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 túléljen és zavartalanul fejlődjön a potenciálisan veszélyes anyai környezetben.
A terhesség során a sejtes immunreakciók átmeneti csökkenése (1) és a humorális immunitás túlsúlya alakul ki (2). Ezt jelzi, hogy a fertőzések (3) és daganatos betegségek (4) gyakorisága megnő a terhesség alatt. Az autoimmun kórképek 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 fellobbanását 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 fejeznek ki (7). A progeszteron receptorok megjelenése a krónikus alloantigén stimuláció következménye (8), amely a magzati antigének anyai immunrendszer által történő felismerésének fontosságára utal. A progeszteron immunológiai hatásai egy 34 kDa-os fehérje, a Progeszteron Indukálta 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 terheség korai felismerése az anyai immunrendszer által

A fenti előzmények alapján vizsgálni kívántuk, hogyan jön létre a magzat immunológiai felismerése az anyai immunrendszer által. Feltételeztük, hogy a megtermékenyített petesejt képes jelzést kibocsátani, amelynek hatására az anyai lymphocyták citokin termelése átprogramozódik a TH2 citokin túlsúly irányában. Irodalomból ismert, hogy a megtermékenyített petesejt lymphocytákra szupresszív hatást fejt ki (11). Kísérleteinkben IVF-ből származó különböző minták hatását vizsgáltuk az aktivált lymphocyták IL-10 termelésére. Az IL-10, a TH2 tipusú citokinek egyik legfontosabb képviselője, amely gátolja a TH1 tipusú sejtek aktivitását, így a celluláris immunreakciókat (12). Az aktivált lymphocytákat
a). petesejteket és spermiumokat tartalmazó tápfolyadék
b). folliculáris folyadék
c). kontroll tápfolyadék

jelenlétében inkubáltuk 48 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után vizsgáltuk a lymphocytákban az IL-10 mRNS termelődését reverz transzkripció és PCR segítségével, a sejtek felülúszójából pedig ELISA módszerrel meghatároztuk az IL-10 fehérje mennyiségét.
Eredményeink azt mutatták, hogy a megtermékenyített petesejt jelenlétében a lymphocyták IL-10 termelése szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest és ez a jelenség a mRNS és a fehérje 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 aktivitás csökkentése és az anti-abortív hatás. Vizsgálni kívántuk, milyen citokinek játszanak szerepet a fenti hatások kialakulásában. PIBF jelenlétében az aktivált lymphocyták több TH2 tipusú citokint, elsősorban több IL-10-et termelnek. Feltételeztük, hogy a PIBF az IL-10 közvetítésével csökkenti az NK aktivitást.
Terhes egereken végzett in vivo kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az endogén PIBF neutralizálása a resorbtiók számának megnövekedését, magas NK aktivitást és a lépsejtek csökkent 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 aktivitást mutatnak. Anti-PIBF és anti-IL-10 kezelés in vitro növeli az NK aktivitást. Anti-PIBF hatását az exogén IL-10 hozzáadása ellensúlyozta. Viszont, anti-IL-10 kezelés mellett a kívülről bevitt PIBF képes volt az NK aktivitás csökkentésére, vagyis a PIBF NK aktivitást csökkentő hatása nemcsak kizárólag 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 fenyegető koraszülés tüneteit mutató terhesek lymphocytáin. Ugyanezen csoportokban mértük a TNFα szintjét a szérumban, az L929 egér fibroblaszt sejtekre kifejtett citotoxikus hatás meghatározása alapján. Egyidejűleg detektáltuk az IL-12 kifejeződését is a lymphocytákon immuncitokémiával.
Eredményeink azt mutatták, hogy a TNFα szintje szignifikánsan magasabb volt a fenyegető koraszülés tüneteit mutató terhesek csoportjában, mint egészséges terheseknél. A PIBF expressziója a lymphocytákon ezzel fordított arányosságot mutatott. A pathológiás terheseknél 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 specificitású normál ellenanyagok jelenlétében "co-precipitál". A nem precipitáló ellenanyagok szerkezete aszimmetrikus az egyik Fab régióban jelenlévő mannózban gazdag szénhidrátcsoport jelenlétének köszönhetően (14). A szénhidrát csoport gátolja az antitest kapcsolódását az antigénnel, így nem alakul ki térhálós 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 mintegy versengenek az antigénért az azonos specificitású 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 placentáról leoldható antitestek nagy része is ebbe a csoportba tartozik (15). Ez alapján feltételezhető volt, hogy e potenciális blokkoló ellenanyagok fontos szerepet tölthetnek be a magzat immunológiai védelmében. Feltételeztük, hogy a PIBF hatással lehet a B sejtek által termelt aszimmetrikus ellenanyagok arányára. Kimutattuk, hogy a PIBF jelenlétében hybridóma sejtek által termelt aszimmetrikus ellenanyagok aránya szignifikánsan magasabb volt, mint PIBF nélkül.
Összehasonlítottuk egészséges terhesek és pathológiás terhesek, valamint nem terhes egyének szérumában az aszimmetrikus ellenanyagok arányát. A teljes IgG szint mérése immundiffúziós technikával, míg az aszimmetrikus ellenanyagok meghatározása ELISA-val történt. Az egészséges terhesek szérumában az aszimmetrikus antitestek aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a habituális 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 egerek szérumában mért aszimmetrikus ellenanyagok arányát az RU 486-tal (egy ismert progeszteron antagonistával), illetve anti-PIBF-fel kezelt terhes egerek szérumában mért értékhez hasonlítottuk. A normál terhes egerek szérumában 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. Összehasonlítottuk az izolált aszimmetrikus anti-TNFα antitestek effektor funkcióját konvencionális anti-TNFα ellenanyagokéval. A kísérlet során a TNFα L929 sejtekre kifejtett citotoxikus hatását megpróbáltuk gátolni az izolált aszimmetrikus szerkezetű, ill. normál anti-TNFα antitestekkel. Azt tapasztaltuk, hogy az izolált aszimmetrikus antitestek nem gátolták a citotoxikus hatást, ezzel szemben az ugyanolyan koncentrációban adott normál antitestek eredményesen neutralizálták a TNFα 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 túlsúlyt eredményez.
Elemeztük 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 pathológiás terhesek csoportjában mint egészséges terheseknél. Az alacsony PIBF expressziót fokozott NK aktivitás, a szérumban mérhető magas TNFα 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 progeszteron-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. HLA 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., Autran,B. and Chaouat,G. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor monoclonal antibody. Cell. Immunol. 1990, 125, 273-283.

8. Szekeres-Bartho,J., Reznikoff-Etievant,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 Pacsa,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 Borel,I., Gentile,T., Angelucci,J., Pividori,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 JELÖLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEI

1. Early recognition of pregnancy by the maternal immune system.
Kelemen, K., Paldi,A., Tinneberg,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., Faust,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 succesful gestation.
Szekeres-Bartho,J., Wegmann,T.G., Kelemen,K., Bognar,I., Faust,Zs. and Varga,P. Regional Immunology, 1994, 6, 315-319.