



T-regulačné lymfocyty v reprodukcii

Elena Tibenská, Barbora Onderová, Katarína Bergendiová



Asociácia IS s reprodukčným systémom človeka je jedným z najdôležitejších objavov v reprodukcii.

1953

- Medawar ako prvý predstavil existenciu regulačných mechanizmov – supresia maternálneho IS

1970s

- *Gershon & Kondo* – história regulačných buniek/ lymfocyty „suppressor T-cells“

1980s

- Objavy ohľadne heterogenity Th buniek

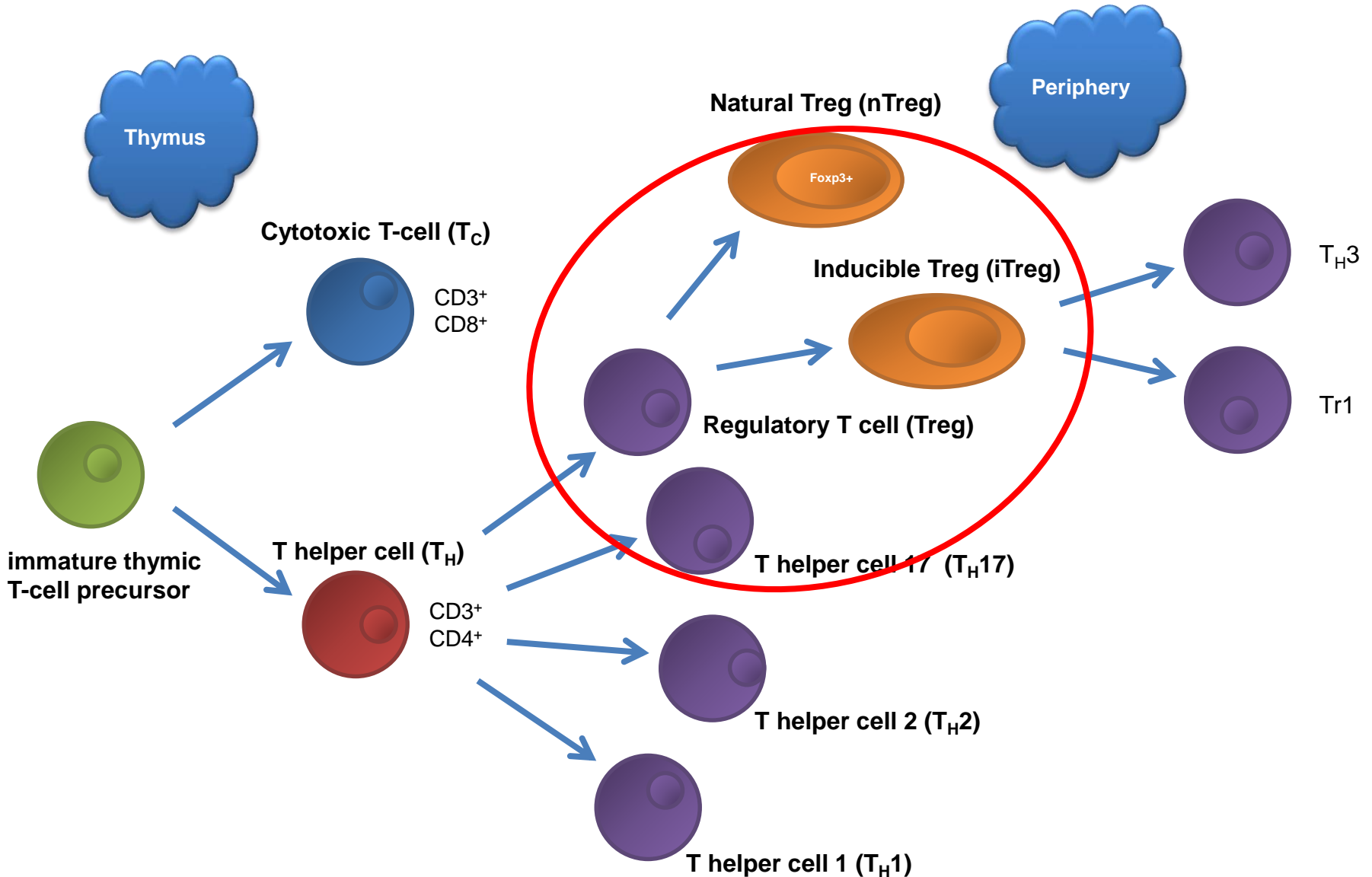
1995

- *Sakaguchi et al.* - **Treg bunky (CD4⁺CD25⁺)** špecializovaná subpopulácia T-buniek u myší (eliminácia CD4⁺CD25⁺ T-buniek spôsobuje multiorgánovú autoimunitu)

2003

- transkripčný faktor *FOXP3* – hlavný kontrolný gén – vývoj a funkcia Treg – mutácia - IPEX syndrom

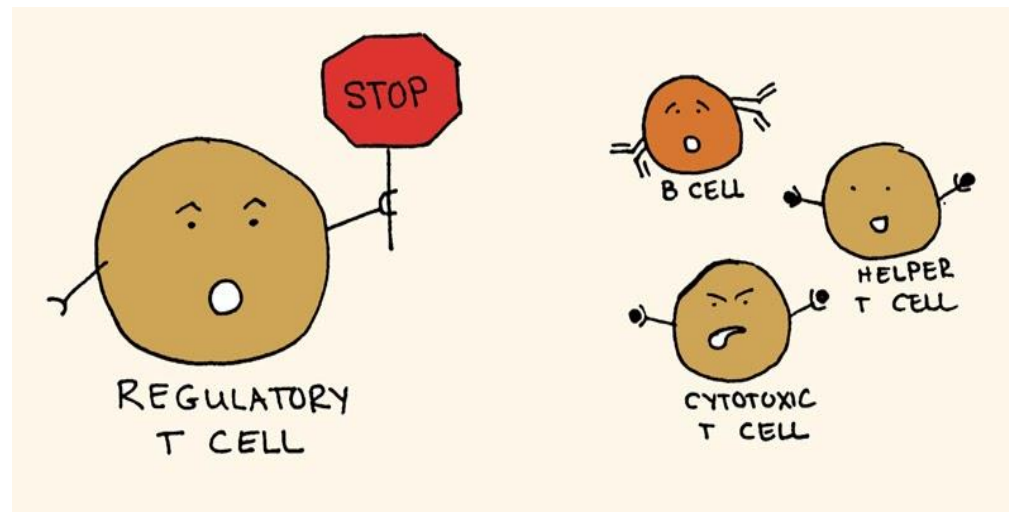
T-lymfocyty



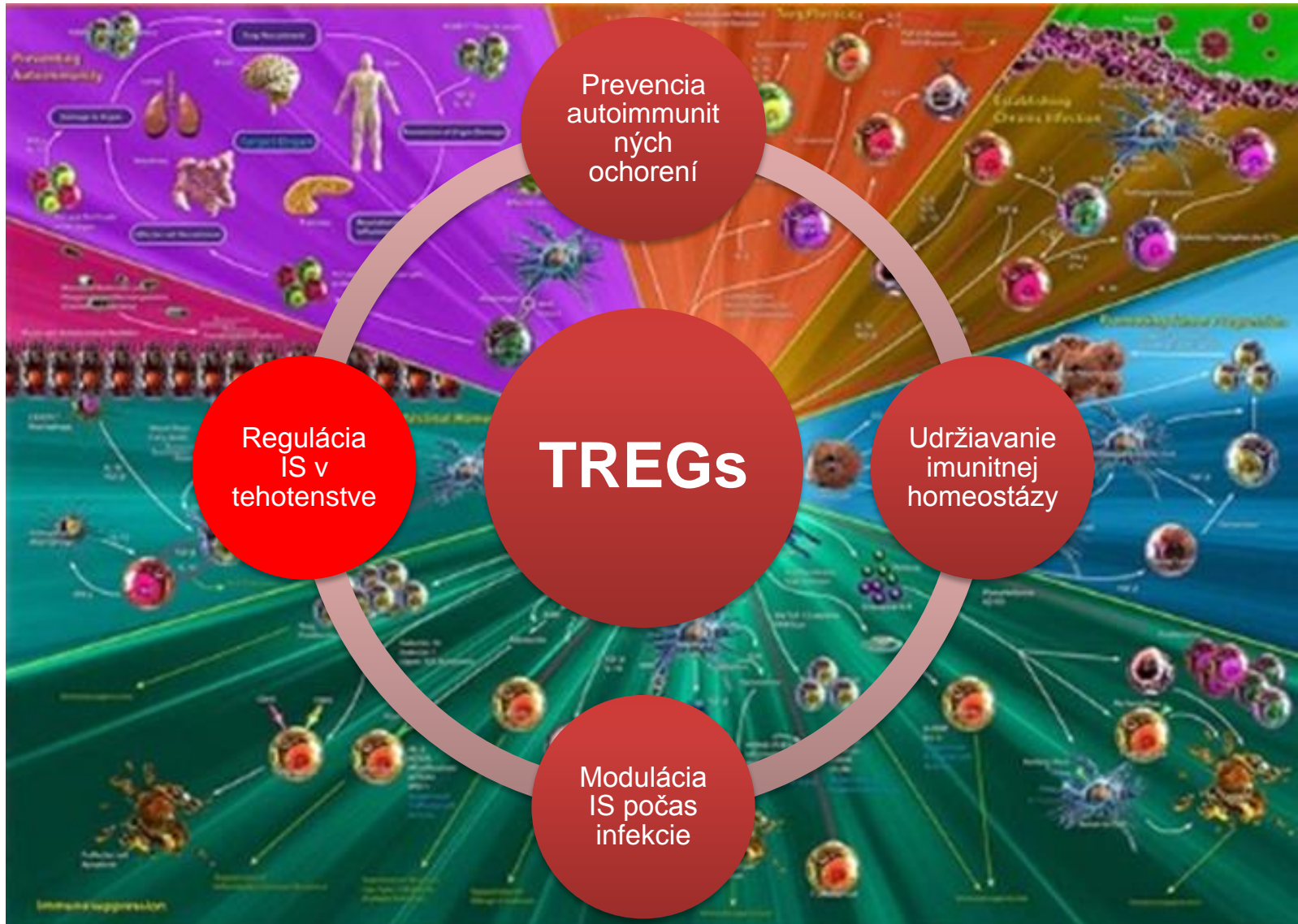
jedna z populácií CD4+ lymfocytov (CD25+CD127dim/low)

- konvenčný TCR
- tolerogénne pôsobenie
- ✓ tolerancia voči „vlastnému“ – zabraňujú vzniku autoimunitných chorôb
- ✓ tolerancia k antigénom črevnej flóry - orálna tolerancia
- ✓ aktívna imunitná tolerancia plodu
 - inhibícia produkcie cytokínov CD4+ a CD8+
 - inhibícia proliferácie a produkcie protilátok u B-lymfocytmi
 - inhibícia cytotoxického pôsobenia NK buniek
 - inhibícia maturácie a diferenciácie makrofágov a dendritických buniek

- v periférnej krvi - 5 až 10% z CD4+



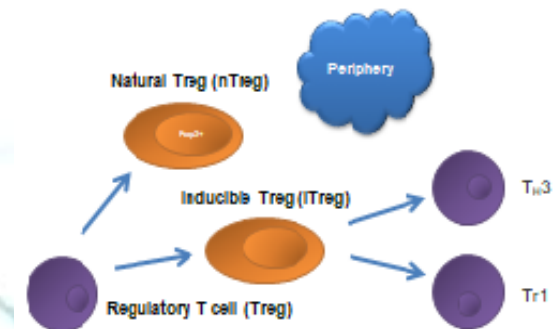
T-regulačné bunky



Tregs a tehotenstvo

animálne modely

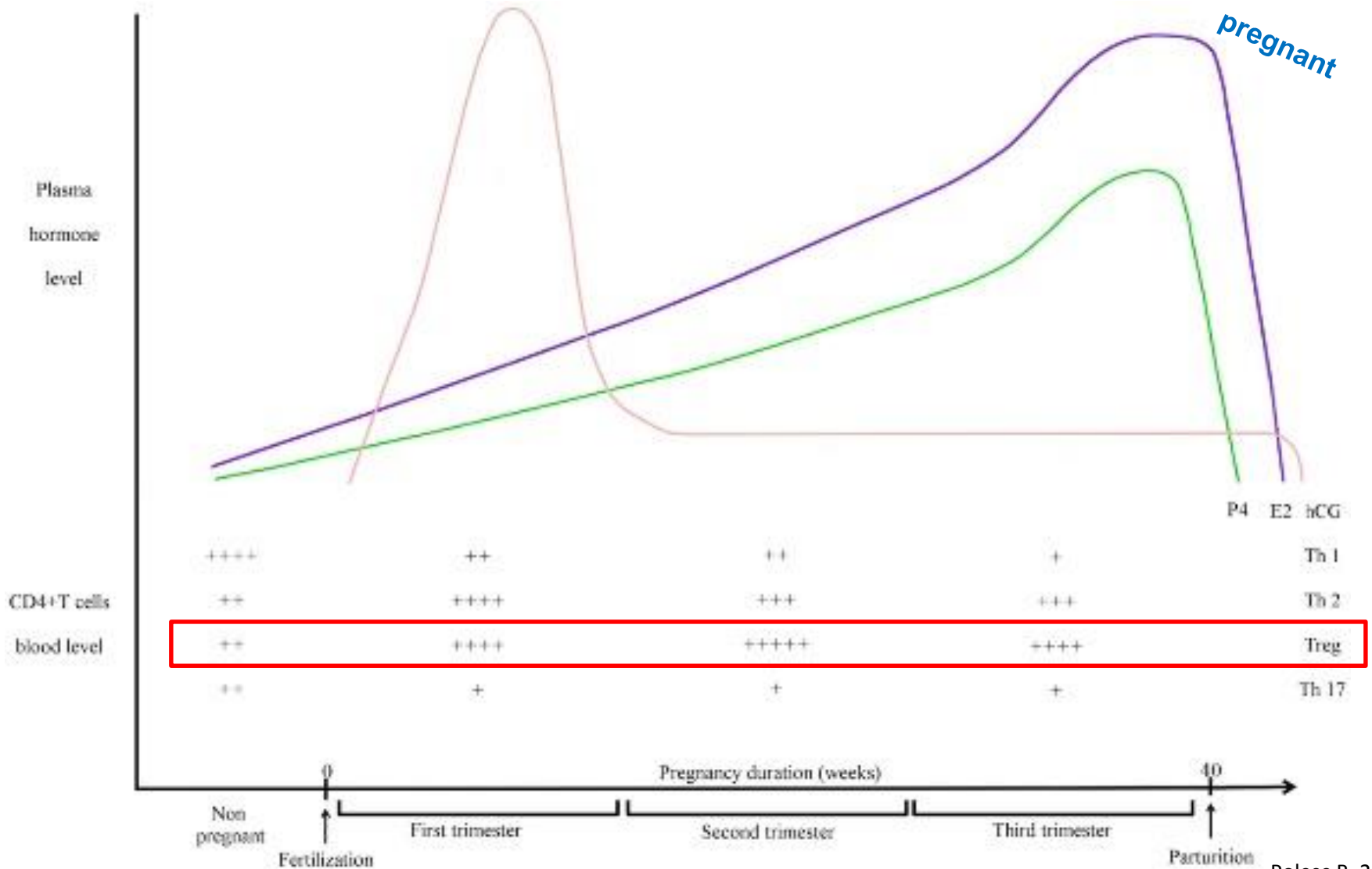
- Aluvihare (2004) – Treg – tolerancia plodu (u myší)
 - expanzia CD4+CD25+ počas tehotenstva
 - expresia Foxp3 uterinnými CD4+CD25+ T-lymfocytmi
 - deplécia CD4+CD25+ \Rightarrow gestačné zlyhanie
- Zenclussen (2005, 2006) - \downarrow aktivita Tregs \Rightarrow spontánne aborty
 - transfer Treg \Rightarrow zabránenie abortov – vytvorenie tolerogénneho mikroprostredia (produkcia LIF, TGF- β , HO-1)
- Robertson (2009) – seminálna tekutina – spôsobuje expanziu Tregs
- Shima (2010) – Treg – nevyhnutné pre implantáciu a skoré štádia tehotenstva
- ktoré Tregs sú potrebné pre normálne tehotenstvo:
 - Samstein (2012) – iTreg
 - Zenclussen (2010,2013)
 - tTreg – implantácia a skoré štádiá
 - iTreg – neskoršie štádiá tehotenstva
- **Tilburgs (2008)** – migrácia špecifických Treg z PK do decidua počas tehotenstva



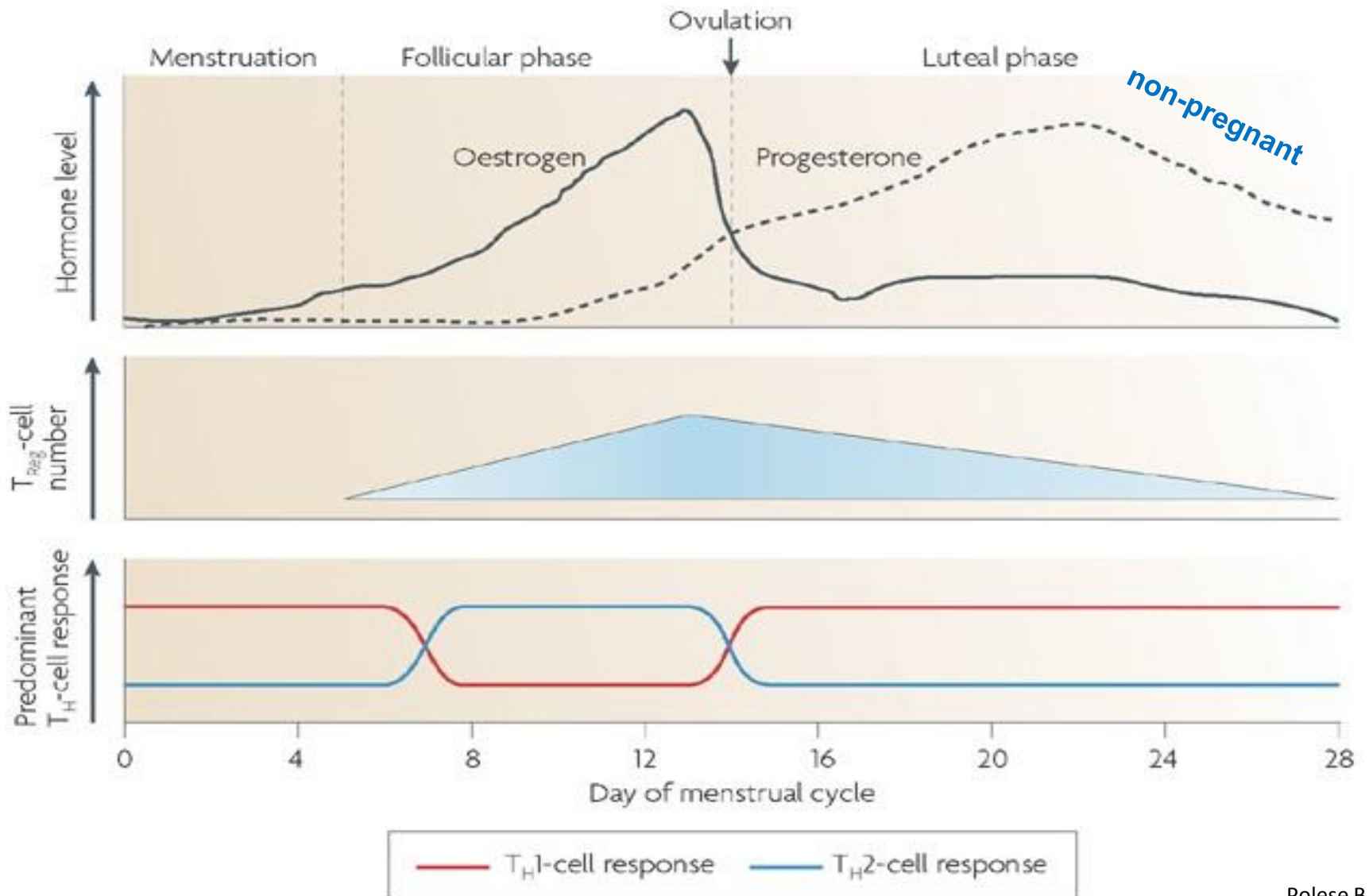
TREGs a poruchy tehotenstva

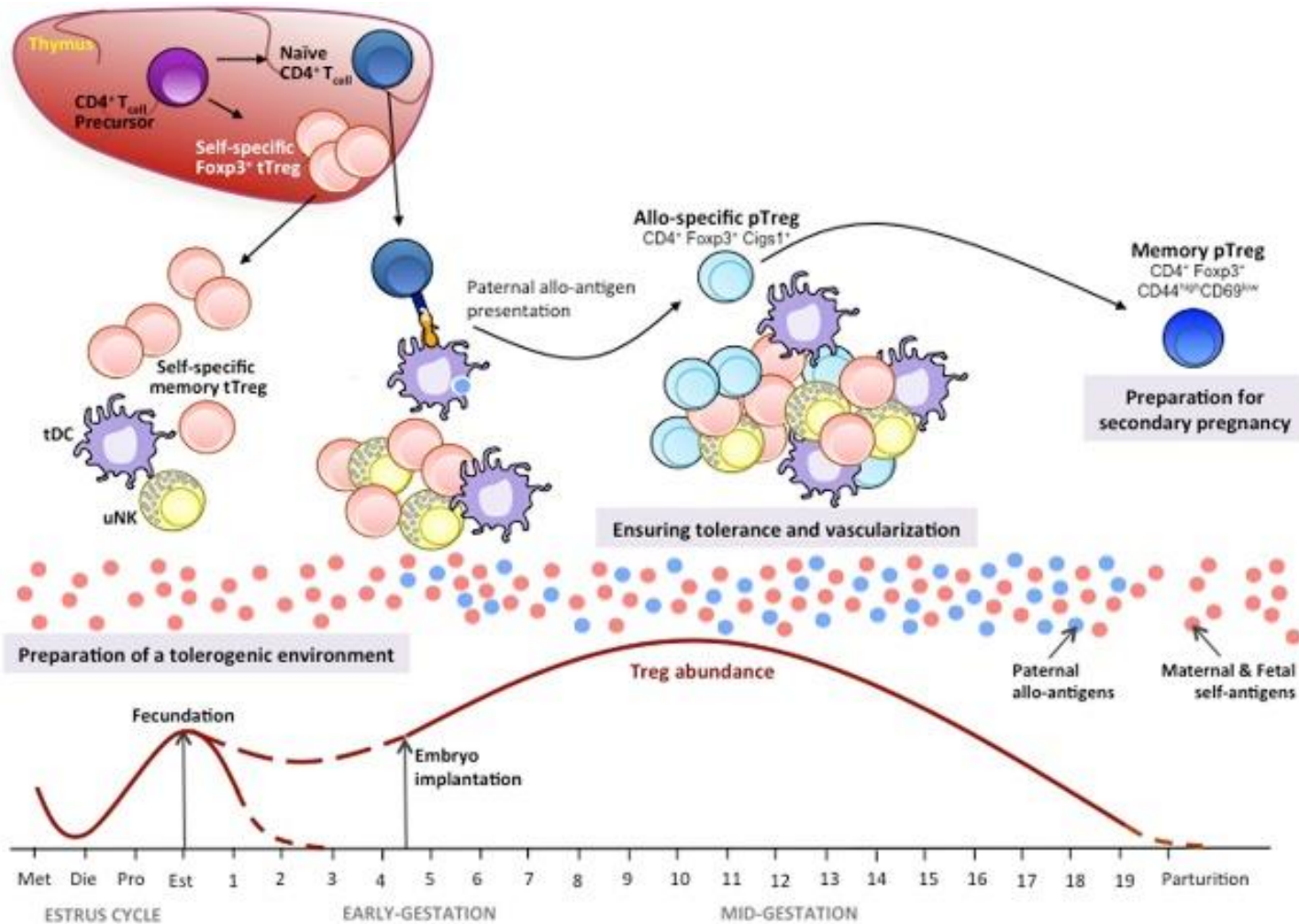
- asociácia medzi deficienciou Treg a komplikáciami v tehotenstve
- početná a funkčná deficiencia Treg v PK a/alebo v deciduu je asociovaná s infertilitou, rekurentými spontánnymi potratmi (RSA) a preeclampsiou (Sasaki 2004, 2007, Arruvito 2007, 2010, Jianjun 2010, Darmochwal-Kolarz 2012)
- ↓ expresia Foxp3 mRNA v endometriu žien s primárnou neobjasnenou sterilitou (Jasper 2006)
- IL-6 = kľúčový cytokín, blokuje vývoj Treg a indukuje diferenciáciu T_H17
- opakované tehotenské straty (RM) - ↓ hodnoty cirkulujúcich $CD4^+CD25^+$ buniek počas tehotenstva (negatívna korelácia s T_H17 lymfocytmi)
- hodnoty Treg v periférnej krvi môžu predikovať riziko tehotenských strát

Tregs v tehotenstve

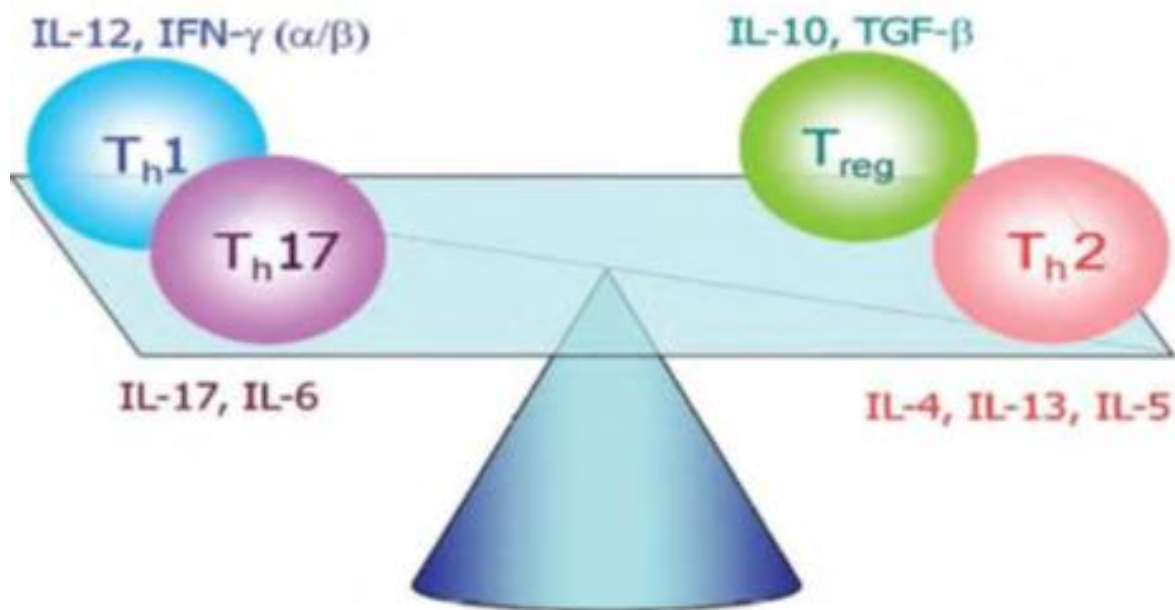


Tregs v tehotenstve





$T_H1/T_H2/T_H17/Treg$ paradigma



$T_H1/T_H2/T_H17/Treg$ paradigma

- Fyziologické tehotenstvo (implantácia embrya do maternice, maternofetálna tolerancia)

	T_H1	T_H2	T_H17	T-reg
periférna krv	↘	↗	↘	↑
maternica	↓	↑	↗	↑↑

- Patologické tehotenstvo (zlyhanie implantácie)

	T_H1	T_H2	T_H17	T-reg
periférna krv	↗	→	↗	↓
maternica	↗	↘	↕	↓↓



úspešné tehotenstvo – expanzia v periférnej krvi a deciduu

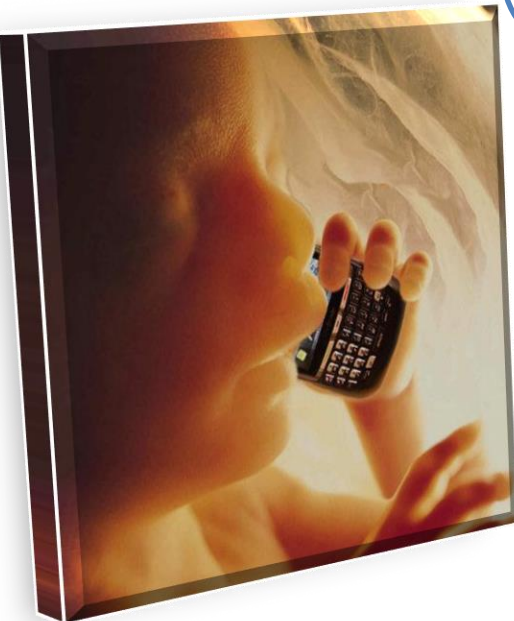
materská tolerancia a protizápalové mikroprostredie sú nevyhnutné, aby sa predišlo odmietnutiu plodu (cross-talk medzi bunkami materského imunitného systému a placenty trofoblastu)

sekrécia IL-10 a TGF- β \Rightarrow supresia imunitnej odpovede na cudzie antigény

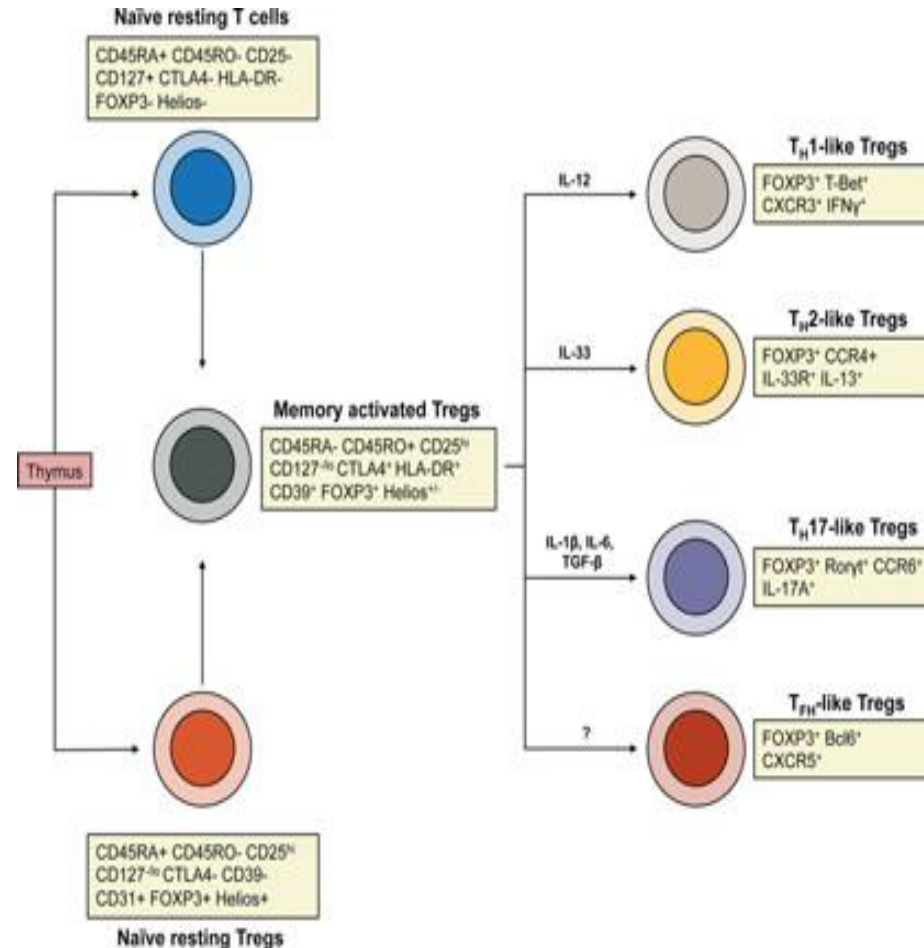
špecificita voči paternálnym antigénom

na materno-fetálnom rozhraní – extratýmusový pôvod (indukované Treg = iTreg)

mechanizmy a faktory expanzie Tregs počas normálneho tehotenstva – stále predmetom skúmania



- humánne Treg (CD4+25+) nie sú homogénnou skupinou (génová expresia, fenotyp a supresívne funkcie)
- **FOXP3** (Forkhead box protein P3, Scurfin, JM2, IPEX) – špecifický transkripčný faktor – konštitutívne exprimovaný v prirodzených Treg (nTregs)
 - slúži ako hlavný regulátor diferenciácie nTreg a ich supresívnych funkcií (CD4+CD25+FoxP3+ Treg bunky)



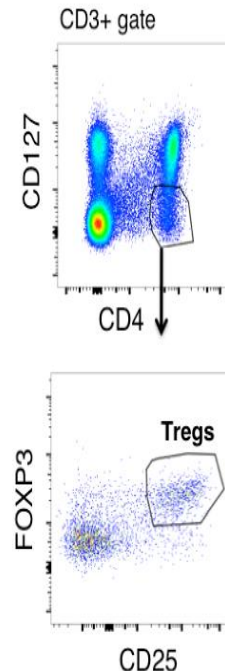
➤ prietoková cytometria

- intracelulárne stanovenie FOXP3 - CD4+CD25+ FOXP3 +
- FOXP3 – viaže sa na promótor α -reťazca receptora pre IL-7 (**CD127**) \Rightarrow down-regulácia jeho expresie \Rightarrow bunky FOXP3 exprimujúce s nízkou expresiou CD127 = Treg
- identifikácia Treg – povrchové značenie – CD4+CD25+CD127-

Defining Tregs using Flow Cytometry

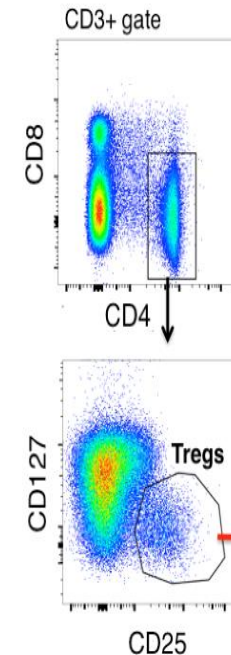
Option 1:

Fixed sample run with FOXP3



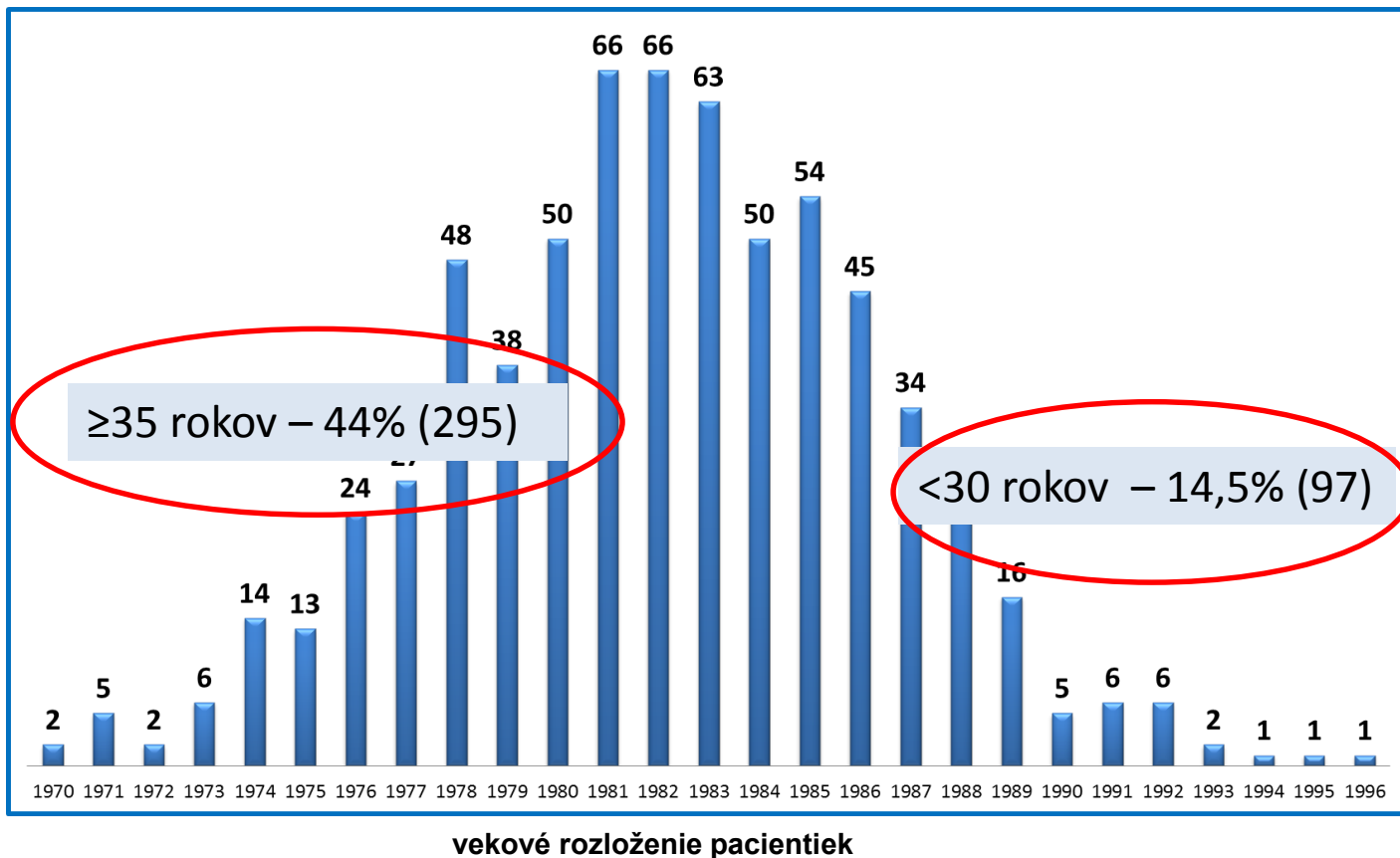
Option 2:

Viable cell run, no FOXP3



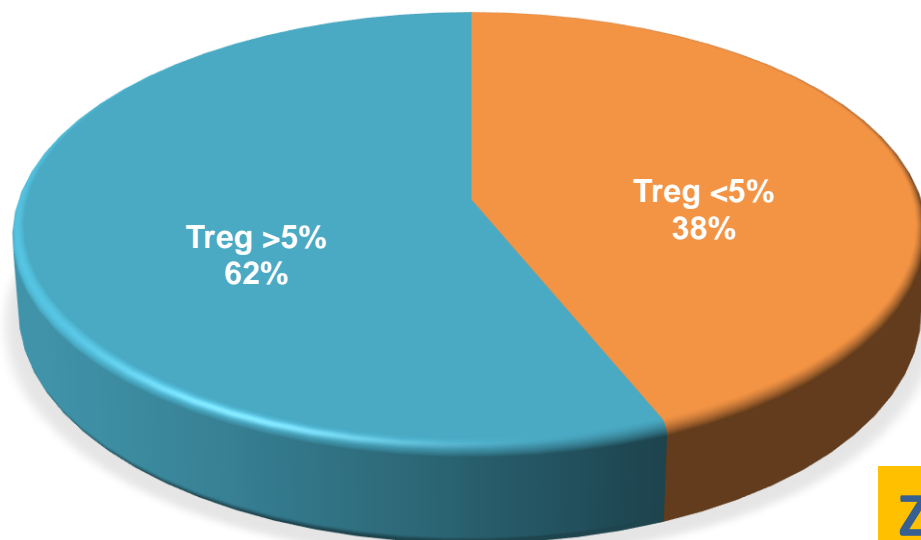
➔ SORT CELLS: add to suppression, functional assays

- január 2016 – júl 2017 – 670 pacientiek Tregs % +AP (vek 21-47) s diagnózou poruchy plodnosti
- vzorky periférnej krvi (LiHep, EDTA)
- protokol pre identifikáciu Treg – CD4+CD25+CD127-



Tregs výsledky

- hodnoty Tregs 2,4 - 8,00%
- ↓ **hodnoty** (<5%) – 38%



percentuálne zastúpenie hodnôt Tregs

Vplyv veku?

– ženy vo veku 35-46

- ↓ Treg rokov – **45,1%**
- normálne Tregs – **52,1%**

Zmena referenčných hodnôt?

- normálne hodnoty <4%

- fáza menštruačného cyklu?

TREGs a menštruačný cyklus

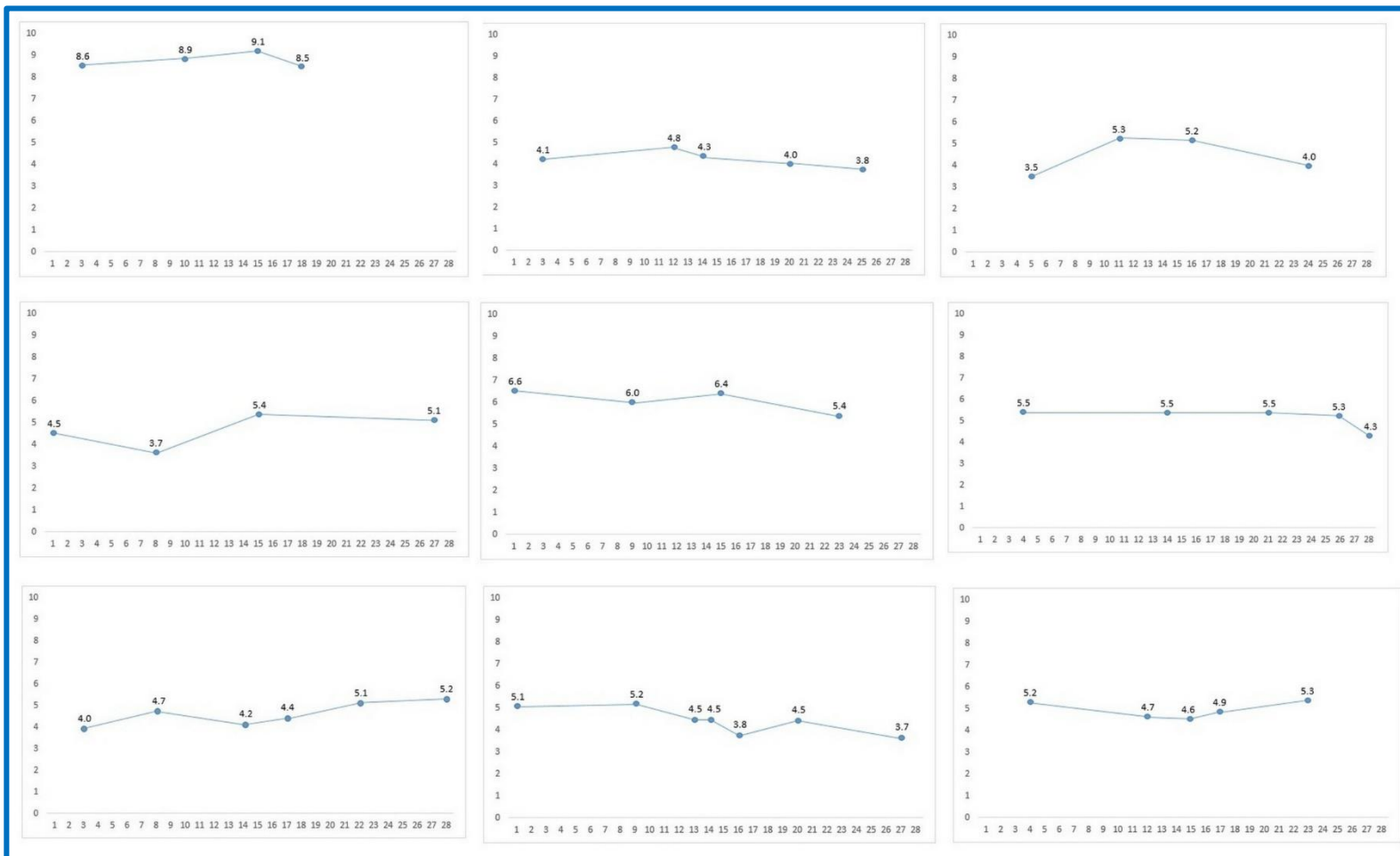
Kontrolná skupina: 9 zdravých žien vo veku 21 – 35 rokov
pravidelný menštruačný cyklus
bez tehotenstva/porúch reprodukcie

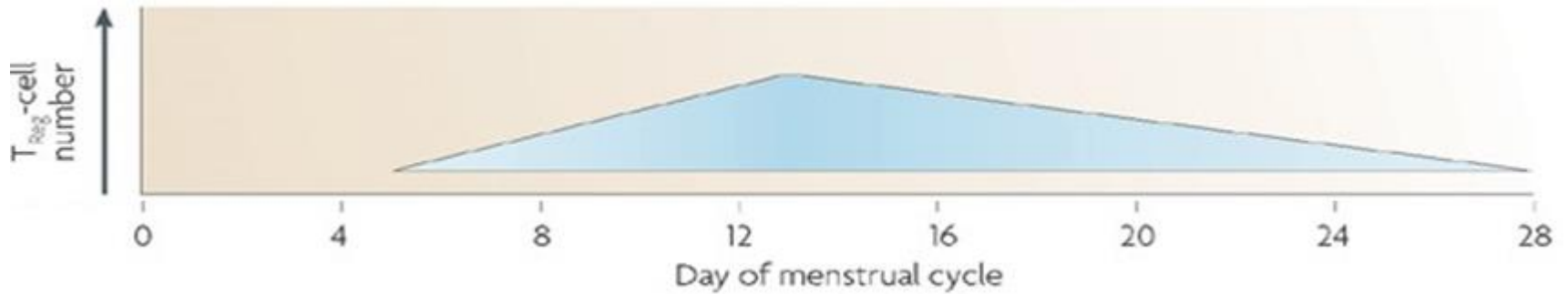
Pacientská skupina: 87 žien vo fertilnom veku
pravidelný menštruačný
poruchy reprodukcie (sterilita/infertilita)

Kontrolná skupina: 9 žien

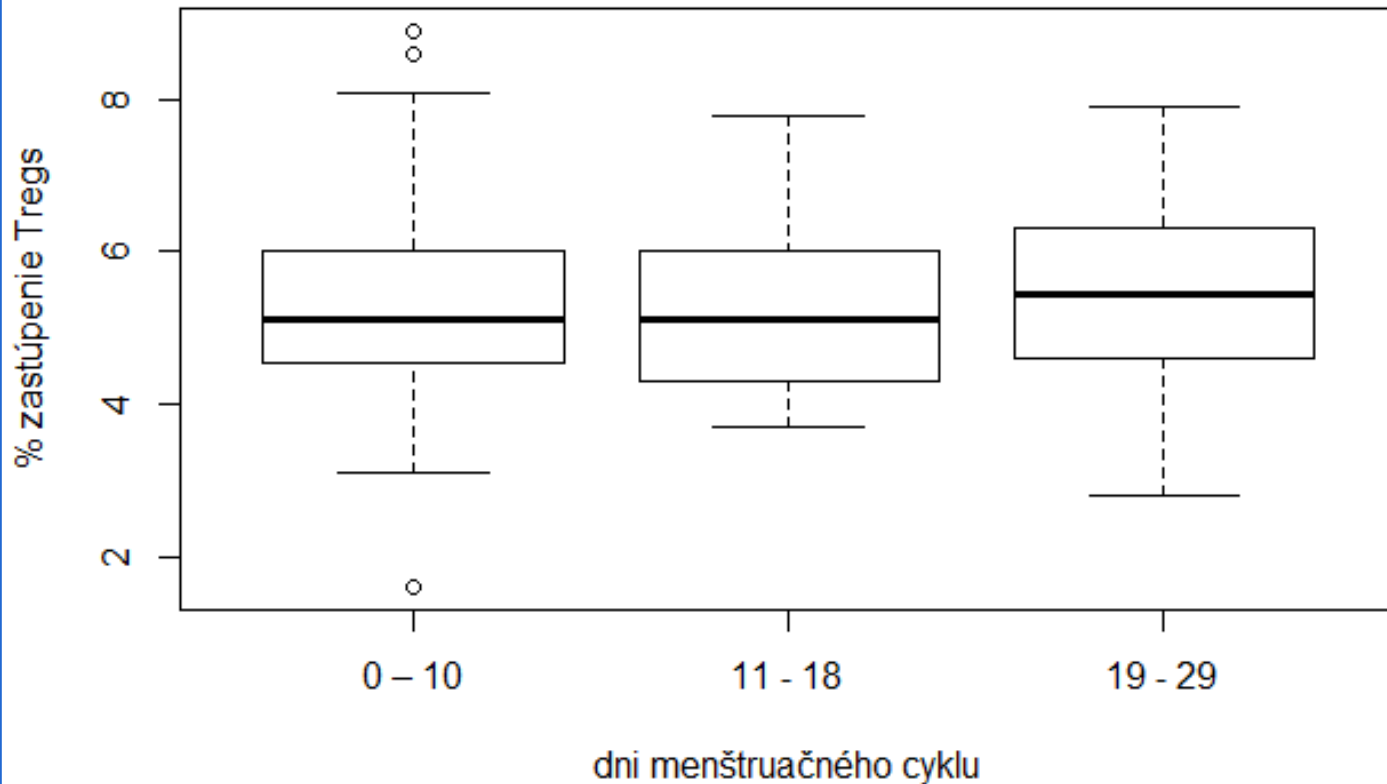
1	Day 3	Day 10	Day 15	Day 18		
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	8,6	8,9	9,1	8,5		
2	Day 3	Day 12	Day 14	Day 20	Day 25	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	4,1	4,8	4,3	4	3,8	
3	Day 5	Day 11	Day 16	Day 24		
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	3,5	5,3	5,2	4		
4	Day 1	Day 8	Day 15	Day 27		
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	4,5	3,7	5,4	5,1		
5	Day 1	Day 9	Day 15	Day 23		
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	6,6	6	6,4	5,4		
6	Day 4	Day 14	Day 21	Day 26	Day 28	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	5,5	5,5	5,5	5,3	4,3	
7	Day 3	Day 8	Day 14	Day 17	Day 22	Day 28
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	4	4,7	4,2	4,4	5,1	5,2
8	Day 1	Day 9	Day 13	Day 14	Day 16	Day 27
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	5,1	5,2	4,5	4,5	3,8	3,7
9	Day 4	Day 12	Day 15	Day 17	Day 23	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ , %	5,2	4,7	4,6	4,9	5,3	

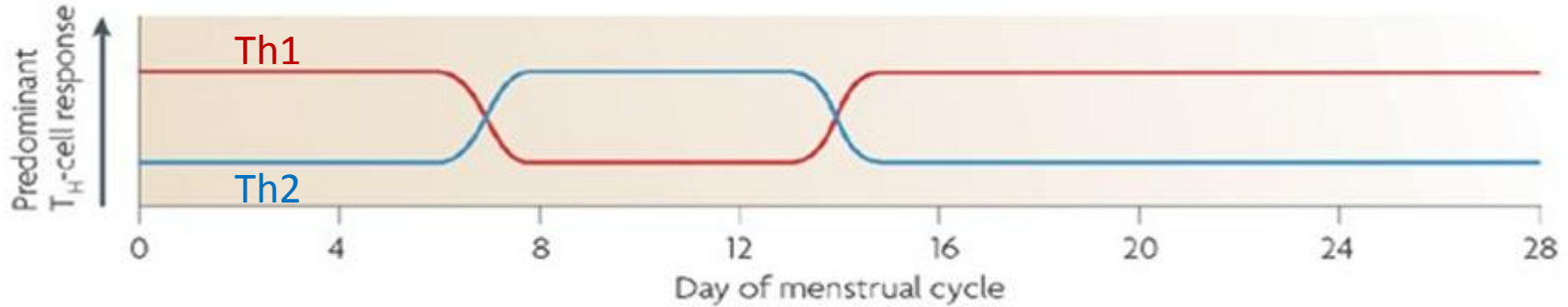
Kontrolná skupina





% zastúpenie Tregs v závislosti od dňa menštruačného cyklu





patient	MC (day)	CD4+IFN- γ	CD4+IL-4	CD4+TNF- α	CD4+IL-2	TREGs	E2	PROG
1	M (3)	21,4	1,3	28,6	17,5	4,3	264	
2	M (3)	15,1	0,7	39,8	21,8	4,4	90,64	
3	M (2)	32,7	1,9	47,6	25,1	4,2	73,09	
4	M (2)	23,9	1,7	46,5	29,5	4,7	141,1	
5	M (5)	34,8	2,9	48,3	32,3	4,4	172,4	
6	M (4)	33,2	4,5	20	14,8	2,8	176,5	
7	M (2)	12,6	0,9	35,6	23,9	3,1	160	
8	M (3)	36,7	2,2	58,7	25,4	4	186,1	
9	M (5)	18,3	0,8	23,6	9,6	4,6	371,3	<0,16
10	M (3)	29,8	3,4	46,1	31,4	3,8	187,9	
11	M (3)	18,6	1	25,4	14,8	3,7	122,1	
12	PR-O (10)	26,9	1,1	43,6	27,5	4,7	990,3	
13	PR-O (14)	31,4	6,7	38,9	37	4,6	572,8	
14	PR-O (8)	13	3,1	57,2	28,2	3,7	522	0,9
15	PR-O (11)	21,8	0,3	32,9	13,9	4,3		
16	O (15)	27,7	2,5	50,1	23,8	4,8	669,8	1,98
17	O (15)	16,9	1,2	30,8	8,3	4,8	254,5	28,34
18	L (23)	16,4	1,5	31,1	11,5	4,8		

E2, Prog – \uparrow hodnoty indukcia Th2 / supresia Th1

E2, Prog v našom súbore \Rightarrow korelácia s menštruačným cyklom, nie však s Th1/Th2/Tregs

Záver



- imunitná odpoveď matky na plod – významne suprimovaná Tregs
- **zvýšené hodnoty Tregs** v periférnej krvi – asociované so zvýšenou pravdepodobnosťou **úspešného tehotenstva a pôrodu** po IVF
- **defekt** v počte a funkcii Tregs → môže byť príčinou **neúspešných tehotenstiev**
- sledovanie počtu Treg – dôležitý marker reprodukčnej imunológie

Do našej praxe:

- vplyv menštruačného cyklu na hodnoty Tregs????
- referenčné hodnoty v súvislosti s menštruačným cyklom????

Ďakujem za pozornosť



Za spoluprácu svojim spoluautorkám
a kolektívu imunológie Medirex a.s.

elena.tibenska@medirex.sk