

## Szakmai zárójelentés dr. Szereday László

### „Az implantáció immunológiája: az anyai immunrendszer szabályozási mechanizmusainak vizsgálata a beágyazódás során”

#### I. Perifériás immunválasz összehasonlító vizsgálata implantációs eredetű terhességi betegségben (Pre-eclampsia) szenvedő terhesekben, egészséges terhesekben és nem terhes nőkben

41 olyan terhes nő vett részt a kutatásban, akik a pre-eclampsia súlyos tüneteit mutatták, úgymint hypertonia, proteinuria és ödéma (1. táblázat). 41 egészséges a terhesség azonos időszakában lévő nő (3. trimeszter) és 48 nem terhes nő alkották a kontroll csoportokat (1.táblázat).

#### Vizsgált betegek klinikai adatai (1. Táblázat):

Csoportok	Egészséges terhesek (n=41)	Pre-eclampsia (n=41)	Nem-terhes önkéntesek (n=48)
Életkor (átlag)	27.7	26.5	28.95
Terhességi kor (átlag±SE)	35.9 (27-41)	35.8 (29-40)	-
Paritás (átlag±SE)	0.875 (0-3)	0.305 (0-2)	-
Korábbi vetélések Száma (átlag±SE)	0.32 (0-3)	0.155 (0-1)	-

Az iNKT és a V $\delta$ 2+ T sejtek fontos kapcsolatot teremtenek a természetes és szerzett immunitás között. Annak felismerése, hogy az iNKT és  $\gamma/\delta$  T sejtek egyaránt feldúsulnak a deciduális szövetekben arra enged következtetni, hogy mind az iNKT mind a V $\delta$ 2+ T sejtek fontos szerepet játszhatnak a beágyazódás folyamán illetve a terhesség alatt később megjelenő immunológiai változásokban. Következésképpen jelen tanulmány célja az volt, hogy megvizsgáljuk az iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtek lehetséges szerepét a pre-eclampsia kialakulásában.

#### iNKT sejtek és V $\delta$ 2+ T sejtek jellemzése egészséges terhes, nem terhes és pre-eclampsia tüneteit mutató nők perifériás vérében

iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtek arányát vizsgáltuk egészséges terhes, nem terhes és pre-eclampsia tüneteit mutató nők limfocita populációiban. Az eredmények nem mutatnak szignifikáns különbséget, tehát a két vizsgált sejtpopuláció aránya mindhárom vizsgált csoportban hasonló.

Ha a vizsgált sejtek mennyiségében nem is, de a felszínükön expresszált markerekben már találtunk eltérést. Eredményeinkből látható, hogy a V $\delta$ 2+ T sejtek CD69 expressziójában nincs eltérés a 3 csoport között. Azonban szignifikáns különbség van a pre-eclampsias betegek CD69+ iNKT sejtjeinek számában az egészséges terhes, illetve a nem terhes nők mintáihoz viszonyítva. Pre-eclampsiasokban ugyanis sokkal több olyan iNKT sejt található melyek kifejezik a korai aktivációs markert (CD69) a felszínükön.

Megvizsgáltuk a sejtek perforintartalmát is. Azt találtuk, hogy egészséges terhes nők iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtjei szignifikánsan kevesebb perforint tartalmaztak, a másik két csoporthoz képest. Pre-eclampsziás betegek iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtjei szignifikánsan nagyobb mértékben expresszálják intracellulárisan perforint, mint az egészséges terhesek sejtjei.

A sejtek stimulálása és permeabilizálása után megmértük azok IFN- $\gamma$  expresszióját. Az egészséges terhes nők iNKT és V $\delta$ 2+ T sejt populációjának IFN- $\gamma$  termelése szignifikánsan alacsonyabb volt a másik két csoporthoz képest (hasonlóan, mint a perforin koncentrációnál). Valamint megfigyelhetjük, hogy a V $\delta$ 2+ T sejtek IFN- $\gamma$  expressziójában nincs különbség a nem terhes illetve a pre-eclampsziás nők között. Azonban ha az iNKT sejteket tekintjük, akkor a pre-eclampsziás betegek sejtjeinek nagyobb az IFN- $\gamma$  expressziója. A magas IFN- $\gamma$  koncentráció gyulladásozó reakciókra utalhat.

Megvizsgáltuk az iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtek CD95 sejt felszíni marker expresszióját. Eredményeinkből látható, hogy mindkét sejt populáció Fas receptor expressziója kisebb mértékű a pre-eclampsziásokban az egészséges terhesekhez képest. Tehát a pre-eclampsziás nők perifériás vérében található iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtek kevésbé apoptotikusak, kisebb számuk pusztul el programozott sejt halál által. A nem terhes csoport iNKT sejtjei ugyanolyan mértékben expresszálják CD95-t, mint a beteg nők sejtjei, ezzel ellentétben több CD95+ V $\delta$ 2+ T sejtjük van.

A sejt felszíni receptorokat egészséges terhes és pre-eclampsziás nők perifériás vérének iNKT és V $\delta$ 2+ T sejt populációiban vizsgáltuk.

Az inhibitoros jelet közvetítő NKG2A receptor kifejeződése kisebb mértékű mind az iNKT mind a V $\delta$ 2+ T sejtek felszínén pre-eclampsziásokban a másik két betegcsoporthoz képest. Tehát egészséges terhesekben a vizsgált sejtek felszínén nagyobb számban fordulnak elő azok az inhibitor receptorok, melyek gátolják az NK sejtek citotoxikus aktivitását.

Egészséges terhes és pre-eclampsziás nők perifériás vérének iNKT és V $\delta$ 2+ T sejt populációiban nincs szignifikáns különbség az NKG2D (NK aktivátor) receptor expressziójában.

Megvizsgáltuk, hogy milyen mintát mutat az aktivátoros és inhibitoros receptorok koexpressziója, pre-eclampsziás illetve egészséges terhes nők mintáiban.

Pre-eclampsziásokban - amennyiben NKG2D/NKG2A koexpresszióról beszélünk - szignifikánsan kevesebb olyan iNKT sejt van, mely egyszerre hordozza a felszínén az aktiváló és gátló receptorokat is, ugyanez elmondható a betegek V $\delta$ 2+ T sejtjeiről is.

A fentiekben tehát megvizsgáltuk, hogy milyen arányban fordul elő iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtek felszínén egyszerre NK gátló és aktiváló receptor. Eredményeink alapján elmondható, hogy amennyiben szignifikáns különbség volt egészséges terhes és pre-eclampsziás nők között, úgy minden esetben a pre-eclampsziások körében találtunk kevesebb olyan sejtet mely koexpresszálta volna az adott két receptort. Tehát elmondható, hogy a beteg nőknek kevesebb olyan sejtje van, melynek aktivátoros szignáljait az ugyanazon sejtben előforduló inhibitoros receptor felül tudja bírálni.

A kapott eredményekből kiindulva megvizsgáltuk, hogy milyen arányban vannak jelen pre-eclampsziások és egészséges terhes nők perifériás vérében olyan iNKT és V $\delta$ 2+ T sejtek, melyek az aktivátor receptor mellett hordoznak gátló receptort is a felszínükön. Tulajdonképpen szintén koexpresszálást vizsgálunk, azonban ebben az összehasonlításban nagyobb hangsúlyt fektetünk arra, hogy milyen mértékű az NKG2A (KIR) receptor expresszió azokon az iNKT és V $\delta$ 2+ T sejteken melyek NK aktivátor receptort hordoznak a felszínükön.

Az egészséges terhes nőkben szignifikánsan nagyobb azon NKG2D<sup>+</sup> iNKT és V $\delta$ 2<sup>+</sup> T sejtek száma, melyek még gátló NKG2A receptort is hordoznak a sejt felszínükön. Összegezve a fenti eredményeket elmondható, hogy pre-eclampsziásokban csökken azon iNKT és V $\delta$ 2<sup>+</sup> T sejtek aránya melyek egyszerre hordoznak a felszínükön aktiváló és gátló receptort. Illetve szignifikánsan kevesebb olyan sejtjeik (iNKT és V $\delta$ 2<sup>+</sup> T sejt) vannak, melyek felszínén az NK aktiváló receptor mellett az inhibitoros receptor is megtalálható.

### **Regulátoros T sejtek jellemzése egészséges terhes, nem terhes és pre-eclampsia tüneteit mutató nők perifériás vérében**

A regulátoros T sejtek fontos szerepet játszanak a tolerancia kialakításában, így az allogén transzplantáció során is. A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T sejtek közül a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> sejtek rendelkeznek regulátoros funkciókkal. Nemrég megjelent publikációk szerint egerekben ezen regulátoros T sejtek nélkülözhetetlenek a egészséges terhesség fenntartásában. Habitúan vetülő nők perifériás vérében a regulátoros T sejtek számának szignifikáns csökkenését írták le. Eredményeink azt mutatják hogy pre-eclampsziás betegek perifériás vérében szignifikánsan lecsökken a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T sejtek aránya nem terhes önkéntesekhez képest, de ez a csökkenés nem mutat szignifikáns eltérést egészséges terhesekhez képest.

Sejtaktivációt követően a T sejtek fokozottan expresszálják felszínükön a cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) molekulát, mely magas homológiát mutat a CD28 molekulával. A CD28 molekula a T sejteken expresszálódik és kostimulációs szignálok közvetít, mely szignálok szükségesek a T sejtaktivációhoz. Habár a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T sejtek aránya szignifikánsan csökkent pre-eclampsziás betegekben, ezen sejtek CTLA-4 expressziója viszont szignifikánsan emelkedett nem terhesekhez képest. Ezen megfigyelés arra utal, hogy a regulátoros T sejtek ugyan alacsonyabb számban vannak jelen, de aktiváltabb állapotban pre-eclampsziásokban, mint egészségesekben.

A pre-eclampsia eddig tisztázatlan etiológiájú megbetegedés, melynek hátterében számos kóros mechanizmus figyelhető meg, mint pl. generalizált endothelkárosodás, elégtelen placentáció, túlzott maternális gyulladásos reakció és káros immunológiai eltérések. A pre-eclampsia immunológiailag Th1 irányú eltolódással jellemezhető, zavart szenvednek azon anyai tolerancia-mechanizmusok, melyek a magzat normális fejlődését biztosítanák a terhesség alatt. Az invariáns NKT sejtek a perifériás vér limfocitáinak kis populációját alkotják, viszont fontos kapcsolatot teremtenek a természetes és szerzett immunitás között azáltal, hogy mind végrehajtó, mind szabályzó immunológiai mechanizmusok kivitelezésére képesek. A  $\gamma/\delta$  T sejtekkel együtt terhesség során a decíduális szövetekben halmozódnak fel jelentős mértékben. Munkánk során a V $\delta$ 2<sup>+</sup>T és iNKT sejtek lehetséges szerepét vizsgáltuk a harmadik trimeszter során és pre-eclampsziában.

Egészséges és pre-eclampsia tüneteit mutató terhes nők perifériás véréből flow cytometriás analízissel határoztuk meg a V $\delta$ 2<sup>+</sup> és iNKT sejtek arányát, illetve ezen sejtek perforintartalmát, CD69 (korai aktivációs marker), NKG2A (NK inhibitoros receptor) NKG2D, (NK aktiváló receptorok) felszíni expresszióját.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy egészséges terhesség esetén, nem terhes donorokhoz viszonyítva a perforin-, illetve IFN- $\gamma$  tartalmú V $\delta$ 2<sup>+</sup>T és iNKT sejtek száma szignifikáns csökkenést mutatott. A fenti eredményekkel ellentétben pre-eclampsziás betegekben ezen változás elmarad. Az iNKT sejtek aktiváltsága szignifikánsan magasabb pre-eclampsziában a többi

donorcsoporthoz képest. Számos eltérés mutatkozott a vizsgált sejtpopulációk NK aktiváló és inhibitoros receptor expressziójában. Eredményeink arra utalnak, hogy ezen sejtpopulációk pre-eclamsziában, Th1-es jelleget mutatnak amely jelenség a terhesség kimenetele szempontjából kedvezőtlen. Pre-eclamsziában a V $\delta$ 2+T és iNKT sejtpopulációkban megfigyelt változások arra engednek következtetni, hogy ezen sejtek is aktívan részt vesznek a betegség során megfigyelhető kóros immunológiai elváltozások kialakításában, továbbá ezen paraméterek szűrése diagnosztikai jelentőséggel is bírhat.

## **II. NK sejtek összehasonlító vizsgálata sikeres vagy sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nőkben**

Az asszisztált reprodukciós kezelések - azon belül az mesterséges megtermékenyítés (in vitro fertilizáció, IVF) - ma már elsődleges szerepet játszanak a meddőségi probléma megoldásában. Számptalan tanulmány igazolta már, hogy az IVF eljárás hatékonysága elvitathatatlan, ugyanakkor kevés az információ a sikertelen esetek háttérében álló folyamatokról.

Az implantáció a megtermékenyített petesejtnek a méhbe történő sikeres beágyazódása, mely esemény a későbbiekben immunológiai szempontból nagyon fontos reakciók láncolatát indítja el, mind lokálisan, mind szisztémásan. A terhesség zavartalan lefolyásához számos immunológiai folyamat összehangolt, a terhességre jellemző átmeneti megváltozása szükséges.

Célunk a fent említett immunológiai folyamatok kutatása volt, különös tekintettel a létrejövő változások dinamikus ábrázolására, miután kevés irodalmi adattal rendelkezünk arról, hogy beágyazódás során mely események és hogyan követik egymást. Erre adott nekünk lehetőséget az IVF programban résztvevő nők követéses vizsgálata, mely során nemcsak az egészséges immunológiai folyamatokba nyerhettünk betekintést, hanem sikertelen mesterséges megtermékenyítés esetén pathológiás elváltozások is felderíthetőek voltak.

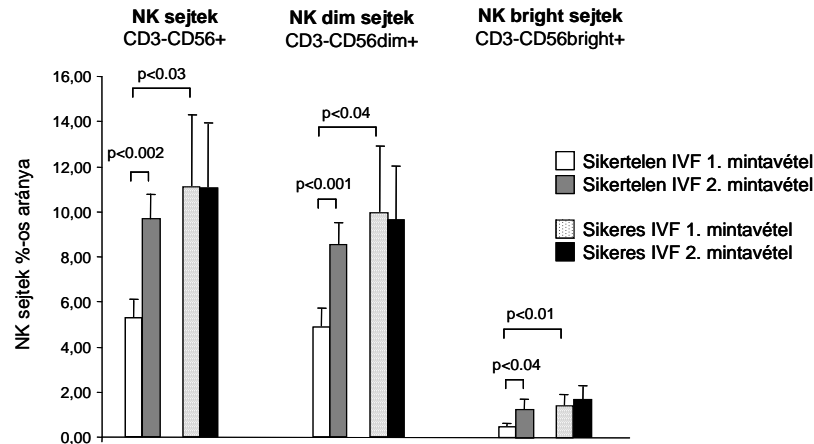
Összesen 19 nőt vizsgáltunk, akiket a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika IVF programja keretében kezeltek, megfelelő kivizsgálás után (hormonvizsgálat, cytológia, laparoscopia, hysteroscopia, férj vizsgálata). A programba jelentkezett házaspárok, vagy a feleség (petevezetők elzáródása, ill. hiánya, esetleg egyéb ok), vagy a férj (pl. alacsony spermium szám) részéről meglévő elváltozás miatt természetes úton nem tudtak gyermeket nemzeni.

Minta és mintavétel: Heparanizált perifériás vénából levett vér. Első mintavétel ideje a stimulációs fázis végén a pete leszívásának napján. Második mintavétel 1 héttel az embriók visszaültetése után.

Kutatásaink során sikeres vagy sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nők perifériás NK sejteinek összehasonlító vizsgálatát végeztük.

Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy azokban a nőkben akiknél sikertelen lett a mesterséges megtermékenyítés, az NK sejtek aránya szignifikáns emelkedést mutatott ( $5.28 \pm 0.74$  vs.  $9.66 \pm 1.11$   $p < 0.002$ ). Ezzel ellentétben a sikeres mesterséges megtermékenyítésen átesett nőkben az NK sejtek aránya nem mutatott változást ( $11.09 \pm 3.16$  vs.  $11.01 \pm 2.8$ ) (12. ábra).

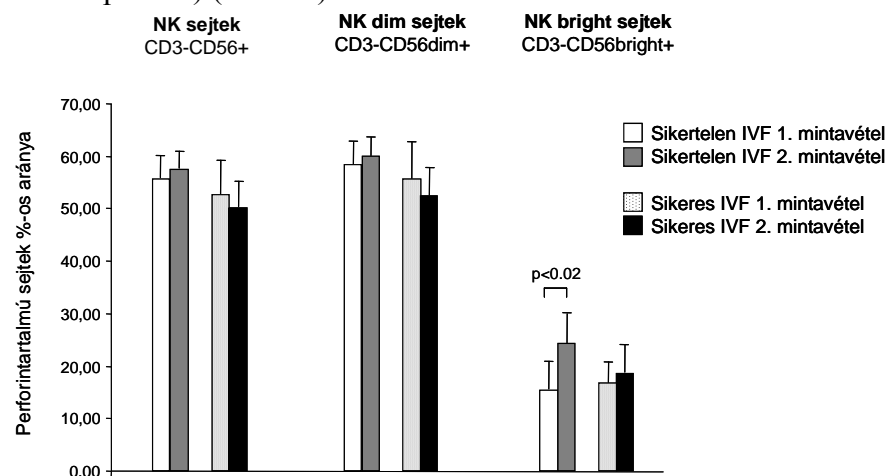
Az NK sejt szubpopulációinak (NKdim és NKbright) vizsgálata hasonló eredményt hozott (12. ábra).



12 ábra: NK sejtek aránya a limfocita populációban

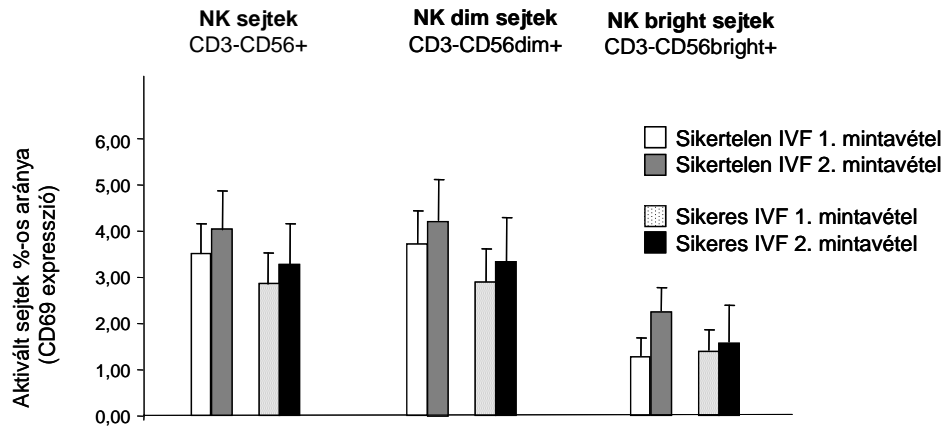
A perforin egy olyan cytotoxikus molekula, melyet az immunsejtek egy része (NK sejtek, CD8+ T lymphocyták, és  $\gamma/\delta$  T sejtek) idegen struktúrák előlésére termelnek, granulumjaikban tárolnak, majd veszély, illetve megfelelő stimulus hatására a külvilágba aktívan szecernálják, hogy általuk az idegen sejteken pórusokat formálva lízist idézzenek elő.

Vizsgálva a perforintartalmú NK sejtek arányát eredményeink azt mutatják, hogy az össz NK sejteket tekintve nincs különbség az egyes vizsgált csoportok között, viszont az NKbright szubpopulációt vizsgálva azokban a nőkben, akiknél sikertelen lett a mesterséges megtermékenyítés, a perforintartalmú NK sejtek aránya szignifikáns emelkedést mutatott ( $15.29 \pm 5.24$  vs.  $24.34 \pm 5.49$   $p < 0.02$ ) (13 ábra).



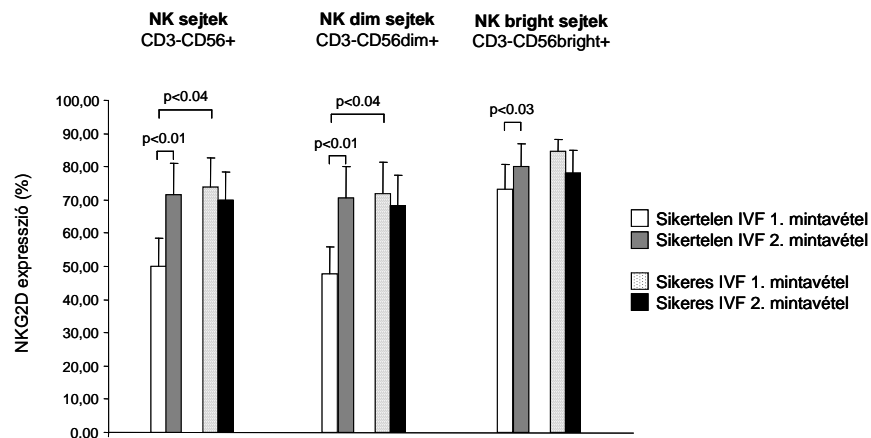
13 ábra: NK sejt perforin termelése

A 14. ábrán az aktivált sejtek arányát láthatjuk. A CD69 expressziót vizsgálva, mely általános korai aktivációs lymphocytamarker, azt találtuk, hogy nincs szignifikáns különbség az NK sejtek és szubpopulációik aktiváltsága között a vizsgált csoportokban.

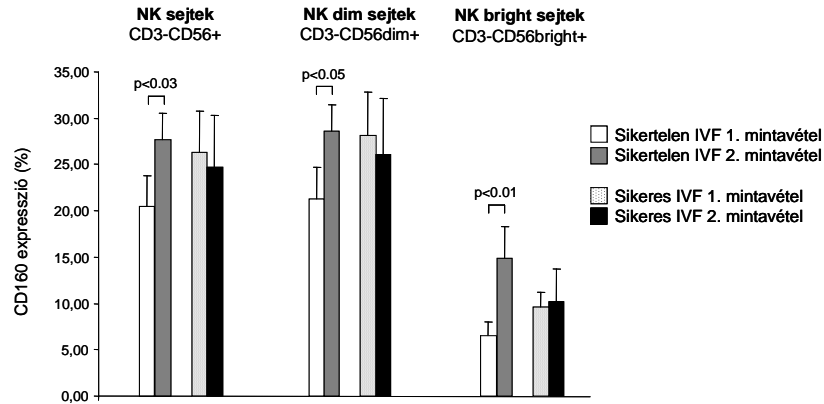


14 ábra: NK sejtek CD69 expressziója

Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy azokban a nőkben, akiknél sikertelen lett a mesterséges megtermékenyítés, az NKG2D és CD160+ NK sejtek aránya szignifikáns emelkedést mutatott ( $50.14 \pm 8.35$  vs.  $71.64 \pm 9.28$   $p < 0.01$ ,  $20.43 \pm 3.38$  vs.  $27.71 \pm 2.88$   $p < 0.03$ ) (15. és 16. ábra). Ezzel ellentétben a sikeres mesterséges megtermékenyítésen átesett nőkben ezen aktiváló receptorokat expresszáló NK sejtek aránya nem mutatott szignifikáns változást. Az NK sejt szubpopulációinak (NKdim és NKbright) vizsgálata hasonló eredményt hozott.

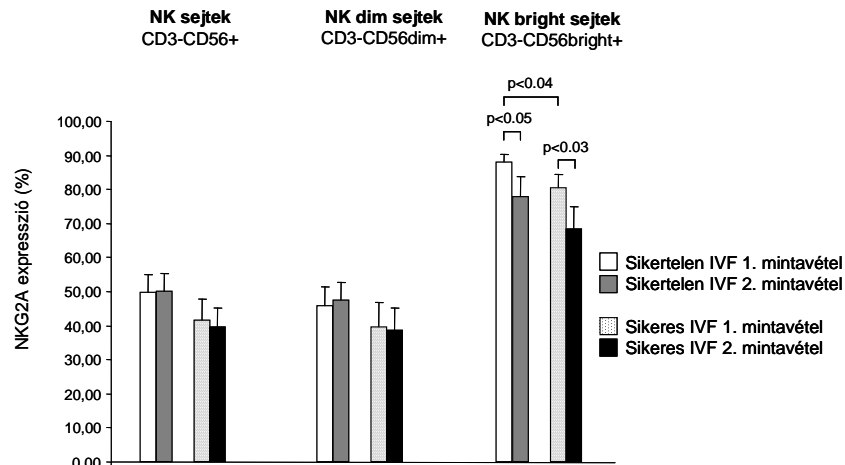


15 ábra: NK sejtek NKG2D expressziója



16 ábra: NK sejtek CD160 expressziója

Az inhibitoros jelet közvetítő NKG2A receptor vizsgálata során azt találtuk, hogy mind a sikeres, mind a sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nők perifériás NKbright sejtjeinek NKG2A expressziója szignifikánsan lecsökkent ( $88.05 \pm 2.12$  vs.  $77.88 \pm 5.72$   $p < 0.05$ ,  $80.47 \pm 3.72$  vs.  $68.41 \pm 6.28$   $p < 0.03$ ). Ezen változás nem volt megfigyelhető az NK és NKdim sejtjeinél (17. ábra).



17 ábra: NK sejtek NKG2A expressziója

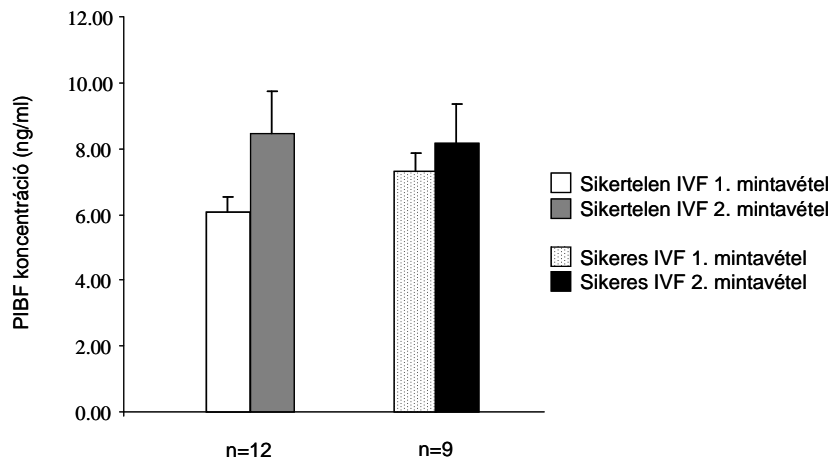
A progeszteron hatásai a többi szteroid hormonokéhoz hasonlóan mediátorfehérjéken keresztül valósulnak meg. A progeszteron immunmoduláló hatásait egy 34 kD molekulású fehérje, a Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) közvetíti.

A PIBF gátolja az arachidonsav felszabadulását, s így csökkenti a méhkontrakcióért felelős prosztaglandinok termelődését, másrészt immunmodulátor hatásokkal rendelkezik és egerekben antiabortív hatású. A PIBF immunmodulátor hatásai magában foglalják mind az NK sejtek aktivitásának gátlását és a szuppresszor funkciójú sejtek aktivitásának indukcióját, valamint a ciktokintermelés egyensúlyának megváltozását. Ezen fehérje a terhesség korai szakaszában jelenik meg a szérumban, illetve a lymphocytákon. Koncentrációja a terhesség előrehaladtával fokozódik, míg közvetlenül a szülést megelőzően csökken. Általánosságban

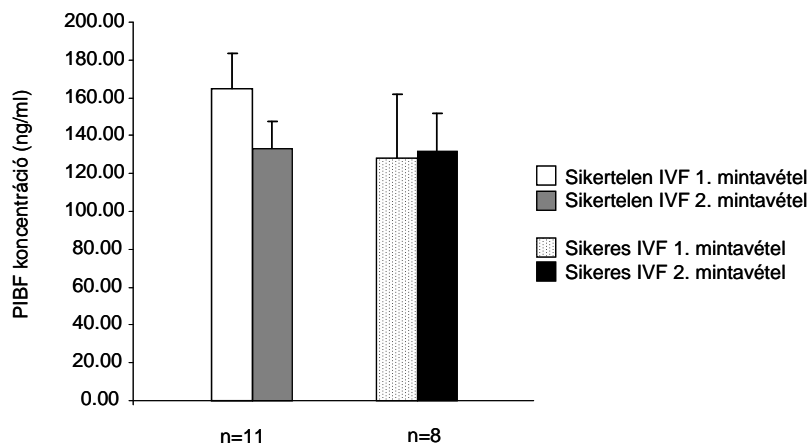
elmondhatjuk, hogy a PIBF szérumban koncentrációja összefüggést mutat a terhesség kimenetelével, s a fehérje hiánya együtt jár az NK aktivitás fokozódásával és a terhesség következményes megszakadásával.

A rendelkezésünkre álló ELISA alapú teszt segítségével határoztuk meg sikeres vagy sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nők vizeletének és szérumban PIBF koncentrációját. Megvizsgáltuk hogy van-e összefüggés a IVF sikere ill. sikertelensége és a szervezet PIBF termelése között.

Vizsgálva a vizelet és szérumban minták PIBF koncentrációját eredményeink azt mutatják, hogy nincs szignifikáns különbség az egyes vizsgált csoportok között (18. és 19. ábra). Sem a vizelet, sem a szérumban PIBF koncentrációjának megváltozása nem mutat összefüggést az IVF sikerével ill. sikertelenségével.



18. ábra: PIBF koncentráció a vizeletben



19. ábra: PIBF koncentráció a szérumban



Jelen munkánkban sikeres és sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nők perifériás NK sejtjeinek fenotípusát és funkcióját hasonlítottuk össze. Vizsgáltuk az NK sejtek aktiváltságát, gátló és aktiváló receptorainak expresszióját és perforin termelésüket.

Eredményeink arra utalnak, hogy eltérő immunológiai változások figyelhetők meg a perifériás vérben már a petenyerést követően azokban a nőkben akiknek később sikerrel zárult a lombikbébi program, mint azokban akiknél sikertelenül.

Megfigyeléseink prediktív értéket hordozhatnak, ez azonban szélesebb körű és nagyobb esetszámú immunológiai profilvizsgálatot igényel.

Összefoglalva elmondható, hogy a sikertelen mesterséges megtermékenyítésen átesett nőkben a megtermékenyített pete beültetését követően szignifikánsan megemelkedett az NK sejtek aránya a perifériás vérben.

Habár az NK sejtek a korai aktivációs marker expresszióját tekintve nem mutattak szignifikáns különbséget, eltérő gátló és aktiváló NK sejt receptoraik expressziója arra utal hogy effektor funkciójuk (cytotoxicitás és citokin termelés) révén szerepet játszhatnak a sikeres illetve sikertelen mesterséges megtermékenyítés pathomechanizmusában.

### **III. Hematopoetikus őssejtek vizsgálata humán deciduában**

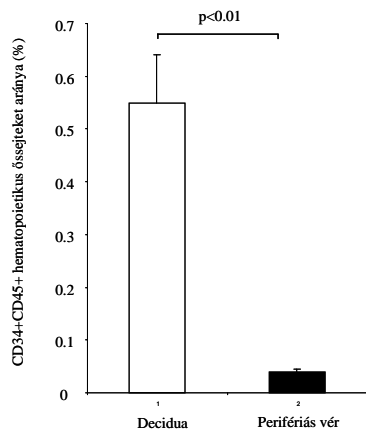
Az őssejtek korlátlan ideig osztódó, nem specializálódott önmegújító sejtek. Az embrionális és a magzati egyedfejlődést követően a felnőtt szervezet specializálódott testi sejtjei között nagyon kis számban jelen vannak ilyen sejtek, amelyek megtartják önmegújító képességüket és azt a sajátságukat is, hogy belőlük többféle típusú utódsejt alakulhat ki.

Emlősökben az immunrendszer működését biztosító sejtek a magzati élet utolsó szakaszától kezdve a csontvelői hematopoetikus őssejtekből fejlődnek. Ez a folyamat nem fejeződik be a születést követően, hanem egész életünket végigkíséri. A vér sejtjes elemeinek folyamatos újratermelődése, gyors válasza a különböző stresszhatásokra (például vérzés, fertőzések) és az egyensúly fenntartása összetett szabályozó mechanizmusok eredménye. Az immunrendszer sejtjeinek állandó újraképződése alapvető fontosságú a szervezet megfelelő védelmét biztosító folyamatok zavartalan és hatékony lezajlásához. Különleges regenerációs képességük és "halhatatlan" sajátságuk alapján mind az embrionális, mind a felnőtt őssejtek felhasználhatók hiányzó, károsodott vagy hibásan működő szövetek pótlására, helyettesítésére. Az immunrendszer egyik fontos biológiai funkciója a szervezet integritásának, belső egyensúlyának folyamatos védelme. Ennek érdekében az immunrendszer felismeri és tolerálja a saját szerveket, szöveteket, de sejtpusztító folyamatokkal lép fel a testidegen kórokozók, valamint a más egyedből származó idegen szövetek ellen.

A humán endometrium nagyon különleges immunológiai követelményeknek tesz eleget. Terhesség során az endometriumnak tolerálnia kell a fejlődő embriót, mely anyai és apai antigéneket egyaránt kifejez, valamint a lokális immunitás révén fontos védelmet jelent a fertőző ágensekkel és a malignitásokkal szemben. Az uterinális limfoid sejtek ezen kettős feladatra specializálódtak. Egyrészt segítik a terhesség sikeres kihordását, másrészt fontos szerepet játszanak a lokális immunológiai védelem kialakításában. Irodalmi adatok szerint ezen sejtek lokális progenitor sejtekből differenciálódhatnak. Emberben feltételezik, hogy az uterinális NK sejtek az endometrium egyes területein lévő prekursor sejtekből megújulhatnak. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a hematopoetikus őssejtek előfordulását humán deciduában.

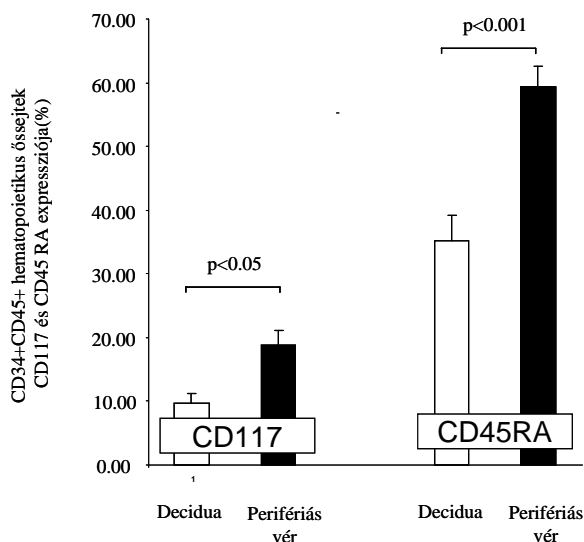
A Baranya Megyei Kórház Szülészetre terhesség-megszakítás céljából felvett terhes nők vákuum aspirált mintáiból izoláltunk sejteket. Ezzel párhuzamosan perifériás vénás vérből is

elvégeztük a sejtszeparálást. Egészséges terhesek deciduális és perifériás limfocitáiban a hematopoetikus őssejtek és limfoid progenitor sejtek előfordulását flow citométeres analízis segítségével határoztuk meg. Hematopoetikus őssejteket a CD34 és CD45 ko-expressziójával jellemeztük.



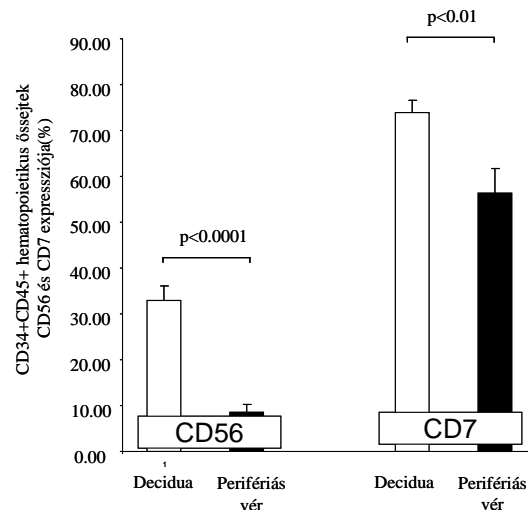
20 ábra: CD34+CD45+ hematopoetikus őssejtek aránya (decidua: n=13, perifériás vér: n=13)

Minden egyes deciduális mintában sikerült CD34+CD45+ hematopoetikus őssejteket kimutatnunk, ezek százalékos aránya szignifikánsan magasabb ( $0.55 \pm 0.09$  vs.  $0.04 \pm 0.005$   $P < 0.01$ ) volt, mint a perifériás vérben (20. ábra). A deciduális hematopoetikus őssejteket többsége a CD34-t alacsony, míg a CD45-t magas szinten expresszálta, utalva ezen sejtek kevésbé differenciált voltára ellentétben a csontvelőben található primitív pluripotens CD34<sup>high</sup> sejtekkel.



21 ábra: CD34+CD45+ hematopoetikus őssejtek CD117 és CD45RA expressziója

Korai őssejt antigén expresszió: A korai őssejt marker, c-kit (CD117) a deciduális őssejteken szignifikánsan alacsonyabb mértékben van jelen ( $9.7 \pm 1.56$ ) mint a perifériás mintákon ( $18.89 \pm 2.29$   $P < 0.05$ ) (21. ábra). Ezen megfigyelés arra utal hogy a deciduális sejtpopuláció sokkal érettebb, mint a keringésben lévő hasonló társaik. Az aktivációs antigén, CD45RA a deciduális őssejtek 38.26%-án expresszálódik, utalva az akut differenciálódásra. A periférián mért magasabb CD45RA expresszió (59.38) arra utalhat, hogy ezen sejtek a csontvelőből mobilizálódnak.



22 ábra: CD34+CD45+ hematopoietikus őssejtek CD56 és CD7 expressziója

A hematopoietikus őssejtek további jellemzése céljából megvizsgáltuk a mieloid előalakokra jellemző antigén, a CD33, az NK sejtekre jellemző CD56 és a T progenitor sejtekre jellemző CD7 expresszióját. A deciduális hematopoietikus őssejtek 11.65%-a fejezte ki felszínén a CD33-t. Ez arra utal, hogy a deciduális őssejteknek nem elsődleges szerepe a mieloid sejtek képzése. Érdeklődésünk középpontjában a CD56 és CD7 állt, mely limfoid antigéneket a hematopoietikus őssejtek 32.93 és 73.89%-a expresszálta. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a CD34+CD45+ deciduális őssejtek szerepet játszanak az NK, T és NKT sejtek lokális termelésében. Deciduális őssejtek nagyobb számban expresszálták a CD56 és CD7 molekulákat mint perifériás vérben lévő társaik ( $32.93 \pm 3.25$  vs  $8.63 \pm 1.59$   $p < 0.0001$  és  $73.89 \pm 2.6$  vs.  $56.27 \pm 5.49$   $p < 0.01$ ) (22. ábra).

Limfopoiétikus citokin receptorok IL2/15R-beta (CD122) és IL7R-alpha (CD127) vizsgálata során sikerült detektálnunk a deciduális hematopoietikus őssejteken ezen receptorok expresszióját, mely arra utal, hogy ezek a sejtek érzékenyek IL-15 és IL-7 citokinekre. Ezen citokinekről tudjuk, hogy fontos szerepet játszanak a limfoid sejtek differenciációjában. Azonban nem találtunk szignifikáns különbséget deciduális és perifériás minták között.

Eredményeink azt mutatják, hogy egészséges humán deciduában megtalálhatók az elkötelezett hematopoietikus progenitor sejtek, még hozzá szignifikánsan nagyobb arányban, mint a perifériás vérben. Ezen sejtek eltérnek a keringésben lévő sejtektől, többségük limfoid sejtekre jellemző antigéneket fejeznek ki és ebből arra következtethetünk, hogy szerepük lehet a lokális immunreguláló funkcióval bíró deciduális limfoid repertoár létrehozásában.

#### IV. Állatkísérletes eredmények

A dendritikus sejtek az immunrendszer fontos antigén-prezentáló sejtjei, melyek szerepet játszanak az elsődleges immunválasz beindításában, a transzplantátumok kilökődésében, autoimmun betegségek kialakításában és nem utolsósorban a magzat kilökődésében. A dendritikus sejtek képesek az immunrendszert aktiválni vagy képesek toleranciát kialakítani. Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a dendritikus sejtek bejuttatása (dendritikus sejterápia) csökkenti terhes egerekben az abortuszok előfordulását.

Megvizsgáltuk, hogy ezen dendritikus sejterápia hogyan befolyásolja a foeto-maternális határon elhelyezkedő sejtek összetételét, immunprotektív molekulák (TGF- $\beta$ 1 és PIBF) expresszióját.

Feltételeztük, hogy a dendritikus sejtek bevitele szuppresszor/regulátoros sejtek megjelenéséhez vezet, így megvizsgáltuk a terhesség fenntartásában kulcsfontosságú szerepet játszó két sejtpopuláció expresszióját a foeto-maternális határon. Kimutattuk, hogy a terhesség alatti tolerancia kialakításában szerepet játszó CD8<sup>+</sup> sejtek (regulátoros CD8<sup>+</sup> T sejtek) száma megnőtt a decidua basalis és parietális területén a perifériás vérhez képest. Egerekben a gamma/delta T sejtek szintén jelen vannak a foeto-maternális határon és fontos szerepet játszanak a terhesség fenntartásában. Dendritikus sejtek bevitele után ezen sejtek számának szignifikáns emelkedését mutattuk ki. Régóta ismert szerepük a terhességek alatti fertőzések elleni védekezésben illetve fontos immunreguláló hatásuk. A gamma/delta T sejtek immunreguláló hatásukat IL-10 és TGF- $\beta$ 1 termelésen keresztül fejtik ki. Dendritikus sejtek bevitele fokozta a TGFbeta1 termelést.

A progeszteron immunmoduláló hatásait egy 34 kD molekulasúlyú fehérje, a PIBF közvetíti. A PIBF gátolja az arachidonsav felszabadulását, s így csökkenti a méhkontrakciókért felelős prosztaglandinok termelődését, másrészt immunmodulátor hatásokkal rendelkezik és egerekben antiabortív hatású. A PIBF immunmodulátor hatásai magában foglalják mind az NK sejtek aktivitásának gátlását és a szuppresszor funkciójú sejtek aktivitásának indukcióját, valamint a ciktokintermelés egyensúlyának megváltozását. Ezen fehérje a terhesség korai szakaszában jelenik meg a szérumban, illetve a lymphocytákon. Koncentrációja a terhesség előrehaladtával fokozódik, míg közvetlenül a szülést megelőzően csökken. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a PIBF szérumban koncentrációja összefüggést mutat a terhesség kimenetelével, s a fehérje hiánya együtt jár az NK aktivitás fokozódásával és a terhesség következményes megszakadásával.

Kísérleteinkben elsőként sikerült kimutatni, hogy a dendritikus sejtek bevitele fokozta a lokális PIBF expressziót, megerősítve ezzel, hogy a terhességet védő különféle molekulák szerepet játszanak a dendritikus sejterápia jótékony hatásaiban.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a dendritikus sejtek bevitele képes foetális toleranciát kiváltani, hasonlóan ahhoz a stratégiához, melyet a dendritikus sejtek bevitelén alapuló tumor ellenes vakcináknál látunk.