

ROLA KOMÓREK T REGULATOROWYCH W CIĄŻY

ROLE OF REGULATORY T CELLS IN PREGNANCY

Maciej KWIATEK, Anna KWAŚNIEWSKA

Katedra i Klinika Położnictwa i Patologii Ciąży Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie

Streszczenie: Limfocyty T regulatorowe CD4+/CD25+ (TREG) odgrywają kluczową rolę w rozwoju tolerancji immunologicznej w ciąży pozwalając na rozwój obcoantygennego płodu w łonie matki. TREG, aktywowane na skutek kontaktu z ojcowskimi antygenami przy współdziałaniu czynników hormonalnych, regulują odpowiedź immunologiczną poprzez bezpośredni kontakt komórka-komórka, a także przez wytwarzanie cytokin. Populacja TREG rozrasta się w trakcie ciąży, co można stwierdzić zarówno w krążeniu matczynym, jak i w doczesnej. W macicy, na styku środowiska matki i płodu TREG wraz z innymi komórkami immunokompetentnymi pobudzają ekspresję różnych regulatorowych molekuł, takich jak: TGF- β , LIF czy HO-1, tworząc specyficzne mikrośrodowisko sprzyjające tolerancji immunologicznej. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, iż zmniejszona liczba lub upośledzona funkcja CD4+/CD25+ komórek T prowadzi do poważnych zaburzeń w procesie implantacji, sprzyja poronieniom, a także ma udział w patogenezie stanu przedrzucawkowego.

Słowa kluczowe: komórki T regulatorowe CD4+/CD25+, ciąża.

Summary: During gestation, CD4+/CD25+ regulatory T cells (TREG) play crucial role in mechanisms by which maternal immunological system tolerates semiallogeneic fetus. Paternal antigens as well as maternal hormones contribute to the pregnancy-associated increase of TREG population. TREG regulate immunological response by cell-cell contact and indirectly by cytokines. TREG population expands during human pregnancy, that may be detected both in peripheral blood and in decidua. At the fetal-maternal interface TREG create tolerant microenvironment by interaction with other immune cells and by inducing the expression of immune regulatory molecules such as TGF- β , LIF or HO-1. The importance of TREG for a normal pregnancy was proven by many studies. Diminished numbers of CD4+/CD25+ regulatory T cells or their improper function is associated with implantation failure, fetal rejection, miscarriage and pre-eclampsia.

Key words: CD4+/CD25+ regulatory T cells, pregnancy.

WSTĘP

Adaptacja układu immunologicznego matki do rozwoju obcoantygennego płodu jest niezbędna do prawidłowego rozwoju ciąży. Mechanizmy, dzięki którym nie dochodzi do odrzucenia allogenicznego przeszczepu, jaki stanowi płód, są wciąż słabo

poznane i stanowią temat wielu badań naukowych. Syncytiotrofoblast ma bezpośredni kontakt z matczynymi leukocytami krążącymi w przestrzeni międzykosmkowej. U ludzi syncytiotrofoblast nie wykazuje jednak ekspresji antygenów MHC klasy I ani MHC klasy II [27]. Z drugiej strony trofoblast pozakosmkowy obecny w doczesnej ma polimorficzne antygeny HLA-C i monomorficzne antygeny HLA-G, HLA-E i HLA-F z równoczesnym brakiem ekspresji MHC klasy II [27]. W tych warunkach matczyne komórki immunokompetentne nie mają kontaktu z komórkami wykazującymi ekspresję ojcowskich alloantygenów. Łożysko, jak się okazało, nie jest jednak barierą, przez którą nie może zachodzić wymiana komórek między matką a płodem. Stąd komórki pochodzenia płodowego występują w krążeniu matczynym, jak i komórki wywodzące się od matki można stwierdzić u noworodka [1]. Ponadto, w donoszonej ciąży do krążenia matczynego dziennie przedostaje się nawet do kilku gramów fragmentów komórek trofoblastu, w głównej mierze komórek, które wcześniej uległy apoptozie. Na powierzchni retikulum endoplazmatycznego powyższych fragmentów komórek trofoblastu zidentyfikowano niektóre z antygenów MHC klasy II, takie jak: HLA-DR i HLA DQ [29]. Komórki dendrytyczne wylapujące z krążenia matczynego komórki pochodzenia płodowego z ekspresją antygenów MHC klasy I lub MHC klasy II prezentują je następnie matczynym limfocytom CD8+ i CD4+ [27].

Po latach traktowania ciąży jako stanu immunologicznej supresji obecnie większość badaczy skłania się, aby definiować płodowo-matczyną symbiozę jako stan immunologicznej tolerancji. Po odkryciu w latach osiemdziesiątych XX wieku heterogenicznej populacji komórek pomocniczych (*T helper*) przez kilka lat matczyzna tolerancja była rozpatrywana w kontekście tzw. dewiacji immunologicznej i polaryzacji odpowiedzi immunologicznej z przeważającym udziałem cytokin Th2 nad Th1. Jednak badania nad zwierzętami nie wykazały, aby u myszy z genetycznie uwarunkowanym niedoborem Il-4/Il-10 i u myszy z poczworną delecją genową prowadzącą do braku Il-4, Il-5, Il-9 i Il-13 dochodziło do zaburzeń rozrodu [22]. Odkrycia te sugerują, że same komórki Th2 nie gwarantują prawidłowego przebiegu ciąży, a alloreaktywne komórki Th1 muszą być regulowane w inny sposób. Badania z ostatnich lat wskazują, iż za obwodową tolerancję immunologiczną odpowiadają limfocyty T CD4+ ze stałą ekspresją receptora dla łańcucha α IL-2 (CD25). Populację limfocytów T CD4+/CD25+ o właściwościach hamujących określono jako komórki T regulatorowe (TREG).

FUNKCJA TREG

CD4+/CD25+ komórki T regulatorowe mają potencjalną zdolność hamowania immunologicznej odpowiedzi zapalnej oraz odgrywają główną rolę w przeciwdziałaniu autoagresji i tolerancji allogenicznych przeszczepów [28]. Są zdolne nie tylko do hamowania proliferacji i wydzielania cytokin przez limfocyty T CD4+/CD25-, ale działają również supresyjnie w stosunku do limfocytów T CD8+, komórek NK i

komórek dendrytycznych [35]. Fizjologiczna rola TREG jest dwojaka. Po pierwsze, nadzorują komórki T, które nie uległy negatywnej selekcji w grasicy i które rozpoznają własne antygeny. Druga funkcja polega na ograniczaniu natężenia i czasu trwania odpowiedzi immunologicznej komórek T na alloantygeny i antygeny egzogenne. TREG są traktowane jako strażnicy integralności tkanek, zapobiegają bowiem uszkodzeniom, do których może dochodzić podczas niekontrolowanej odpowiedzi immunologicznej. Ta regulacja homeostazy jest najbardziej istotna w tkankach zawierających endogenne antygeny, które nie podlegają rozpoznaniu jako antygeny własne oraz na powierzchniach nabłonkowych, gdzie tolerancja na obce, lecz nieszkodliwe antygeny jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Komórki te odgrywają olbrzymią rolę w immunologii nowotworów, przeszczepów allogenicznych, patogenezie schorzeń autoimmunologicznych i alergicznych. Ponadto, wyjątkowe właściwości TREG, a w szczególności zdolność hamowania immunologicznej odpowiedzi na tkankowo swoiste i alloantygeny wydają się nadawać im unikatową rolę w wydarzeniach związanych z rozrodem i ciążą.

MECHANIZM DZIAŁANIA TREG

Badania na mysim modelu allogenicznej ciąży prowadzą do wniosków, iż w normalnych warunkach matczyne komórki T rozpoznające płodowe alloantygeny są hamowane lub eliminowane. Dokładne mechanizmy interakcji międzykomórkowych biorących udział w wytworzeniu matczynej tolerancji immunologicznej nie są w pełni poznane i stale prowadzone są badania, w których dzięki zastosowaniu nowoczesnych technologii poznawane są kolejne aspekty pozwalające wyjaśnić fenomen tolerancji immunologicznej w ciąży.

TREG, aby mogły spełniać swoją regulatorową funkcję, wymagają aktywacji. Wydaje się, iż zachodzi ona poprzez receptor komórek T (TCR) i kostymulację za pośrednictwem CD28. W procesie aktywacji biorą udział komórki prezentujące antygen – APCs (ang. *antigen presenting cells*), takie jak komórki dendrytyczne DCs – (ang. *dendritic cells*). Po aktywacji, w komórkach regulatorowych dochodzi do ekspresji receptora CCR5 dla chemokin [17] i powierzchniowego receptora CTLA-4 [26]. Aktywowane TREG regulują odpowiedź immunologiczną poprzez bezpośredni kontakt komórka - komórka, a także przez wytwarzanie cytokin, takich jak: TGF- β i Il-10.

Tylko 10–20% krążących komórek T CD4+/CD25+ wykazuje ekspresję CCR5 i tylko one mają zdolność hamowania proliferacji komórek T u myszy, nawet przy braku obecności komórek dendrytycznych [17]. Komórki T CD4+/CD25+/CCR5+ gromadzą się w ciężarnej macicy u myszy, co prawdopodobnie spowodowane jest rozpoznaniem antygenów ojcowskich przez komórki T. Podkreślana jest tu również rola DCs obecnych w macicy, które mogą stymulować ekspresję CCR5 w komórkach T CD4+/CD25+/CCR5-.

Populacja komórek T CD4+/CD25^{high} wykazujących ekspresję powierzchniowego receptora CTLA-4 zwiększa się w doczesnej podczas prawidłowo przebiegającej

ciąży [30]. Nie wykazano jednak takiego wzrostu we krwi obwodowej, co może sugerować, że komórki T CD4+/CD25^{high} rozpoznające ojcowskie antygeny migrują do ciężarnej macicy i te z nich, które mają powierzchniowe receptory CTLA-4, zapobiegają odrzuceniu płodu. W badaniach *in vivo* podawanie przeciwciał anti-CTLA-4 blokowało funkcje komórek T CD4+/CD25+ [23].

Kolejny mechanizm immunoregulacji komórek T regulatorowych CD4+/CD25+ obejmuje nasilenie ekspresji 2,3-dioksygenazy indoleaminy (IDO) w komórkach prezentujących antygen za pośrednictwem powierzchniowego receptora CTLA-4 [7]. Połączenie receptora CTLA-4 z kompleksem B7 na powierzchni APCs indukuje produkcję IFN-gamma, który z kolei pobudza wytwarzanie IDO [7]. IDO jest enzymem biorącym udział w katabolizmie tryptofanu, a jego ekspresja zachodzi w makrofagach, komórkach dendrytycznych i komórkach trofoblastu pozakosmkowego. Zmniejszona produkcja tryptofanu na powierzchni trofoblastu zapobiega aktywacji komórek T i NK, przez co IDO odgrywa ważną rolę w rozwoju tolerancji i utrzymaniu allogenicznej ciąży [36]. Wytwarzanie IFN- γ przez leukocyty doczesnej jest wybitnie nasilone w prawidłowo przebiegającej ciąży, a znacznie zmniejszone w przypadku poronień. Wykazano, iż stymulacja DCs przy pomocy IFN- γ prowadziła do ekspresji IDO przez te komórki, jednak nie miały one właściwości hamujących odpowiedź T komórkową [32]. Odkrycia te sugerują, że zdolność do regulacji układu immunologicznego w obrębie macicy mają tylko te DCs, które wcześniej miały kontakt z receptorem CTLA-4^{high} komórek T.

W interakcji komórka - komórka ważną rolę odgrywają również inne czynniki, wśród których podkreślana jest rola TGF- β 1 związanego z błoną komórkową TREG, który reguluje aktywację komórek T oraz funkcję komórek NK [36]. Jednak badania nad transgenicznymi myszami pozbawionymi powierzchniowego TGF- β 1 wykazały, że funkcja supresorowa komórek T CD4+/CD25 była nadal zachowana, co stwarza kontrowersje w sprawie rzeczywistej roli TGF- β 1 [15].

Kolejną niedawno odkrytą molekułą, której przypisuje się ważną rolę dla prawidłowego funkcjonowania komórek T, jest galektyna-1 [10]. Jej ekspresja na powierzchni komórek T CD4+/CD25+ oraz komórek NK CD16-/CD56^{bright} w macicy jest regulowana przez hormony steroidowe [8]. Komórki T CD4+/CD25+ pochodzące od transgenicznych myszy niewytwarzających galektyny-1 wykazywały znacznie niższą zdolność immunoregulującą [10].

Mechanizmy prowadzące do zmniejszonej aktywności komórek T obejmują między innymi oddziaływanie na receptor PD-1 w komórkach CD28 przez wiązanie PDL-1, co warunkuje tolerancję immunologiczną w tkankach obwodowych [29]. Receptory PD-1 wykryto również na komórkach T CD4+/CD25+. W ciąży ekspresja PDL-1 zachodzi w komórkach syncytiotrofoblastu, cytotrofoblastu oraz trofoblastu pozakosmkowego. Trofoblast może być chroniony przed atakiem matczynek komórek T przez układ PDL-1/PD-1, a sam trofoblast może regulować funkcje komórek T CD4+/CD25+ poprzez ten układ. W modelu mysim, u osobników pozbawionych zdolności ekspresji PDL-1, dochodziło do szybkiego odrzucenia ciąży i poronienia w ciążach allogenicznych, natomiast nie wykazano takiej zależności w przypadku ciąż syngenicznych [39].

Wysunięto teorię, według której dla utrzymania i prawidłowego rozwoju ciąży konieczne jest specyficzne mikrośrodowisko sprzyjające tolerancji immunologicznej. Między innymi podkreśla się ogromną rolę oksygenazy hemowej-1 (HO-1), enzymu cytoprotekcyjnego, związanego ze stresem oksydacyjnym w przebiegu różnych procesów zapalnych. Nasilenie ekspresji HO-1 zachodzi pod wpływem Foxp3 [37], czego dowodem był stwierdzony wysoki poziom HO-1 mRNA u zwierząt, którym podawano komórki regulatorowe [40]. Z kolei u transgenicznych myszy, które roniły ciążę, poziom HO-1 w łożysku i w doczesnej był znacznie obniżony [39]. Kolejnym ważnym czynnikiem wydaje się być czynnik hamujący białaczkę (LIF). Podkreśla się jego szczególne znaczenie w procesie implantacji [38]. U zwierząt pozbawionych genu kodującego LIF nie dochodzi do prawidłowego zagnieżdżenia blastocysty. Dootrzewnowe podanie LIF tym zwierzętom w 4 dniu od zapłodnienia pozwalało jednak na prawidłową implantację [42]. Podanie limfocytów T regulatorowych istotnie zwiększało poziom LIF [38].

Mechanizmy, przez jakie TREG oddziałują na układ immunologiczny w trakcie ciąży, wydają się być bardzo złożone i istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań mających na celu ich wyjaśnienie, szczególnie w aspekcie ciąży o patologicznym przebiegu.

EKSPANSJA TREG W CIAŻY

Komórki T CD4⁺/CD25⁺ pełnią kluczową rolę w utrzymaniu tolerancji immunologicznej w okresie ciąży, jednak czynniki odpowiedzialne za rekrutację tych komórek wciąż pozostają niejasne. Obecnie postulowane są dwa różne mechanizmy przyczyniające się do ekspansji TREG: zależny i niezależny od antygenów.

Szczególnie interesujące wydają się zagadnienia dotyczące tego, jak, gdzie i kiedy dochodzi do rozpoznania ojcowskich antygenów przez matczyne komórki immunokompetentne. U myszy w niedługim czasie po zapłodnieniu obecność ojcowskich antygenów można stwierdzić w różnych narządach żeńskich osobników, takich jak: węzły chłonne, śledziona, grasica oraz we krwi obwodowej [33, 41]. Prawdopodobnie ojcowskie antygeny są wylapywane z nasienia przez APCs obecne w śluzie szyjkowym, a następnie transportowane do układu limfatycznego, gdzie dochodzi do aktywacji i proliferacji TREG, nie stwierdzono bowiem obecności komórek wykazujących ekspresję Foxp3 w samym śluzie szyjkowym [41]. Rekrutacja TREG w organizmie matki prawdopodobnie może zachodzić także na skutek kontaktu z ojcowskimi APCs obecnymi w nasieniu, pod wpływem których CD4⁺/CD25⁻ komórki T spontanicznie przekształcają się w CD4⁺/CD25⁺ komórki T [12]. Limfocyty te fenotypowo i funkcjonalnie nie różnią się od naturalnie występujących TREG [12]. Wiadomo także, iż w obwodowych tkankach limfatycznych same TREG mają zdolność do stymulacji komórek T CD4⁺/CD25⁻, na skutek czego powstają komórki o właściwościach supresorowych [28].

U myszy wzrost populacji TREG w węzłach chłonnych zbierających chłonkę z macicy był stwierdzany już w 2 dni po zapłodnieniu [2, 33]. Podanie w tym czasie

monoklonalnych przeciwciał PC61 zmniejszających liczbę TREG powodował zaburzenie implantacji [39]. Wyniki cytowanych powyżej badań skłaniają do wniosku, że komórki T regulatorowe są niezbędne do prawidłowego zagnieżdżenia jaja płodowego, a ich obecność w macicy jest konieczna jeszcze przed tym procesem. We wczesnej ciąży wysoki odsetek komórek T CD4+/CD25+ został stwierdzony zarówno w doczesnej, jak i w krążeniu macicznym. Populacja komórek T CD4+/CD25^{high} w doczesnej niemal trzykrotnie przewyższa jednak poziom tych limfocytów stwierdzany we krwi [26]. Najwyższy poziom TREG osiągają w drugim trymestrze ciąży [26, 30]. Ciągłe uwalnianie do macicznego krwioobrotu antygenów pochodzących z łożyska pozwala na utrzymywanie się populacji limfocytów regulatorowych specyficznych dla antygenów ojcowskich i zachowanie tolerancji immunologicznej w stosunku do semiallogenicznego płodu do końca trwania ciąży. TREG migrują z tkanek obwodowych do macicy, gdzie na granicy tkanek macicznych i płodowych tworzą specyficzne mikrośrodowisko działając tolerogennie poprzez różne wspomniane wcześniej mechanizmy. Niektóre badania wykazały związek pomiędzy obniżeniem poziomu komórek T CD4+/CD25+ w obrębie doczesnej a wystąpieniem czynności porodowej [9]. W okresie poporodowym populacja komórek T CD4+/CD25+ stopniowo zmniejsza się, a ich poziom jest tylko nieznacznie wyższy niż przed ciążą [30]. Po ciąży brak dalszej stymulacji TREG przez ojcowskie antygeny powoduje spadek ich liczby oraz zanik aktywności, czego dowodem może być brak tolerancji i odrzucanie przeszczepów tkanek ojcowskich [13].

Druga przyczyna ekspansji TREG to prawdopodobnie czynnik hormonalny. Mao i wsp. [18] wykazali istotny wpływ estrogenów na nasilenie ekspresji Foxp3 zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Podawanie estrogenów myszom prowadziło do wzrostu populacji komórek T CD4+/CD25+, stąd hormony te prawdopodobnie sprzyjają rozwojowi macicznej tolerancji. Ponadto wzrost odsetka TREG wykazano zarówno w ciążach syngenicznych, jak i allogenicznych [2]. Według autorów, estrogeny nie tylko stymulują proliferację TREG, ale również sprzyjają przekształceniu CD4+/CD25⁻ komórek T w populację CD4+/CD25⁺.

W swoich badaniach Mao i wsp. [18] nie wykazali, aby poziom progesteronu, hormonu najważniejszego dla utrzymania ciąży, korelował z poziomem i aktywnością TREG. U transgenicznych myszy, wykazujących skłonność do poronień, stwierdzano poziomy progesteronu porównywalne z grupą kontrolną. Autorzy podważyli tym samym teorię, aby niepowodzenie ciąży wynikało tylko z niskiego poziomu hormonów [35]. Stwierdzono, że do odrzucenia płodu niezbędny był czynnik immunologiczny w postaci podwyższonego poziomu TNF- α . Z tego powodu uważa się, że status hormonalny ciąży jest istotny, ale to układ immunologiczny ma decydujące znaczenie dla prawidłowego jej rozwoju [38].

ROLA TREG W CIĄŻY LUDZKIEJ I MODELU MYSIM

U kobiety ciężarnej już na bardzo wczesnym etapie ciąży obserwuje się zwiększoną liczbę komórek T regulatorowych zarówno we krwi doczesnej, jak i

obwodowej [20, 30]. Badania wskazują, iż wzrost populacji TREG wynika z obecności ojcowskich antygenów [19, 34] i komórki te mają zapobiegać odrzuceniu obcych antygenów przez matczyne układy immunologiczne. Somerset i wsp. [30] wykazali, że średni odsetek komórek T CD4+/CD25+ był dwukrotnie wyższy w grupie ciężarnych w porównaniu z kontrolną grupą zdrowych kobiet nie będących w ciąży. Największy wzrost odsetka TREG był obserwowany w drugim trymestrze. Liczba komórek T CD4+/CD25+ zmniejszała się 6–8 tygodni po porodzie [30]. Izolowane komórki T CD4+/CD25+ wykazywały ekspresję Foxp3 mRNA, czynnika transkrypcji będącego najbardziej specyficznym i wiarygodnym markerem komórek CD4+ [43]. W powyższych badaniach brano pod uwagę całą populację CD4+/CD25+ komórek T, natomiast za rzeczywiste funkcje regulatorowe odpowiada populacja komórek CD4+/CD25^{high}. Według Sasaki i wsp. [26] odsetek krążących CD4+/CD25^{high} komórek T poza ciążą wynosi 6%. We wczesnej prawidłowo przebiegającej ciąży odsetek ten zwiększa się do 8%. Sasaki i wsp. [26] jako pierwsi opisali zależność pomiędzy samoistnym poronieniem a zmniejszonym poziomem krążących TREG. W obrębie doczesnej obserwuje się jeszcze większy odsetek komórek T CD4+/CD25^{high} sięgający 20%, który w przypadku samoistnego poronienia spada do poziomu sprzed ciąży. Badania Arruvito i wsp. [3] potwierdziły niższy poziom TREG u kobiet z nawracającymi poronieniami i wykazały, że immunizacja antygenami ojca zmienia w osoczu poziom czynników odpowiedzialnych za procesy zależne od Il-6 i prowadzi do wzrostu populacji komórek T regulatorowych u matki.

Badania prowadzone wśród kobiet z niepłodnością pierwotną wykazały bardzo niską ekspresję mRNA dla Foxp3 w obrębie endometrium w połowie fazy sekrecyjnej cyklu miesięczkowego [16]. Może to dowodzić, że słaba ekspresja tego genu zaburza różnicowanie macicznych komórek T CD4+/CD25^{high} i uniemożliwia prawidłową implantację.

Aluvihare i wsp. [2] udowodnili wzrost populacji TREG w niemal wszystkich tkankach u ciężarnych myszy w porównaniu z nieciążnymi. Podobne spostrzeżenia mieli także inni autorzy, którzy ponadto wykazali, że w przypadkach ciąży zakończonej poronieniem odsetek TREG w tkankach ciężarnych myszy, takich jak: śledziona, grasica czy doczesna, był istotnie niższy w porównaniu z osobnikami z ciążą przebiegającą prawidłowo [39]. Aktywność TREG w obrębie doczesnej była również zmniejszona, co potwierdzono badając poziom Foxp3 i neuropiliny-1 [39]. W doświadczeniach prowadzonych przez Aluvihare i wsp. [2], w których w sposób sztuczny zmniejszono liczbę komórek T CD4+/CD25+, nie udało się uzyskać prawidłowo przebiegającej ciąży. Badania prowadzone u kobiet ciężarnych wykazują analogiczne jak w modelach zwierzęcych zależności. Sasaki i wsp. [26] w swojej pracy obserwowali, że kobiety, u których doszło do samoistnego poronienia, miały niższy odsetek komórek T CD4+/CD25+ w doczesnej w porównaniu z tą tkanką u kobiet z ciążą prawidłową. Odkrycia te sugerują, iż mechanizmy mogące wpływać na tolerancję immunologiczną w ciąży są podobne u ludzi i u myszy, a niedostatek komórek T CD4+/CD25+ może prowadzić do straty ciąży.

Kolejne interesujące wyniki przyniosły badania Zenclussen i wsp. [39] nad transgenicznymi myszami CBA/J x DBA/2 skłonnyymi do poronień. W dniu zapłodnienia i dwa dni później badacze podawali komórki T CD4+/CD25+, które wcześniej wyizolowano od zdrowych żeńskich osobników zarówno ciężarnych, jak i niebędących w ciąży. Transfer komórek od osobników ciężarnych pozwolił uzyskać 100% prawidłowych ciąż, natomiast komórki pochodzące od nieciężarnych nie zapobiegały poronieniom. Sugeruje to, iż tylko wcześniejsza ekspozycja na antygeny ojcowskie moduluje TREG i wpływa na ich protekcyjne działanie. Podanie komórek pomiędzy 4 a 5 dniem od zapłodnienia nie chroniło jednak przed poronieniem.

U podłoża niektórych patologii ciąży, takich jak: nawykowe poronienia, poród przedwczesny, często leżą procesy zapalne lub infekcyjne mogące prowadzić do nieprawidłowej rekrutacji bądź zaburzonej funkcji komórek T CD4+/CD25+ [27]. Wykazano, iż czynnik bakteryjny lub wirusowy może blokować supresyjną rolę komórek T CD4+/CD25+, przez co dochodzi do aktywacji adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej specyficznej dla danego patogenu. Blokowanie TREG zachodzi w tym przypadku za pośrednictwem receptorów TLR, których ekspresja ma miejsce między innymi w komórkach T CD4+/CD25+ [8]. TLR odpowiedzialne są za wrodzone mechanizmy obronne organizmu gospodarza. Przedłużająca się aktywacja TLR znosi immunoregulującą funkcję TREG [8]. Częściowo blokowanie supresyjnej aktywności TREG jest zależne od IL-6 [28]. Ta prozapalna cytokina hamuje także tolerogenną funkcję komórek dendrytycznych CD8+ wykazujących ekspresję IFN- γ i produkującychIDO [7]. Nadmierna odpowiedź zapalna była obserwowana również w przypadku stanu przedrzucawkowego [24]. W przypadku tego powikłania ciąży odsetek komórek T CD4+/CD25+ jest zmniejszony zarówno w obrębie doczesnej, jak i we krwi obwodowej [6, 25, 26]. Jedną z teorii rozwoju stanu przedrzucawkowego pozostaje nieprawidłowa inwazja trofoblastu w obrębie endometrium, na skutek czego dochodzi do prezentacji matczynym APCs niektórych alloantygenów pochodzących z trofoblastu [11]. Przewlekły proces zapalny w przypadku nawracających poronień, porodu przedwczesnego czy stanu przedrzucawkowego może więc poważnie zaburzać efekt supresorowy komórek T CD4+/CD25+, co może prowadzić do nasilenia odpowiedzi immunologicznej mającej na celu odrzucenie płodu.

MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE

Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że oddziaływanie na układ immunologiczny matki ukierunkowane na nasilenie działania populacji limfocytów T regulatorowych, może pozytywnie wpłynąć na przebieg ciąży [2, 13, 14, 39]. Autorzy podkreślali szczególnie potencjalne zastosowanie antygenowo swoistych TREG w leczeniu niepłodności i poronień. Próby immunizacji matki antygenami ojca w przypadku nawykowych poronień o niewyjaśnionej etiologii prowadzone w różnych ośrodkach wykazywały znaczący wzrost liczby TREG [3, 12]. Badania Clark i wsp. [5] polegały na dopochwowym podaniu myszom TGF- β , co również prowadziło do

zwiększenia populacji limfocytów T regulatorowych i redukowało liczbę poronień. Obiecująco wyglądały próby pobudzania rekrutacji TREG przez super agonistów CD28 [4], jednak badania kliniczne przeprowadzone w 2006 roku przez Suntharalingam i wsp. [31] przyniosły mniej entuzjastyczne rezultaty. U zdrowych kobiet, którym podano TGN1412 – ludzkie monoklonalne przeciwciała przeciwko CD28, wystąpiło mnóstwo objawów niepożądanych, takich jak: bóle głowy, bóle mięśni, wymioty, biegunka, rumień, rozszerzenie naczyń krwionośnych, spadek ciśnienia tętniczego, a nawet uszkodzenie płuc, niewydolność nerek i zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) [31]. Nie wszystkie więc pozytywne skutki tego typu terapii u gryzoni są możliwe również u ludzi, stąd potrzebne są dalsze badania nad zastosowaniem biologicznego leczenia w przypadku niepłodności, poronień czy stanu przedrzucawkowego.

WNIOSKI

Ostatnie lata przyniosły odkrycie nowej populacji komórek, jakimi są limfocyty T regulatorowe CD4+/CD25+, którym przypisuje się ogromną funkcję immunoregulującą pozwalającą na rozwój obcoantygenowej ciąży w łonie matki. W bardzo krótkim czasie po zapłodnieniu komórki te na skutek kontaktu z antygenami ojcowskimi i przy współdziałaniu czynników hormonalnych zostają aktywowane, a ich populacja rozrasta się w miarę trwania ciąży. Znaczenie TREG dla prawidłowego rozwoju ciąży zostało udowodnione przede wszystkim na modelach zwierzęcych, gdzie wykazano, iż niedostatek ich liczby lub upośledzona funkcja przyczyniają się do niepłodności i poronień. W macicy, na styku tkanek macicznych i trofoblastu, TREG, przy współdziałaniu innych komórek immunokompetentnych, takich jak: komórki NK czy dendrytyczne, nasilają ekspresję różnych regulatorowych molekuł, między innymi TGF- β , LIF czy HO-1 i tworzą specyficzne mikrośrodowisko sprzyjające tolerancji immunologicznej. Prowadzone próby leczenia niepłodności i poronień nawykowych przez wpływ na limfocyty T regulatorowe wciąż pozostają w sferze badań przedklinicznych. Niezbędne wydają się dalsze badania, które pozwolą lepiej poznać mechanizmy działania protekcyjnego TREG w stosunku do płodu, tak by wiedza ta pozwoliła pomóc kobietom zająć w ciąży i urodzić zdrowe, donoszone dziecko.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS AP, ORIOL JG, CAMPBELL RE, OPPENHEIM YC, ALLEN WR, ANTCZAK DF. The effect of skin allografting on the equine endometrial cup reaction. *Theriogenology* 2007; **68**(2): 237–247.
- [2] ALUVIHARE VR, KALLIKOURDIS M, BETZ AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; **5**(3): 266–271.
- [3] ARRUVITO L, BILLORDO A, CAPUCCHIO M, PRADAME, FAINBOIM L. IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2009; **82**(2): 158–165.

- [4] BEYERSDORF N, HANKE T, KERKAU T, HÜNIG T. CD28 superagonists put a break on autoimmunity by preferentially activating CD4+CD25+ regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 2006; **5**(1): 40–45.
- [5] CLARK DA, FERNANDES J, BANWATT D. Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4+8+ FOXP3+ cells. *Am J Reprod Immunol* 2008; **59**(6): 525–534.
- [6] DARMOCHWAL-KOLARZ D, SAITO S, ROLINSKI J, TABARKIEWICZ J, KOLARZ B, LESZCZYNSKA-GORZELAK B, OLESZCZUK J. Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; **58**(1): 39–45.
- [7] FALLARINO F, GROHMANN U. Using an Ancient Tool for Igniting and Propagating Immune Tolerance: IDO as an Inducer and Amplifier of Regulatory T Cell Functions. *Curr Med Chem* 2011; **18**(15): 2215–2221.
- [8] FRIEBE A, DOUGLAS AJ, SOLANO E, BLOIS SM, HAGEN E, KLAPP BF, CLARK DA, ARCK PC. Neutralization of LPS or blockage of TLR4 signaling prevents stress-triggered fetal loss in murine pregnancy. *J Mol Med* 2011 [Epub ahead of print].
- [9] GALAZKA K, WICHEREK L, PITYNSKI K, KIJOWSKI J, ZAJAC K, BEDNAREK W, DUTSCHWICHEREK M, RYTLEWSKI K, KALINKA J, BASTAA, MAJKAM. Changes in the subpopulation of CD25+ CD4+ and FOXP3+ regulatory T cells in decidua with respect to the progression of labor at term and the lack of analogical changes in the subpopulation of suppressive B7-H4 macrophages – a preliminary report. *Am J Reprod Immunol* 2009; **61**(2): 136–146.
- [10] GARÍN MI, CHU CC, GOLSHAYAN D, CERNUDA-MOROLLÓN E, WAIT R, LECHLER RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2007; **109**(5): 2058–2065.
- [11] GOSWAMI D, TANNETTA DS, MAGEE LA, FUCHISAWA A, REDMAN CW, SARGENT IL, VON DADELSZEN P. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006; **27**(1): 56–61.
- [12] GUERIN LR, MOLDENHAUER LM, PRINS JR, BROMFIELD JJ, HAYBALL JD, ROBERTSON SA. Seminal Fluid Regulates Accumulation of FOXP3+ Regulatory T Cells in the Preimplantation Mouse Uterus Through Expanding the FOXP3+ Cell Pool and CCL19-Mediated Recruitment. *Biol Reprod* 2011 [Epub ahead of print].
- [13] GUERIN LR, PRINS JR, ROBERTSON SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update* 2009; **15**(5): 517–535.
- [14] HABICHTA, DADAS, JUREWICZ M, FIFE BT, YAGITA H, AZUMAM, SAYEGH MH, GULERIAI. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. *J Immunol* 2007; **179**(8): 5211–5219.
- [15] HOUSLEY WJ, ADAMS CO, NICHOLS FC, PUDDINGTON L, LINGENHELD EG, ZHU L, RAJAN TV, CLARK RB. Natural but Not Inducible Regulatory T Cells Require TNF- α Signaling for *In Vivo* Function. *J Immunol* 2011 [Epub ahead of print].
- [16] JASPER MJ, TREMELLEN KP, ROBERTSON SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod* 2006; **12**(5): 301–308.
- [17] KALLIKOURDIS M, ANDERSEN KG, WELCH KA, BETZ AG. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(2): 594–599.
- [18] MAO G, WANG J, KANG Y, TAI P, WEN J, ZOU Q, LI G, OUYANG H, XIA G, WANG B. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology* 2010; **151**(11): 5477–5488.
- [19] MJÖSBERG J, BERG G, ERNERUDH J, EKERFELT C. CD4+ CD25+ regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. *Immunology* 2007; **120**(4): 456–466.
- [20] MJÖSBERG J, SVENSSON J, JOHANSSON E, HELLSTRÖM L, CASAS R, JENMALM MC, BOIJ R, MATTHIESEN L, JÖNSSON JI, BERG G, ERNERUDH J. Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17beta-estradiol. *J Immunol* 2009; **183**(1): 759–769.
- [21] READ S, GREENWALD R, IZCUE A, ROBINSON N, MANDELBROT D, FRANCISCO L, SHARPE AH, POWRIE F. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function *in vivo*. *J Immunol* 2006; **177**(7): 4376–4383.

- [22] SAINI V, ARORA S, YADAV A, BHATTACHARJEE J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J. Clin Chim Acta* 2011; **412**(9–10): 702–708.
- [23] SAITO S, SAKAI M, SASAKI Y, NAKASHIMAA, SHIOZAKI A. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2007; **76**(1–2): 30–39.
- [24] SARGENT IL, BORZYCHOWSKIAM, REDMAN CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 2006; **13**(5): 680–686.
- [25] SASAKI Y, DARMOCHWAL-KOLARZ D, SUZUKI D, SAKAI M, ITO M, SHIMA T, SHIOZAKI A, ROLINSKI J, SAITO S. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 2007; **149**(1): 139–145.
- [26] SASAKI Y, SAKAI M, MIYAZAKI S, HIGUMAS, SHIOZAKIA, SAITO S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**(5): 347–353.
- [27] SCHERJON S, LASHLEY L, VAN DER HOORN ML, CLAAS F. Fetus specific T cell modulation during fertilization, implantation and pregnancy. *Placenta* 2011 [Epub ahead of print].
- [28] SHALEV I, SCHMELZLE M, ROBSON SC, LEVY G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol* 2011 [Epub ahead of print].
- [29] SHARPE AH, WHERRY EJ, AHMED R, FREEMAN GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007; **8**: 239–245.
- [30] SOMERSET DA, ZHENG Y, KILBY MD, SANSOM DM, DRAYSON MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004; **112**(1): 38–43.
- [31] SUNTHARALINGAM G, PERRY MR, WARD S, BRETT SJ, CASTELLO-CORTES A, BRUNNER MD, PANOSKALTSIS N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; **355**(10): 1018–1028.
- [32] TERNESS P, CHUANG JJ, BAUER T, JIGAL, OPELZ G. Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO? *Blood* 2006; **105**(6): 2480–2486.
- [33] THUERE C, ZENCLUSSEN ML, SCHUMACHER A, LANGWISCH S, SCHULTE-WREDE U, TELES A, PAESCHKE S, VOLK HD, ZENCLUSSEN AC. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; **58**(6): 514–523.
- [34] TILBURGS T, ROELEN DL, VAN DER MAST BJ, DE GROOT-SWINGS GM, KLEIJBURG C, SCHERJON SA, CLAAS FH. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol* 2008; **180**(8): 5737–5745.
- [35] TROWSDALE J, BETZ AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol* 2006; **7**(3): 241–246.
- [36] VACCA P, CANTONI C, VITALE M, PRATO C, CANEGALLO F, FENOGLIO D, RAGNI N, MORETTA L, MINGARI MC. Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**(26): 11918–11923.
- [37] ZELENAY S, CHORAA, SOARES MP, DEMENGEOT J. Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function. *Int Immunol* 2007 Jan; **19**(1): 11–18.
- [38] ZENCLUSSEN AC, GERLOF K, ZENCLUSSEN ML, RITSCHEL S, ZAMBON BERTOJAA, FEST S, HONTSU S, UEHAS, MATSUSHIMA K, LEBER J, VOLK HD. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol* 2006; **36**(1): 82–94.
- [39] ZENCLUSSEN AC, GERLOF K, ZENCLUSSEN ML, SOLLWEDEL A, BERTOJAAZ, RITTER T, KOTSCH K, LEBER J, VOLK HD. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol* 2005; **166**(3): 811–822.
- [40] ZENCLUSSEN ML, ANEGON I, BERTOJAAZ, CHAUVEAU C, VOGT K, GERLOF K, SOLLWEDELA, VOLK HD, RITTER T, ZENCLUSSEN AC. Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. *J Reprod Immunol* 2006; **69**(1): 35–52.
- [41] ZENCLUSSEN ML, THUERE C, AHMAD N, WAFULA PO, FEST S, TELES A, LEBERA, CASALIS PA, BECHMANN I, PRILLER J, VOLK HD, ZENCLUSSEN AC. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; **63**(3): 200–208.

- [42] ZHAO M, CHANG C, LIU Z, CHEN LM, CHEN Q. Placenta. Treatment with low-dose aspirin increased the level LIF and integrin $\beta 3$ expression in mice during the implantation window. 2010 Dec; **31**(12): 1101–1105.
- [43] ZIEGLER SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006; **24**: 209–226.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 25.05. 2011 r.

Przyjęto: 02.06. 2011 r.

lek. med. Maciej Kwiatek

Katedra i Klinika Położnictwa i Patologii Ciąży UM w Lublinie

ul. Staszica 16, 20-081 Lublin

e-mail: kwiatula1@wp.pl