



T lymfocyty ve fyziologické a patologické graviditě

Karin Malíčková

Klinická imunologie a alergologie - laboratoř

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

Všeobecná fakultní nemocnice a 1.lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Imunitní systém má důležitou úlohu v řadě procesů lidské reprodukce. V průběhu gravidity, kdy organismus matky musí akceptovat semialogenní plod, je úloha imunitních procesů obzvlášť důležitá.

Tolerance plodu imunitním systémem matky je zajišťována komplexem navzájem souvisejících imunitních mechanismů.

1505

Leonardo
da Vinci

- *...this work must commence with the conception of man, and must describe the nature of the womb, and **how** a baby lives in it, and **in what degree** it resides there, and the way it **is enlivened** and nourished, and its growth, and what interval there will be between one degree of growth and the next, and what it is which **pushes it out** of the mother and for what reason it sometimes comes out of its mother's womb before due time...*





1953

Peter

Medawar



- *koncept funkční suprese maternálních lymfocytů*
- *“The immunological problem of pregnancy may be formulated thus: How does the pregnant mother contrive to nourish within itself, for many weeks or months, a fetus that is an antigenically foreign body?... By the immunological indolence or inertness of the mother.”*

Medawar PB: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates Symp Soc ExpBiol 1953, 7:320-338



1993
Tom
Wegmann

- *Th1/Th2 paradigm*

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR.
Bidirectional cytokine interactions in the maternal-
fetal relationship: is successful pregnancy a TH2
phenomenon? *Immunol Today*. 1993;14(7):353-6

viewpoint

Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T_H2 phenomenon?

**Thomas G. Wegmann, Hui Lin, Larry
Guilbert and Tim R. Mosmann**

Pregnant females are susceptible to intracellular pathogens and are biased towards humoral rather than cell-mediated immunity. Since T_H1 cytokines compromise pregnancy and T_H2 cytokines are produced at the maternal-fetal interface, we hypothesize that these T_H2 cytokines inhibit T_H1 responses, improving fetal survival but impairing responses against some pathogens.

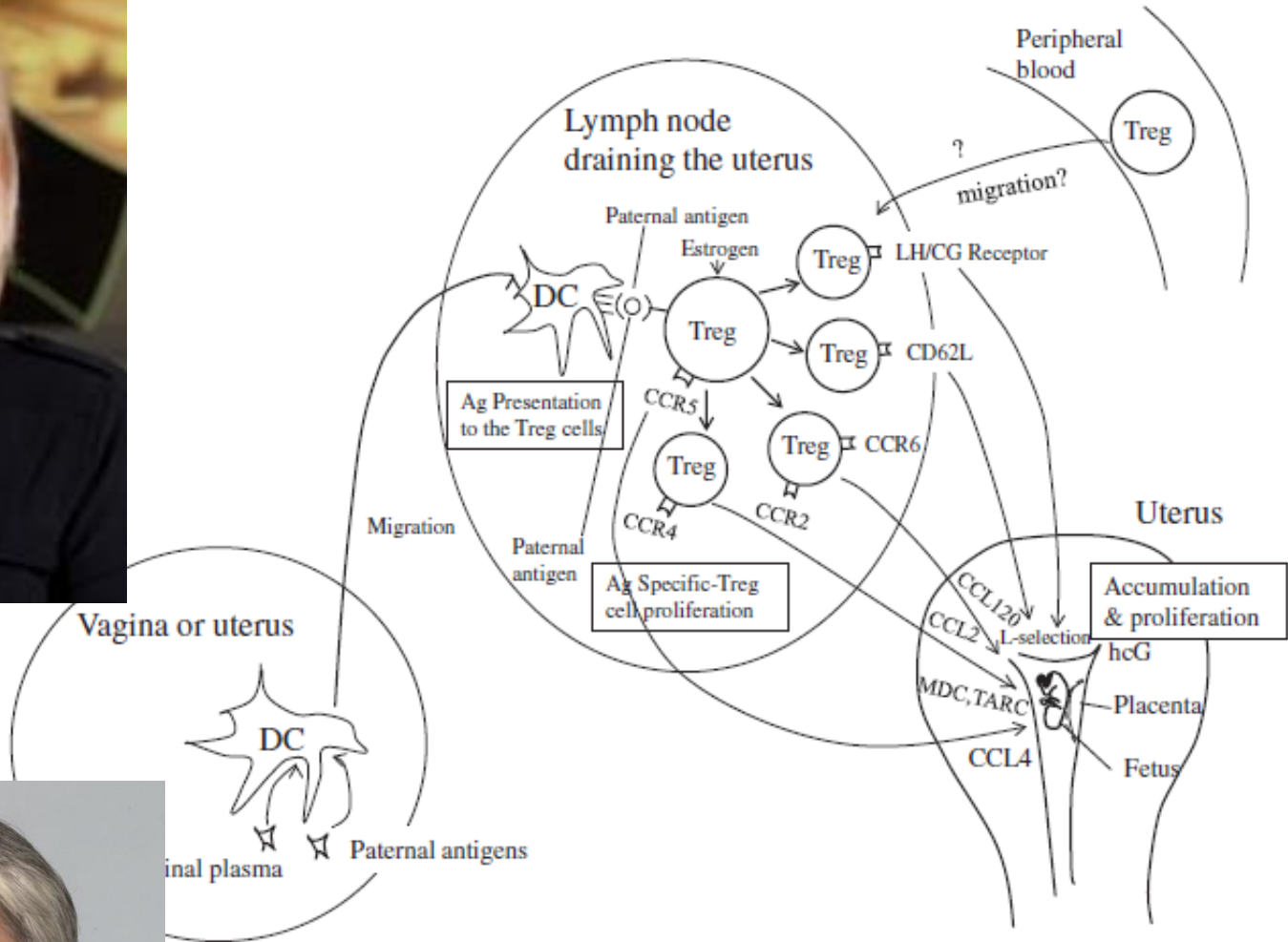


2010
Shigeru
Saito

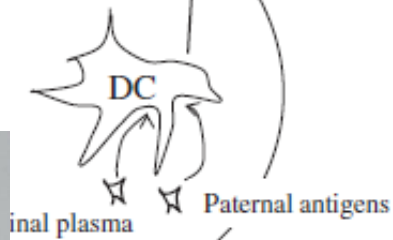


• ***Th1/Th2/Th17/Treg
koncepte***

Saito S, Nakashima A, Shima T,
Ito M. Th1/Th2/Th17 and
regulatory T-cell paradigm in
pregnancy. Am J Reprod
Immunol. 2010 ;63(6):601-10.



Vagina or uterus





Th1/Th2/Th17/Treg paradigma přináší nové pohledy na procesy lidské reprodukce a je výchozím bodem pro hledání nových perspektivních způsobů imunointervenční terapie opakovaných selhání implantace embrya, habituálního potrácení, předčasných porodů a preeklampsie.

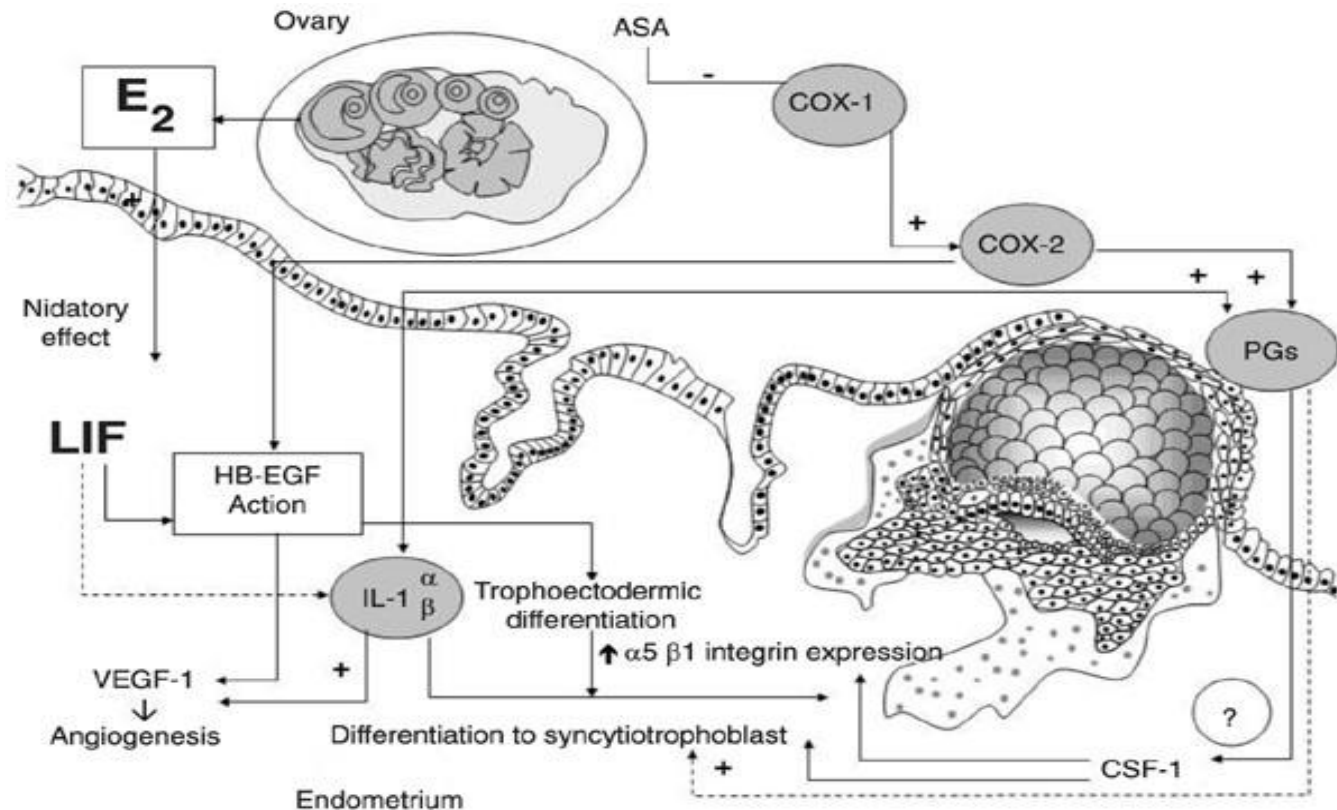


Th1/Th2/Treg/Th17 a fyziologické těhotenství



Krok č. 1 – implantace embrya do decidualizované děložní stěny

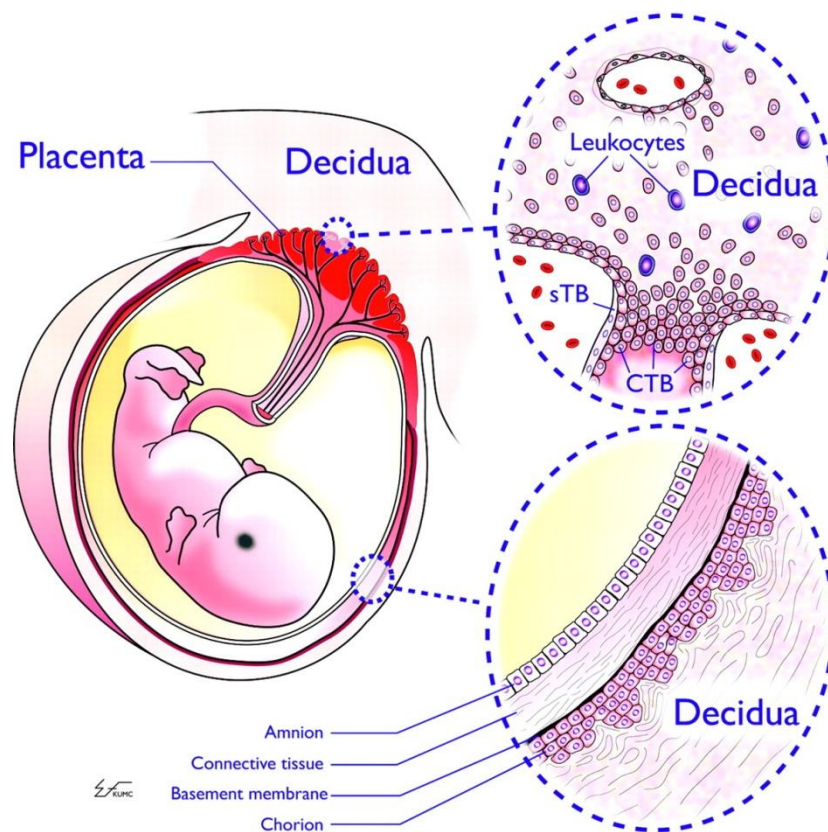
- angiogeneze, vyzrívání trofoblastu
- IL-1, TGF-beta, VEGF, PGF atd.



Krok č. 2 – maternofetální tolerance

Ačkoliv mezi maternální a fetální cirkulací nedochází k významnému přímému kontaktu a buňky trofoblastu v kontaktu s maternálními imunokompetentními buňkami vykazují limitovanou expresi HLA antigenů, fetální buňky mají schopnost pronikat do maternální cirkulace.

Maternální imunitní systém je tak postaven před problém aloantigenní rekognice semialogenního plodu, který vlastní jeden celý paternální HLA haplotyp.













Th1/Th2/Treg/Th17 a fyziologické těhotenství



Krok č. 2 – maternofetální tolerance

predominance Th2 imunitní odpovědi a suprese Th1 imunitních mechanismů

	Th1	Th2	Th17	Treg
periferní krev				
děloha				



Th1/Th2/Treg/Th17 a fyziologické těhotenství



Krok č. 2 – maternofetální tolerance

Úloha Th17 lymfocytů

- Th17 lymfocyty hrají důležitou úlohu při indukci zánětlivé odpovědi a jsou nejspíše ústředním faktorem při vzniku řady autoimunitních nemocí a při akutní rejekci transplantátu
- fenotypově jsou charakterizovány mj. expresí receptoru pro interleukin 23 (IL-23), chemokinového receptoru 4 (CCR 4) a 6 (CCR6)
- Hlavní zdroj IL-17
- zastoupení cirkulujících Th17 v periferní krvi zdravých osob je velmi nízké, nepřevyšuje 1 %.
- v I. a II. trimestru fyziologické gravidity se zastoupení cirkulujících Th17 buněk neliší od netěhotné populace
- ve III. trimestru fyziologické gravidity dochází k jejich signifikantnímu poklesu.



Th1/Th2/Treg/Th17 a fyziologické těhotenství



Krok č. 2 – maternofetální tolerance

Úloha Th17 lymfocytů

Opačná a překvapivá situace je však *in situ*:

- z povahy a funkce Th17 buněk by bylo možné usuzovat, že jejich zvýšené zastoupení v decidue by mohlo být nežádoucí
- je však zajímavou skutečností, že zastoupení uterinních Th17 je signifikantně vyšší než zastoupení cirkulujících Th17 v periferní krvi

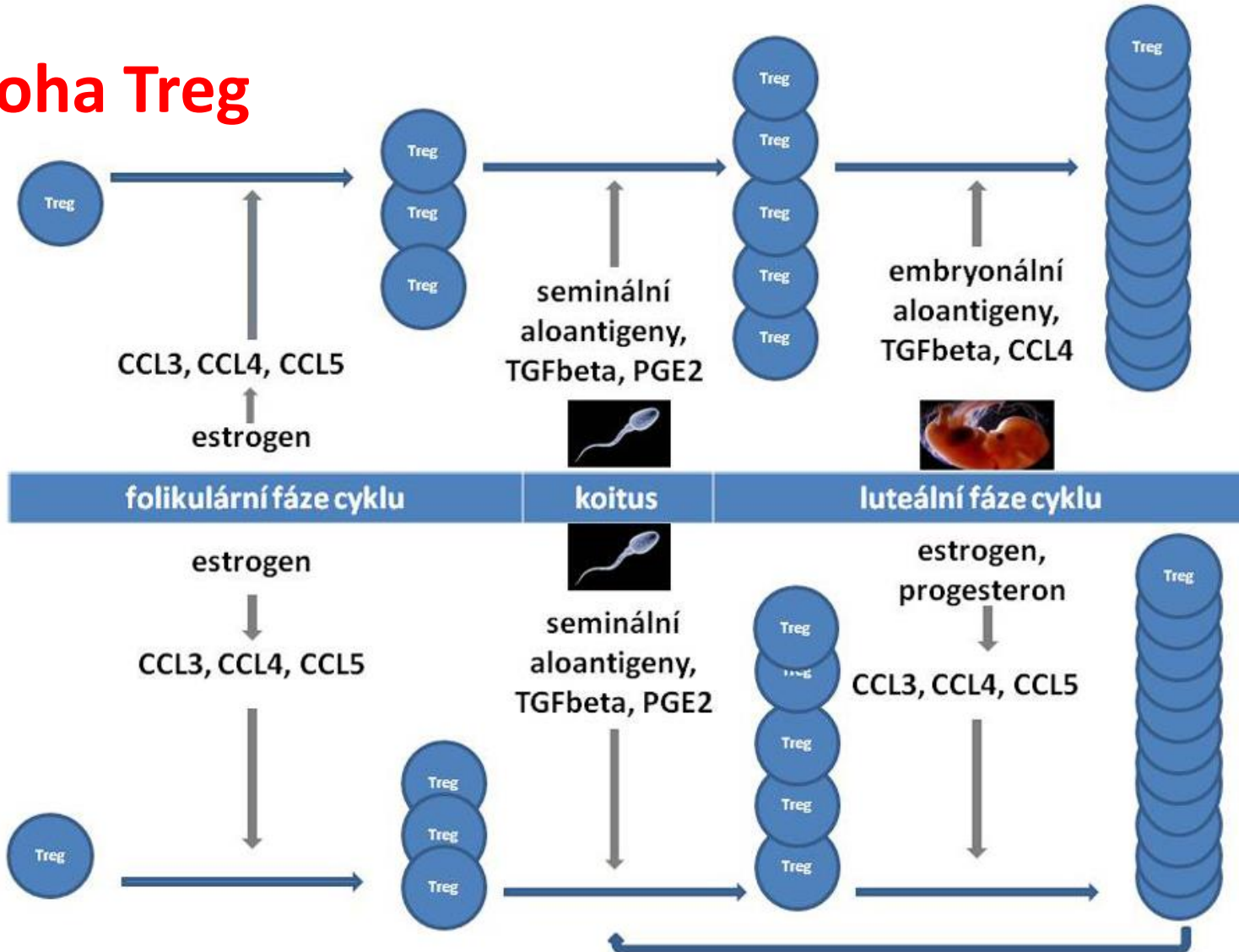
v nesterilní děložní dutině mají Th17 lymfocyty ochrannou úlohu v boji proti extracelulárním mikrobům?

IL-17 stimuluje sekreci progesteronu v buňkách trofoblastu a podporuje tak jejich invazivní kapacitu ?

úspěšná implantace embrya = zánětlivý proces

Krok č. 2 – maternofetální tolerance

úloha Treg





Th1/Th2/Treg/Th17 a těhotenské neúspěchy



Problém č. 1 - selhání implantace

- deplece nebo porucha funkčních schopností uDC
- porušená maturace uNK
- patologická remodelace tkání
- Embryotoxický efekt Th1 cytokinů

	Th1	Th2	Th17	Treg
periferní krev				
děloha			MAB	



Th1/Th2/Treg/Th17 a těhotenské neúspěchy



Problém č. 1 - selhání implantace

- **pokles počtu a/nebo funkčních schopností Treg**
 - primární idiopatická sterilita je u lidí asociována se sníženou expresí Foxp3 mRNA v děložní sliznici ještě před snahami o početí
 - otěhotnění po embryotransferu je spojeno se signifikantně vyšším zastoupením cirkulujících Treg již v den punkce folikulu a odběru oocyty
 - inseminace dárcovskými spermiemi je u žen s nízkým zastoupením cirkulujících Treg ve folikulární fázi menstruačního cyklu signifikantně méně
 - deplece antigen-specifických Treg je podstatou jedné z hypotéz zvýšeného výskytu sterility u žen s endometriózou - po vzniku endometriálních lézí totiž dochází k redukci počtu Treg v periferní krvi i v endometriu



Th1/Th2/Treg/Th17 a těhotenské neúspěchy



Problém č. 2 - potrácení

Cytokinová dysbalance

- Opakované časně potraty jsou typické Th1 fenotypem imunitní odpovědi, byť některé práce upozorňují též na situace, kdy je habituální potrácení spojeno s Th2 fenotypem
- Pro úspěch těhotenství je proto nezbytné spíše adekvátní vyvážení obou systémů.
- Klíčový faktor: dominance prozánětlivého cytokinu IL-17, jež dále indukuje expresi řady zánětlivých mediátorů. Habituální časně potrácení je v mnoha případech charakteristické vysokým zastoupením cirkulujících Th17 s nadprodukcí IL-17 a IL-23, přičemž zvýšení počtu Th17 je nepřímo úměrné snižujícímu se zastoupení cirkulujících Treg. K tomu dochází nejspíše vlivem IL-6, který blokuje maturaci Treg a indukuje diferenciaci Th17.



Th1/Th2/Treg/Th17 a těhotenské neúspěchy



Problém č. 2 - potrácení

Dysregulace Treg

- Počty cirkulujících i uterinních Treg jsou u žen s habituálním potrácením sniženy.
- Tato skutečnost je vysvětlována některými autory jako důsledek chronické zánětlivé stimulace.
- **ALE** Transfer CD4+CD25+ Treg od zdravé březí myši potrácujícímu zvířeti vede k prevenci abortu, kdežto transfer Treg od zdravé nebřezí myši takový efekt nemá. **PROČ?**



Th1/Th2/Treg/Th17 a těhotenské neúspěchy



Problém č. 3 - předčasné porody

- Jakýkoliv, tj. termínový i předčasný porod, je iniciován dočasným zvýšením zánětlivých signálů.

v placentárním mikroprostředí dojde ke zvýšení produkce TNF-alfa, IL-1 a IL-8

aktivace buněk vrozené imunity a iniciace prozánětlivé kaskády včetně
aktivace NF- κ B

up-regulace receptoru pro oxytocin na myometriu

zahájení porodu



Th1/Th2/Treg/Th17 a těhotenské neúspěchy



Problém č. 3 - předčasné porody

- V decidue a plodové vodě předčasně rodících žen lze prokázat nadprodukcí prozánětlivých působků, např. IL-1, IL-6, IL-8 a TNF-alfa, zvýšená je však často i tvorba tzv. Th2 cytokinů.
- Patofyziologický význam při indukci zánětu mají nejspíše Th17. V plodových obalech žen po předčasném porodu s chorioamniitidou jsou nacházeny zvýšené počty Th17, hladiny IL-17 v plodové vodě stoupají.
- dysregulace v počtu a funkčních schopnostech Treg má souvislost s patogenézí předčasné intrauterinní zánětlivé aktivace. Pokles zastoupení periferních Treg byl prokázán např. u žen s preeklampií, HELLP syndromem i v souborech předčasně rodících žen.



Th lymfocyty v periferní krvi – jak poznám patologii?



- detekce intracelulárních cytokinů v T-lymfocytech

		31,6	32,9	31,8	33,1	33,0	37,5	31,3	34,5	36,5
Ly_CD8	%									
Ly_45RA	%			11,7			7,1			12,2
Ly_CD5	%	67,6		60,1			71,7	68,1		21,5
Ly_4+RA	%	10,0		9,2			13,5	10,7		0,6
Ly_5+19	%	1,9					1,2	1,9		
Intracel. cytokiny										
Cyt_IFNg	%	21,6	29,5	18,7	35,3	44,7	42,4	47,0	47,0	55,8
Cyt_TNFA	%	36,6	53,9	47,8	39,2	55,4	50,8	48,6	45,6	65,6
Cyt_IL2	%	34,2	24,6	26,3	24,6	31,7	22,5	44,5	35,0	41,8
Cyt_IL4	%	9,4	2,1	6,3	6,0	6,2	7,6	9,3	3,3	8,4

Callouts from the table:

- gravidní 12.tt. (points to Ly_CD8)
- po IVIG a pentoxifylinu (points to Ly_CD5)
- po kortikoidech (points to Cyt_IFNg)
- vstupní hodnoty (points to Cyt_TNFA)



SUBPOPULACE LYMFOCYTŮ

Th lymfocyty v periferní krvi – jak poznám patologii?

- detekce intracelulárních cytokinů v T-lymfocytech

TH1/TH2 Intracellular Cytokine Ratios

TNF- α :IL-10 (CD3+CD4+)

IFN- γ :IL-10 (CD3+CD4+)

18,0

38,7 (H)

ratio

13,2-30,6

ratio

5,8-20,5

2



Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



KORTIKOSTEROIDY



- Greenblatt, 1956 - pozitivní vliv na maturaci oocytů, interakce s proteiny zona pellucida, inhibice produkce adrenálních androgenů – **NE**
- Jako imunomodulátory mají kortikosteroidy schopnost potlačit produkci placentárního TNF-alfa, aniž by současně došlo k poklesu produkce IL-10
- **POZOR** Dlouhodobě podávané malé/imunomodulační dávky steroidů mohou mít tlumivý vliv na funkční schopnosti i počty cirkulujících, ale i uterinních NK buněk
- lymfocytotoxické - imunosupresivní účinky mají pouze vysoké dávky kortikoidů (~100 mg methylprednisolonu)
- v nižších dávkách se uplatňuje imunomodulační účinek zejména v důsledku ovlivnění produkce cytokinů
- V reprodukční imunologii jsou doporučovány dávky prednisonu v rozmezí 0,15 - 0,2 mg/kg/den, přednost se někdy dává methylprednisolonu, který se v nezměněné formě vylučuje močí pouze z 10 %, kdežto prednison a prednisolon až ze 34 %



Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



INHIBITORY FOSFODIESTERÁZY

- PDE4 – dominantní izoenzym lymfocytů určený k degradaci cAMP
- Inhibitory PDE  intracelulární elevace cAMP 
inhibice intracelulární tvorby TNFa
- **pentoxyfilin** – kompetitivní neselektivní inhibitor PDE
600 – 1800 mg/den
- roflumilast, apremilast - selektivní PDE4 inhibitory, v reprodukční imunologii zatím jen studie na zvířatech



Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



„BABY ASPIRIN“

- malé dávky kyseliny acetylsalicylové mají protizánětlivé a vazodilatační účinky, inhibují agregaci trombocytů, blokují cyklooxygenázu 1 a tím i syntézu řady prostaglandinů
- aspirin inhibuje aktivitu NF- κ B, protože stabilizuje protein κ B, který je specifickým inhibítorem transkripčního faktoru NF- κ B
- tohoto efektu lze využít při dávkování kyseliny acetylsalicylové v rozmezí 30 - 100 mg/den



Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



NITROŽILNÍ IMUNOGLOBULINY (IVIG)

Li J et al. Intravenous immunoglobulin treatment for repeated IVF/ICSI failure and unexplained infertility: a systematic review and a meta-analysis. *Am J Reprod Immunol.* 2013;70(6):434-47. doi: 10.1111/aji.12170.

10 klinických studií publikovaných v databázích PubMed, EMBASE a Cochrane

Celkový počet hodnocených případů n = **8207**

Podání IVIG bylo ve srovnání s placebem signifikantně asociováno s

- vyšší mírou implantace embrya OR **2,708** {CI 1,302;5,629}
- vyšší četností těhotenství OR **1,475** {1,191;1,825}
- vyšší mírou živě narozených dětí OR **1,616** {1,234;2,101}
- nižší mírou potráčovosti OR **0,352**{0,168;0,738}



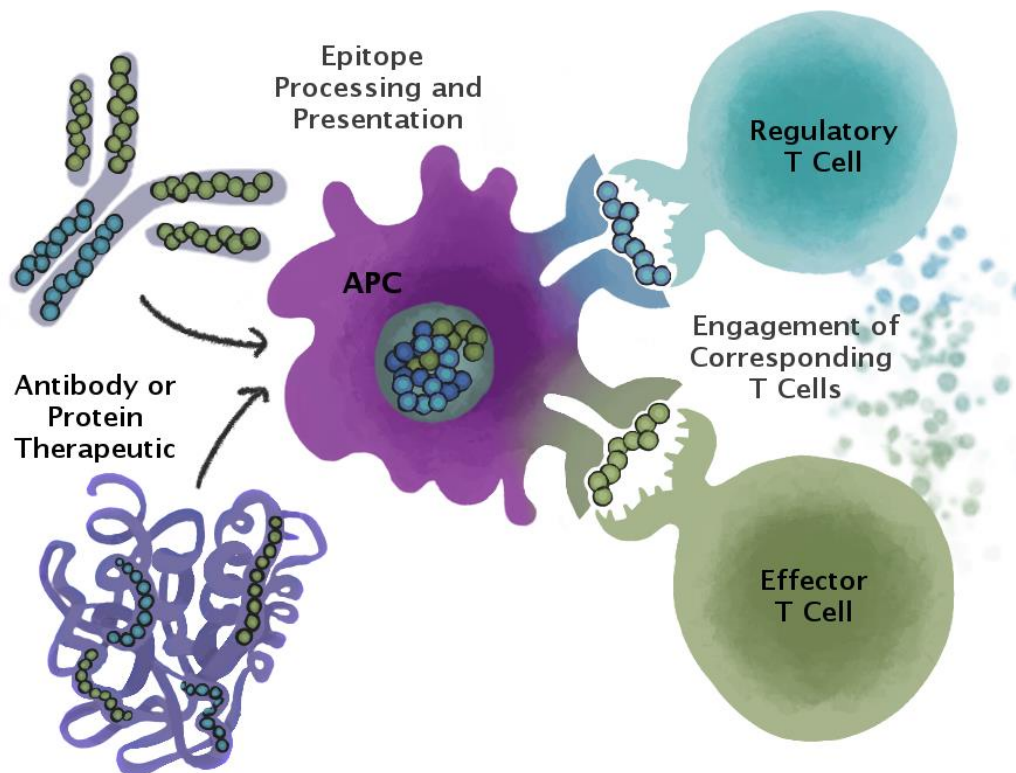
Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



NITROŽILNÍ IMUNOGLOBULINY (IVIG)

Teorie **tregitopů**

Tregitopy = antigenní epitopy T-lymfocytů, které jsou součástí molekul humánních IgG, váží se na MHC II.třídy a indukují Treg odpověď.





Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



NITROŽILNÍ IMUNOGLOBULINY (IVIG)

velká variabilita dávkovacích schémat
od dávky 150 mg/kg až po 500 mg/kg

- s aplikacemi několikrát v průběhu IVF cyklu
- v graviditě á 3-4 týdny
- jen v určitých fázích těhotenství (např. týdny 7,13,20 a 28)



Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



NITROŽILNÍ IMUNOGLOBULINY (IVIG)

off – label indikace

finančně nákladná terapie

1 gram IVIG ~ 1 300 Kč

150 mg/kg/měsíc ~ 15 000 Kč/měsíc

~ 150 000 Kč/gravidita





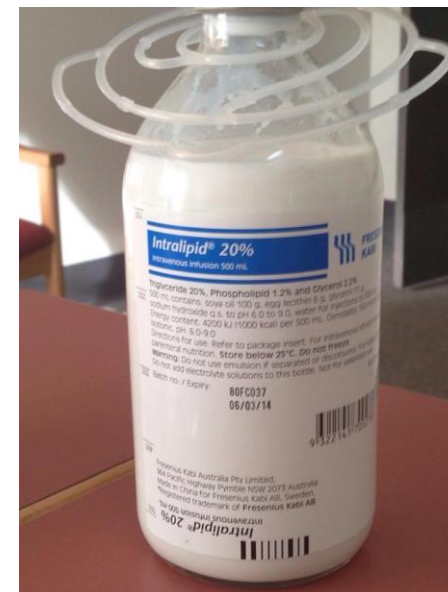
Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



NITROŽILNÍ INTRALIPIDY

- přínosné u sterilních a infertilních žen s prokázanou dominancí Th1 fenotypu cirkulujících T lymfocytů
- emulze s obsahem tuků, která se podává v různých schématech, nejčastěji dle Rousseva

Přesný mechanismus imunomodulačního účinku intralipidu není dosud znám, předpokládá se však, že mastné kyseliny fungují jako ligandy a aktivují receptory aktivované peroxizómovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR), nacházející se v jádrech Th1 lymfocytů, což vede k supresi jejich aktivity, ke snížení produkce prozánětlivých a embryotoxických cytokinů s pozitivním efektem na implantaci a udržení





Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



NÍZKOMOLEKULÁRNÍ HEPARINY

- Nízkomolekulární hepariny (low molecular weight heparines, LMWH) jsou deriváty heparinu, vznikají enzymatickou nebo chemickou depolymerizací nefrakcionovaného heparinu, jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 4300 - 5000 kDa.

inhibují aktivitu komplementu

příznivě ovlivňují adhezivní molekuly, cytokiny a matrixové metaloproteinázy nutné pro úspěšnou implantaci embrya

snižují adherenci leukocytů a zpomalují jejich migraci do místa zánětu

Jako imunomodulátory v graviditě jsou LMWH používány v profylaktické dávce, cílem je dosažení aktivity anti-Xa v rozmezí 0,2 – 0,4 kIU/l .



Th1/Th2/Treg/Th17 koncepce a možnosti imunointervenční terapie imunologicky podmíněných poruch plodnosti



VAGINÁLNÍ PROGESTERON

Progesteron má klíčovou úlohu při vzniku a udržení gravidity nejenom díky svým endokrinním funkcím. Je též potentním imunomodulátorem:

- tlumí lokální i systémovou proliferaci CD4+ a jejich diferenciaci směrem k Th1/Th17 odpovědi
- podporuje diferenciaci Th2 a Treg
- vysoké dávky terapeuticky podávaného progesteronu přímo ovlivňují diferenciaci naivních CD4+ lymfocytů směrem k Foxp3-pozitivním Treg buňkám
- progesteron indukuje tvorbu indolamindioxygenázy (IDO) nebo progesteronem indukovaného blokujícího faktoru (PIBF) s přímým vlivem na proliferaci Treg a supresi cytotoxické aktivity NK buněk

V klinické praxi se s úspěchem používá vaginální aplikace 200 mg progesteronu/den u žen s opakovanými těhotenskými neúspěchy, a to s podáním od pozitivního gravitestu až do III.trimestru těhotenství.



"YOU'VE BEEN MISINFORMED. YOU DON'T BECOME IMMUNE AFTER ONE CHILD."