtek felszínén szignifikánsan csökken pre-eklampsziában egészséges terhesekhez viszonyítva. Pre-eklampsziás NKG2D+ iNKT sejtek felszínén szintén szignifikánsan csökken az NKG2A gátló receptor kifejeződése.

## **TÉZISEK, AZ ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

1. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a perifériás  $\gamma/\delta$  T sejteknek szerepük van a fenyegető koraszülés pathogenesisében. A potenciálisan cytotoxikus V $\delta$ 2+ T sejtek dominanciája, csökkent NKG2A gátló receptor expressziója és redukált apoptotikus kapacitása hozzájárulnak az egészséges terhességben megfigyelt Th2-dominancia hiányához. Adataink szerint a periférián megfigyelt elváltozások

korrelálnak a lokális folyamatokkal, így a perifériás vérből elvégzett immunológiai vizsgálatok diagnosztikus információkkal bírhatnak.

2. Igazoltuk, hogy pre-eklampsziában a perifériás V $\delta$ 2+ T sejtek pro-inflammatorikus, Th1-es irányú polarizációt mutatnak magasabb perforin és IFN- $\gamma$  expresszióval és csökkent TIM-3 kifejeződéssel. Ezen sejtek megváltozott gátló és aktiváló NK receptor expressziós mintázata magyarázatul szolgál megfigyeléseinkhez. A csökkent apoptózis-készség hosszabb élettartamot biztosít a megnövekedett cytotoxikus potenciállal rendelkező V $\delta$ 2+ t sejteknek tovább növelve a sejtpopuláció pathológiás elváltozásának mértékét pre-eklampsziában. Megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a megváltozott V $\delta$ 2+ T sejtek aktív részesei a pre-eklampszia második, szisztémás gyulladással kísért klinikai fázisának.
3. A regulátor T sejtek szignifikánsan lecsökkent aránya pre-eklampsziás betegek perifériás vérében elégtelen toleranciaindukcióra utal. A csökkent számú regulatorikus T sejtek az egészségesnél magasabb aktivációt mutatnak.
4. Kimutattuk, hogy pre-eklampsziában a perifériás iNKT sejtek pathológiás mértékben aktiváltak és a V $\delta$ 2+ T sejtekben már megfigyelt módon Th1 irányban polarizáltak. A két sejtpopuláció párhuzamos elváltozása közös kiváltó okot, és központi regulatorikus mechanizmusokat feltételez.

#### A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ CIKKEK

**Miko E., Szereday L., Barakonyi A., Jarkovich A., Varga P., Szekeres-Bartho J.:** Immunoactivation in pre-eclampsia: V $\delta$ 2+ and regulatory T cells during the inflammatory stage. **J. Reprod. Immunol.** 2009;80:100-108 (*Impact factor: 3,011*)

**Miko E., Szereday L., Barakonyi A., Jarkovich A., Varga P., Szekeres-Bartho J.:** The role of invariant NKT cells in pre-eclampsia. **Am. J. Reprod. Immunol.** 2008;60:118-126. (*Impact factor: 2,13*)

Barakonyi A., **Miko E.,** Varga P., Szekeres-Bartho J.: V-chain preference of gamma/delta T-Cell Receptors in peripheral blood during term labor. **Am. J. Reprod. Immunol.** 2008;59:201-205. (*Impact factor: 2,13*)



Luchetti C.G., **Miko E.**, Szekeres-Bartho J., Agustin D.P., Motta A.B.: Dehydroepiandrosterone and metformin are modulators of progesterone-induced blocking factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant BALB/c mice.

**J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 2008;111:200-207. (*Impact factor: 2,82*)

Polgar B., Nagy E., **Miko E.**, Varga P., Szekeres-Bartho J.: Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. **Biol. Reprod.** 2004;71:1699-1705. (*Impact factor: 3,55*)

Szereday L., Barakonyi A., **Miko E.**, Varga P., Szekeres-Bartho J.:  $\gamma\delta$  T cell subsets, NKG2A expression and apoptosis of V $\delta$ 2+ T cells in pregnant women with or without risk for premature pregnancy termination. **Am. J. Reprod. Immunol.** 2003;6: 490-496. (*Impact factor: 2,088*)

Polgar B., Kispal G., Lachmann M., Paar C., Nagy E., Csere P., **Miko E.**, Szereday L., Varga P., Szekeres-Bartho J.: Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. **J. Immunol.** 2003;171:5956-5963. (*Impact factor: 6,702*)

Barakonyi, A., Kovacs KT., **Miko, E.** Szereday L., Varga P., Szekeres-Bartho J.: Recognition of nonclassical HLA class I antigens by gamma/delta T cells during pregnancy. **J. Immunol.** 2002;168:2683-2688. (*Impact factor: 7,145*)

Szekeres-Bartho J., Barakonyi A., **Miko E.**, Polgar B., Palkovics T.: The role of gamma/delta T cells in the fetomaternal relationship.

**Semin. Immunol.** 2001;13:229-233. (*Impact factor: 6,022*)

## **EGYÉB CIKKEK**

A.Peterfalvi, T. Molnar, M. Banati, G. Pusch, **E. Miko**, L. Szereday, Z. Illes:

Impaired function of innate T lymphocytes and NK cells in the acute phase of ischemic stroke

**Cerebrovasc. Dis. in press** (*Impact factor: 3,041*)

## **KÖNYVFEJEZET:**

Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, **Miko E**, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P. Progesterone-dependent immunomodulation. **Chem. Immunol. Allergy.** 2005;89:118-25.

## **IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK:**

L. Szereday, A. Barakonyi, **E. Miko**, P. Varga, J. Szekeres-Bartho. Gamma/delta T cell subsets, NKG2D expression and apoptosis of Vdelta2+ T cells in pregnant women with or without risk for premature pregnancy termination. In: Hippokration congress on reproductive immunology : The 4th congress of the European Society for Reprod. and Developm. Immunology. Rhodes **J. Reprod. Immunol.** 2003;58:2. - 157.

J. Szekeres-Bartho, A. Barakonyi, **E. Miko**, L. Szereday, P. Varga. Recognition of non-classical HLA antigens by gamma/delta T cells / In: Hippokration congress on reproductive immunology : The 4th congress of the European Society for Reprod. and Developm. Immunology. Rhodes **J. Reprod. Immunol.** 2003;58:2-157.

J. Szekeres-Bartho, B. Polgar, E. Nagy, **E. Miko**, N. Kozma, T. Palkovics, O. Papp and Melinda Halasz: Genomic bases of progesterone-dependent immunomodulation **Tissue Antigens**, 2004; 64:356-357.

Influence of HLA-G and HLA-E on PIBF signaling and cytokine production.

**E Miko**, N Kozma, J Szekeres-Bartho

Abstracts and poster abstracts from the 4th European Congress of Reproductive Immunology. July5-9, 2006, Graz, Austria **Am. J. Reprod. Immunol.** 2006 ;56:1-61.

L. Szereday, A. Barakonyi, **E. Miko**, L. Lynch, C.O. Farrelly, P. Varga, J. Szekeres-Bartho Haematopoietic Stem Cells in human decidua. 5th European Congress of Reproductive Immunology Aug 30 – Sept 1 Berlin , Germany **Am. J. Reprod. Immunol.** 2007;58:236.

J. Szekeres-Bartho, B. Polgar, M. Halasz, N. Kozma, **E. Miko**, T. Palkovics, A. Barakonyi, L. Szereday Progesterone-dependent immunomodulation. 5th European Congress of

Reproductive Immunology Aug 30 – Sept 1 Berlin , Germany **Am. J. Reprod. Immunol.** 2007; 58: P187.

Szereday L, **Miko E**, Barakonyi A, Szekeres-Bartho J. The role of  $\gamma/\delta$  T cell in the pathogenesis of pre-eclampsia. Federation of Clinical Immunology Societies 8th Annual Meeting (FOCIS) Boston, USA, June 5-9, 2008. **Clin. Immunol.** 2008;127:158.