A B7 kostimuláció és az indolamin-2,3- dioxigenáz vizsgálata köldökzsinórvérben és várandósságban

Doktori értekezés

Dr. Grozdics Enikő

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola

Konzulens: Dr. Toldi Gergely, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kriván Gergely, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Csuka Dorottya, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Machay Tamás, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bajtay Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Barna Gábor, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4

2 BEVEZETÉS 6

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8

3.1 A KÖLDÖKZSINÓRVÉR IMMUNOLÓGIAI JELLEMZŐI 8

3.1.1 ANTIGÉNPREZENTÁLÓ SEJTEK (APS) 8

3.1.2 AZ ANTIGÉNPREZENTÁLÓ SEJTEK ÉS A T LIMFOCITÁK KÖZÖTTI INTERAKCIÓ 13

3.1.3 T LIMFOCITÁK PREVALENCIÁJA ÉS FUNKCIÓJA 15

3.1.3.1 A Th1 és Th2 citokin szekréció eltérései köldökzsinórvérben 15

3.1.3.2 T sejt aktiváció és érés 18

3.1.3.3 A regulátoros T sejt (Treg) és Th17 szerepe az újszülöttkori immunitásban 20

3.1.3.4 A limfocita aktiváció kinetikája köldökzsinórvérben 23

3.1.3.5 A Galectin-1 hatása a Th1 / Th2 sejtaránya 24

3.2 TERHESSÉGI IMMUNITÁS 26

3.2.1 TH1 ÉS TH2 SEJTEK SZEREPE A TERHESSÉGI IMMUNITÁS KIALAKULÁSÁBAN 26

3.2.2 GALECTIN-1 HATÁSA A TH1 / TH2 SEJTARÁNYRA 28

3.2.3 REGULÁTOROS T SEJT (TREG) SZEREPE AZ TERHESSÉGI IMMUNITÁSBAN 29

3.2.4 A TH17 SEJTEK 30

3.2.5 AZ IL-17 TERMELŐ CD8 ÉS NK SEJTEK 32

3.2.6 A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ KINETIKÁJA 33

3.2.7 B7 CSALÁD SZEREPE AZ ANYAI IMMUNRENDSZER SZABÁLYOZÁSÁBAN 34

3.3 INDOLAMIN-2,3-DIOXIGENÁZ (IDO) 37

4 CÉLKITŰZÉS 38

5 ALANYOK ÉS MÓDSZEREK 39

5.1 A KÖDÖKZSINÓRVÉR - FELNŐTT PERIFÉRIÁS VÉR VIZSGÁLATOK ALANYAI 39

5.2 AZ EGÉSZSÉGES TERHES – EGÉSZSÉGES NEM TERHES VIZSGÁLATOK ALANYAI 39

5.3 MONONUKLEÁRIS SEJT IZOLÁCIÓ 41

5.4 ÁRAMLÁSI CITOMETRIA 41

5.5 NAGYTELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉK KROMATOGRÁF (HPLC) 42

5.5.1 NAGYTELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA (HPLC) MÓSZER VALIDÁCIÓ 43

5.5.1.1 Kalibrációs görbe és linearitás 43

5.5.1.2 Szelektivitás 43

5.5.1.3 Kimutatási határ (LOD) és mennyiségi meghatározás alsó határa (LLOQ) 43

5.5.1.4 Pontosság 44

5.5.1.5 Visszanyerés 44

5.5.1.6 Statisztika 44

6 EREDMÉNYEK 45

6.1 A KÖLDÖKZSINÓRVÉR – FELNŐTT PERIFÉRIÁS VÉR VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI 45
6.2 AZ EGÉSZSÉGES TERHES – EGÉSZSÉGES NEM TERHES VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI 46

7 MEGBESZÉLÉS 49

8 KÖVETKEZTETÉSEK 69

9 ÖSSZEFOGLALÁS 70

10 SUMMARY 72

11 IRODALOMJEGYZÉK 74

12 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 92
12.1 ÉRTEKEZÉS ANYAGÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK 92
12.2 ÉRTEKEZÉS ANYAGÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK 92

13 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 93

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APC	antigén prezentáló sejt
BDCA	blood dendritic cell antigén
CCR	c kemokin receptor
CTLA	citotoxikus T limfocita antigén
DS	dendritikus sejt
mDS	mieloid dendritikus sejt
pDS	plazmacitoid dendritikus sejt
GM-CSF	granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor
GVHD	graft versus host disease
HLA	humán leukocita antigén
ICOS	inducible T cell costimulator
IFN-γ	interferon gamma
IDO	indolamin-2,3-dioxigenáz
IL	interleukin
KYN	kinurenin
KYNA	kinurénsav
Kzsv	köldökzsinórvér
LPS	lipopoliszacharid
Max	maximum érték
MHC	major histocompatibility complex
MFI	átlagos fluoreszcens intenzitás
NFκB	nuclear factor kappa B
NK	natural killer
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffer saline
PE	préeklampszia
PerCP	peridinin-chlorophyll-protein complex
PHA	fitohemagglutinin
PIP_2	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PMA	phorbol-myrisate-acetate
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute medium

RR	ruthenium red
TCR	T sejt receptor
TG	thapsigargin
TGF-β	transforming growth factor beta
TNF-α	tumor nekrózis faktor alfa
TLR	toll-like receptor
TPA	tetradekanyl-phorbol-acetate
TRAM	triarilmetán
Treg	regulátoros T sejt
TRP	triptofán

2 BEVEZETÉS

Újszülöttekben jól ismert, hogy csökkent az immunválasz hatékonysága a felnőttekéhez képest. Számos faktor játszhat ebben szerepet, melyek közül kiemelkedő az adaptív immunválasz éretlensége, valamint a felnőtt típusú immunitáshoz képest alacsony számban előforduló és eltérő működésű humorális és celluláris immunelemek jelenléte. A megfelelő antigén prezentáció és T sejt funkció már ebben a korai életszakban is kiemelkedően fontos a megfelelő immunválasz koordinálásában. Az elmúlt évtizedekben számos vizsgálat történt, melyek figyelemre méltó eredményeket közöltek az újszülött korban tapasztalt eltérő immunműködéssel kapcsolatban, ennek számos aspektusa azonban továbbra sem teljesen tisztázott.

A felnőtt perifériás vérhez képest a köldökzsinórvérben (kzsv) tapasztalt legfontosabb különbségek a csökkent antigén prezentáció, a kostimuláló molekulák alacsony expressziója, a csökkent Th1 és Th17 válasz és a regulációs elemek hiányos működése. Klinikailag ezen eltérések két szempontból különösen lényegesek. Egyrészt a csökkent immunválasz amellett, hogy fontos szerepet játszik számos, koraszülötteket és érett újszülötteket érintő betegség kialakulása szempontjából, növeli a fertőzések előfordulási gyakoriságát ebben az életkorban a felnőttekhez képest. Másrészt a kzsv-ből nyert hemopoetikus őssejt széles körben használt különböző hematológiai és immunbetegségek kezelésében. Kiemelendő, hogy a fent leírt eltéréseknek köszönhetően a graft versus host disease (GVHD) előfordulása jóval alacsonyabb kzsv-ből vett őssejt transzplantációja kapcsán, szemben a felnőtt perifériás vérből gyűjtött őssejt vagy csontvelői őssejt átültetésekor.

Terhességben a magzat, tekintettel arra, hogy apai antigéneket is prezentál, az anyai immunitás szempontjából szemiallograftnak tekinthető. Ezért a magzat ellen irányuló immunreakció megakadályozása céljából az anyai T sejteknek a magzati antigénnel szemben immuntoleránsnak kell lenniük. Az anyai immuntoleranciához hozzájáruló eltéréseknek, mind lokálisan (placentárisan), mind szisztémásan jelen kell lenniük. A terhesség specifikus immuntolerancia kialakulásához vezető T sejt eltérések jól ismertek. Amellett, hogy terhesekben a T sejtek szubpopulációinak előfordulása különbözik a nem terhesekétől, a T limfociták működése is eltérő. A második és a harmadik trimeszterben jellegzetes az ún. Th2 shift és csökkent a Th17 / regulátoros T sejt (Treg) arány. Terhesekben a T sejt receptoron (TCR) keresztüli stimulus hatására

bekövetkező kalcium beáramlás kinetikája csökkent a Th1 és CD8+ limfocitákban a nem terhesektől gyűjtött T limfocitákhoz képest. Emellett számos egyéb faktor játszhat szerepet a csökkent perifériás T limfocita aktivációban az egészséges terhesekben, melyek közül a B7 kostimulációs molekula család szisztémás anyai immuntolerancia kialakulásában betöltött szerepét eddig még nem vizsgálták.

Célunk volt, hogy meghatározzunk a B7 kostimulációs molekulát expresszáló monociták, illetve a nekik megfelelő T sejt receptorok pervalenciáját, úgy, mint az intracelluláris indolamin-2,3-dihidrogenáz (IDO) expressziót és az immunregulációs tulajdonságú plazma triptofán (TRP), kinurenin (KYN) és kiurénsav (KYNA) szinteket kzsv-ben, felnőtt perifériás vérben, egészséges terhesekben, valamint egészséges nem terhesekben, vizsgálva a csökkent újszülöttkori T sejt aktivációban és a terhesség specifikus immuntolerancia kialakulásában betöltött szerepüket.

Eredményeink alátámasztották a kzsv-ben a korábban már leírt, felnőtt perifériás vérhez képest csökkent T limfocita reaktivitást. Ebben kiemelkedő szerepe van a B7 kostimulációs molekula, illetve a triptofán katabolizmusában kulcsfontosságú enzim, az IDO működését befolyásoló, általunk leírt eltéréseknek. A terhesség specifikus immuntolerancia kialakulásában vizsgálataink szintén igazolták az eltérő expressziójú B7 kostimulációs molekula, illetve a megváltozott IDO expresszió és aktivitás jelentőségét.

Mindezek alapján azoknak a folyamatoknak a részletesebb megismerése, amelyek hozzájárulnak a csökkent T sejt válaszhoz, különösen fontos a terhességi-, és újszülöttkori immunitás pontosabb megismeréséhez, illetve elősegíthetik a különböző hematológiai-, és immunbetegségek terápiájának javítását.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A KÖLDÖKZSINÓRVÉR IMMUNOLÓGIAI JELLEMZŐI

3.1.1 ANTIGÉNPREZENTÁLÓ SEJTEK (APS)

A monociták a legfontosabb antigénprezentáló sejtek (APS) közé tartoznak. A makrofágokkal és a dendritikus sejtekkel (DS) együtt szerepet játszanak a fagocitózisban, citokin termelésben és a citotoxikus effektor sejtek indukciójában. A keringő monociták szövetspecifikus érésen mennek keresztül, mely során mononukleáris makrofágokká és dendritikus sejtekké differenciálódnak. Először a 18-20. gesztációs héten jelennek meg a magzati vérben, majd számuk a gesztációs korral együtt nő [1]. Különböző vizsgálatok arra utalnak, hogy az újszülöttkori APS-ek működése éretlen. Az inkomplett aktivációjuk és elégtelen érésük hozzájárul a köldökzsinór T sejtek csökkent működéséhez, elsősorban a megváltozott kostimuláló jelátvitelnek köszönhetően [2].

A kzsv monocitái a CD86 (B7-2) és a CD40 kostimuláló molekulák alacsony bazális expressziójával jellemezhetőek. Ezeknek a molekuláknak az expressziója nem emelkedik meg olyan potens aktivátorok hatására sem, mint az IFN-γ és CD40 ligand (CD40L, CD154) kötődése [3]. A kzsv dendritikus sejtjei szintén éretlenek, tekintettel arra, hogy nincs, vagy csak nagyon alacsony a bazális CD40, CD80 (B7-1) és CD86 (B7-2) expressziójuk [4,5]. Egy másik tanulmány szerint a neonatális plazmacitoid dendritikus sejtek (pDS) - melyek alacsony CD80, CD83, CD86 és CD40 expresszióval jellemezhetőek - inkomplett érést mutatnak a toll-like receptor (TLR) 9 agonista CpG stimulus hatására, szemben a felnőtt stimulált pDS-ekkel [6]. A kzsv mieloid dendritikus sejtjeinek (mDS) lipopoliszaharid (LPS) és TLR3 agonista poli (I:C) hatására bekövetkező CD80, CD83, CD86 és CD40 upregulációja szintén kisebb mértékű volt a felnőtt mDS-ekhez képest [7].

Pérez és mtsai. a stimuláció hatására bekövetkező monocita választ vizsgálták gesztációs kor szerint csoportosított (extrém koraszülött, koraszülött, érett) újszülöttek köldökzsinórvérében. Meghatározták a CD4+ T limfociták antigén prezentációjában kiemelkedő szerepet játszó, monociták által magasan expresszált MHC II molekula, a

HLA-DR antigén mennyiségét. Az extrém koraszülött csoportban mind a nem stimulált, mind az LPS vagy LPS és IFN- γ által stimulált CD14+ monocita kultúrákban a sejtek alacsony HLA-DR arányt mutattak. Mivel a T sejt aktiváció előfeltétele a B7 molekulák upregulációja, összehasonlították a B7 kostimulációs molekulák (CD80 és CD86) expresszióját az extrém koraszülött, koraszülött és érett újszülött köldökzsinórvér monocitáin. Stimulus hatására a CD80 sejtek emelkedett és a CD86 sejtek csökkent aránya minden csoportban megfigyelhető volt. A neonatális monociták azon képessége, hogy stimulus hatására Th1 választ indukálnak, leginkább az IL-12 termelésen keresztül vizsgálható, mivel ez a citokin központi szerepet játszik a naiv T sejtek Th1 irányú polarizációjában. Azt találták, hogy az IL-12 termelése alacsonyabb volt az extrém koraszülöttekben. A neonatális monociták adhéziós képessége hasonló volt az egyes csoportokban, és független volt a gesztációs kortól. Az extrém koraszülöttekben a monociták részlegesen reagáltak LPS-re, illetve működésük csökkent volt koraszülöttek és érett újszülöttek monocitáihoz képest. A vizsgálat jól demonstrálja a különböző érettségű neonatális monociták stimulusok iránti eltérő érzékenységét [1].

Darmochwal-Kolarz és mtsai. meghatározták a CD274 (B7-H1), B7-H4, CD200 és CD200R kostimuláló molekulák expresszióját a mieloid BDCA-1+ és limfoid BDCA-2+ dendritikus sejteken, monocitákon és B limfocitákon érett újszülöttek kzsv-ben és egészséges felnőttek perifériás vérében [8]. Azt találták, hogy ezeknek a molekuláknak az expressziója, felnőttekével összehasonlítva, szignifikánsan alacsonyabb volt kzsv dendritikus sejteken. Másrészt a B7-H4, CD200 és CD200R expressziója jelentősen magasabb volt CD14+ monocitákon kzsv-ben. A CD200 és CD200R kölcsönhatása szupresszálta a hízósejt degranulációt és csökkentette a citokin termelést, főleg az IL-13, TNF-α, IFN-γ és IL-17 tekintetében [9]. Ennek következményeképpen a kzsv-ben a CD200-at és CD200R-t expresszáló monociták emelkedett aránya valószínűleg csökkenti a monociták citokin termelését.

Más vizsgálatok szintén alátámasztották, hogy kzsv-ben a monociták és a makrofágok LPS stimulus hatására alacsonyabb szintű proinflammatorikus TNF-α, IL-1, IL-6 és IL-12 citokintermelésre képesek [10,11]. A kzsv-ben a mDS-ek IFN-γ-val kombinált vagy anélküli LPS stimulus hatására bekövetkező alacsony szintű citokin termelése szintén megfigyelhető volt, és érintette a TNF-α, IL-1, IL-6, és IL-12 termelést [12,13]. Érdekesség, hogy későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a citokint expresszáló sejtek

száma megegyezett ugyan, de az egy sejt általi expresszió mértéke alacsonyabb volt köldökzsinórvérben.

Az IL-27-et elsősorban az APS-ek termelik, és különböző immunsejt típusokra nézve immunszupresszív hatású. Kraft és mtsai. vizsgálataik során azt találták, hogy az IL-27 gén expressziója fokozott volt a kzsv makrofágokban az egészséges felnőttek makrofágjaihoz képest. Továbbá egerekben meghatározták azt az időtartamot, amely alatt az emelkedett IL-27 génexpresszió és az intracelluláris citokin expresszió hatással lehetett az immunválaszra. Azt találták, hogy az IL-27 szignifikánsan emelkedett maradt az újszülött egerekben, majd csökkent idősebb egerekben. Leírták, hogy a fötomaternális immunszupresszív környezetnek köszönhetően az IL-27 a terhesség során indukálható volt, ugyanis progeszteron hatására dózisfüggő génexpresszió jött létre a makrofágokban. Az IL-27 neutralizálása újszülött makrofágokban javította a sejtek bakteriális replikációt gátló képességét. Továbbá, amennyiben az IL-27 közömbösítése Mycobacterium bovis bacillus Calmette – Guérin vakcinával való inkubálás alatt történt, emelkedett IFN-γ termelést váltott ki allogén CD4+ T limfocitákban [14].

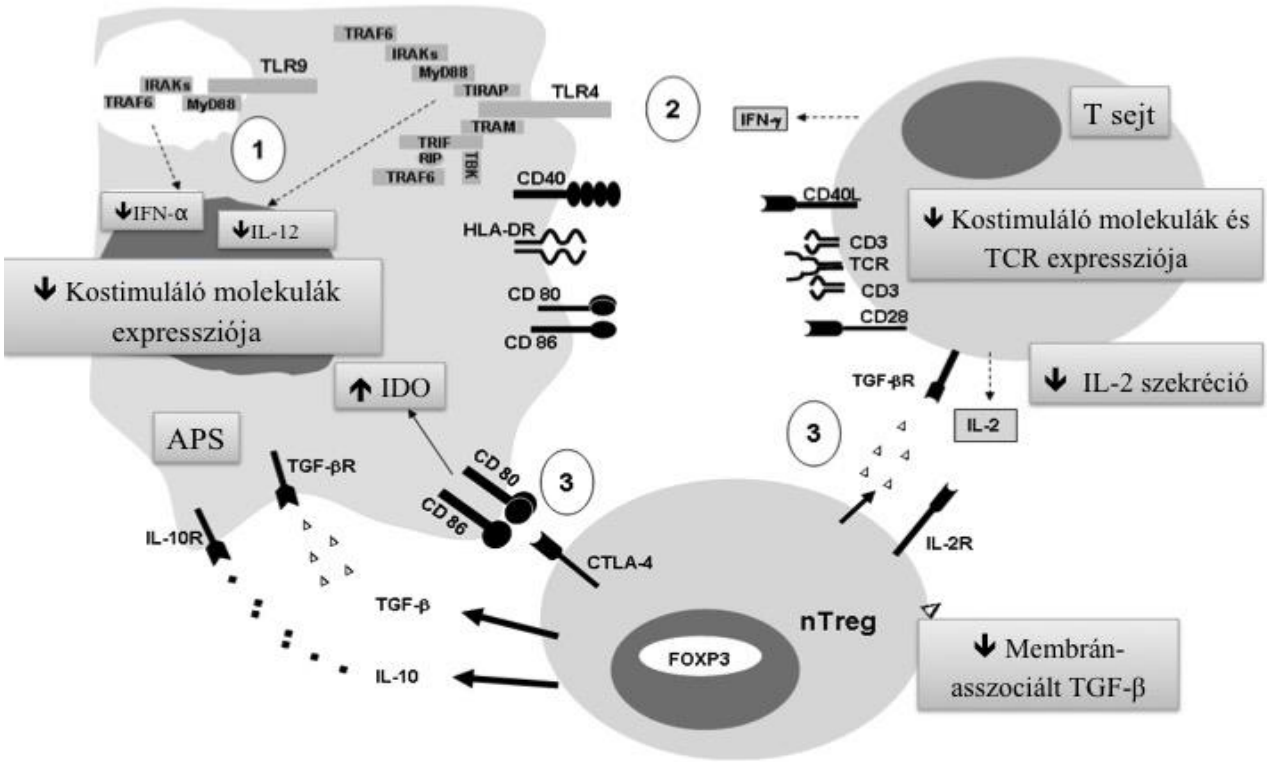
A toll-like recepotor (TLR) az egyik legjelentősebb szenzora a veleszületett immunrendszernek. Ezek a filogenetikailag konzervált receptorok elsősorban a mikrobiális patogén-asszociált molekuláris mintázat felismerésében vesznek részt. A TLR4 az LPS receptor transzmembrán egységeként is működik. Az LPS mellett, amely a Gram negatív baktériumok membránjának fő glikolipid komponense, a TLR4 képes a Gram negatív baktériumokban lévő zsírsavak, illetve hősokk fehérjék megkötésére is. Ligandkötés hatására, a TLR4-en keresztül aktivált intracelluláris jelátviteli utak eredményeként indukálódik a proinflammatorikus mediátorok (TNF-α, IL-1 β, IL-6), kemokinek, valamint kolóniastimuláló faktorok termelése. Ezek a szekretált fehérjék az elsődleges immunvédekezésben lényegesek és fertőzés hatására lokális, illetve szisztémás immunválaszt hoznak létre. Egyes vizsgálati eredmények szerint a kzsv-ben a monociták TLR jelátvitele csökkent. Bár az újszülött monociták a felnőtt monocitákhoz képest azonos mennyiségben expresszálják a különböző TLR-ok mRNS-ét [15,16], ez nem zárja ki azt, hogy az egyes receptorfehérjék expressziója eltérő lehet. Az LPS stimulus hatására bekövetkező TLR4 és CD14 expresszió upregulációja nem volt megfigyelhető a kzsv eredetű monocitákon [15,17]. Továbbá koraszülött

monocitákon a TLR4 protein expressziója alacsonyabb volt, mint érett újszülöttek monocitáin [16].

Gold és mtsai. kzsv DS-ek antigén feldolgozó, és CD8 sejteknek történő prezentáló képességét vizsgálták. Humán CD8 sejtklónok alkalmazásával hasonlították össze a kzsv, illetve felnőtt monocita eredetű DS-ek MHC I útvonalon keresztüli antigén prezentáló képességét. Vizsgálták a DS-nek az antigén peptidre, illetve a HLA-E-re korlátozott antigén prezentáló képességét, a klasszikus MHC I útvonalon keresztüli MHC I-re korlátozott antigén feldolgozó és prezentáló képességét, valamint az MHC I útvonalon keresztüli sejt asszociált antigénnel való kereszt prezentációját. Nem találtak eltérést a kzsv DS-ek fent leírt antigén felismerő-, és prezentáló funkciójában. Arra a következtetésre jutottak, hogy ellentétben a TLR jelátvitellel és citokin termeléssel, az MHC I típusú antigén felismerés és prezentáció megfelelően működik a kzsv DS esetében, ezért ezek a folyamatok nem felelősek a patogének csökkent eliminációjáért [18].

A kzsv DS-ek allogén kzsv T sejteket stimuláló hatásának vizsgálata során gyenge proliferációt figyeltek meg pDS-ekkel stimulált sejtkultúrákban, szemben a teljes kzsv DS-kel stimulált sejtkultúrákkal [5], amely az eredeti sejtkultúrák emelkedett apoptotikus T sejt arányával hozható összefüggésbe. Ennek a megfigyelésnek a hátterében álló folyamat még nem tisztázott, feltehetően vagy a kzsv pDS által közvetített direkt apoptotikus szignálnak köszönhető vagy a „rescuing” jel kiváltásának hibájából adódhat. Érdekesség, hogy a kzsv monociták fagocita funkciója szintén érintettnek tűnik, ugyanis a kzsv monociták alacsonyabb fagocitáló képességet mutatnak E. coli irányában, mint a felnőtt monociták. Ez a különbség különösen kifejezett 30. gesztációs hétnél fiatalabb magzatokban [19].

Végezetül a regulátoros T sejtek (Treg) gátló hatása szintén felelős lehet a kzsv APS-ek eltérő működéséért (**1. ábra**). A DS-ek működésére gyakorolt, természetes Treg (nTreg) sejtek direkt gátló hatását napjainkban több egérmodellen demonstrálták [20,21]. Emellett az nTreg sejtek képesek az antigén prezentáló funkciót indirekten is gátolni. Köszönhetően az effektor T sejtekre gyakorolt gátló hatásuknak és az anti-inflammatorikus citokinek, mint az IL-10 és TGF-β termelésének [22]. Mivel az nTreg sejtek nagy számban fordulnak elő és funkcionálisan aktívak a humán kzsv-ben, a Treg által közvetített gátló hatás egy további mechanizmust jelenthet az APS-ek diszfunkciójában.



1. ábra: A neonatális DS-ek diszfunkciójának lehetséges mechanizmusai. A neonatális APS-ek eltérő működése mögött álló folyamatok.

1. A neonatális DS veleszületetten éretlen. A kostimuláló molekulák bazális expressziója csökkent az újszülött APS-en. Továbbá a TLR komplex hibás, mely elsősorban a TLR4 és TLR9 működését érinti. Ez a kostimuláló molekulák upregulációjának zavarához vezethet, illetve a bakteriális vagy virális stimuláció hatására elmaradt citokin (IL-12, IFN-α) szekréciót okozhatja.

2. Az APS és T sejt közötti eltérő interakció. A nem megfelelő T sejt aktiváció az APS működésének zavarához vezethet, mivel a T sejt mediált szignál jelentős szerepet játszik az APS érésében és aktivációjában. A TCR függő stimuláció hatására elmarad a IFN-γ és az IL-2 szekréció és csökken a CD40L és a TCR komplex expresszió.

3. Az újszülött APS és T sejt gátlása nTreg-gel. A neonatális nTreg képes mind az APS, mind a T sejt funkcióját elnyomni, direkt és indirekt úton egyaránt. Ezen folyamatok során a Treg által expresszált CTLA-4 és az APS által kifejezett CD80/CD86 kapcsolódás hatására fokozódik az IDO expresszió, az immunszuppresszív citokinek, így a IL-10 és a TGF-β szekréciója, a membrán asszociált TGF-β expressziója, a nTreg által expresszált magas affinitású IL-2R IL-2 felhasználása, illetve a FOXP3 mediált mechanizmus.

3.1.2 AZ ANTIGÉNPREZENTÁLÓ SEJTEK ÉS A T LIMFOCITÁK KÖZÖTTI INTERAKCIÓ

Az elmúlt években újabb részletek kerültek felismerésre a DS-ek funkcionális érését illetően, különös tekintettel a T sejtekkel való interakciójukra. Langrish és mtsai. vizsgálataik során kimutatták, hogy a kzsv-ből származó éretlen DS-ek ugyanazokat a markereket expresszálják, mint a felnőttekből származó éretlen DS-ek [23]. Mind a felnőttekből, mind a kzsv-ből származó éretlen DS-ek magasan expresszálták a CD11-et és a HLA-DR-t, nem vagy alacsonyan expresszálták a CD25 és CD83 érési markereket, míg mérsékelt expressziót mutattak CD86 tekintetében. LPS aktiváció hatására a felnőtt DS-ek képesek voltak érett fenotípus adaptálására szemben a kzsv-ből származó DS-kel, melyek fenotípusosan éretlenek maradtak, köszönhetően az elmaradt HLA-DR upregulációnak és a csak minimálisan emelkedett CD86 expressziónak. Hasonló eredményeket mutattak De Wit és mtsai. vizsgálatai, melyek szerint a kzsv pDS-ek alacsonyabb CD86 expressziót mutattnak, mint a felnőtt pDS-ek TLR9 stimuláció hatására [6]. Egy Perez és mtsai. által végzett vizsgálat továbbá azt is leírta, hogy LPS stimuláció hatására csökkent a CD86 expresszió CD14+ monocitákon [1]. Az érés elmaradása önmagában nem kapcsolható az LPS stimulusra adott válaszképtelenséghez, ugyanis Langrish és mtsai. szerint a TLR4-et a kzsv DS-ek a felnőtt DS-kel azonos mennyiségben expresszálták [23]. Ezzel szemben egyéb közlemények viszont arról számoltak be, hogy LPS stimulus hatására elmaradt a TLR4 upreguláció a kzsv-ből származó monocitákon [15].

A kzsv DS-ek továbbá képtelenek voltak IL-12p70 termelésére, nem voltak képesek a CCR5 kemokin receptor expresszió downreguláláséra, illetve alacsonyabb IFN-γ termelést váltottak ki allogén naiv CD4+ T sejtekből, mint felnőttkori alakjuk. Ugyanabban a szervezetben aktivált kzsv T sejtek kevesebb IFN-γ-t termeltek, mint a felnőtt T sejtek, de a kzsv DS-ek kevésbé voltak képesek ezeket a sejteket stimulálni, mint azok a DS-ek, melyek felnőtt vérből származtak. Ellenben LPS stimulus hatására a TNF-α és IL-10 termelés kinetikája hasonló volt a felnőtt DS-hez. A kzsv DS-ek csökkent képessége arra, hogy teljesen érett felnőtt fenotípust érjenek el és aktiválják, valamint IFN-γ termelésre serkentsék a naiv CD4+ T sejteket, azt mutatja, hogy ezek a sejtek eredendően előprogramozottak a Th 1 immunválasz ellen [23].

A CD40 - CD40L interakció fontos a sejtes immunválasz regulálása szempontjából. Han és mtsai. a CD40 - CD40L interakció működését vizsgálta kzsv-ből származó T sejtek és monociták, illetve B sejtek és monociták között felnőtt vérrel való összehasonlítása során in vitro körülmények között. A teljes vérben a felnőtt monociták, szemben a neonatális monocitákkal, T sejt aktivációt követően aktiválódtak. A felnőtt monociták aktiválódása azonban független volt a CD40 - CD40L kapcsolódástól. A CD40L trimer (Lt) alkalmazása során a kzsv B sejtek hasonlóan reagáltak a CD40 kötődésére, mint a felnőtt B sejtek. Sem a kzsv monociták, sem a felnőtt monociták nem reagáltak olyan jól a CD40 - CD40L kapcsolódásra, mint a B sejtek, mely valószínűleg az alacsony CD40 expressziójuknak tulajdonítható. Ugyanakkor az IFN-γ upregulálta a CD40-et felnőtt monocitákon, de nem úgy a kzsv monocitákon. Ez fokozta a felnőtt monociták CD40Lt által kiváltott CD40-hez való kötődésére adott válaszkészségét. Han és mtsai. vizsgálatai alátámasztották, hogy az újszülöttkori CD40 - CD40L kapcsolódás éretlen a sejtes immunválaszban résztvevő monocitákon, valamint azt, hogy az IFN-γ nem képes aktiválni a neonatális monocitákat a CD40L kapcsolódás által kiváltott válasz során [3]. Eliott és mtsai. azt találták, hogy a CD40 azonos mértékben expresszálódott nyugvó B sejteken felnőttekből, fiatal gyermekekből (2-20 hónapos) és kzsv-ből származó mintákban. PMA és ionomycin aktivációt követően a CD40 fokozottabban expresszálódott kzsv B sejteken, mint felnőtt B sejteken, viszont CD3 elleni monoklonális antitesttel stimulált T sejtekkel történt aktiválódást követően a CD40 expressziója azonos volt a kzsv és a felnőtt perifériás vér B sejteken. PMA és ionomycin stimulált kzsv-ből származó T sejtek kezdetben felnőttekre jellemző mértékű CD40L-t expresszáltak, de ez az expresszió jóval átmenetibb volt kzsv T sejteken, mint felnőtt perifériás vér T sejteken. A felnőtt és kzsv mononukleáris sejtek CD3 elleni antitesttel való stimulációja során egyes kzsv mintából származó T sejtek eltérő kinetikájú CD40L expressziót mutattak, mint a felnőtt vérből izolált T sejtek. Más kzsv eredetű T sejtek viszont a felnőtt mintázatra jellemző CD40L expressziót mutattak. Amikor az előzetesen B sejt és monocita mentesített mononukleáris sejteket anti-CD3 antitesttel stimulálták, a CD40L-t expresszáló T sejtek aránya és átlagos fluoreszcenciája jelentősen megemelkedett és a T sejtek expressziós mintázata hasonló volt mind felnőtt vérben, mind kzsv-ben. Ezek az eredmények bár felhívják a figyelmet a CD40 és CD40L különböző mértékű expressziójára újszülött és felnőtt limfocitákon, de nem magyarázzák az újszülöttkori humorális immunitás relatív hiányosságait [24].

3.1.3 T LIMFOCITÁK PREVALENCIÁJA ÉS FUNKCIÓJA

Az újszülöttkori T sejtek csökkent funkciója széles körben felismert kísérletes és klinikai jelenség. A csökkent működés mellett jól ismert az egyes limfocita típusok eltérő előfordulási gyakorisága is újszülöttkorban. A kzsv limfocitáinak túlnyomó többsége naiv sejt (CD45RA), szemben a felnőttekkel, ahol az effektor (CD45RO) sejtek dominálnak [25]. Egy kutatócsoportunk által végzett korábbi vizsgálat ezt szintén alátámasztotta, ugyanis a kzsv-ben magasabb számban találtunk naiv (CD4+ CD45RA+ CCR7+) sejteket, míg centrális (CD4+ CD45RA- CCR7-) és effektor memória T sejteket a felnőttekéhez képest alacsonyabb mennyiségben detektáltunk [26]. A CD8 limfocitákhoz képest a CD4 limfociták szignifikánsan magasabb százalékban fordultak elő újszülöttekben, mint felnőttekben, a CD4/CD8 arány jelentős csökkenését okozva [27]. Az NK sejtek pervalenciája szintén alacsonyabb kzsv-ben [26].
Az átfogó immunműködéshez mind a Th1, mind a Th2 válasz szükséges. Újszülött egér, és humán immunfolyamatok vizsgálatai erős elköteleződést mutattak a Th2 út irányában [23,28], amely az immunfolyamatok minden szakaszában – az elsődleges effektor sejtektől a memóriaválaszig - megfigyelhető volt [29]. Viszont mind az egér, mind a humán neonatális T sejtek megtartották azon képességüket, hogy bizonyos körülmények között protektív Th1 választ hozzanak létre [30,31].

3.1.3.1 A Th1 és Th2 citokin szekréció eltérései köldökzsinórvérben

García Vela és mtsai. az intracelluláris citokin termelést vizsgálták PMA-ionomycin-brefeldin A által stimulált köldökzsinór-, és felnőtt perifériás vérmintákban. Szemben a felnőtt T limfocitákkal, a köldökzsinór T limfocitái kevesebb IL-2, IL-4 és IFN-γ-t termeltek. A kzsv-ben ezeket a citokineket elsősorban a CD4 sejtek termelték. Felnőttekben az IL-2 és az IL-4 termelése szintén főleg a CD4 sejtek által történt. Viszont itt az IFN-γ termelésben mindkettő T sejt altípus, mind a CD4 T limfocita, mind a CD8 T limfocita részt vett [25]. Gasparoni és mtsai. meghatározták a Con A hatására kiváltott IL-2, IL-4, IFN-γ és IL-10 termelés szintjét T sejtekben, 12 extrém koraszülött, 12 koraszülött és 20 érett újszülött, valamint 10 gyermek és 10 felnőtt esetében. Az találták, hogy a Con A kiváltotta immunproliferáció jóval alacsonyabb volt

kzsv-ben, mint gyermek-, vagy felnőtt vérmintákban. Az IL-2 termelő CD4 és CD8 sejtek százalékos aránya magasabb volt valamennyi kzsv-ben, szemben a gyermek-, vagy felnőtt vérmintákkal. A kzsv-ben az IL-4 termelő sejtek magasabb százalékban a CD8 típusú sejtek voltak, kisebb mértékben CD4 típusúak, összehasonlítva a gyermek vagy felnőtt mintákkal. Újszülöttekben jelentősen alacsonyabb mértékben fordultak elő IFN-γ termelő CD4 és CD8 sejtek. Szignifikáns negatív korrelációt figyeltek meg a gesztációs kor és a CD4+ IFN-γ, CD8+ IL-2 és CD4+ IL-10 termelő sejtek között. Továbbá pozitív összefüggést találtak a gesztációs kor és a CD8+ IL-10 termelő sejtek között [27].

Nitsche és mtsai. összehasonlították a különböző stimulusok által indukált citokin szekréciót mRNS és fehérje szinten kzsv-ben és felnőtt vérben. Míg az IL-2 szint hasonló volt kzsv-ben és felnőtt vérmintában, addig a Th1 citokin, az IFN-γ alacsonyabban volt indukálható kzsv-ben. Az IL-4, IL-5, és IL-13 Th2 típusú citokinek és az IL-3 hemopoetikus citokin szintje jóval alacsonyabb volt kzsv-ben, mint felnőtt mintákban TCR mediált stimulus hatására, míg a GM-CSF termelése hasonló volt a két csoportban. Alacsonyabb Th1 és Th2 citokin értékeket mértek 4 napos vizsgálat során, az IL-3 és GM-CSF szintje azonban hasonló volt 12 óra elteltével. Az összes citokin, kivéve az IFN-γ, IC50 értéke ciklosporin A gátlás során azonos volt kzsv-ben és felnőtt vérmintában. Ezzel szemben a transzkripciós faktorok expressziója és aktivációja alacsonyabb volt kzsv-ben. TPA/ionomycin hatására bekövetkező NF-κB aktivációja kimutatható volt felnőttekben, kzsv-ben azonban nem. Továbbá a T helper alcsoport specifikus transzkripciós faktorok, a T-bet és a c-maf expressziója alacsonyabb volt kzsv-ben, míg a GATA-3 expressziója hasonló volt a két populációban. A T-bet és c-maf expressziója korrelált a Th1 és Th2 citokinek expresszójával. Az időbeli lefolyást vizsgálva megállapították, hogy a T-bet expresszió indukálható volt mindkét csoportban, míg a c-maf és GATA-3 expresszió csak a felnőtt vérben volt stimulálható. Ezek alapján a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a kzsv csökkent citokintermelő képesessége az alacsony NF-κB aktivációjával magyarázható, míg az egyes Th csoportok különbségei a Th specifikus transzkripciós faktorok eltérő regulációjának köszönhető [32].

Más módszert alkalmazva Kilpinen és mtsai. eltérő eredményt kaptak a humán kzsv T limfociták NF-κB aktivációjának vizsgálata során. Kutatásaik során az aktivációt elektroforézis (EMSA) segítségével vizsgálták, meghatározva a kappa B szekvenciát tartalmazó oligonukleotidhoz komplementer kötődő nukleáris proteinek mennyiségét.

Az adatok azt mutatták, hogy a forbol dibutirát és A23187 kalcium ionofor kombináció jelentősen magasabb NF-κB nukleáris transzlokációt indukált újszülött T sejtekben, mint felnőtt T sejtekben. Ez a magasabb NF-κB aktivitás a CD4 sejtekre korlátozódott. Az NF-κB fő fehérjekomponensei, a p50 és a RelA (p65) fehérjék elleni antitest vizsgálata azt mutatta, hogy az NF-κB összetétele hasonló volt mind a kzsv sejtekben, mind a felnőtt sejtekben. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a neonatális T sejtek oxidatív stresszt indukáló szignálnak vannak kitéve szülés során és/vagy eredendően nagyobb ezeknek a sejteknek az érzékenysége NF-κB aktiváló szignálra, mint a felnőtt T sejteknek [33].

Az újszülöttek azon képessége, hogy a Th1 választ a Th2 immunválasz irányába tolják el, részben a csökkent IL-12 expresszióval magyarázható [34]. Továbbá mind egér, mind humán újszülött sejtek esetén az IL-12 szabályozásával a T sejt válasz Th1 irányba terelhető [35]. Ezért a köldökzsinór DS-ek azon tulajdonsága, hogy képtelenek IL-12 termelésre, alapvető fontosságú a Th2 válasz irányában való elköteleződésben. Feltehetően egy másik olyan domináns Th2 citokin segítségén keresztül, mint az IL-10 [23].

Másfelől közelítve, Schultz és mtsai. kimutatták, hogy az antiinflammatorikus válasz is csökkent kzsv-ben, ugyanis anti-CD3 / anti-CD28 kostimulációt követően az IL-10 termelés jelentősen csökkent a neonatális T limfocitákban. Az IL-10 receptor expressziója szintén alacsonyabb volt újszülött T limfocitákban, mint felnőtt T limfocitákban, de hasonló volt újszülött B limfocitákban és monocitákban [36].

A kzsv IFN-γ termelés negatív szabályozása a placenta által termelt Th1 antagonista hatású mediátoroknak tulajdonítható. Viszont bizonyítottan létezik egy másik, jóval direktebb transzkripciós szabályozás is. White és mtsai. publikálták, hogy szemben a felnőtt sejtekkel, a kzsv-ben a CD3+ CD45RO- T sejtek, ezen belül is legfőképp a CD4+ CD45RO- sejtek hipermetiláltak a CpG és a nem-CpG (CpA és CpT) területeken az IFN-γ promoteren belül, illetve annak szomszédos részein. Ezzel szemben a CpG metilációs mintázata a kzsv INF-γ termelő CD8+ CD45RO- T sejtjeiben és a CD56+ CD16+ CD3- NK sejtekben nem különbözött jelentősen a felnőttek hasonló típusú sejtjeitől. Ezzel összhangban a stimulált naiv köldökzsinór CD4+ sejtek IFN-γ termelése ötödére-tizedére csökkent a felnőtt CD4+ sejtekéhez képest, míg a CD8+ sejtek IFN-γ termelése azonos volt újszülöttekben és felnőttekben. Szignifikáns CpA és CpT

metiláció nem volt kimutatható egyéb citokinek (IL-4, TNF-a, IFN-gR alfa-lánc) promoter régiójában [37].

3.1.3.2 T sejt aktiváció és érés

Az adaptív immunrendszer érésének indukálásához antigén hatás szükséges. Ezért a neonatális limfociták főleg naivak és nyugvó fenotípusúak, hiszen ritka az in utero idegen antigén expozíció komplikációmentes terhesség során. Az érett újszülöttek T sejtjeivel szemben azonban a koraszülöttekben a T sejtek gyakran aktiválódnak az emelkedett számú aktivációs markereket (CD25, CD69, HLA-BR) expresszáló sejtek tanúsága szerint. Ez a hatás független a korioamnionitisz jelenlététől. Továbbá, korioamnionitisz hiányában a T sejtek aktiváltsága és a spontán szülés idején betöltött gesztációs kor között ellentétes összefüggés mutatható ki. Ezek az eredmények azt az elképzelést támogatják, miszerint az in utero aktivált magzati adaptív immunrendszer szorosan összefügg a koraszüléssel. Ugyanakkor a fennáll fertőzésnek köszönhetően korioamnionitiszt követően született érett újszülöttekben fokozott T sejt aktiváció szintén megfigyelhető [38].

Felnőttekben a legjelentősebb stimulus, mely naiv T sejt aktivációt és érést indukál, a neoantigén peptidek által kiváltott TCR működés. Crespo és mtsai. azonban leírták, hogy a neonatális naiv T sejt képes a CD45RO érési antigén expresszióját upregulálni toll-like receptor (TLR) függő mechanizmuson keresztül is. Szelektált TLR ligandok használatával újszülött T sejtekben egyenletes CD45RO upregulációt találtak, míg ez a hatás felnőtt naiv T sejtekben elmaradt [39]. Továbbá a CD45RO+ T sejtek aránya magasabb volt koraszülöttekben, mint érett újszülöttek köldökzsinórvérében, tükrözve a koraszülött sejtek korai érését válaszul a mikrobiológiai ágensek korai expozíciójára. Ennek az expozíciónak feltehetően az a következménye, hogy fokozott a T sejt migráció a nem gasztrointesztinális területekre (tüdő, bőr, agy). Ez magyarázhatja a koraszülésnél gyakran észlelhető szisztémás gyulladásos szervdiszfunkciót. Ezt a megfigyelést érdekes eredmények támasztják alá. Egyrészt az α4β7 homing molekula a T sejtek intesztinális területekre való bejutását segíti elő, másrészt a C kemokin receptor 4 (CCR4) a T sejtek kemotaxisát és a nem intesztinális területekre való migrációját indukálja [40]. Megfigyelték, hogy a koraszülött kzsv T sejtek az α4β7 integrint alacsonyan expresszálják, míg a CCR4 molekulát magasan, összehasonlítva az érett

kzsv T sejtekkel. Viszont korioamnionitisz esetén a gesztációs kortól függetlenül a CD45RO és α4β7 receptorok expressziója magasabb volt [39].

A CD80, CD86, CD28 és a CD152 (CTLA-4) expresszióját Elliot és mtsai. vizsgálták kzsv-ből izolált limfocitákban 2-20 hónapos gyermekekben és felnőttekben. Nem találtak különbséget a CD86 vagy CD80 expressziójában felnőtt-, valamint neonatális B sejtekben sem aktivált, sem nyugvó állapotban. Ugyanakkor a CD28 expresszáló nyugvó T sejtek magasabb százalékban fordultak elő kzsv-ben és fiatal gyermekek vérében a felnőttekhez képest. A CD28 expressziója PMA-t és ionomycint követő aktiváció során azonos volt mind felnőtt, mind kzsv T sejtekben. CD3 stimulus követően azonban a CD28 nagyobb sűrűségben és magasabb százalékban expresszálódott neonatális T sejtekben, mint felnőtt T sejtekben. A CD152 expresszió kzsv T sejtekben alacsonyabb volt, mint felnőtt T sejtekben PMA-val és ionomycinnel való aktivációkor, de az expresszió nem volt kimutatható kzsv T sejtekben CD3 stimulus követően. Ellenben az intracelluláris CD152 azonos volt PMA és ionomycin aktivált kzsv és felnőtt T sejtekben, mely felveti annak a lehetőségét, hogy a CD152 sejtfelszínre történő irányítása eltérően szabályozott neonatális T sejtekben. Mivel a T sejtválaszt a CD28-tól és CD152-tól származó jelek egyensúlya határozza meg, kzsv T sejtek magas CD28 expressziója és alacsony sejtfelszíni CD152 expressziója fokozhatja a neonatális T sejt aktivációt [41].

Schelonka és mtsai. azt vizsgálták, hogy vajon a kisebb T sejt repertoár hozzájárulhat-e a kzsv sejtek alacsonyabb válaszkészségéhez. Ahhoz, hogy meghatározzák a T sejtek fejlődési különbségeit, amplifikálták a 24-41. gesztációs hét közötti kzsv-ből származó TCR 3-as komplementer régiójának (CDR3) megfelelő cDNS szegmenseket TCR családspecifikus szakaszokkal. Az így keletkező CDR-eket fingerprinting és SSCP (single strand confronting polymorphism) analízis segítségével tették láthatóvá. A 24. gesztációs héten nem volt korlátozott a TCRBV (T sejt receptor β-lánc variabilitás) család használata, illetve a CDR3 méret heterogenitásának mértéke sem különbözött a felnőttekétől. Fiatalabb gesztációs korban azonban a CDR3 rövidebb volt minden családban és általában mérete a terminusig nőtt. Az oligoklonális expanzió mértéke nagyobb volt kzsv-ben, mint felnőtt perifériás vérben. Azt találták, hogy a T sejtek oligoklonális expanziója a 29-33. gesztációs héten volt a legnagyobb, majd fokozatosan csökkent a terminusig. Az expanzió mind a CD4, mind a CD8 alpopulációban megfigyelhető volt. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a genetikai folyamatok

repertoár változatossága intaktnak tűnik olyan korai szakban, mint a 24. gesztációs hét, de a repertoár diverzitása limitált a kisebb CDR3 méretnek köszönhetően [42].
Korábbi eredményekkel összhangban Chen és mtsai. közölték, hogy a kzsv naiv CD4 T sejtek aktivációja és a korai Th1 differenciálódása csökkent a felnőtt perifériás vér naiv CD4 T sejtekhez képest, felnőtt monocitákból származó allogén DS-kel történő aktiváció során. Leírták, hogy a korai Th1 polarizáció IL-12 és CD154 függő, valamint, hogy mindkét proteint a kzsv CD4 T sejt / DS kokultúra csökkenten expresszálja. A kzsv naiv CD4 T sejtek alacsony bazális szintű szignáltranszdukcióval és csökkent transcription 4 mRNS és fehérje aktivitással jellemezhetőek, valamint alloantigén stimulációt követően csökkent IL-12 indukált szignáltranszdukciót és a transcription 4 tirozin csökkent foszforilációs aktivitását mutatják, szemben a felnőtt naiv T sejtekkel. Kimutatták, hogy a Fox P3 protein expresszió, mely lényeges Treg marker, alacsonyabb kzsv naiv CD4 T sejteken, mint felnőtt perifériás vérben, ami vitatja, hogy a megnövekedett Treg aktivitás felelős lehetne a csökkent Th1 differenciálódásért kzsv CD4 T sejtekben [43].

3.1.3.3 A regulátoros T sejt (Treg) és Th17 szerepe az újszülöttkori immunitásban

A korai, megfelelő Treg funkció óriási jelentőségű a megfelelő immunérés szempontjából. Schaub és mtsai. a T sejt választ vizsgálták veleszületett (lipid A és peptidoglikán) és adaptív (phytohemagglutinin) ingerek hatására születéskor, összehasonlítva a felnőtt immunválasszal [44]. Egyéb vizsgálatokkal megegyezően azt találták, hogy kzsv-ben a Treg sejtek jelen vannak és megfelelően funkcionálnak PHA stimulus hatására [45]. Ugyanakkor a felnőttekhez képest újszülöttekben, mind az adaptív-, mind a veleszületett stimulus általánosságban kevésbé érett Treg választ indukál. Ennek egyik magyarázata, hogy a Treg sejtek nagyrészt születést követően érnek, mely megegyezik a Wing és mtsai. által leírtakkal, mely szerint a kzsv CD4+CD25+ sejtek nem gátolják a saját antigénre adott választ, szemben a felnőtt Treg sejtekkel [46]. Másrészt összehasonlították a Treg markerek expresszióját kzsv-ben és felnőtt vérben. A kapott eredmények összhangban voltak Chen és mtsai. eredményeivel, mely szerint bár a CD4+CD25high sejtek és a Fox P3 kimutathatóak a kzsv-ben, de veleszületett stimulust követően alacsonyabban expresszálódnak szemben a felnőtt vérmintával [43]. Ez arra enged következtetni, hogy kzsv-ben az alacsony expressziójú

Fox P3 és CD4+CD25high sejtek hozzájárulhatnak a Treg-ek alacsonyabb szupressziós képességéhez.

Veleszületett stimulus hatására kzsv-ben alacsony volt a Th17 sejtek prevalenciája, illetve e sejttípus felnőtt vérben jellemző Th1/Th2 citokinekkel mutatott korrelációja szintén megfigyelhető volt. Érdekesség, hogy kzsv-ben az IL-17 szekréciója a veleszületett stimulusra korlátozódott, míg PHA stimulusra ez a hatás elmaradt. Ezért érthető, hogy a hatékony veleszületett válaszkészség befolyásolja az adaptív immunválasz kialakulását [44]. A kzsv alacsony IL-17 szintjének egy lehetséges magyarázata, hogy születés után a Th17 sejtek érése késik, mint ahogy a Treg-gel kapcsolatban már azt korábban leírták [47]. Másik elképzelés szerint a Th17 sejtek aktiválódásához további specifikus stimulus szükséges. Az anti-CD3/anti-CD28-cal, illetve IL-6 és TGF-β-val történő aktiváció azonban nem indukált szignifikáns IL-17 szekréciót.

Összefoglalva, kzsv-ben az alacsonyabb számú Th17 és Th1 sejtek, valamint a Treg sejtek által kevésbé szupresszált emelkedett Th2 citokin szekréció kombinációja sérülékeny immunrendszert hoz létre a korai életszakban. Ugyanakkor a veleszületett immunstimulus, mint például a fokozott mikrobiológiai behatás, potenciális faktor a korai immunrendszer érésében.

Chang és mtsai. olyan eredményeket közöltek a Treg sejtekkel kapcsolatban, melyek ellentmondanak a korábban Chen és mtsai., valamint Schaub és mtsai. által leírtakkal [44]. Összehasonlították a kzsv naiv, illetve antigén által aktivált CD4+CD25- és CD4+CD25+ T sejtjeit a felnőtt perifériás vérből származó hasonló sejtekkel, különös tekintettel a genetikai expressziós mintázatra, immunfenotípusra, szupressziós aktivitásra és a szupresszió mechanizmusára. Mind a naiv kzsv CD4+CD25+, mind a felnőtt CD4+CD25+ T sejtek hasonlóan magas GITR, FOXP3, CD25 és CD152 mRNS-t expresszáltak, mint ahogy emelkedett CTLA-4 és CITR fehérje szintet hoztak létre. Viszont csak a naiv felnőtt perifériás vér mutatott szupressziót allogén válaszra szemben a kzsv CD4+CD25+ T sejtekkel. CD4+CD25- T sejtek MUTZ-3 specifikus éretlen DS-kel (MUTZ-iDC) való stimulációja e gének amplifikációját váltotta ki és erősen szupresszálta a MUTZ-iDC által indukált CD4+CD25- T sejt proliferációt. Összehasonlítva a felnőtt vérből származó sejtekkel, szignifikánsan magasabb százalékú CD4+CD25+CD152+ Treg sejt volt indukálható kzsv CD4+CD25- T sejtekből allogén stimulus hatására. Ez az eredmény azt támasztja alá, hogy a kzsv CD4+CD25+ Treg

sejtek, melyek magasabb százalékban voltak indukálhatóak allogén stimulus hatására, szemben a felnőtt sejtekkel, készek erős allogén immunszupresszorként funkcionálni és részben hozzájárulhatnak a kzsv-ben a csökkent allogén felismeréshez és csökkent CD4+CD25+ T sejt aktivációhoz.

Black és mtsai. naiv T sejtek Th17 effektor sejtekké való fejlődési képességét vizsgálták in vitro körülmények között extrém koraszülöttekben, koraszülöttekben, érett újszülöttekben és felnőttekben [49]. A Schaub és mtsai. által korábban megfigyelt Th17 korlátozott érési kapacitással szemben azt találták, hogy a Th17 sejtvonal kapacitása fordítottan arányos az életkorral. Vizsgálatuk szerint az extrém koraszülöttekből származó T sejtek rendelkeznek a legnagyobb képességgel arra, hogy Th17 sejtekké alakuljanak. Ezt követően az érett újszülöttek T sejtjei, majd a felnőtt naiv T sejtek, melyek kevéssé vagy egyáltalán nem képesek Th17 sejtekké alakulni. Ezzel ellentétben a Th1 sejtválasz felnőttek esetében kifejezettebb volt, mint újszülöttekben. Újszülöttek T sejtjei magasabb IL-23RO, ROR-gt és STAT3 expressziót mutattak aktivációt megelőzően és szignifikáns Th17 sejtté való átalakulási hajlamot aktiváció után. Ezzel szemben a felnőtt T sejtek több TBX21-et expresszáltak, ennek megfelelő Th1 irányultsággal.

Cosmi és mtsai. leírták, hogy a kzsv Th17 sejtek elsődlegesen a CD161+CD4+ prekurzor populációból alakulnak ki és ez a populáció hiányzik felnőtt naiv sejtekben [50]. Tekintettel arra, hogy a koraszülött T sejtek azonos vagy nagyobb mennyiségű IL-17-et és IL-21-et termelnek, illetve hogy koraszülöttek vérmintáiban a Th17 sejteknek megfelelő körülmények közötti tenyésztést követően, áramlási citometriás méréssel több Th17 sejt volt kimutatható, azt feltételezték, hogy a koraszülöttekben nagyobb a CD161+ Th17 sejtek prekurzor populációja. Áramlási citometriás mérés segítségével meghatározták a koraszülött és érett újszülött sejtek CD161+ frakcióját élő CD3+CD4+ T sejtekben. A magasabb Th17 sejtekké való differenciálódási képesség ellenére a koraszülöttek mintáiban jelentősen alacsonyabb CD161+ Th17 prekurzort észleltek stimulációt megelőzően, ami felvetette annak a lehetőségét, hogy koraszülöttekben a Th17 sejtek képesek CD161- prekurzorokból is kialakulni. Bár Black és mtsai. vizsgálatainak eredménye szerint in vitro körülmények között a kzsv CD4 sejtek képesek Th17-é alakulni, ugyanakkor ezt a képességüket elvesztik in vivo körülmények között az elégtelen antigénprezentáció és citokin jelátvitel következtében.

Lee és mtsai. a közelmúltban vetették fel a progeszteron kulcsfontosságú szerepét a naiv kzsv T sejtek Treg-é való átalakulásában [51]. A progeszteron a kzsv-ben, szemben a felnőtt perifériás vérrel, a naiv T sejtek allogén aktiváció-indukált differenciálódását irányítja az immunszupresszív Treg sejtek irányába, mely sejtek közül számos FoxP3-at expresszál. Összehasonlítva azokkal a sejtekkel, melyeket progeszteron hiányában indukáltak, a progeszteron által indukált FoxP3+ T sejtek fokozottabban expresszáltak memória T sejt markereket. Ennek tekintetében a progeszteron tartalmú kzsv főleg memória típusú FoxP3+ T sejtekben volt gazdag. Továbbá a kzsv APS-ek sokkal hatásosabban indukálták a FoxP3+ T sejteket, mint a felnőtt megfelelőjük. Egy másik, progeszteronhoz kapcsolódó új felismerés szerint a progeszteron szupresszálta a kzsv CD4 sejtek inflammatorikus Th17 sejtekké való átalakulását. A progeszteron továbbá fokozta az IL-2 hatására bekövetkező STAT5 aktivációt, míg csökkentette az IL-6 által okozott STAT3 aktivációt. Ezek a folyamatok magyarázhatják a progeszteron szerepét a Th17 sejtekkel szembeni Treg sejtek szelektív kialakulásában. Emellett a progeszteron szupresszálta a T sejtek IL-6 receptor expresszióját. Ezen eredmények alátámasztják a progeszteron különleges szerepét a magzati T sejt differenciálódás szabályozásában, amely hozzájárul az immuntolerancia kialakulásához.

3.1.3.4 A limfocita aktiváció kinetikája köldökzsinórvérben

Palin és mtsai. az αβ-TCR/CD3 komplex és a CD28 kötődését követően kialakult, naiv CD4 sejtek által közvetített alacsony jelátvitel miatti csökkent neonatális CD4 T sejt immunitást vizsgálták [52]. A CD3 kötődést követő kalcium beáramlás szignifikánsan magasabb volt köldökzsinórvér naiv CD4 sejtekben összehasonlítva a felnőtt CD4 sejtekkel. Mindemellett az újszülött naiv CD4 sejtekre magasabb aktiváció- indukált Erk foszforiláció volt jellemző. A miR-181a mikroRNS, mely fokozta az aktiváció-indukált kalcium beáramlást egerek timocitáiban [53], jelentősen magasabb szinten expresszálódott kzsv naiv CD4 sejtjeiben szemben a felnőttekével. A miR-181a túlexpressziója felnőtt naiv CD4 sejteken növelte az aktiváció-indukált kalcium-influxot, ami maga után vonta azt a következtetést, miszerint a miR-181a szint növekedése kzsv naiv CD4 sejteken hozzájárul a fokozott jelátvitelhez. Ezzel szemben az AP-1 függő transzkripció, amely az Erk jelátvitelt követi és szükséges a teljes T sejt aktivációhoz, köldökzsinórvér naiv CD4 sejtekben csökkent volt szemben a felnőtt

sejtekkel. Ennek megfelelően a kzsv naiv CD4 sejt fokozott aktiváció-indukált kalcium beáramlása a timocitaszerű fenotípus megőrzésére utalhat. A fokozott kalcium jelátvitel és Erk foszforiláció független a downstream AP-1 függő transzkripciótól, mely csökkent és valószínűleg hozzájárul a limitált kzsv CD4 sejtimmunitáshoz.
Kutatócsoportunk korábbi vizsgálata, melyben a kzsv T sejtek kalcium beáramlási kinetikáját vizsgáltuk, eltérő eredményeket mutatott, mely feltehetően az eltérő vizsgálati módszernek és az eltérő vizsgált sejtcsoportoknak volt tulajdonítható. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a kzsv aktivált T limfociták kalcium beáramlási kinetikáját, valamint vizsgáljuk a Kv1.3 és IKCa1 limfocita kálium csatornák expresszióját és funkcióját, melyek fontos szerepet játszanak a kalcium beáramlás szabályozásában [54]. A kalcium beáramlás kinetikájának mérése áramlási citometriás módszer alkalmazásával történt Th1, Th2, CD4 és CD8 limfocitákban PHA-val történt aktivációt követően. A CD4 sejtek kivételével a kalcium beáramlás kinetikája csökkent az aktivált kzsv T limfocitákban a felnőtt T limfocitákhoz képest. A neonatális T sejtek kevésbé voltak érzékenyek a Kv1.3 és IKCa1 kálium csatornák specifikus gátlásakor. A Kv1.3 csatorna expressziója, kivéve a Th1 limfocitákat, magasabb volt a fő T limfocita populációkban újszülöttekben. Vizsgálatunk szerint a fő T limfocita altípusok rövid idejű aktivációja csökkent a felnőttekhez képest érett újszülöttekben. A neonatális limfociták kálium csatornájának megváltozott funkciója valószínűleg hozzájárul ehhez a jellegzetességhez.

3.1.3.5 A Galectin-1 hatása a Th1 / Th2 sejtaránya

A galectin-1 (Gal-1) fontos szerepet játszik a gyulladásos válasz és az immuntolerancia szabályozásában erős immunszupresszív tulajdonságának köszönhetően [55]. Elősegíti a naív T sejtek túlélését, valamint antiproliferatív hatással rendelkezik mind a naiv-, mind az aktivált T sejtekre nézve [55,56]. A Gal-1 a CD8 és Th1 sejtek apoptózist indukálja, míg a Th2 sejtek védettek a Gal-1 által mediált sejthalállal szemben [57]. A Gal-1 elnyomja az IL-2 proinflammatorikus citokin szekrécióját [58], és elősegíti az IL-10 aniinflammatorikus citokin termelődését [59]. A Gal-1 nagy valószínűséggel hatásos effektor is egyben, mely szerepet játszik a CD4+CD25high Treg sejtek működésében [60]. Érdekesség, hogy a Gal-1 jól ismert immunszupresszív hatásával ellentétben azt találtuk, hogy a Gal-1 expressziója CD3, CD4, CD8, Treg és NK limfocitákon

alacsonyabb volt kzsv-ben, mint felnőtt perifériás vérben [26]. Az alacsonyabb Gal-1 sejtarány valószínűleg a naivitásnak és az alacsonyabb szintű hosszú-hatású kzsv limfocita stimulációnak köszönhető. Ezt támasztja alá az is, hogy kzsv-ben magasabb a naiv sejtek prevalenciája, míg a centrális és az effektor memória T sejtek előfordulási gyakorisága alacsonyabb, mint felnőtt vérben. Továbbá pozitív korreláció figyelhető meg az intracelluláris Gal-1-et expresszáló CD3 limfocita száma és a memoria T sejtek prevalenciája között. Az intracelluláris Gal-1 mennyisége azonos kzsv és felnőtt perifériás vérben, ami feltételezi, hogy a Gal-1 produkciós kapacitása ezeken a sejteken érett. Az intracelluláris Gal-1 expresszió valószínűleg downregulált neonatális limfocitákon, köszönhetően a már csökkent kzsv immunreaktivitásnak. Szemben a korábbi eredményekkel, kutatócsoportunk által végzett vizsgálatok szerint az exogén Gal-1 nem képes T limfociták proliferációját csökkenteni sem kzsv-ben, sem felnőtt vérben. Ennek alapján a Gal-1 expresszáló limfociták nem valószínű, hogy szerepet játszanak az immunreaktivitás csillapításában, köldökzsinórvérben.

3.2 TERHESSÉGI IMMUNITÁS

Egészséges terhességben az anya minden szervrendszerének adaptálódnia szükséges a fejlődő magzat fiziológiai szükségleteihez. Ebben az anyai immunrendszer sem kivétel. Tekintettel arra, hogy a fejlődő magzat apai antigén prezentáló képessége miatt szemi-allograftnak tekinthető az anyai immunitás szempontjából, immuntoleranciának szükséges kialakulnia a rejekció elkerülése céljából. Egészséges terhesség során a magzat idegen antigénjeit az anyai immunrendszer 40 hétig „sajátjának" tekinti. Ennek a toleranciának a meggyengülése a magzat ellen irányuló abnormális immunválasz kialakulásához vezet, mely a terhesség kedvezőtlen kimenetelét okozza, úgymint a spontán vetélés, a koraszülés vagy a préeklampszia. Visszatérő vetéléskor és préeklampsziában a normálistól eltérő anyai immunválaszban olyan autoimmun komponensek fedezhetőek fel, melyek az autoimmun betegségekben figyelhetőek meg vagy az autoimmun reakciókkal állnak összefüggésben. Fontos megjegyezni, hogy a visszatérő vetélés és préeklampszia nem tekinthető autoimmun állapotnak, de patomechanizmusukban jelentős szerepet játszik a „saját" ellen irányuló folyamat. Ebben a tekintetben a préeklampszia például mind az allograft rejekcióban, mind a GVHD-ben megfigyelhető autoimmun választ utánozza [61].

A terhességre specifikus immuntolerancia kialakulásának számos részlete ismert. Kezdetben az anyai és a magzati sejtek közötti toleráns kapcsolat lokális szinten, a deciduára korlátozódva jön létre, később a második trimeszterben már az egész anyai szervezetre kiterjedve figyelhető meg. Ezekben a folyamatokban mind a természetes, mind az adaptív immunitás elemei részt vesznek. Az anyai immuntolerancia kialakulásában viszont kiemelkedően fontos szerepe a T limfocitáknak van. Ugyanis a terhesség során a megváltozott pervalenciájuk és működésük befolyásolja az egészséges és a patológiás immuntolerancia kialakulását.

3.2.1 TH1 ÉS TH2 SEJTEK SZEREPE A TERHESSÉGI IMMUNITÁS KIALAKULÁSÁBAN

Korábbi feltételezések szerint az egészséges terhesség a Th1-től a Th2 típusú immunitás irányába való eltolódást indukálta. Egyes vizsgálatok azonban azt igazolták, hogy bizonyos Th1 citokinek szintje egészséges terhességben megemelkedett, ahelyett hogy

csökkent volna a nem terhes állapothoz képest [62,63]. A legfrissebb eredmények arra utalnak, hogy a várandósság mind pro-, mind antiinflammatorikus állapot, a hangsúly a gesztáció szakaszától függ. Ennek megfelelően a terhesség immunológiai szempontból három fázisra osztható. Az első szakasz, mely az implantációtól az első trimeszterig tart, erős gyulladásos választ igényel, mely szükséges a méh epitél megfelelő átépüléséhez és a blasztociszta beágyazódása után visszamarad sejttörmelék eltávolításához. Ezért sem tartható az a korábbi elképzelés, mely szerint az egészséges terhesség relatív immunszupresszív állapotnak felel meg. A sikeres implantáció tehát függ az anyai immunrendszertől, mely stimulálja az anyai méhfal megfelelő trofoblaszt invázióját, ezért a terhesség első fázisa proinflammatorikus állapotnak tekinthető. A terhesség második immunológiai fázisa a második és a harmadik trimeszterre korlátozódik. Ez a magzati növekedés és fejlődés szakasza, amely során egy antiinflammatorikus állapot alakul ki. Végül a harmadik immunológiai szempontból jelentős szakasz a szülés, mely alatt ismét a proinflammatorikus folyamatok uralkodnak, amelyek a magzat, illetve a placenta megszületéséhez szükséges méhkontrakció kiváltásában játszanak szerepet [64].

Egyes vizsgálatok szerint a Th1 sejtek által termelt IFN-γ a legfőbb citokin, amely a terhesség alatti gyulladásos folyamatokat szabályozza. Megfigyelték, hogy az elégtelen immuntoleranciával járó patológiás folyamatokban, mint például a préeklampszia, az IFN-γ termelése szignifikánsan megemelkedett [65]. Egerekben az IL-4, IL-5 és IL-10 a terhesség teljes időtartalma alatt detektálható volt a fötomaternális felszínnél, míg az IFN-γ átmenetileg, csak az első periódusában volt kimutatható [66,67]. Bár a decidua NK sejtjei képesek IFN-γ termelésre, nem játszanak központi szerepet a magzati allograft rejekciójában, mivel nem expresszálnak apai antigén specifikus receptorokat, így nem érzékenyek az apai alloantigének jelenlétére [68]. Mindemellett Piccinni és mtsai. korábbi vizsgálata szerint, melyben a deciduális CD4+ T sejtek citokin termelését vizsgálták ismétlődő spontán vetélésben szenvedő nőkben szemben az egészséges terhesekkel, azt találták, hogy az elvetélt nők CD4 sejtjeinek IL-4 és IL-10 termelése elégtelen [69].

A fejlődő magzat antigénjei két határfelületen kerülnek bemutatásra a terhesség során. Az első felület lokálisan, a deciduában alakul ki, ahol kapcsolat jön létre az invazív extravillózus citotrofoblaszt és az anyai immunsejtek között. Ez a „szöveti felszín” a beágyazódáshoz szükséges immunológiai adaptációban játszik fontos szerepet. A

második szisztémásan, a szinciciotrofoblaszt és az anyai vér immunsejtjei közötti határfelületen alakul ki. Ez utóbbi a „szisztémás felszín”, amely a tizedik gesztációs hét körül jön létre és válik különösen fontossá a terhesség második felében [70]. Két ellentétes hatás befolyásolja a magzati extravillózus citotrofoblasztok inváziójának mértékét a anyai deciduában: a placenta rögzítettsége, mely biztosítja a magzat megfelelő tápanyagellátását, illetve a méhfal védelme a túlzott invázióval szemben [71]. Túlzott fokú immuntolerancia és a trofoblaszt sejtekkel szembeni túlzott tolerancia esetén a méhfal túlinváziója alakul ki, ami olyan kórállapotokért felelős, mint a placenta akréta (a méh falához nőtt a méhlepény), inkréta (a chorion-bolyhok közvetlenül a méhizomzatba marják be magukat) vagy perkréta (a chorion-bolyhok a méhizomzatot teljes vastagságában átjárják) [72]. Amennyiben azonban az anyaméh spirális arterioláinak az extravillózus citotrofoblasztok általi megfelelő inváziója elmarad, úgy hipoxia és oxidatív stressz alakul ki a méhlepényben, mely fontos triggere az anyai szisztémás gyulladásos válasz kialakulásának, ezáltal a préeklampszia klinikai manifesztálódásának [71].

3.2.2 GALECTIN-1 HATÁSA A TH1 / TH2 SEJTARÁNYRA

Számos kutatás számolt be arról, hogy a szolúbilis faktorok szerepet játszhatnak az egészséges terhességben megfigyelhető Th2 irányú eltolódásban. Ezek közül az egyik legfontosabb szolubilis faktor a 14 kDa méretű β-galaktóz kötő fehérje, a galectin-1. Az immunrendszer elemei közül az aktivált T, B és NK sejtek, valamint a makrofágok expresszálják [73,74,75,76]. A galectin-1 számos mechanizmuson keresztül fejti ki immunregulátoros hatását. Azáltal, hogy hozzákötődik a sejtfelszíni glikoproteinekhez, gátolja a T sejt proliferációt és apoptózist indukál a Th1, Th17 és CD8+ sejtekben [73,77,78].

In vitro körülmények között Rabinovich és mtsai. kimutatták, hogy a galectin-1 gátolja a T sejtek extracelluláris mátrixhoz való kötődését és megszünteti a proinflammatorikus citokinek szekrécióját [58]. Továbbá leírták, hogy az autóimmunitás in vivo modelljeiben a galectin-1 a gyulladásos egyensúlyt a Th2 domináns citokinek irányába billenti [79,80].

Közelmúltban végzett vizsgálatok szerint a galectin-1 elősegíti a fötomaternális tolerancia kialakulását, ugyanis a rekombináns galectin-1-gyel kezelt vetélésre hajlamos

egerekben megakadályozta a magzat elvesztését. A galectin-1 ezen protektív hatása viszont nem érvényesült Treg depletált egerekben [81]. Az, hogy a Treg sejtek szelektíven upreguláljják a galectin-1 expressziót [60], szintén hozzájárul a magzat anyai immunrendszer általi elfogadásához.

Míg a Th1 és Th17 sejtek fogékonyak a galectin-1 indukálta sejthalálra, addig a Th2 sejtek védettek a galectin-1-gyel szemben a sejtfelszíni glikoproteinjeik eltérő szialilezésének köszönhetően. A galectin-1 deficiens egerekben megfigyelhető, hogy jóval nagyobb Th1 és Th17 válasz alakul ki [78]. Következésképpen érdekes feltételezés, hogy a keringő T és NK sejtek csökkent galectin-1 termelése hozzájárulhat-e a proinflammatorikus Th1 és Th17 immunválasz kialakulásához, amely jól ismert jellemzője a préeklampsziának [82,83].

Korábbi, kutatócsoportunk által végzett vizsgálatban áramlási citometria segítségével meghatároztuk a galectin-1-et expresszáló T és NK sejteket PE-ben, egészséges terhes nők és egészséges nem terhes nők perifériás vérében. A szérum galectin-1 és a galectin-1 elleni antitest mennyiségét ELSA-val mértük. Nem találtunk különbséget a szérum galectin-1 és a galectin-1 elleni IgG antitest szintek között PE-ben és egészséges terhességben. Egészséges terhes nőkben a galectin-1-et expresszáló T és NK sejtek szintje magasabb volt, mint egészséges nem terhes nőkben. PE-ben viszont a galectin-1-et expresszáló T és NK sejtek alacsonyabb százalékban fordultak elő szemben az egészséges terhes nőkben mértekkel, mely feltehetően összefügg a PE-ben jellemző proinflammatorikus Th1 és Th17 immunválasz kialakulásával [83].

3.2.3 REGULÁTOROS T SEJT (TREG) SZEREPE AZ TERHESSÉGI IMMUNITÁSBAN

A T helper limfociták különböző alpopulációinak felfedezése, különösképpen a Th17 sejtek funkciójának megismerése megváltoztatta az terhességi immunitásról korábban gondoltakat. Az új modell szerint a terhesség specifikus immuntoleranciát négy sejttípus, a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek közötti egyensúly hozza létre, szemben a korábbi kétkomponensű, Th1 és Th2 sejteket tartalmazó modellel. Több munkacsoport is kimutatta, hogy a Th1 és Th2 egyensúly elvesztése mellett a megváltozott Th17 és Treg prevalencia is jelentős szerepet játszik a kedvezőtlen terhességi kimenetel patogenezisében [84].

A tolerancia kialakulásában az egyik legfontosabb szerepe a Treg sejteknek van. Az apai antigénekre specifikus Treg sejtek szisztémás expanziója figyelhető meg már a terhesség nagyon korai stádiumában, amely arra utal, hogy a Treg sejtek legfőbb funkciója az apai eredetű antigéneket tartalmazó sejtek rejekcióval szembeni védelme [85].

A növekvő perifériás Treg prevalencia mellett megfigyelhető, hogy a Treg sejtek a fötomaternális határfelületen, elsősorban a anyai deciduában is szignifikáns mennyiségben vannak jelen. Sasaki és mtsai. voltak az elsők, akik közölték, hogy a CD4+CD25+ Treg sejtek prevalenciája növekszik a deciduában a humán terhesség korai szakaszában [86]. Ezt alátámasztották Heikkinen és mtsai.-nak, valamint Somerset és mtsai.-nak eredményei. Akik továbbá közölték, hogy a keringő CD4+CD25+ Treg sejtek mennyiségük maximumát a második trimeszterben érik el, majd számuk fokozatosan csökken, de szintjük magasabb marad a postpartum periódusban, mint a nem terheseké. Amennyiben a Treg prevalencia nem éri el a küszöbszintet a terhesség korai szakaszában, úgy fokozódik a préeklampszia kialakulásának valószínűsége [87,88].

Ahhoz, hogy a Treg toleráns hatása érvényesüljön, folyamatos antigénprezentációra van szükség, gyulladásos kostimuláció nélkül. Ez magyarázza a magzattal szembeni átmeneti toleranciát, illetve azt, hogy különösen a terhesség korai heteiben előforduló gyulladásos fertőzés befolyásolja a terhesség kimenetelét. A közelmúltban került felismerésre, hogy a Treg sejtek felelősek lehetnek a lokális Th1 aktivitás szabályozásáért egészséges koraterhességben [89].

A Treg sejtek csökkent száma terhesség során hozzájárul a magzat immunológiai rejekciójához [90]. Sasaki és mtsai. spontán vetélésben alacsonyabb szisztémás Treg szintet találtak, mint egészséges terhesekben [86]. Számos vizsgálat mellett, mely alacsonyabb perifériás vér Treg prevalenciát talált préeklampsziában, mint egészséges terhességben, egyes kutatások arra utalnak, hogy a Treg sejtek száma préeklampsziában a deciduában is csökkent [91,92,93,94].

3.2.4 A TH17 SEJTEK

A CD4+ IL-17+ (Th17) sejt egy nemrégiben felfedezett CD4 limfocita alcsoport, mely a Th1-től és Th2-től különböző fejlődési vonalból származik. A Th17 sejtek a gyulladás

egyensúlyi folyamatában a Treg-gel ellentétes hatásúak és az IL-17 mellett egyéb proinflammatorikus citokineket termelnek. Az IL-17 fontos szerepet játszik az autoimmun betegségek kialakulásában és a krónikus gyulladás fenntartásában. Szemben a Th1-gyel és Th2-vel, melyek kialakulása egymástól független, a Th17 és Treg sejtek azonos fejlődési vonalból származnak. Ezeknek a sejteknek a kialakulása során egy érdekesség figyelhető meg: a közös őssejtből Th17 vagy Treg jön létre, attól függően, hogy a közös őssejt aktivációja a transzformációs növekedési faktor béta (TGF-β) vagy TGF-β plusz inflammatorikus citokin jelenlétében történik-e [95].

Amellett, hogy meghatározott szerepük van a gyulladás szabályozásában, a Th1, Th2, Treg és Th17 sejtek a különböző citokinek termelésén keresztül befolyásolják egymás működését is. Ezt jól szemlélteti a megemelkedett Th17 / Treg sejtarány, amely hozzájárul az immunválasz Th1 irányú eltolódáshoz, ugyanis a fokozott IL-17 termelésen keresztül a Th17 serkenti az egyéb proinflammatorikus citokinek, mint például az IFN-γ termelését. Ugyanakkor ezzel egy időben a Treg sejtek Th1-gyel szembeni gátló hatása csökken [96].

Santner-Nanan és mtsai. azt találták, hogy szemben a nem terhesekkel vagy a préeklampsziásokkal, a magas Treg prevalencia mellett a Th17 sejtek százalékos aránya szignifikánsan csökkent egészséges terheseknél a harmadik trimeszterben. Következésképpen a Th17 / Treg sejtarány szignifikáns csökkenése figyelhető meg az egészséges terhesekben a préeklampsziával szövődött terhesekhez képest [97].

A Th17 sejtek eltérései egyéb, terhesség asszociált betegségekben is megfigyelhetők, ami alapján feltételezhető, hogy a Th17 és Treg egyensúlya ugyanolyan fontos szerepet játszik a egészséges terhesség által kiváltott gyulladásos állapotban, mint a Th1 és Th2 egyensúlya. Ito és mtsai. nemrégiben közölt cikke szerint például az IL-17 termelő sejtek különösen fontos jelentőséggel bírnak a koraszülés patomechanizmusában [98]. Nakashima és mtsai. pedig azt találták, hogy a decidua IL-17 termelő sejtek prevalenciája jelentősen megemelkedik elkerülhetetlen abortusz esetében, szemben az egészséges terhességgel. Ez arra utal, hogy az említett sejtek feltehetően elősegítik a gyulladás kialakulását az abortusz késői szakaszában, de nem a korai periódusban [99]. Egy másik vizsgálatban Wang és mtsai. azt közölték, hogy a IL-17 sejtek előfordulási gyakorisága a perifériás vérben és a deciduában is megemelkedett megmagyarázhatatlan, visszatérő spontán vetélés esetén. Megfigyelték, hogy ezekben a betegekben a Th17 asszociált faktor, a RAR kapcsolt orphan receptor gamma (ROR-γ

vagy RORc) expressziója szintén fokozódott a perifériás vér limfocitákban, illetve a deciduában [100].

A szisztémás gyulladás kialakulásában préeklapsziában - mely a legfőbb oka ennek a terhesség specifikus állapotnak - a Th1 és Th2 mellett a megváltozott Th17 és Treg sejtek előfordulása is kulcsfontosságú. Egy korábbi, kutatócsoportunk által végzett vizsgálatban összehasonlítottuk a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek prevalenciáját préeklapsziában és normális terhességben, illetve meghatároztuk az IL-17 termelő CD4, CD8 és NK sejtek mennyiségét is. Azt találtuk, hogy nemcsak a Th1/Th2, hanem a Th17/Treg sejtek közötti egyensúly is a proinflammatorikus állapot felé tolódik préeklampsziában. Mindemellett az IL-17 expresszáló CD8 és NK sejtek mennyisége is magasabb volt préeklampsziában. Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer szerepet játszik a fokozott anyai szisztémás gyulladás kialakulásában, ebben a terhességhez kapcsolódó rendellenes állapotban [83].

3.2.5 AZ IL-17 TERMELŐ CD8 ÉS NK SEJTEK

Bár, az IL-17 először a CD4+ sejtek kapcsán került felismerésre, később kiderült, hogy a CD8+ és NK sejtek is képesek ennek a citokinek a termelésére [101,102]. Számos kutatási eredmény támasztja alá, hogy az IL-17 termelő limfociták, különösen az NK sejtek, nagymértékben hozzájárulnak a terhességben kialakuló gyulladásos állapothoz. Sargent és mtsai. szerint sokkal inkább a veleszületett, mint a szerzett immunrendszer az, ami irányítja az immunszabályozást a humán terhesség során és ebben a folyamatban az NK sejteknek központi szerepük van [103,104]. Az NK sejtek kóros aktivációja és ez által megváltozott IL-17 termelése mind szisztémásan, mind lokálisan a placentában hozzájárul az immuntolerancia zavarához és a terhesség asszociált kórállapotok kialakulásához.

Egy kutatócsoportunk által végzett vizsgálatban meghatároztuk az egészséges terhes és nem terhes nők perifériás vérmintájában az IL-17 termelő sejtek prevalenciáját a CD4+, CD8+ és NK sejtek körében, illetve az IL-17 termelő CD4+, CD8+ és NK sejtek mennyiségét az teljes limfocita populációban. Azt találtuk, hogy a Th17 sejtek alacsonyabb számban fordultak elő egészséges terhesekben, mint nem terhesekben. A CD8+ IL-17+ (Tc17) sejtek prevalenciája a CD8+ limfociták között magasabb volt

terhesekben nem terhesekhez képest. Az emelkedett Tc17 sejtprevalencia egészséges terhességben elsősorban a csökkent CD8+ IL-17- sejtszint következményének volt tekinthető, amely ezáltal magasabb Tc17 arányt eredményezett a CD8+ sejtpopulációban. Mivel a Tc17 alacsonyabb citotoxikus aktivitású, mint a CD8+ IL-17- sejt [105], az utóbbi sejttípus mennyiségének csökkenése, illetve ennek következtében létrejövő relatív Tc17 sejtszám emelkedés a terhességre jellemző immunszupresszív mechanizmus részének tekinthető [61].

3.2.6 A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ KINETIKÁJA

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy nem csak a T limfocita alcsoportok prevalenciája, hanem a funkciójuk is megváltozik terhesség során. Ezt jól mutatja, hogy a T sejtek kalcium beáramlásának szabályozása is eltérő várandósságban. Ezek a korábbi vizsgálatok kimutatták azt is, hogy szemben a nem terhesekkel, mind egészséges terhességben, mind préeklampsziában a bazális intracelluláris kalcium szint a limfocitákban hosszantartóan megemelkedik. Ugyanakkor préeklampsziában magasabb értéket ér el, mint egészséges terhességben [106,107,108]. A citoplazmában rendelkezésre álló szabad kalciumnak fontos szerepe van a limfocita aktiváció szabályozásában. A feszültségfüggő Kv1.3, illetve a kalciumdependens IKCa1 káliumcsatornák fontos szerepet játszanak az intracelluláris kalcium homeosztázisban azáltal, hogy limfocita aktiváció során ellensúlyozzák a megemelkedett szabad kalciumtartalmat a citoplazmában. Ezek a csatornák felelősek a kálium kiáramlásáért a citoplazmából, így biztosítják az elektrokémiai potenciál gradiens megtartását, ami ahhoz szükséges, hogy további kalcium áramolhasson a citoplazmába. Ezeknek a csatornáknak a specifikus gátlása esetén csökkent a kalcium influx mértéke, ami alacsony szintű limfocita aktivációhoz vezet [109].

Feltételezésünk az volt, hogy a limfocita aktiváció során a kalcium szabályozás elemei, beleértve a limfociták káliumcsatornáit is, érintettek lehetnek terhességben és préeklampsziában. A kutatócsoportunk által végzett vizsgálat során az aktiváció kiváltotta kalcium influxot mértük Th1, Th2, CD4+ és CD8+ limfocita alcsoportokban, egészséges várandósságban, préeklampsziában és egészséges nem terhesekben. Meghatároztuk az előbb említett csoportokban az aktiváció indukált kalcium beáramlást a feszültségfüggő Kv1.3, illetve a kalciumdependens IKCa1 káliumcsatornák gátlása

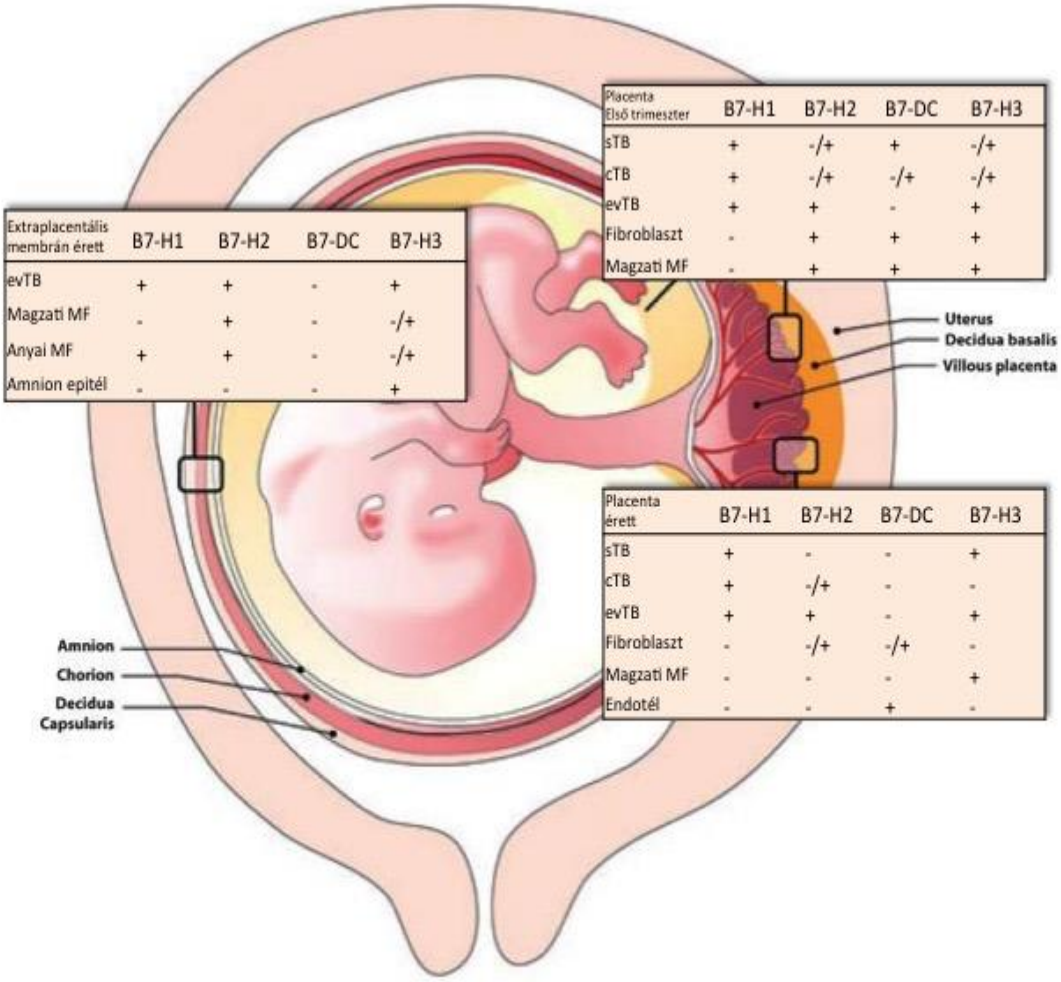
során. Az eredmények azt mutatták, hogy csökkent a kalcium beáramlás a Th1 és CD8+ sejtekben, egészséges terhességben szemben a préeklampsziában mértekkel. Viszont a kálium csatornák gátlása esetén a Th2 sejtek kalcium beáramlása nem változott egészséges várandósokban, míg préeklampsziásokban a gátlás hatására a kalcium beáramlás mértéke jelentősen csökkent. A limfociták kalcium beáramlási kinetikája, valamint a kálium csatornák gátlószerekre való szenzitivitása egészséges terhesekben specifikus mintázatot mutatott. Ez a mintázat préeklampsziában nem volt megfigyelhető, sokkal inkább a nem terhes állapothoz volt hasonló. Vizsgálati eredményeink arra utaltak, hogy a limfociták kalcium szabályozásának eltérései szerepet játszhatnak az egészséges terhesség során megjelenő immunológiai tolerancia kialakulásában [110].

3.2.7 B7 CSALÁD SZEREPE AZ ANYAI IMMUNRENDSZER SZABÁLYOZÁSÁBAN

A placentáris és a magzati növekedés és fejlődés szorosan összefügg a magzat által prezentált apai antigének miatti állandó stimulus alatt álló anyai immunrendszerrel. Mivel az anyai limfociták érzékelik a magzati antigének jelenlétét, aktív tolerancia szükséges a komplikációmentes terhesség és szülés lefolyásához. E toleráns mechanizmusok, mint a deléció, receptor downreguláció és a limfoid szövetek magzati antigénspecifikus sejtjeinek anergiája mellett az immunregulációban szintén jelentős szerepe van a különböző, lokálisan a fötomaternális felszínen expresszálódó immunregulációs molekuláknak. E molekulák közül kiemelendő a B7 kostimulációs molekulák családja, melyek a placentában és a deciduában is jelen vannak. A B7 család tagjai a T limfociták aktivációját és effektor funkcióját mindkét, serkentő, illetve gátló irányban befolyásolhatják, ezáltal központi szerepet játszanak a magzattal szembeni tolerancia kialakulásában.

Az 1990-es években először a B7-1 és B7-2 immunválaszban betöltött szerepe került felismerésre. Olivares és mtsai. közölték elsőként, hogy a decidua sejtjei B7-1 és B7-2 molekulákat expresszálnak és ezen keresztül képesek arra, hogy limfocitaválaszt serkentsenek [111]. A B7 család molekuláinak különleges regulációja és placentáris mintázata arra utal, hogy ezek a fehérjék jelentős szerepet játszanak a lokális fötomaternális miliő kialakulásában (**2. ábra**). Továbbá a B7 molekulák kostimuláló és

koinhibitoros szignált is közvetítő természetének köszönhetően befolyásolják az anyai limfociták és a limfoid szövetek magzati antigénjei közötti interakciót. Petroff és mtsai. vizsgálatai kimutatták, hogy a B7 molekula három lényeges tulajdonsággal rendelkezik. Az első és legfontosabb, hogy terhesség során a B7 molekulát expresszáló sejtek APS-ként is funkcionálnak. Ezt alátámasztja az, hogy azok a sejtek, amelyek a B7 molekula mellett MHC-t is expresszálnak, direkten befolyásolják a T sejt aktivációt és effektor funkciót azáltal, hogy pozitív vagy negatív kostimulációs szignált váltanak ki a TCR-en keresztüli jelátvitel mellett. Második lényeges jellemzője a B7 molekuláknak, hogy azok a trofoblaszt sejtek, amelyek elnyomják az MHC-t, a limfocitákra a B7/CD28-on keresztül hatnak. Végezetül, az APS-n vagy a trofoblaszton lévő B7 molekula visszaható szignált küld a B7 expresszáló sejtnek, melyen keresztül befolyásolja a lokális immunkörnyezetet, azáltal, hogy T sejtre való hatásától függetlenül az immunszupresszív faktorok expresszióját indukálja [112].



2. ábra: B7 fehérjecsalád expressziós mintázata a humán fötomaternális felszínen. Am J Pathol 2005,167:465–473.

Van B7 fehérje expresszió, +; Nincs B7 fehérje expresszió, -; Változó B7 fehérje expresszió, +/-; cTB, citotrofoblaszt; evTB, extravillózus citotrofoblaszt; MF, makrofág; sTB, szinciciotrofoblaszt.

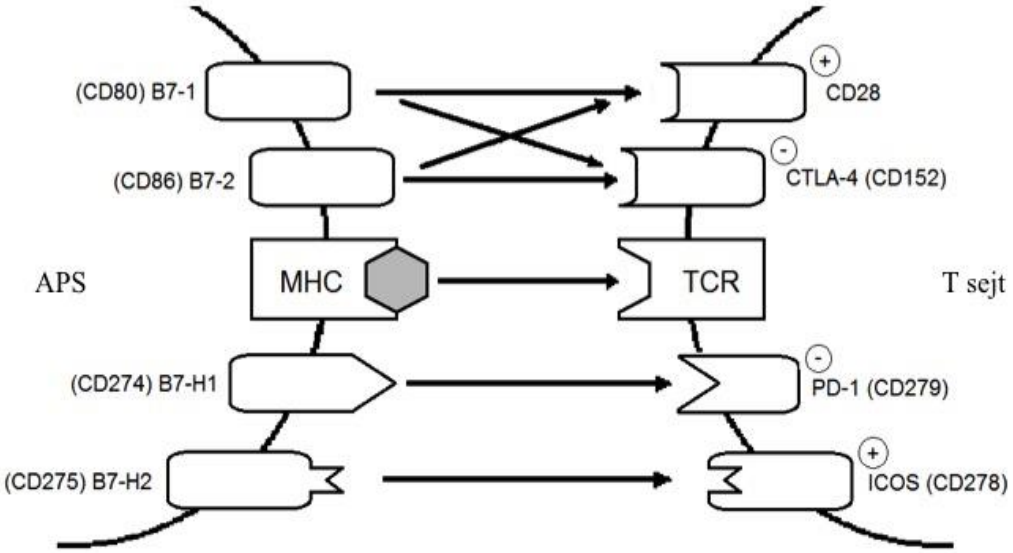
3.3 INDOLAMIN-2,3-DIOXIGENÁZ (IDO)

Az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) potens immunszupresszív hatását először terhességben ismerték fel, ahol az IDO aktivitás kémiai gátlásával megszüntették az allogén terhességet. Bár az enzim genetikai deléciója nem ismételte az enzim gátlásával kiváltott hatást, mégis számos tény támasztja alá a fehérje fötomaternális immuntoleranciában betöltött szerepét [113,114]. Ennek egyik jelentős példája, hogy a humán decidua monociták és dendritikus sejtek drámaian upreguláljáik az IDO-t, IFN-γ vagy CTLA-4 / Fc fúziós fehérje hatására [115]. Minél magasabb volt a B7-2 expresszió a deciduális monocitákon és a dendritikus sejteken, annál kifejezettebben emelkedett az IDO termelés. Ez az eredmény támogatja azt az elképzelést, hogy a decidua dendritikus sejtek valószínűleg védekező funkcióval rendelkeznek a terhesség során. Az IDO és B7 szintjei szoros összefüggést mutattak a terhesség kimenetelével kapcsolatban is, mivel spontán vetélés esetén mindkettő szintje csökkent.

Petroff és mtsai. feltételezték, hogy in vivo a Treg sejtekből származó CLTA-4 is képes a decidua DS-ek IDO termelésének serkentésére [112]. A CTLA-4 terhességben betöltött protektív szerepét alátámasztja, hogy mind a Treg sejtek, mind a CTLA-4 szintje a Treg sejteken alacsonyabb a deciduában spontán vetélésben [86]. Terhességben a méhlepény fibroblaszt CLTA-4 expressziója szintén megfigyelhető. Ez egy másik, jelentős ligandforrást biztosít a visszaható jelátvitel szabályozásában a fötomaternális felszínen [116]. A visszaható jelátvitelt követő IDO termelés szintén előfordulhat placentális makrofágokban. Az, hogy a Hofbauer sejtek expresszálják mind az IDO-t, mind a B7-2-t alátámasztja, hogy a CLTA-4 és B7-2 kapcsolódása placentáris makrofágokon szintén IDO-t indukálhat ezekből a sejtekből, mint ahogy az a decidua DS-ben történik [115].

4 CÉLKITŰZÉS

Vizsgálataink során célunk volt, hogy áramlási citometria segítségével meghatározzuk a B7-1, B7-2, B7-H1 és B7-H2 kostimulációs molekulákat expresszáló aktivált CD11b+ monociták szintjét, valamint a nekik megfelelő receptorokat, úgymint a CD28, CTLA-4, PD-1 és ICOS expresszáló T sejtek, különösen a CD4+ T sejtek mennyiségét köldökzsinórvérben, felnőtt perifériás vérben, egészséges terhesekben, valamint egészséges nem terhesekben (**3. ábra**). Szintén célunk volt, hogy az előbb említett mintákban meghatározzuk az IDO intracelluláris expresszióját áramlási citometriával, továbbá a plazma kinurenin, kinurénsav és triptofán szintjeit nagyteljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) segítségével.



3. ábra: B7 család vizsgált fehérjéi az antigén prezentáló sejteken (APS) és a nekik megfelelő receptorok a T sejteken.

Rövidítések: APS, antigén prezentáló sejt; MHC, major histocompatibility complex; TCR, T sejt receptor.

5 ALANYOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 A KÖDÖKZSINÓRVÉR - FELNŐTT PERIFÉRIÁS VÉR VIZSGÁLATOK ALANYAI

Vizsgálatainkhoz 20 egészséges felnőttől vettünk perifériás vérmintát, valamint 17 egészséges, érett újszülöttől gyűjtöttünk köldökzsinórvért közvetlenül a megszületést követően. A vizsgálatban résztvevők tájékozott beleegyezésüket adták. Az újszülöttek esetében a vizsgálatba a szülők beleegyezését kértük és kaptuk. Vizsgálatunkat a Helsinki Deklaráció aktuális irányelveivel összhangban végeztük. A vizsgálat résztvevőinek adatai az **1. táblázatban** szerepelnek.

5.2 AZ EGÉSZSÉGES TERHES – EGÉSZSÉGES NEM TERHES VIZSGÁLATOK ALANYAI

Vizsgálatainkhoz 20 egészséges terhestől a harmadik trimeszterben, valamint 14 azonos korú, egészséges nem terhestől vettünk perifériás vérmintát. Utóbbi csoport tagjai esetében a mintagyűjtés a menstruációs ciklus azonos idejében, a luteális szakaszban történt az eltérő hormonszintek esetleges befolyásoló hatásának kiküszöbölésére. A vizsgálatban résztvevők tájékozott beleegyezésüket adták. Vizsgálatunkat a Helsinki Deklaráció aktuális irányelveivel összhangban végeztük. A vizsgálat résztvevőinek adatai a **2. táblázatban** szerepelnek.

1. táblázat: A résztvevők adatai a köldökzsinórvért és felnőtt perifériás vért összehasonlító vizsgálatban.

Adatok: medián (kvartilis)

	Felnőtt n = 20	Újszülött n = 17
Férfi/nő	12/8	10/7
Életkor (év)	26,5 (24 – 28)	-
Gesztációs kor (hét)	-	39 (38-40)
Születési súly (g)	-	3300 (3150 – 3650)

2. táblázat: A résztvevők adatai az egészséges terhes és egészséges nem terhes vérmintákat összehasonlító vizsgálatban.

Adatok: medián (kvartilis)

	Nem terhes n = 14	Terhes n = 20
Életkor (év)	32 (27-34)	33,5 (30-36)
Primiparák száma	-	12 (60%)
Gesztációs kor vérvételkor (hét)	-	39 (38-40)
Magzati születési súly (g)	-	3180 (2915 – 3725)

5.3 MONONUKLEÁRIS SEJT IZOLÁCIÓ

A mononukleáris sejtek (PBMC és CBMC) elválasztása lítium heparinos csőbe (BD Vacutainer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) frissen gyűjtött perifériás vérmintából vagy köldökzsinórvérből standard sűrűség grádiens centrifugálással (Ficoll Paque, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Svédország, 25 perc, 400 g, 22 °C) történt. Az így nyert sejteket -80 °C fokon, 10% DMSO tartalmú Fetal Bovine Serumban tároltuk a mérések elvégzéséig. A felolvasztást követően a sejtszuszpenziót kétszer mostuk PBS-ben (Phosphate Buffered Saline). A sejtek életképességét tripánkék festés segítségével állapítottuk meg (minden esetben 90% felett).

5.4 ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

A mononukleáris sejteket 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk a következő konjugált anti-humán monoklonális antitestek kombinációjával, a gyártó javaslatainak megfelelően: anti-CD3 PerCP, anti-CD4 phycoerythrin-Cy7, anti-CD28 phycoerythrin, anti-CD152 allophycocyanin (CTLA-4), anti-CD278 FITC (ICOS) és anti-CD279 allophycocyanin-Cy7 (PD-1) vagy anti-CD3 PerCP, anti-CD11b phycoerythrin-Cy7, anti-CD80 allophycocyanin (B7-1) és anti-CD275 phycoerythrin (B7-H2), vagy anti-CD3 PerCP, anti-CD11b phycoerythrin-Cy7, anti-CD86 allophycocyanin (B7-2) és anti-CD274 phycoerythrin (B7-H1) külön csövekben (BioLegend, San Diego, CA, USA). Mosást követően a sejteket Fixation/Permeabilization oldatban fixáltuk és Permeabilization Bufferrel kezeltük a gyártó javaslatainak megfelelően (eBioscience, San Diego, CA, USA). A sejteket ezt követően egér anti-humán IDO monoklonális antitesttel (Milipore, város, állam, USA) inkubáltuk 30 percig, sötétben, 4°C-on. Újabb mosás után a sejteket 15 perig, sötétben, 4°C-on FITC-vel jelölt kecske anti-egér antitesttel inkubáltuk. Mosást követően a sejteket 488 nm és 633 nm excitációs lézerrel rendelkező BD FACSAria áramlási citométerrel (BD Biosciences, város, állam, USA) vizsgálatuk. Az adatokat FACSDiVa szoftverrel dolgoztuk fel. Csövenként 100000 sejtet vizsgálatuk. A limfociták és monociták sejtpopulációját a mononukleáris sejtek közül Forward Scatter és a Side Scatter karakterisztika alapján különítettük el az áramlási citométeres mérések során. A FITC-vel jelölt kecske anti-egér specifikus festés izotípus kontrollja céljából a

mononukleáris sejteket sejtfelszíni antitestekkel és FITC-vel jelölt kecske anti-egér antitestekkel inkubáltuk mintánként külön csőben, egér anti-humán IDO monoklonális antitestek hozzáadása nélkül.

5.5 NAGYTELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉK KROMATOGRÁF (HPLC)

A vizsgált referenciavegyületeket (L-TRP, L-KYN szulfát só, KYNA) és a cink acetát dihidrátot a Sigma-Aldrichtól (Saint Louis, MO, USA), az acetonitrilt és a perklórsavat (PCA) a Scharlautól (Barcelona, Spanyolország), az ecetsavat pedig a VWR Internationaltól (Radar, PA, USA) szereztük be.

A plazma mintákat a vizsgálatig -80°C fokon tároltuk. A vizsgálatot megelőzően a mintákat felolvasztottuk, majd rövid vortexelést követően 300µl-nyi plazmát 700µl precipitációs oldatba pipettáztunk. A precipitációs oldat belső standardként 3,75w/w% PCA-t és 2,857 µM 3-nitro-L-tirozint tartalmazott. Ezt követően a mintákat 13000 g fordulatszámon, 10 percen keresztül, 4°C fokon centrifugáltuk, majd a felülúszókat összegyűjtöttük. A minták KYN, KYNA és TRP tartalmát a Herve és mtsai. által leírt [117], némileg módosított módszerrel, Agilent 1100 HPLC rendszer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével határoztuk meg. A rendszer egy fluoreszcens és egy UV detektorral volt ellátva, melyek közül az előbbi a KYNA és a TRP meghatározására szolgált, míg az utóbbi a KYN kvantifikációra és a belső standard mérésére volt alkalmas. A kromatográfiás elválasztásra izokratikus elúcióval Onyx Monolithic C18, 100 mm X 4,6 mm belső átmérőjű (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) oszlopot alkalmaztunk, a minta Hypersil ODS, 20 x 2,1 mm belső átmérőjű, 5 µm részecskeméretű (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) előoszlopon való áthaladása után. A mobil fázis összetétele 0,2 M cink acetát / ACN = 95 / 5 (v/v%) volt, a pH-t jéghideg ecetsavval 6,2-re állítottuk be. Az áramlási sebesség 1,5 ml/min, az injektált volumen 20 µl volt. A fluoreszcens detektor excitátoros és emissziós hullámhossza 344 nm, illetve 398 nm volt. Mindegyik futtatásnál 3,5 perc után a hullámhosszakat 254 nm-re és 398 nm-re változtattuk. Az UV detektor hullámhosszát 365 nm-re állítottuk.

5.5.1 NAGYTELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉK KROMATOGRÁFIA (HPLC) MÓSZER VALIDÁCIÓ

5.5.1.1 Kalibrációs görbe és linearitás

A kalibránsokat 6 különböző koncentrációban készítettük el, a KYNA esetében 1 - 100 nM, a KYN esetében 0,1 - 5 μM, a TRP esetében 5 nM - 50 μM és a belső standard esetében 0,5 nM – 7,5 μM tartományban. Az egyes oldatokból 3 párhuzamos injekció történt a fent leírt kromatográfiás feltételeknek megfelelően. A csúcsi válaszjeleket a megfelelő koncentráció függvényében ábrázoltuk. A lineáris regresszió számításokat a legkisebb négyzet módszerrel végeztük a nyilvánosan hozzáférhető R szoftver segítségével. Nagyon jó linearitás volt megfigyelhető a vizsgált koncentrációs sorozatban a KYN, KYNA, TRP és a belső standard esetében fluoreszcens vagy UV detektor alkalmazásakor.

5.5.1.2 Szelektivitás

A módszer szelektivitását az „üres” plazmaminta és a KYN, KYNA, TPR és belső standard csúcsát tartalmazó plazmaminta kromatogramjainak összehasonlítása alapján ellenőriztük. Minden összetevőt a rá jellemző kromatogramon detektáltunk jelentős interferencia nélkül.

5.5.1.3 Kimutatási határ (LOD) és mennyiségi meghatározás alsó határa (LLOQ)

A kimutatási határ (LOD) és a mennyiségi meghatározás alsó határának (LLOQ) megállapítása az ICH irányelv előírása szerinti jel / zaj arány segítségével történt, melyek küszöbei 3, illetve 10 (18). A LOD a KYN, KYNA és TRP esetében 100 nM, 1 nM és 15 nM volt, míg a LLOQ érték a KYN, KYNA és TRP-nél 275 nM, 3,75 nM, és 35 nM volt. A LOD és LLOQ értékei a **3. táblázatban** szerepelnek.

3. táblázat: Kimutatási határ (LOD) és mennyiségi meghatározás alsó határa (LLOQ) a plazma vizsgált összetevőinek nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) vizsgálatakor.

Összetevő	Módszer	Koncentráció tartomány	LOD (nM)	LLOQ (nM)
Kinurenin	UV	0,1-5 µM	100	275
Kinurénsav	Fluoreszcencia	1-100 nM	1	3.75
Triptofán	Fluoreszcencia	5-50 µM	15	35

5.5.1.4 Pontosság

A HPLC vizsgálat megismétlése során a relatív standard deviáció a csúcs alatti területnél ≤ 2,2%, míg retenciós időnél ≤ 0,1% volt.

5.5.1.5 Visszanyerés

A relatív visszanyerés megbecslése két különböző koncentrációban adagolt KYN, KYNA és TRP csúcs mérésével történt, háromszor ismételve. Nem volt szignifikáns különbség az alacsonyabb és a magasabb koncentrációk között. A KYN, KYNA és TRP visszanyerési határa 108-110%, 86-91% és 85-89% között voltak.

5.5.1.6 Statisztika

Az adatokat medián (kvartilis) formátumban fejeztük ki. A vizsgált csoportokat Mann-Withney teszt segítségével hasonlítottuk össze, mivel az előzetesen elvégzett Kolmogorov-Smirnoff teszt az adatok nem normál eloszlását mutatta. A korreláció vizsgálatához Spearman tesztet alkalmaztunk. Amennyiben a p-érték kisebb volt, mint 0,05, a különbséget szignifikánsnak tartottuk. A statisztikai számításokat STATISTICA szoftverrel (8.0 verzió, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) végeztük el.

6 EREDMÉNYEK

6.1 A KÖLDÖKZSINÓRVÉR – FELNŐTT PERIFÉRIÁS VÉR VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Köldökzsinórvérben statisztikailag szignifikáns, de biológiailag szerény csökkenést tapasztaltunk a CD4+ CD28+ limfociták gyakoriságában felnőtt perifériás vérhez képest. Ugyanakkor jelentősen emelkedett a CD152 szabályozó receptor (CLTA-4) expressziója ezeken a sejteken. A CD11b+ CD86+ monociták előfordulása gyakoribb volt kzsv-ben, mint felnőtt perifériás vérben.

A CD3+ CD278+ limfociták előfordulási gyakorisága szintén magasabb volt kzsv-ben felnőtt perifériás vérhez képest, bár ez a különbség nem volt szignifikáns a CD4+ alcsoport esetében. A megfelelő kostimuláló molekula, a CD275 előfordulása a CD11b+ monocitákon hasonló volt a két csoportban. Ellenben a CD11b+ CD274+ monociták, melyek gátló jelzést közvetítenek a CD279-en keresztül, alacsonyabb gyakorisággal voltak detektálhatóak kzsv-ben szemben a felnőtt perifériás vérrel.

Köldökzsinórvérben emelkedő tendenciájú előfordulási gyakoriságot figyeltünk meg az IDO-t expresszáló CD3+ limfociták tekintetében, összehasonlítva a felnőtt perifériás vérrel ($p = 0,069$). A CD11b+ alcsoport esetében az IDO-t expresszáló sejtek azonos mennyiségben fordultak elő. Az átlagos fluoreszcens intenzitás (MFI) értéke IDO-ra nézve alacsonyabb volt kzsv-ben szemben a felnőtt perifériás vérrel, mind CD3+ limfociták, mind CD11b+ monociták esetében.

A plazma KYN és TRP szintje magasabb volt kzsv-ben, mint felnőtt perifériás vérben. KYN-re nézve kifejezett emelkedést láttunk, ami kzsv-ben több mint kétszeres KYN / TRP arányt eredményezett szemben a felnőtt perifériás vérrel. A KYNA szintje szintén jelentősen, majdnem tízszer magasabb volt kzsv-ben.

A CD80-on és CD86-on keresztüli visszaható jelátvitel jelenlétét korrelációs analízis segítségével vizsgáltuk. Ellentétes összefüggést találtunk a CD11b+ CD86+ monociták és az IDO-t expresszáló CD11b+ monociták között kzsv-ben ($r = -0,59$), míg nem volt korreláció felnőtt perifériás vérben. Továbbá pozitív összefüggést találtunk felnőtt perifériás vér CD3+ sejtjeinek IDO MFI értéke és a CD11b+ CD80+ monociták prevalenciája között ($r = 0,48$). Részletes eredményeinket a **4. táblázat** tartalmazza.

6.2 AZ EGÉSZSÉGES TERHES – EGÉSZSÉGES NEM TERHES VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Egészséges terhesek esetében szignifikánsan emelkedett CD28+ T sejt prevalenciát találtunk nem terhes nők vérmintáival való összehasonlítás során. Ugyanakkor egészséges terheseknél ezeken a T sejteken csökkent CTLA-4 expressziót figyeltünk meg.

A CD 278+ és CD 279+ T sejtek előfordulási gyakorisága magasabb volt egészséges terhesek esetében szemben a nem terhesekkel. Mind a CD80+ monociták, mind a CD275+ monociták szintje alacsonyabb volt terhes nőkben, a CD86+ és CD274+ monociták számában azonban különbséget nem találtunk.

Az IDO-t expresszáló T sejtek és monociták prevalenciája magasabb volt egészséges terhesekben, mint nem terhesekben. Az MFI érték IDO estében szintén szignifikánsan magasabb volt mindkét sejttípus estében egészséges terhes nőkben.

A plazma KYN, KYNA és TRP szintek alacsonyabbak voltak egészséges terhesekben, míg a KYN / TRP arány magasabb volt nem terhes nőkhöz képest.

A CD80-on és CD86-on keresztüli visszaható jelátvitel jelenlétét egészséges terhesek – nem terhes nők esetében is korrelációs analízis segítségével vizsgáltuk. Nem találtunk összefüggést a CD80+ és CD86+ monociták előfordulási gyakorisága és az IDO-t expresszáló T sejtek vagy monociták prevalenciája vagy az IDO MFI értéke között a vizsgálat csoportokban. Részletes eredményeinket az **5. táblázat** tartalmazza.

4. táblázat: Felnőtt perifériás vérben és köldökzsinórvérben vizsgált sejtek sejtfelszíni és intracelluláris markerei és a plazma kinurenin (KYN), kinurénsav (KYNA) és triptofán (TRP) szintjei.

* p < 0,05 versus Felnőtt. Az adatok mediánban (kvartilis) formátumban szerepelnek.
IDO – indolamin 2,3-dioxigenáz, MFI – átlagos fluoreszcens intenzitás.

	Felnőtt (n=20)	Újszülött (n=17)
CD3+ CD28+ sejtek / CD3+ limfociták	77,2 (65,8-82,5) %	80,7 (71,2-88,4) %
CD3+ CD28+ CD152+ sejtek / CD3+ CD28+ limfociták	8,74 (6,46-11,7) %	12,0 (6,09-15,8) %
CD3+ CD278+ sejtek / CD3+ limfociták	56,4 (50,4-74,9) %	73,6* (67,9-77,7) %
CD3+ CD279+ sejtek / CD3+ limfociták	51,2 (45,3-61,2) %	52,7 (28,0-61,6) %
CD4+ CD28+ sejtek / CD4+ limfociták	97,9 (96,8-99,1) %	95,4* (93,1-98,3) %
CD4+ CD28+ CD152+ sejtek / CD4+ CD28+ limfociták	6,15 (4,55-8,57) %	9,21* (6,53-13,1) %
CD4+ CD278+ sejtek / CD4+ limfociták	59,2 (54,8-74,0) %	69,4 (59,3-79,2) %
CD4+ CD279+ sejtek / CD4+ limfociták	54,2 (49,1-63,3) %	54,5 (42,5-57,3) %
CD11b+ CD80+ sejtek / CD11b+ monociták	54,2 (19,6-68,8) %	34,0 (19,7-56,7) %
CD11b+ CD86+ sejtek / CD11b+ monociták	27,6 (19,6-29,8) %	43,1* (30,0-51,9) %
CD11b+ CD274+ sejtek / CD11b+ monociták	74,1 (68,2-84,9) %	57,2* (51,5-72,7) %
CD11b+ CD275+ sejtek / CD11b+ monociták	61,2 (34,5-70,0) %	46,6 (39,1-57,9) %
CD3+ IDO+ sejtek / CD3+ limfociták	3,33 (2,12-5,95) %	4,57 (3,00-10,8) %
IDO MFI érték CD3+ IDO+ sejtek (tetszőleges egység)	9888 (7461-11175)	7627* (6551-9768)
CD11b+ IDO+ sejtek / CD11b+ monociták	2,45 (1,92-2,99) %	2,90 (1,65-4,52) %
IDO MFI érték CD11b+ IDO+ sejtek (tetszőleges egység)	21400(19075-24175)	15200* (13300-18700)
KYN (uM)	1,80 (1,63-2,26)	4,77* (3,73-5,45)
KYNA (nM)	29,8 (22,9-42,8)	294,7* (253,8-360,6)
TRP (uM)	53,4 (46,3-59,6)	62,4* (56,6-70,4)
K/T arány	0,036 (0,032-0,041)	0,075* (0,063-0,086)

5. táblázat: Egészséges nem terhesekben és egészséges terhesekben vizsgált sejtek sejtfelszíni és intracelluláris markerei és a plazma kinurenin (KYN), kinurénsav (KYNA) és triptofán (TRP) szintjei.

* p < 0,05 versus Nem terhes. Az adatok mediánban (kvartilis) formátumban szerepelnek.
IDO – indolamin 2,3-dioxigenáz, MFI – átlagos fluoreszcens intenzitás.

	Nem terhes (n=14)	Terhes (n=20)
CD3+ CD28+ sejtek / CD3+ limfociták	76,0 (64,7-82,9) %	88,4* (81,8-90,6) %
CD3+ CD28+ CD152+ sejtek / CD3+ CD28+ limfociták	8,90 (7,57-11,4) %	6,64* (5,07-9,89) %
CD3+ CD278+ sejtek / CD3+ limfociták	55,7 (49,5-56,7) %	89,9* (75,7-91,6) %
CD3+ CD279+ sejtek / CD3+ limfociták	46,3 (39,3-51,2) %	51,9* (47,9-67,7) %
CD4+ CD28+ sejtek / CD4+ limfociták	97,8 (96,7-98,8) %	97,3 (93,0-99,2) %
CD4+ CD28+ CD152+ sejtek / CD4+ CD28+ limfociták	6,92 (4,93-8,63) %	5,61 (3,65-9,09) %
CD4+ CD278+ sejtek / CD4+ limfociták	56,7 (52,8-59,5) %	87,7* (76,3-92,2) %
CD4+ CD279+ sejtek / CD4+ limfociták	49,4 (42,1-54,5) %	44,2 (37,5-65,2) %
CD11b+ CD80+ sejtek / CD11b+ monociták	55,5 (17,3-69,8) %	17,6* (13,6-25,4) %
CD11b+ CD86+ sejtek / CD11b+ monociták	23,8 (17,3-29,5) %	20,7 (14,9-31,9) %
CD11b+ CD274+ sejtek / CD11b+ monociták	78,4 (70,3-85,9) %	80,7 (77,2-87,8) %
CD11b+ CD275+ sejtek / CD11b+ monociták	63,8 (59,0-72,1) %	17,3* (14,1-27,0) %
CD3+ IDO+ sejtek / CD3+ limfociták	5,90 (2,65-16,9) %	24,1* (13,3-56,4) %
IDO MFI érték CD3+ IDO+ sejtek (tetszőleges egység)	9888 (7482-11475)	62500* (19800-84475)
CD11b+ IDO+ sejtek / CD11b+ monociták	2,59 (1,99-11,7) %	22,5* (13,6-50,5) %
IDO MFI érték CD11b+ IDO+ sejtek (tetszőleges egység)	21400 (19075-23875)	70450* (38775-114000)
KYN (uM)	1,80 (1,70-2,08)	1,55* (1,31-1,83)
KYNA (nM)	29,8 (25,6-47,7)	18,8* (15,0-23,0)
TRP (uM)	54,1 (49,0-59,3)	38,6* (33,9-42,5)
K/T ratio	0,037 (0,032-0,040)	0,041* (0,038-0,045)

7 MEGBESZÉLÉS

Az éretlen immunrendszer szerepet játszik az újszülöttek magas infekciós morbiditásában és mortalitásban [118]. A WHO szerint körülbelül 7,1 millió 1 és 12 hónapos kor közötti csecsemő hal meg évente világszerte [119]. A halál okai leggyakrabban akut légúti fertőzés, vagy bakteriális, illetve virális patogén által okozott hasmenés [119,120,121]. Ezek a fertőzések ritkán fatálisak idősebb gyermekekben vagy felnőttekben. Ennek hátterében feltehetően az éretlen neonatális immunrendszer áll, melynek egyik jelentős komponense a funkciójában eltérő neonatális T sejt. Az elmúlt időszakban végzett vizsgálatok szerint a neonatális APS-ek működése sem megfelelő, mely másodlagosan szintén hozzájárulhat az adaptív T sejt válasz defektusához. A korai életszakban a csökkent működésű immunrendszer befolyásolja az újszülöttkori immunizációra adott válaszreakciót is, mivel gyakori a vakcináció utáni gyenge antitest-válasz. A BCG oltás kivételével az első hat élethónapban adott oltás esetén több dózist kell adni ahhoz, hogy megfelelő védettség jöjjön létre. Tehát a vakcinációval kiváltott védelem és a fokozatosan érő újszülött immunrendszer között szoros összefüggés van [122].

Az APS-ek központi szerepet játszanak a veleszületett immunválaszban és felelősek az adaptív immunválasz kialakításáért. Az antigén hatására kiváltott immunreakció számos tényezőtől, elsősorban az APS-ek típusától függ. Naiv T sejt aktivációhoz minimum két, APS által közvetített szignál szükséges. Az első szignál antigén függő, T sejt receptor mediált, míg a másik, antigén független, kostimulációs jelen keresztül váltja ki a T sejt aktivációját. Az antigén független aktivációhoz szükséges jel további két részre osztható. Egyik része a kostimulációs molekulákkal való interakcióért felel, míg a másik részét a szolúbilis mediátorok, mint például a citokinek által kiváltott hatás alkotja. Jól ismert, hogy az interakció az APS-ek és az aktivált T sejtek között kétirányú, mely egyrészt az APS-ek éréséhez, másrészt a teljes T sejt aktivációhoz vezet [123,124]. Az interakció során létrejövő minőségi és mennyiségi változások hatására alakul ki az effektor T sejtek toleranciája [124,125,126,127]. A felnőttekhez képest a neonatális APS-ek éretlen markereket expresszálnak és citokintermelésük alacsonyabb. A nem megfelelő neonatális APS működésben számos további tényező, mint az APS-ek és T sejtek közötti hibás kapcsolódás és a regulátoros T sejt mediált gátlás játszik szerepet [118].

A újszülöttkori mononukleáris fagocitarendszer hibás funkciója jól ismert. Ezek a defektusok, melyek bizonyítékul szolgálnak az éretlenségre, csökkent citokintermelésből és hibás fogocitózisból állnak. Az újszülött monociták ugyanis a kostimulációs molekulák, mint a CD86 és a CD40, alacsony szintű expressziójával jellemezhetőek. Ezeknek a molekuláknak az expressziója nem up-regulálódik olyan potens aktivátorok, mint a IFN-γ és a CD40 ligand (CD40L) kapcsolódás hatására [3]. Továbbá, a neonatális monociták és makrofágok kevesebb proinflammatorikus citokint, mint például TNF-α-t, IL-1β-t és IL-12-t termelnek bakteriális lipopoliszacharid (LPS, TLR4 ligand) vagy egyéb toll-like receptor ligand (TLR) hatására [15]. Ez valószínűleg a TLR kapcsolódás által kiváltott jelátviteli út hibájából adódik, de ezeknek az eltéréseknek a pontos természete még nem ismert. Érdekes, hogy az újszülött monociták a felnőtt monocitákhoz képest azonos mennyiségű mRNS-t expresszálnak különböző TLR-ekhez [15,16], viszont ez nem zárja ki e receptorfehérjék expressziójának lehetséges különbségeit. Azok a vizsgálatok, melyek szerint a TLR jelátvitel hibás, azt mutatták, hogy újszülött monocitákon a LPS stimuláció hatására a TLR4 upreguláció és CD14 expresszió nem figyelhető meg [15,17]. Továbbá a MyD88 expressziója, ami egy fontos adaptor molekula a TLR mediált jelátvitelben, csökkent [17]. Bár a MyD88 mRNS szintje az újszülött és felnőtt monocitákban megegyező volt [15]. Érdekesség, hogy a TLR4 fehérje expressziója alacsonyabb koraszülöttek monocitáin, mint érett újszülöttek monocitáin [16]. Ez az eltérés egyrészt alapja lehet annak a folyamatnak, mely felelős a fokozott infekciós fogékonyságért koraszülöttekben, másrészt feltételezi, hogy szoros összefüggés van a TLR expresszió szabályozása és a magzati fejlődés között.

A neonatális makrofágok alacsony válaszkészséget mutatnak IFN-γ-ra, mely szorosan kapcsolódik a hibás STAT-1 foszforilációhoz. Lényeges, hogy ez az eltérés az IFN-γ által stimulált neonatális makrofágok elégtelen intracelluláris patogénölő kapacitásával függ össze [128,129].

Az újszülött monociták alacsony IL-12 termeléssel jellemezhetőek [11,130]. A monociták legfőbb funkciója a fagocitózis. Felnőtt monocitákkal összehasonlítva a neonatális monociták E. coli fagocita képessége jelentősen alacsonyabb. A fagocitózis hibája még inkább kifejezett a 30. gesztációs hétnél fiatalabb koraszülöttekben [19]. A pinocitózis azonban megtartottnak látszik újszülött monocitákban, mivel a fehérjék, mint például a bovine szérum albumin, felvételének képessége megtartott ezekben a

sejtekben [4]. Végül a monociták dendritikus sejtekké való átalakulása is hibás, amit alátámaszt, hogy a neonatális monocita derivált dendritikus sejtek (MDDS) morfológiája különbözik a felnőtt MDDS-ektől [131]. Összegezve, tehát a TLR aktivációs kaszkád defektusa nyilvánvaló az újszülött monocita / makrofág rendszerben, de a jelátviteli útvonalak működési hibáinak pontos természete még nem ismert.

Mivel a perifériás vér alacsony DS előfordulással jellemezhető, ezért a legtöbb, neonatális DS-re vonatkozó vizsgálat monocitából származó DS-tel történt. Általánosságban elmondható, hogy az újszülött DS-ek éretlenek, mivel az MHC II és a kostimulációs molekulák (CD80, CD40) alacsony expressziójával jellemezhetők. A CD1 molekula expressziója, mely a lipopeptid antigén bemutatásában játszik fontos szerepet, szintén alacsonyabb ezeken a sejteken [131,132]. Az LPS vagy nekrotikus sejt általi stimulációt követően a köldökzsinórvér DS-ek megőrzik éretlen fenotípusukat, mivel nem képesek upregulálni a HLA-DR-t, CD86-ot és a CD83-at [23,133]. A korábbiakban a neonatális monocitáknál leírtak szerint, a DS-ek inkomplett érése feltehetően a hibás TLR jelátvitelnek köszönhető [134]. Fontos hangsúlyozni, hogy egyéb, a TLR családba tartozó molekulák (TLR1, TLR2, TLR3, TLR6, TLR8) expressziójára adott válasz még nem került leírásra újszülöttekben [135]. A DS-ek éretlenségének további bizonyítéka, hogy endocitózisuk sem megfelelő, mely az alacsony mannóz receptor expressziónak és LPS, valamint CD40L hatására kiváltott alacsony IL-12 termelésnek tulajdonítható [132].

Feltehetően az újszülött APS-ek gyenge kostimulációs képességének szerepe van a nem megfelelő neonatális T sejt funkcióban. Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a neonatális DS-ek nagyobb mértékű aktivációt igényelnek, mint a felnőtt DS-ek, de aktiválódásukat követően képesek megfelelő mértékű adaptív effektor választ indukálni. A neonatális pDS-ek nem képesek IFN-α mRNS-t expresszálni CpG hatására [6]. Érdekesség, hogy a nem frakcionált kzs mononukleáris sejtek vírus indukált INF-α termelésének defektusa már korábbról ismert [136,137]. A vírus stimulált mononukleáris sejtek közül a pDS-ek tekinthetőek a INF-α fő celluláris forrásának, ezért a nem frakcionált kzs mononukleáris sejtek csökkent INF-α produkciója leginkább a kzs pDS-ek hibás működését tükrözi. LPS hatására jelentkező alacsony kzs mDS citokin termelése, INF-γ-val kombinálva vagy anélkül, szintén megfigyelhető, mely befolyásolja a TNF-α, IL-1, IL-6 és IL-12 produkciót [13,138]. Érdekesség, hogy későbbi kutatások kimutatták, hogy az expresszáló sejtek száma azonos volt, míg az egy

sejtre jutó expresszió mértéke alacsonyabb volt. Továbbá, hogy a nem szeparált kzsv sejtek TLR3 agonista poly (I:C)-re történő INF-α szekréciója csökkent [7]. Mivel a TLR3 kifejeződés mértéke limitált mDS-en, ez az eredmény szintén alátámasztja, hogy a ezek a sejtek vírus termékek által kiváltott reakciója hibás.

Borras és mtsai. kzsv DS-ek allogén kzsv T sejt stimuláló hatásának vizsgálata során gyenge proliferációt figyeltek meg pDs-ek stimulált sejtkultúráiban a teljes stimulált kzsv DS-ekhez képest, mely feltehetően szorosan összefügg az eredeti sejtkultúra emelkedett apoptotikus T sejt tartalmával [5]. A mechanizmus egyelőre még nem tisztázott, feltehetően vagy a kzsv pDs-ek által közvetített magas direkt apoptotikus szignálnak, vagy a rescuing jelátvitel hibás működésének köszönhető. A kzsv DS-ek antigén protein kötése szintén hibás, amely valószínűsíti, hogy ezek a sejtek nem képesek megfelelő APS-ként funkcionálni [4]. Habár ennek ellentmond, hogy a nem frakcionált kzsv DS-ek erős allogenikus választ képesek indukálni [5].

Az APS-ek hibás működésének hátterében három lényeges mechanizmus állhat. Egyrészt az antigén prezentációban részt vevő sejtek eredendően éretlenek. Az előbbiekben leírtak szerint a neonatális APS-ek nagyobb mértékű aktivációt igényelnek ahhoz, hogy működésbe lépjenek, szemben a felnőtt APS-kel. Egyes kutatások kimutatták, hogy számos neonatális APS populációban a TLR kapcsolódás hatására létrejövő jelátviteli kaszkád alulműködik. Második jelentős tényező, mely az APS-ek diszfunkcióját okozza az APS és a T sejtek közötti hibás kapcsolódás. Mivel az optimális APS aktivációhoz megfelelően aktivált CD4+ T sejt szükséges, a hibás újszülött T sejt aktiváció ezért hibás APS funkciót fog eredményezni [139,140]. Végül a regulátoros T sejten keresztüli gátlás is nem megfelelő APS működést okoz. A természetes regulátoros T sejtek (nTreg) által közvetített DS-re kifejtett direkt inhibitoros hatás számos vizsgálatban került leírásra [20,21]. Továbbá a T reg képes indirekten gátolni az APS működést a effektor T sejtre kifejtett gátláson kersztül és/vagy antiinflammatorikus citokinek, mint például a IL-10 és TNF-β szekrécióján keresztül [22,141,142]. Mivel az nT reg jelentős mennyiségben fordul elő és funkciójában aktiv a humán kzsv-ben, az általa közvtített gátlás egy további mechanizmus lehet az APS-ek diszfunkciójában.

A tímuszból származó nT reg sejtek lényegesek az immuntolerancia kialakításában és fenntartásában. Ezek a sejtek állandó CTLA-4 és magas affinitású IL-2 receptor CD25 expressziójával jellemezhetőek. Továbba magasan expresszálnak traszkripciós

faktorokat is, mint a FOXP3 [22]. A nTreg immunszuppressziót okozó működése még nem pontosan ismert, de legfőbb célsejtjük az APS-ek. Az egyik érdekesség, hogy a nTreg indukálja a tiptofán katabolizáló enzim az IDO upreguláció az APS-ben, azon belül is elsősorban a DS-ben [143,144]. Mivel a triptofán az szükséges a megfelelő T sejt működéshez, fokozott katabolizmusa T sejt szupressziót indukál. Az APS-ek emelkedett IDO expressziója a nT reg-en folyamatosan expresszált CTLA-4-en és a DS-ek B7 molekulájának interakcióján keresztül jön létre. Ezek az eredmények ahhoz a feltételezéshez vezetnek, hogy az IDO-t kifejező APS-ek toleránsak. Szintén megfigyelhető, hogy a nTreg és a DS-ek közötti kapcsolat down-regulálja a CD80, CD86 és a MHC II molekulák kifejeződését a DS-en, mely ezeket a DS-ket szintén tolerán APS-ké teszi [21,145]. Végül a nTreg in vivo szupresszív körülmények között direkt kapcsolatba lép a DS-kel és down-regulálja működésüket. Bár egyes in vitro és in vivo kutatások szerint az nTreg direkten gátolja az effektor T sejt működését is, amely indirekt módon befolyásolhatja a DS-ek funkcióját [146]. Mindezek mellett a nTreg fontos szerepet játszik a terhesség során fenntartva az immuntoleranciát a főtusszal szemben [147]. A CTLA-4 expresszáló nTreg sejtek nagy számban fordulnak elő a deciduában és jelenlétük elengedhetetlen a magas IDO szint fenntartásában és az alacsony immunreaktivitás kialakításában a fötomaternális határfelületen [113,148,149,150,151]. Szüléskor kzsv-ben nagy számban találhatóak CD4+CD25+nTreg sejtek, különösképpen koraszülöttekben érett újszülöttekhez képest. Ezeka sejtek a felnőtt nTreg-hez képest szintén expresszálják az olyan nTreg markreket, mint a CTLA-4 és FOXP3, de naív fenotípúsuak maradnak, tekintve, hogy CD45RA és TREC fejeznek ki [152].

A neonatális nTreg potens immunszuppreszív aktivitással rendelkezik, illetve effektor T sejt proliferációt és mitogén, alloantigén, illetve specifikus antigén által kiváltott citokin termelést szupresszál [152,153,154,155]. Az a mechanizmus, mellyel az újszülött nTreg sejtek immunszuppresszív hatást váltanak ki még nem teljesen ismert, de hasonlónak tűnik a felnőtt nTreg működéséhez, mivel a neonatális nTreg in vitro körülmények között kontaktus dependes,illetve IL-10 és TGF-β independens módon működik [152,153]. Együttesen ezek az eredmények arra utalnak, hogy az emelkedett számú nTreg újszülöttekben elengedhetetlen a homeosztázis fenntartásában, az autoimmunitás megelőzésében és a GVHD csökkent előfordulásában kzsv transzplantációt követően [154,155]. Ezzel szemben viszont a neonatális T reg sejtek szintén felelőssé tehetőek az

újszülött immunrendszer csökkent védekező kapacitásában fertőzésekkel szemben, mely elsősorban a hibás APS funkciójának köszönhető.

Mindezek tekintetében elmondható, hogy a APS-ek T sejteknek hibásan közvetített kostimuláló jelátvitele az APS-ek inkomplett aktivációjának és/vagy nem megfelelő érésének köszönhető. Mivel a TLR kapcsolódás az egyik legfőbb része a DS aktivációnak, ebben a jeltáviteli kaszkád részvevő molekulák és működésük vizsgálata elősegítené a neonatális APS funkciójának pontos megismerését.

Az APS-ek érésének kinetikája részletes ismerete a korai életszakban nagyban hozájárulna a vakcinációs stratégiák finom pontosításához, illetve az autoimmun és atópiás betegségek kialakulásának megelőzéséhez.

Az újszülöttek celluláris immunrendszere éretlen és hiporeszponzív szemben a felnőttekével, mely az újszülötteket kifejezetten fogékonnyá teszik infekcióval szemben. Az, hogy az elmaradt válaszképesség hátterében melyik limfocita funkció éretlen, egyelőre még nem ismert. Hodge és mtsai. áramlási citometria segítségével sejtfelszíni limfocita márkereket és citokineket vizsgált nyugvó, illetve stimulált kzsv-, illetve felnőtt perifériás vérben. Az IL-2 mennyiségét, valamint az ennek megfelelő recpetor (IL-2Rα/β/γ) expresszióját is vizsgálta. Nem talált különbséget az IL-2Rα és az IL-2Rγ produkáló limfociták mennyiége között felnőtt és újszülött mintákban. Újszülöttekben kevesebb T limfocita és NK sejt expresszált IL-R2β-t és az expresszió upregulációja is lassabb volt. Ebből arra a következtetésre jutott, hogy a csökkent IL-R2β feltehetően csökkenti a korai autokrín IL-2 aktivációs immunválaszt újszülöttekben. Ezt az elképzelést támogatja az a megfigyelés is , hogy az újszülöttekben az emelkedett mennyiségű stimulált T sejt IL-2 termelése 4 órával a stimuláció után jelentkezik, míg 24 órával később a IL-2 termelése csökkent a felnőtt T sejtekhez képest. A rendkívül alacsony neonatális T sejt és NK sejt általi IFN-γ produkció szintén részben magyarázhatja a csökkett korai autokrín T sejt aktivációt. Hodge és mtsai. az feltételezték, hogy az alacsony számú IL-2Rβ-t expresszáló kzsv T sejtek szerepet játszhatnak a újszülött leukociták csökkent IFN-γ termelő képességében, azáltal hogy csökken a magas affinitású IL-2R-hez való kapcsolódásuk, mely korlátozza a korai IL-2R - ligand indukálta szignáltranszdukciót. Ez megakadályozza a korai autokrín IL-2 aktivációt kzsv T sejteken [10].

Az NK sejtek IFN-γ termelése esszenciális a intracelluláris mikrobális patogének által kiváltott fertőzések megelőzésében azáltal, hogy az IFN-γ keresztül hozzájárul a Th1

típusú válaszreakció kialakulásához [156,157]. Ezért a T sejt és NK sejt alacsonyabb IFN-γ termelése részben magyarázhatja az újszülöttek gomba-, vírus, protozon és egyéb bakteriális fertőzésre való fokozott hajlamát. Az IL-2 szükséges a CD8+ sejtek magas IFN-γ produkció fenntartásához vírusfertőzésben [10]. Ez a vizsgálat, az előbbiekben leírtak szerint, a neonatális CD4+ sejtek alacsony IL-2 termelését mutatta, összehasonlítva a felnőttekével, mely alacsony termelés tovább csökkentheti a folyamatos citokin elválasztás az újszülött antivirális CD8+ sejteken nővelve ezáltal a fertőzés iránti fogékonyságot.

Viszgálták az egyéb funkciónális molekulák, mint a CD71, HLD-DR, szöveti faktorok és CD152 expresszióját és upregulációs kinetikáját is. Ezek a leukocita érési márkerek jelenősek az antigénprezentációban (HLA-DR), a sejtproliferáció szabályozásában (CD71), a T sejt kostimulációban (CD152) és a koagulációs aktivációban (szöveti faktorok). Ezeknek a molekuláknak a szintje lényegesen nem különbözött a felnőttekben mértektől, mely arra utalhat, hogy a kzsv leukociták részben funkciónálisan érettek lehetnek. Mind a felnőtt, mind a kzsv-ben a CD71 expresszió korábban upreguláldódott stimulált monocitákon, mint T sejteken. Az IL-2 és az ennek megfelelő magas affinitású receptor közötti interakció szükséges a T sejt transzferrin receptor expressziójához és a T sejt proliferáció indukálásához [158]. Mivel a magas affinitású IL-2R expressziója később jelentkezik stimulált T sejteken, mint monocitákon, ennek az receptornak a T sejten való kifejeződésének késése magyarázhatja a késői T sejtes CD71 upregulációt is, mely következetesen késői T sejt proliferációt okoz az immunválasz során [159,160].

A neonatális immunrendszer éretlensége magyarázza az alacsony GVHD előfordulási gyakoriságát kzsv transzplantációt követően. Melyben a CD40 és CD40 ligand (CD40L) interakció központi szerepet játszik a celluláris immunválasz regulációján keresztül. Feltételezhető, hogy a neonatális immunrendszer éretlen ebben a kapcsolódásban. A hematológiai betegségek terápiájában alkalmazott őssejt transzplantáció sikerességét gyakran a súlyos GVHD akadályozza meg. Ennek az előfordulását csökkentheti az őssejt helyetti kzsv transzplantációja. A csökkent GVHD incidenciájáért ez esetben a felnőtt T sejthez képest minőségileg különböző neonatális T sejt felelős.

A magzat és az újszülött, valamint a felnőtt immunrendszer fejlődése között minőségi és mennyiségi eltéréseket lehet megfigyelni. Ezek az eltérések mind a veleszületett és

mind az adaptív immunválaszban megnyilvánulnak. Az újszülött veleszületett immunrendszerének hibás működése az alacsonyabb számú és csökkent funkciójú neutrofilt és NK sejteknek, a monociták által csökkent mértékben produkált citokineknek és az alacsony növekedési faktor, komplement és akut fázis fehérje koncentrációnak tulajdonítható. A magzat és újszülöttek csökkent mértékű adaptív immunválaszának hátterében az éretlen B sejt és plazmasejt populáció, a csökkent T sejt aktivitás, valamint az emiatti elégtelen B sejt általi antitest produkció, illetve a nem megfelelő citokin termelés és válasz áll. A kzsv T limfociták éretlen fenotípusúak és IL-2 és egyéb stimulus hatására hibásan reagálnak. Továbbá a neonatális T limfociták a felnőtt sejtekhez képest kevésbé expresszálnak CD3-t és inger hatására kiváltott interferon termelésük is csökkent. Elmondható, hogy a neonatális immunrendszer funkciójában azért különbözik a felnőtt immunrendszertől, mert még éretlen. Korábbi vizsgálatok leírták, hogy az újszülött védekező rendszere még az anyai hormonok befolyása alatt áll. Szintén megfigyelték, hogy az újszülöttek Th1 válasza hibás, illetve, hogy a kzsv transzplantációja alacsonyabb GVHD incidenciával jár [161,162].

A DS-ek kritikus szerepet játszanak az elsődleges immunválasz és az immuntolerancia kialakulásában, mint ahogy a T sejt mediált immunválasz reguláláséban. A DS-ek, mint speciális APS-ek tehát a védekezés első vonalát képezi. Intracelluláris információkat rögzítenek és továbbítják az adaptív immunrendszer sejtjei felé. Ezek az egyetlen olyan APS-ek , melyek képesek naiv T sejt aktiváció indukálni egy új antigénre. A mieloid DS-ek (mDS) jelentős subpopulációja a humán DS-eknek és CD4+, Lin-, CD11c bright, CD123 dim, CD45RO+ és CD2+ fenotípusúak. Képesek mieloid markerek (CD32, CD64, FcεRI) expressziójára, mint ahogy az Fc receptor kifejeződésére is. Mindezek mellett az mDS-ek CD1c antigén, vagy más néven BDCA-1 antigént is expresszálnak, melyek karakterisztikusak a perifériás DS-1 sejtekre nézve. Ehhez a BDCA-1+ DS-ek TNF-α vagy CD40L hatására nagyobb mértékben termelnek IL-2-t és így a T sejt differenciálódás Th1 irányában tolja el. A perifériás vér BDCA-2+ DS-ek CD4+, Lin-, CD11c-, CD123 bright, CD45RA+ és CD2- fenotípusúak és nem expresszálnak mieloid markereket (CD13 és CD33), illetve Fc receptor markereket (CD32, CD64 és FcεRI) sem. A DS-2 sejtek megfelelő aktivációt követően képesek a T sejt differenciálódás Th2 irányában indukálni [163,164]. Nemrég került felismerésre a humán DS-ek egy harmadik alcsoportja, ez a CD16+/HLA-DR+ sejt morfológiájában, citokémiájában,

immunfentípusában és funkcionális karakterisztikájában is eltér az érett CD14+ monocita sejtektől [165].

Sica és mtsai. szerint a kzsv-ben az eltérő dendritikus sejt alacsoportok miatti kiegyensúlyozatlanság lehet felelős az immunrendszer éretlenségéért újszülöttkorban. A kzsv monocita érett dendritikus sejtté való átalakulásának diszfunkciója befolyásolja a naiv T sejt aktivációt, különösen a Th1 kialakulását és felelős lehet az újszülöttek különböző fertőzések iránti fokozott fogékonyságának, mint ahogy a kzsv transzplantáció során a csökkent GVHD incidenciájának csökkenéséért egyaránt [166].

Langrish es mtsai. megfigyelték, hogy a köldökzsinór DS-ek csökkent képességet mutatnak érett felnőtt fenotípus kialakulásának irányában és képtelenek a CD4+ T sejt IFN-γ termelését aktiválni. Ezek alapján Langrish és mtsai. arra a következtetésre jutottak, hogy a kzsv DS-ek eredendően előprogramozottak a Th1 immunválasz generálása ellen [23,167]. Leírták, hogy az újszülöttekben a T sejt függő immunválasz a Th2 fenotípus irányába tolódik [23,168], mely nem magyarárható kizárólag a veleszületett T sejt defektussal, hanem elsősorban az immunválasz indukciójában szerepet játszó antigénprezentáció bizonyos folyamatai lehetnek felelősek. Az jól ismert, hogy a neonatális immunrendszer éretlen, mely steril intrauterin környezetért biztosít. Az immunválasz éréséért elsősorban a szervezet számára ismeretlen virális és bakteriális expozíció által kialakított környezet felelős. A DS-eknek kiemelkedő szerepe van az immunrendszer első védelmi vonalának kialakításában. A korai intrauterin patogén expozíció specifikus antigén indukálta T sejt válasz válthat ki. Az ilyen korai mikrobiális hatás tehát esszenciális a allergiás betegségek elleni védekezésben.

Az antigén CD200 egy 1-es típusú membrán protein, mely két immunglobulin domaint tartalmazó szerkezete miatt az immunglobulin szupercsaládjába tartozik. Azt találták, hogy a CD200 a mieloid sejt aktivációját szabályozza, valamint különböző szövetekben gátolja a makrofágok funkcióját. A CD200 molekula a CD200R receptorhoz való kötődésén keresztül befolyásolja számos sejt működését. Kiemelkedően fontos, hogy a CD200 és CD200R közötti interakció jelentős szerepet játszik az immunregulációban. Ez a kapcsolódás az autóimmunitás kialakulásában és a szöveti rejekció elleni védekezésben is lényeges [164,169]. Továbbá a CD200 molekula fontos szerepet játszik a gyulladás és az adaptív immunválasz létrejöttében is. A CD200 és CD200R közötti interakció szupresszálja a masztociták degranulációját és csökkenti elsősorban az IL-13, TNF-α, IFN-γ és az IL-17 citokin produkcióját [9,170].

A DS-ek, mint APS-k felelősek az újszülött szervezet patogének elleni védekezésében. Ezek a sejtek a CD200R-en keresztül interferálhatnak a CD200-at expresszáló sejtekkel, így szabályozhatják a veleszületett immunválaszt. A kostimulációs molekulák elsősorban az aktivált B sejteken, endotél sejteken, agysejteken és DS-eken expresszálódnak. Korábban leírták, hogy a CD200 antigén CD200R-hez kapcsolódva promotálja a szupresszor T sejt IL-10 és TGF-β termelését [164]. Langrish és mtsai. kiemelték, hogy az umbilikális DS-ek kevésbé képesek CD3+ T sejt indukálására a perifériás DS-ekhez képest.

A B7-H1 antigén egy újonnan felismerésre került, B7 immunmoduláns fehérjék családjába tartozó kostimuláló protein, mely képes a T sejt válasz gátlására. A CD28 antigén családhoz kötődő B7-H1 molekula a PD-1 antigénnel is képes kapcsolatba lépni. Ezáltal az utóbbi molekula magas expressziója az inhibíciós szignál közvetítésén keresztül csökkentheti a T sejt választ [165,171]. Hasonlóképpen a B7-H4 molekula szintén a B7 membránfehérjékhez tartozok, mely downregulálja a T sejt választ, mindemellett képes a T sejt proliferáció gátlására, a Th1 és Th2 citokinek termelésének csökkentésére és a T limfocitán lévő B7-H4 molekulának megfelelő, BTLA receptorhoz való kötődést követően a sejtciklus progressziójára is [167,172].

Manhke és mtsai. szerint a B7-H1, B7-H2, MHC komplex és kemokin receptor expressziója a DS-ek érését indukálja. Darmochwal-Kolarz és mtsai. által végzett vizsgálatban a B7 család expresszióját vizsgálata DS-eken. Magasabb expressziót találtak perifériás vér DS-en, mint kzsv sejteken, mely szintén bizonyítékul szolgálhat arra, hogy a neonatális immunrendszer éretlen és toleráns.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a DS-ek az újszülött szervezet hatásos specifikus T és B sejt válaszát irányítják. Ezt azt feltételezi, hogy az újszülött szervezett toleráns, mint ahogy a felnőtt szervezett immunis. Továbbá, hogy az inhibitoros szignált közvetítő B7 család és a CD200 együttes kifejezett expressziója csökkenti, sőt gátolhatja a hiperaktivitást. Másrészt az alacsonyabb CD200 expressziója a mieloid sejt deregulációján keresztül egyik oka lehet az autoimmun betegségek kialakulásának [173,174,175].

Az antigén által kiváltott maximális T sejt válaszhoz elengedhetetlen az antigénprezentáció, melyhez a MHC II molekula általi antigén bemutatás és az APC által közvetített, egy vagy több kostimulációs szignál szükséges. Bár számos molekulát sikerült identifikálni, melyek felelősek lehetnek ezeknek a kostimulációs szignálok

továbbításáért, a legutóbbi vizsgálatok szerint a legjelentősebb, az APC által expresszált B7 molekula, illetve az általa kiváltott kostimulációs szignáltranszdukció, mely a neki megfelelő T sejt sejtfelszíni antigén, a CD28 kapcsolódása által jön létre. Claude és mtsai. által végzett kutatás során humán antigénspecifikus modell segítségével vizsgálata az antigénprezentációt. Ez a mesterséges antigén prezentációs rendszer lehetőséget biztosított a tolerancia kialakulásának biokémiai eseményeinek megfigyeléséhez és a toleranciát kiváltó szignálok vizsgálatához. Az találták, hogy B7 kostimuláció hiányában T sejt klonális anergia jött létre. Ez az eredmény jól demonstrálja, hogy lehetséges antigén specifikus klonális toleranciát indukálni humán, előzőleg antigénnel szenzitivizált T sejtekben [176].

Fontosságuk ellenére, a regulátoros T sejt funkciójáról, az érett és koraszülött neonatális T reg sejtek DS-ket szupresszáló kapacitásáról, valamint ennek mechanizmusáról még kevés információ áll rendelkezésünkre. Rueda és mtsai. in vitro modell segítségével vizsgálta a neonatális T reg sejtek működését. Az találták, hogy a neonatális T reg sejtek nemcsak limitálják a DS-ek és a konvencionális T sejtek (T konv) közötti kapcsolatot, ezáltal csökkentik a aggregátumok kialakulását, hanem elnyomják a DS-ek által termelt kostimáló molekulák expresszióját is, így csökkentik a DS-ek immunogenitását és megszüntetik a T sejt aktivációt. Felnőtt T reg sejtekkel összehasonlítva az újszülöttek aktivált T reg sejtek FOXP3 és CTLA-4 expressziójuk alacsonyabb volt, viszont cAMP szintjük magasabb volt. Érett és koraszülött T reg sejtek nem voltak képesek szupresszálni a DS és T konv aggregátumok kialakulását, szemben a felnőtt naiv és memoriter T reg sejtekkel. A neonatális T reg sejtek viszont csökkentették a DS és a T konv aktivációját úgy, mint ahogy az aktin polimerizációját is az immunológiai szinapszisokban. Továbbá Rueda és mtsai. kimutatták azt is, hogy a CTLA-4 és a cAMP az újszülött T reg sejtek fő szupressziós molekulája. Összességében tehát mind a koraszülött T reg sejtek, mind az érett T reg sejtek kevésbé funkcionálnak a felnőtt T reg sejtekhez képest, mely defektus, következésképpen felelős a csökkent CD4 sejt funkcióért újszülöttekben. [177].

Napjainkban a magzati szabályozás szerepére jelentős figyelem irányul a gyermekkori és felnőtt betegségek kialakulását tekintve. Ezért különböző faktorok mérése szüléskor esszenciális lehet annak meghatározásában, hogy vajon az adott faktor mutat-e változást gesztáció vagy szülés alatt. Thornton és mtsai. azt vizsgálták, hogy a szülés módja hatással van-e a T sejt fenotípusra és funkcióra (CD4+). Az INF-γ produkciója mitogén

fitohemagglutininra vagy anti-CD2/CD3/CD28 F(ab')3 –ra adott válasz esetén jelentősen csökkent neonatális mononukleáris sejtekben összehasonlítva a felnőtt sejtekkel, de ez az eltérés nem változott eltérő szülésmódok esetén (spontán szülés vagy császármetszés). Ugyanúgy, az anti -CD2/CD3/CD28-val stimulált IL-2 termelés újszülöttekben alacsonyabb volt, mint a felnőttekben, de nem változott a szülés módjával. A leggyakoribb T sejt markerek (CD25, MHC II, CD69, CD62L, CD11a, CD44, és CD49d) expressziójának vizsgálata azt mutatta, hogy csak a CD62L (L-selektin) expressziója változott meg jelentősen, kevesebb felnőtt T sejt expresszálta ezt a sejtfelszíni antigént a neonatális T sejtekhez képest. Valamint szignifikánsan több T sejt volt pozitív CD62L-re császármetszéskor, mint spontán szüléskor. Az sCD62L szintje jelentősen alacsonyabb volt köldökzsinór plazmában, mint felnőtt plazmában, de nem mutatott változást a szülés módjától függően. Bár a kzsv T sejt fenotípus és a funkció nem változott a szülés módjától, a T sejt aktivációs markerek tekintetében a variabilitás a normál vaginális szülés mintáiban kifejezettebb volt, mint császármetszés esetén. Ez azt feltételezi, hogy a vajúdás hossza és a szülési stressz hatás lényeges lehet a T sejt fenotípusra és funkcióra [178].

Az antigén prezentáció és a kostimuláció tehát elengedhetetlen a megfelelő T sejt funkcióhoz és fontos szerepet játszik az immunválasz szabályozásában. A kostimulációs molekulák és a nekik megfelelő receptorok eltérő expressziója magyarázza a kzsv és felnőtt perifériás vér T limfocitáinak immunológiai reaktivitásában tapasztalt különbségeket. Ebben a folyamatban az egyik legfontosabb az APS-en expresszálódó fehérje a B7 kostimulációs molekula, mely fontos regulátora a T sejt aktivációnak (**6. táblázat**). Azáltal, hogy a TCR-hez kapcsolódik a B7-1 (CD80) vagy B7-2 (CD86) a CD28-on keresztül kostimulációs szignált vált ki, mely a T sejt IL-2 termelését indukálja, ezáltal védelmet biztosít a T sejt számára az apoptózissal, illetve az anergiával szemben. Mind a TCR, mind a CD28 folyamatosan expresszálódik a naiv T sejteken, mely az antigén prezentáció esetén lehetővé teszi a T sejt választ [112]. Amennyiben nincs kostimuláció, úgy a TCR-en keresztül létrejött szignál a T sejt aktiváció helyett toleranciát indukál az antigénnel szemben [176].

A B7 kostimulációs molekula nemcsak stimuláló, hanem gátló szignált is közvetít a T sejtnek és ezért felelőssé tehető az kzsv alacsony T limfocita reaktivitásért [112]. A TCR stimulációkor a CTLA-4 (CD154) foszforilálódik, melynek hatására a sejtfelszínen stabilizálódik, ezáltal képes a CD28-cal a B7 kötődését versengeni és így

gátolni a kotimuláló jelátvitelt és az T sejt IL-2 termelést. A B7-1 és B7-2 affinitása az inhibitoros CTLA-4 receptorhoz nagyobb, mint a CD-28-hoz. Azáltal, hogy a CTLA-4 kompetitív tulajdonsága mellett gátló jelátvitelt generál, hozzájárul a T sejt aktiváció megakadályozásához [179].

A B7 kostimulációs molekula családban főleg, de nem kizárólag a B7-H1 (CD274) közvetít gátló szignált a T sejt felé. Ez a gátló hatás a PD-1 receptoron (CD279) keresztül jön létre és ön-reaktív T sejt apoptózist, illetve anergiát okoz [180]. Kimutatták, hogy a PD-1 gén delétiója súlyos autoimmun állapotot okoz az ön-reaktív T sejtek perifériás toleranciájának elvesztésén keresztül [181].

A B7-H2 (CD275), mely az indukálható T sejt kostimulátor (ICOS, CD278) ligandja, elősegíti a T sejt aktivációt és differenciálódás, valamint az effektoros válasz kialakulását [182]. Szemben a CD28 kostimuláló hatásával, az ICOS elsősorban az IL-10 termelését segíti elő, míg nincs hatással az IL-2 termelésére [183]. Stabilizálja a T sejt IL-10R expressziót, illetve fokozza ennek a receptornak az IL-10 iránti érzékenységét is [184]. Ezáltal a B7-H2/ICOS útvonal elsősorban a T sejt effektor funkcióját szabályozza [185].

Az antigénprezentáló sejteken expresszálódó B7 fehérjék fontos regulátorai a T sejt aktivációnak. A T sejt szignáltranszdukció mellett fontos szerepet játszik az APS-ek B7-1-en, illetve B7-2-n keresztüli visszaható jelátvitel is. Ez befolyásolja a lokális immunkörnyezet kialakulását az immunszupresszív faktorok expresszióján keresztül, függetlenül a kostimulációs molekula T sejtre való hatásától [112]. Ennek a folyamatnak a következménye, hogy upreguláródik a TRP katabolikus enzim, az IDO [186]. Ez a potens immunszupresszív aktivitású enzim először terhességben került felismerésre, mikor az enzim blokkolása egerekben megszakította az allogenetikus terhességet [113]. A kinurenin útvonal első lépése során az IDO hatására triptofánból (TRP) kinurenin (KYN) képződik. A KYN a továbbiakban különböző enzimek közreműködésével metabolizálódik. Ezek közül az egyik fontos enzim a kinurenin aminotranszferáz, mely egy széles spektrumú endogén excitatórikus aminosav receptor antagonista, a kinurénsav (KYNA) képződéséhez vezet [187,188]. Ennek a molekulának az immunmoduláns hatása nemrég került előterbe [189,190]. A lokális TRP depléció és a KYN útvonal során keletkező proapoptotikus TRP metabolitok, mint a 3-hidroxiantracillin és a kinolinsav fontos szereplői az IDO immunszupresszív hatásának [190]. Mivel a TRP metabolikus útvonal proinflammatorikus stimuluson

keresztül aktiválódik, a KYN metabolitok antiinflammatorikus hatása feedback mechanizmuson keresztül szabályozza az immunválaszt. Szemben egyéb immunmoduláns KYN derivátumokkal, mint a 3-hidroxiantracillin és a kinolinsav, melyek toxikus hatást gyakorolnak az idegi elemekre, a KYNA endogén neuroprotektív ágensnek tekinthető [189].

6. táblázat: A vizsgált B7 család fehérjéi az antigénprezentáló sejteken (APS) és a nekik megfelelő receptorok a T sejteken.

APS	T sejt	Hatás a T sejten
B7-1 (CD80)	CD28	stimuláló
	CTLA-4 (CD152)	inhibitoros
B7-2 (CD86)	CD28	stimuláló
	CTLA-4 (CD152)	inhibitoros
B7-H1 (CD274)	PD-1 (CD279)	inhibitoros
B7-H2 (CD275)	ICOS (CD278)	stimuláló

Az alacsony kzsv T sejt reaktivitás szemben a felnőtt perifériás vér T limfocitáihoz képest jól ismert jelenség [28]. E különbség részletei azonban még nem teljesen tisztázottak. A terhesség egy olyan immunszupresszív állapot, melyben szintén fontos szerepet játszik a megváltozott T sejt prevalencia és funkció. Egészséges terhesek és nem terhesek perifériás vérmintáit, valamint kzsv és felnőtt perifériás vérmintáit összehasonlító vizsgálatunkban meghatároztuk a monociták B7 kostimuláló molekuláinak, illetve a nekik megfelelő T limfocita receptorok prevalenciáját. Mértük továbbá az intracelluláris IDO expressziót, illetve az immunregulációban fontos szerepet játszó plazma kinurenin (KYN), kinurénsav (KYNA) és triptofán (TRP) molekulák plazmaszintjét, melyek hozzájárulhatnak a köldökzsinór T sejt alacsony immunreaktivitásához és a terhesség specifikus anyai immunitás kialakításához. Feltételeztük, hogy egészséges terhességben a B7 fehérjéken keresztüli megváltozott kostimuláció közrejátszhat az alacsonyabb T limfocita aktivációhoz a nem terhesekkel összehasonlítva.

A minimálisan csökkent CD4+ CD28+ limfociták, de különösképpen a magas CTLA-4-et expresszáló sejtek száma felveti annak a lehetőségét, hogy a CD28-on keresztüli kostimuláció csökkent kzsv-ben szemben a felnőtt perifériás vérhez képest. Míg a CD28 konstitutívan expresszálódik a T sejteken, addig a CTLA-4 CD28 stimulus hatására

kerül a sejtfelszínre a CD28 jelátvitel ellenregulációja céljából. A CTLA-4 nagy szekvencia homológiát mutat a CD28-cal és verseng az APS-en lévő B7 molekulákért. A B7 kostimuláló molekula CTLA-4-hez való kapcsolódása során negatív jelátvitelt indukál a T limfocitákon, mely terminálja a proliferatív fázist. Ahogy korábban leírtuk, a B7-1 és B7-2 magasabb affinitással kapcsolódik az inhibitoros CTLA-4 receptorhoz összehasonlítva a CD28-cal [179]. Mivel a CTLA-4 expresszió szintje magasabb a CD4 sejteken kzsv-ben, valamint az azonos időpontban mért B7-2 szintje is emelkedett, ez az inhibitoros kapcsolat kifejezettebben van jelen köldökzsinórvérben felnőtt perifériás vérhez képest. Másfelől viszont ez a magasabb CTLA-4 expresszió a kzsv T sejtjein feltételezhető, hogy csak következménye a fokozott antigénprezentációnak, mely jellemzője az immunválasznak ebben a korai életszakaszban. További vizsgálatok szükségesek, hogy ezt a hipotézist alátámasszuk, vagy elvessük. Egy Han és mtsai. által végzett vizsgálat szerint a kzsv monocitái alacsony bazális B7-2 kostimuláló molekula és CD40 expresszióval jellemezhetőek szemben a felnőtt perifériás vér monocitáival. E molekulák expressziója nem upreguláldódik olyan potens aktivátor, mint az IFN-γ és CD40 ligand (CD40L) kombinációjának hatására [3]. Az eltérő eredmények ezen és az általunk végzett vizsgálat között feltételezhetően abból adódik, hogy mi emelkedett B7-2 szinttel rendelkező aktivált CD11b+ monocitákat vizsgáltunk. Egy másik kutatás szerint a kzsv dendritikus sejtjei szintén éretlennek tekinthetőek, mivel nem, vagy alacsony bazális CD40, B7-1 vagy B7-2 expresszióval rendelkeznek [4,5].

A CD28 és CTLA-4 szempontjából vizsgálatunkkal ellentmondó eredményeket publikáltak Elliott és mtsai. vizsgálatában magasabb százalékban expresszálnak a nyugvó T sejtek CD28-at kzsv és gyermekek vérében, mint felnőttekében. A CD28 expresszió hasonló volt kzsv és felnőtt perifériás vér T sejtjein PMA és ionomicines aktivációt követően. Érdekesség, hogy a sejtfelszíni CTLA-4 expresszió alacsonyabb volt kzsv-ben, mint PMA és ionomicin hatására aktivált felnőtt perifériás vér T sejtjein. Ezzel szemben az intracelluláris CTLA-4 expresszió ekvivalens volt, mely arra utal, hogy a CTLA-4 sejtfelszínre való irányítása eltérően szabályozott kzsv T sejtjeiben [41].

A CD3+ CD278+ limfociták prevalenciája magasabb volt kzsv-ben szemben a felnőtt perifériás vérrel. Az ennek megfelelő kostimuláló molekulának, a B7-H2-nek a CD11b+ monocitákon való előfordulása hasonló volt a két csoportban. A B7-H1 expresszió szintje a CD11b+ monocitákon azonban, mely gátló jelet közvetít a CD279-en

keresztül, alacsonyabb volt kzs-ben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy kzsv-ben eltolódás van a B7-H1 és B7-H2 proteinek szintjén, mely a gátlástól a stimuláló irányba mutat. További vizsgálatok szükségesek ennek fontosságának igazolása céljából. Darmochwal-Kolarz és mtsai. meghatározták a B7-H1, B7-H4, CD200 és CD200R expressziót mieloid BDCA-1+ és limfoid BDCA-2+ DS-en, illetve monocitákon és B limfocitákon kzsv-ben összehasonlítva a felnőtt perifériás vérrel [8]. Azt találták, hogy ezeknek a molekuláknak az expressziója alacsonyabb volt kzsv-ben. Az alacsonyabb B7-H1 expresszió a kzsv antigénprezentáló sejtjein összhangban van az általunk mért eredményekkel.

Az IDO kulcsenzim a triptofán katabolizmusában, mely elősegíti a kinurenin (KYN) termelést. E metabolikus út tagjai számos immunológiai és nem-immunológiai regulátoros funkcióval rendelkeznek. Ha lokálisan depletáljuk a triptofánt (TRP) és megnöveljük a kinurenin (KYN) és metabolitjainak a szintjét, az elnyomja a T sejt mediált immunválaszt azáltal, hogy gátolja a proliferációt és aktivált T sejt apoptózist indukál. Egyben elősegíti a regulátoros T sejtek és a toleráns dendritikus sejtek fejlődését [191]. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a plazma kinurenin / triptofán (KYN / TRP) aránya, mely alapján megbecsülhető az enzimatikus IDO aktivitás, kétszer magasabb volt kzsv-ben szemben a felnőtt perifériás vérrel. Ellentétben számos sejtes komponenssel, mind a KYN, mind a TRP képes áthaladni a placentán - hasonlóan más biológiai barrierhez, mint például a vér-agy gát - és ilyen módon az anyai keringésből bejut a magzati keringésbe [192]. Következésképpen a megfigyelt magas KYN / TRP arány kzsv-ben utalhat a korábban leírt, megnövekedett placentáris IDO aktivitásra, hozzájárulva a fötomaternális immunológiai toleranciához [112,193]. A megemelkedett KYN / TRP arány fontos regulációs faktor lehet, mely hozzájárul az alacsony kzsv T sejt reaktivitáshoz. Továbbá azt találtuk, hogy a KYN – KYNA átalakulás szintén fokozott volt kzsv-ben felnőtt perifériás vérhez képest, mely tízszer magasabb antiinflammatorikus KYNA szintet eredményezett [190], mely magas aktivitású szervessav transzporter jelenlétét jelezheti a méhlepényben, bár a megemelkedett aktivitású kinurenin aminotranszferáz enzim jelenléte sem zárható ki a megfelelő sejtekben.

A B7-1, B7-2 és CTLA-4 kapcsolódás visszaható jelátvitelt indukál monocitákban és IFN-γ termelődést segít elő, amely autokrín vagy parakrín módon IDO expressziót indukál. Ez egyrészt elősegíti a TRP lebontását, másrészt a fent leírt immunszupresszív

hatást eredményezi. A B7 és CTLA-4 közötti interakció két folyamatban játszik fontos szerepet. T sejt szinten, ahol a CTLA-4, mint negatív receptor a T sejt szignáltranszdukciót befolyásolja, illetve antigén prezentáló sejt szinten, ahol a CTLA-4, mint ligand elősegíti az APS-ek IDO expresszióját [185]. Tekintettel arra, hogy a kzsv CD4+ CD28+ limfocitáin a CTLA-4 nagyobb mértékben expresszálódik, feltételeztük, hogy kzsv-ben a visszaható jelátvitel fokozott. Ennek érdekében korrelációs analízist végeztünk, eredményeink elemzése azonban ezt a feltételezést nem támasztotta alá. Ellentétes összefüggést találtunk ugyanis a CD11b+ CD86+ monociták és az IDO-t expresszáló CD11b+ monociták között kzsv-ben. A fordított arányú korreláció a kzsv aktivált monocitáinak IDO és B7-2 expressziója között utalhat arra, hogy a visszaható jelátvitel a B7-2-n keresztül éretlen kzsv-ben. Az IDO-t expresszáló CD11b+ monociták mennyisége azonos volt kzsv-ben és felnőtt perifériás vérben. Továbbá az IDO MFI értéke alacsonyabb volt kzsv CD11b+ monocitáiban. Ez felveti azt, hogy a kzsv sejtjeinek IDO-t termelő képessége alacsonyabb, és a visszaható jelátvitel a kzsv CD11+ monocitáiban vélhetőleg éretlen. Ez alátámasztaná hipotézisünket, mely szerint a kzsv-ben észlelt emelkedett KYN / TRP arány a placentális (anyai) IDO aktivitást tükrözi inkább, mint a kzsv IDO kompetens antigénprezentáló sejtekét.

Ebben a vizsgálatban három tényezőt sikerült azonosítani, mely összefügghet a korábban megfigyelt alacsony limfocita reaktivitással kzsv-ben felnőtt perifériás vérhez viszonyítva. Az első a kzsv CD4 sejtek magasabb CTLA-4 expressziója szemben a felnőtt perifériás vérrel, mely feltételezi a csökkent CD28 mediált kostimuláció jelenlétét. Az ezzel egy időben mért B7-2 kostimuláló molekula szintje szintén magasabb volt, mely összességében arra utal, hogy a gátló funkció nagyobb mértékben van jelen kzsv-ben, mint felnőtt perifériás vérben. A második faktor a plazma KYN / TRP arány, mely kétszer nagyobb volt kzsv-ben. Ez egyrészt összefügghet a kzsv alacsony T sejt reaktivitásával. Másrészt alátámasztja a korábbi eredményeinket, mely szerint a fötomaternális toleranciához szükséges immunszupressziós miliőt biztosító placentáris IDO aktivitás emelkedett. Érdekesség, hogy a kzsv antiinflammatorikus KYNA mértéke közel tízszerese volt a felnőtt perifériás vérben mérthez képest, mely a placentáris barrierben jelenlevő és magas aktivitású szervessav transzporterre utal. Végezetül a harmadik tényező, hogy eddigi ismereteink szerint ez volt az első olyan vizsgálat, mely leírja, hogy a felnőtt perifériás vérhez képest a kzsv monociták alacsony IDO-t termelőképességűek, illetve, hogy a visszaható jelátvitel feltételezhetően éretlen a

kzsv monocitáiban. Ezek az eredmények szintén arra utalnak, hogy a tapasztalt magas KYN / TRP arány inkább placentáris, mint magzati IDO túlexpressziónak köszönhető az arra alkalmas sejtekben. A vizsgálatunkban a B7-H1 és B7-H2 szinteken az inhibitorostól a stimuláló irányba való eltolódást is megfigyeltük, mely biológiai jelentősége egyelőre nem ismert.

Terhességben a magzat, a korábban már említetteknek megfelelően, tekintettel az apai MHC jelenlétére, mint szemi-allograft rejekciót válthat ki. Azért, hogy egészséges terhesekben a magzattal szemben ez az immunreakció ne jöjjön létre, immuntoleranciának szükséges kialakulnia. Az anyai toleranciának mind fötomaternális, mind szisztémás szinten meg kell valósulnia a magzat túléléséhez [61]. Az elmúlt években számos, a terhesség-specifikus immuntolerancia kialakulásában fontos komponens került felismerésre, melyek közül az egyik legfontosabb az alacsony szintű aktivált T sejtszám, szemben a nem terhes állapottal. A legfontosabb faktorok, melyek hozzájárulnak ehhez a folyamathoz: a második és harmadik trimeszterben a Th1-től a Th2 irányában való eltolódás, az alacsony Th1 és CD8+ T sejt aktivitás, a csökkent Th17 / Treg arány, a Treg sejtek és a toleráns DS-ek számának növekedése és a stimuláció hatására a TCR-en keresztüli csökkent kalcium beáramlás Th1 és CD8+ T sejtekben szemben a nem terhes nőkből izolált limfocitákkal [97,110,194].

Vizsgálatunk eredményei alapján meglepő módon szignifikáns emelkedést találtunk CD28+ T sejtek prevalenciájában egészséges terhesekben szemben a nem terhesekben mértekkel. Ez az eredmény arra utal, hogy a CD28-on keresztüli kostimuláció a T sejtekben szintén kiemelkedő jelentőségű terhességben és feltehetően nem vesz részt a terhesség immunszupresszív környezetének kialakításában. Viszont a méréseink során a monocitákon tapasztalt alacsony B7-1 expresszió melletti változatlan B7-2 expresszió valószínűleg csökkent intenzitású CD28-on keresztüli kostimulációhoz vezet terhességben.

Vetélés esetén a B7-2 expressziója fokozottan upreguláldódik a fötomaternális felszínen, összefüggésben a magas Th1 citokin (IL-2 és IFN-γ) és alacsony Th2 citokin (IL-4 és IL10) szintekkel [195]. Továbbá a B7-2 kostimuláció in vivo gátlása esetén a citokin egyensúly a fötomaternális felszínen a Th1-től a Th2 felé tolódik el, illetve növeli a perifériás CD4+CD25+ regulátoros T sejtek arányát. Így a csökkent szintű vagy mérsékelt funkciójú B7-2 előnyös lehet a terhesség első felében. Ezt a csökkenést

vizsgálatunkban nem tudtuk igazolni a harmadik trimeszterben lévő egészséges terhesek mintáinak analízise során.

Az ICOS expressziója, mely a T sejt aktivációjában stimuláló szerepet játszik, erősen emelkedett egészséges terhesekben, míg a neki megfelelő B7-H2 kostimulációs molekula erősen csökkent egészséges terhesek monocitáin. Mivel az ICOS fokozottan indukálja a IL-10-t az IL-2 termelés helyett [183], a magasabb ICOS szint hozzájárulhat a Th2 irányú eltolódáshoz, mely a harmadik trimeszterben figyelhető meg egészséges terhesekben [61]. A PD-1 expresszáló T limfociták szintje szintén megemelkedett egészséges terhesekben. A receptor inhibitoros hatása szerepet játszhat a T sejt aktiváció gátlásában terhesség során.

Az IDO-t expresszáló T sejtek és monociták előfordulási gyakorisága magasabb volt egészséges terhességben, mint nem terhesekben. Ez az eredmény alátámasztja az IDO terhességben kiemelkedően fontos, jól ismert immunszupresszív szerepét, amely hozzájárul a terhesség specifikus immuntolerancia kialakulásához. Továbbá azt találtunk, hogy ugyanabban az időpontban mérve nem csak az IDO-t termelő sejtek száma, hanem maga az intracelluláris IDO mennyisége is megemelkedett mind a két vizsgált sejtcsoportban egészséges terhesekben összehasonlítva a nem terhesekben mértekkel.

Egészséges terhesekben a KYN, KYNA és különösképpen a TRP szintek csökkentek, mely emelkedett KYN / TRP arányt eredményezett, szemben a nem terhesekben mértekkel. Az emelkedett IDO akitvitás egészséges terhesekben, mely a magas KYN / TRP arányban mutatkozik meg, összefügg az egészséges terhesekben mért magasabb IDO-t expresszáló T sejtek és monociták számával. Érdekesség, hogy korábbi kutatásainkban az IDO-t termelő T sejtek prevalenciája csökkent PE-ben az egészséges terhesekéhez képest [193], a KYN, KYNA és TRP szintek, mint ahogy a KYN / TRP arány is, azonosak voltak (1,55 (1,31-1,83) vs. 1,67 (1,33-1,93) uM, 18,8 (15,0-23,0) vs. 22,3 (16,7-28,5) nM, 38,6 (33,9-42,5) vs. 37,1 (30,0-41,3) uM, 0,041 (0,038-0,045) vs. 0,044 (0,036-0,049)). A különbségek, melyek megfigyelhetőek az IDO-t termelő sejtek előfordulásában, nem tükröződnek az IDO enzimatikus aktivitásában PE-ben, egészséges terhességgel ellentétben. Ebben a vizsgálatunkban az intracelluláris IDO expresszió mellett meghatároztuk a B7-1, B7-2, B7-H1 és B7-H2 kostimulációs molekulákat expresszáló aktivált CD11c+ monociták, valamint a nekik megfelelő receptorokat, a CD28, CTLA-4, PD-1 és ICOS molekulákat expresszáló T sejtek

prevalenciájáta is PE-ben és egészséges terhességben. Eredményeink azt mutatták, hogy a B7-1 és B7-2 molekulákat expresszáló aktivált monociták és az IDO-t termelő T sejtek alacsonyabb számban fordultak elő PE-ben. Ez feltételezi, hogy PE-ben a fennálló anyai szisztémás gyulladás miatt egy másodlagos szabályozó mechanizmus jön létre. Mivel az IDO jelentős immunszupresszáns és fontos szerepet játszik a terhesség specifikus immuntolerancia kialakulásában, ezért a PE-ben mért alacsony T sejt intracelluláris IDO szint hozzájárulhat a PE kialakulásához [193].

Elképzelhető, hogy a terhesekben mért csökkent KYN, KYNA és TRP szintek annak a következménye, hogy ezek a molekulák átjutnak a placentán eddig ismeretlen mechanizmusok és transzporterek segítségével, melyek hozzájárulhatnak a magzat csökkent immunválasz képességéhez. A kzsv-rel és felnőtt perifériás vérrel végzett vizsgálataink során nyert eredmények alátámasztják ezt a feltételezést. További vizsgálat szükséges ennek a hipotézisnek az igazolásához.

A már korábban leírtaknak megfelelően a B7-1 és a B7-2 kapcsolódása a CTLA-4-hez visszaható jelátvitelt indukál monocitákban és elősegíti az INF-γ termelődését, mely autokrín, illletve parakrín módon upregulálja az IDO expressziót, ezáltal a TPR degradációjához vezet és immunszupresszív hatást eredményez. Feltételeztük, hogy a visszaható jelátvitel fontos szerepet játszik a magasabb IDO aktivitásban és expresszióban egészséges terhesekben. A B7-1 és B7-2 expresszióval végzett korrelációs analízis azonban ezt a megfigyelést nem támasztotta alá.

Eredményeink alapján a terhesség specifikus immuntolerancia kialakulása szempontjából elsősorban az APS-ek megváltozott B7 expressziója, és nem azok T sejten található receptorainak eltérése játszik szerepet. A megemelkedett IDO expresszió a monocitákban és T sejtekben, valamint a plazma magasabb enzimatikus IDO aktivitása hozzájárulhat a szisztémás immunszupresszív környezet kialakulásához a harmadik trimeszterben egészséges terhesekben.

8 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Vizsgálatunk a kzsv CD4+ T sejtek fokozott CTLA-4 expresszióját mutatta, mely a CD28 mediált kostimuláció csökkenésére utal. Ugyanakkor a CTLA-4-nek megfelelő kostimuláló molekula, a B7-2 szintén emelkedett volt, mely alátámasztja a kzsv-ben kifejezetten jelenlévő gátló kostimuláció szerepét.

2. Újszülöttkorban magasabb a plazma KYN / TRP arány, ami az IDO enzim fokozott működésére utal.

3. Az újszülött monociták alacsony IDO-t termelő kapacitása és a monociták éretlen visszaható jelátvitele alapján azonban a magas KYN / TRP arány a placentáris IDO túlexpressziónak köszönhető, nem magzati eredetű. Az emelkedettet placenta IDO aktivitás tehát, mely immunszupressziót biztosít a fötomaternális tolerancia kialakulásához, hozzájárul a csökkent T sejt reaktivitáshoz újszülöttkorban.

4. Egészséges terhességben magasabb a T sejtek CD28 expressziója és alacsonyabb a CTLA-4 expressziója nem terhesekhez képest. A monociták B7-1 expressziója csökkent terhességben.

5. A terhességi immuntolerancia kialakulásában ezért elsősorban az APS-ek B7 fehérjéinek csökkent expressziója játszhat szerepet, a CD28-on keresztüli kostimuláció változásának a terhesség harmadik trimeszterében feltehetően nincs szerepe.

6. A monocitákban és T sejtekben tapasztalt megemelkedett IDO expresszió, illetve a plazma magasabb enzimatikus IDO aktivitása elősegíti a szisztémás immunszupresszív környezet kialakulását egészséges terhesekben, a harmadik trimeszterben.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

Háttér: A B7 kostimulációs molekulacsalád szerepe nem ismert egészében egészséges terhességben a szisztémás anyai immuntolerancia kialakulása tekintetében, illetve újszülöttkorban a kzsv immunológiai reaktivitása szempontjából. A B7 kostimulációs molekula az APS-en expresszálódik és fontos regulátora a T sejt aktivációnak. Célunk volt, hogy meghatározzunk a B7 kostimulációs molekulák, illetve a nekik megfelelő T sejt receptorok prevalenciáját, úgy, mint az intracelluláris IDO expressziót és az immunregulációs tulajdonságú plazma TRP, KYN, KYNA szinteket kzsv-ben és felnőtt perifériás vérben, valamint egészséges terhesek és egészséges nem terhes nők perifériás vérmintáiban, vizsgálva a újszülöttkori T sejt aktivációban és a terhesség specifikus immuntolerancia kialakulásában betöltött szerepüket.

Módszer: Áramlási citometria segítségével meghatároztuk a B7-1, B7-2, B7-H1 és B7-H2 kostimulációs molekulákat expresszáló aktivált CD11c+ monociták, valamint a nekik megfelelő receptorokat, a CD28, CTLA-4, PD-1 és ICOS molekulákat expresszáló T sejtek prevalenciáját a fenti vérmintákban. Az intracelluláris IDO expressziót áramlási citometriával, a plazma KYN, KYNA és TRP szintjeit pedig magasnyomású folyadék kromatográfiával mértük.

Eredmények: Köldökzsinórvérrel és felnőtt perifériás vérrel végzett vizsgálatunkban a CD4+ T sejteken a CTLA-4 expressziója fokozottabb volt kzsv-ben. A CTLA-4-nek megfelelő kostimlációs molekula, a B7-2 szintén emelkedett volt, mely alátámasztja a kzsv-ben kifejezetten jelenlévő gátló kostimuláció szerepét. A plazma KYN / TRP arány, mely jól tükrözi az IDO aktivitást, kétszer magasabb volt kzsv-ben, mint felnőtt perifériás vérben. A köldökzsinórvér monocitáinak IDO-t termelő kapacitása azonban a felnőtt perifériás vérhez képest alacsonyabb volt, és a B7-2-n keresztüli visszaható jelátvitelt éretlennek találtuk, mely alapján a magas KYN / TRP arány nem a magzati, sokkal inkább a palcentális IDO túlexpressziónak tulajdonítható. Egészséges terhesekben szignifikánsan emelkedett CD28+ T sejt prevalencia mellett ezeken a sejteken alacsony CTLA-4 expressziót találtunk, mely alátámasztja a CD28-on keresztüli kostimuláció fontosságát terhességben, de nem járul hozzá az immunszupresszív környezet kialakulásához. A CD80+ monociták száma alacsonyabb volt egészséges terhesekben. Az IDO-t expresszáló T sejt és monocita előfordulási gyakorisága magasabb volt. A plazma KYN, KYNA, TRP szintje alacsonyabb, míg a

KYN / TRP arány magasabb volt egészséges terhesekben szemben a nem terhesekben mértekkel.

Konklúzió: A CD4+ T sejtek fokozott CTLA-4 expressziója a CD28 mediált kostimuláció csökkenésére utal kzsv-ben. Ugyanakkor a CTLA-4-nek megfelelő kostimlációs molekula, a B7-2 szintén emelkedett volt, mely alátámasztja a kzsv-ben kifejezetten jelenlévő gátló kostimuláció szerepét. Az újszülött monociták alacsony IDO-t termelő kapacitása és a monociták éretlen visszaható szignál jelensége alapján a magas KYN / TRP arány a placentális IDO túlexpressziónak köszönhető, nem magzati eredetű. Az emelkedettet placenta IDO aktivitás, mely immunszupressziót biztosít a fötomaternális tolerancia kialakulásához, hozzájárul a csökkent T sejt reaktivitáshoz újszülöttkorban. Ezek a kzsv-ben észlelt eltérések, szemben a felnőtt perifériás vérrel, hozzájárulnak a korábban már megfigyelt csökkent kzsv T sejt reaktivitáshoz.

Terhességben a CD28-on keresztüli kostimuláció nem csökkent T sejtekben és feltehetően nem függ össze a harmadik trimeszterben az immunszupresszív környezet kialakulásával. A terhesség specifikus immuntolerancia kialakulásában ezért elsősorban az APS-ek csökkent B7 fehérjék expressziója játszhat szerepet. A megemelkedett monocita és T sejt intracelluláris IDO expresszió, valamint a magas plazma IDO aktivitás hozzájárul a szisztémás immunszupresszív környezet kialakulásához a terhesség harmadik trimeszterében.

10 SUMMARY

Background: The role of B7 family of costimulatory molecules is not fully understood in the development of the systemic maternal immune tolerance during healthy pregnancy (HP) and in the reduced immunological reactivity of umbilical cord blood (UCB). B7 costimulatory molecules are expressed on antigen presenting cells (APCs) and are important regulators of T cell activation. We aimed to investigate the prevalence of B7 costimulatory molecules on monocytes and that of their receptors on T cells. We also determined the intracellular expression of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and the plasma levels of tryptophane (TRP), kynurenine (KYN) and kynurenic acid (KYNA), that are important molecules with immunoregulatory properties, in order to describe their potential contribution to the pregnancy-specific maternal immune tolerance and to neonatal T cell activation.

Methods: We determined the frequency of activated (CD11b+) monocytes expressing B7-1, B7-2, B7-H1, and B7-H2, and that of T cells and CD4+ T helper cells expressing CD28, CTLA-4, PD-1, and ICOS in umbilical cord blood (UCB), adult peripheral blood (APB) and peripheral blood samples of healthy pregnant and non-pregnant (NP) women using flow cytometry. We also examined the intracellular expression of IDO applying flow cytometry and plasma levels of TRP, KYN and KYNA using high-performance liquid chromatography.

Results: In UCB the level of CTLA-4 expression on CD4 cells was higher compared to APB. At the same time, that of the corresponding costimulator molecule, B7-2 was also elevated. We found that the plasma KYN / TRP ratio, a formula generally used as an estimated representation of the enzymatic activity of IDO, was two-fold higher in UBC. However, the capacity of UCB monocytes compared to APB monocytes was lower to produce IDO, and reverse signalling via B7-2 in UCB monocytes was found to be immature. In HP a significant increase in the prevalence of CD28+ T cells was observed compared to NP women. At the same time a decrease was shown in the expression of CTLA-4 on these cells. This finding indicates that costimulation via CD28 is of great importance also during pregnancy in T cells. The frequency of CD80+ monocytes was lower in HP women. The prevalence of IDO-expressing T cells and monocytes was higher in HP compared to NP women. Plasma KYN, KYNA and TRP levels were

lower, while at the same time, the KYN / TRP ratio was higher in HP than in NP women.

Conclusions: The level of CTLA-4 expression on CD4 cells was higher in UCB indicating that the possibility of CD28-mediated costimulation may be decreased. The level of the corresponding costimulator molecule, B7-2 was also elevated. Therefore, this inhibitory relation function is present to a higher extent in UCB. The increased IDO activity in plasma, which is responsible for the development of the foetalmaternal immune tolarence, plays a role in decreased T cells reactivity in UCB. However, the capacity of UCB monocytes compared to APB monocytes was lower to produce IDO, and reverse signalling via B7-2 in UCB monocytes was found to be immature, which suggests that the observed increase in KYN / TRP ratio may be due to placental rather than fetal overexpression of IDO in competent cells. These factors may all contribute to the previously observed reduced reactivity of UCB T lymphocytes compared to APB T cells.

Costimulation via CD28 is not decreased in T cells, and it probably does not contribute to the immunosuppressive environment, at least in the third trimester of pregnancy. The development of the pregnancy-specific immune tolerance in the mechanism of B7 costimulation may be more related to the altered expression of B7 proteins on APCs rather than that of their receptors on T cells. The elevated intracellular IDO expression in monocytes and T cells, as well as the higher plasma enzymatic IDO activity probably contributes to the systemic immunosuppressive environment in the third trimester characteristic for healthy gestation.

11 IRODALOMJEGYZÉK

1. Pérez A, Bellón JM, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. (2010). Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. Hum Immunol. 71:151-157.
2. Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA. (2006). Defective antigen-presenting cell function in human neonates. Clin Immunol. 121:251-259.
3. Han P, McDonald T, Hodge G. (2004). Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. Immunology. 113:26-34.
4. Sorg RV, Kogler G, Wernet P. (1999). Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c-population. Blood. 93:2302-2307.
5. Borras FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarrete CV. (2001). Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. Br J Haematol. 113:925-931.
6. De Wit D, Olislagers V, Goriely S, Vermeulen F, Wagner H, Goldman M, et al. (2004). Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. Blood. 103:1030-1032.
7. De Wit D, Tonon S, Olislagers V, Goriely S, Boutriaux M, Goldman M, et al. (2003). Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. J Autoimmun. 21:277-281.
8. Darmochwal-Kolarz D, Serafin A, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Oleszczuk J. (2013). The expressions of co-stimulatory molecules are altered on putative antigen-presenting cells in cord blood. Am J Reprod Immunol. 69:180-187.
9. Mahnke K, Enk AH. (2005). Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? Curr Top Microbiol Immunol. 293:133-150.
10. Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P. (2001). Cord blood leucocyte expression of functionally significant molecules involved in the regulation of cellular immunity. Scand J Immunol. 53:72-78.
11. Upham JW, Lee PT, Holt BJ, Heaton T, Prescott SL, Sharp MJ, et al. (2002). Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. Infect Immun. 70:6583-6588.

12. Crespo I, Paiva A, Couceiro A, Pimentel P, Orfao A, Regateiro F. (2004). Immunophenotypic and functional characterization of cord blood dendritic cells. Stem Cells Dev. 13:63-70.

13. Drohan L, Harding JJ, Holm B, Cordoba-Tongson E, Dekker CL, Holmes T, Maecker H, Mellins ED. (2004). Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets. Hum Immunol. 65:1356-1369.

14. Kraft JD, Horzempa J, Davis C, Jung JY, Peña MM, Robinson CM. (2013). Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses. Immunology. 139:484-493.

15. Levy O, Zarember KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. (2004). Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. J Immunol. 173:4627-4634.

16. Forster-Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, et al. (2005). Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. Pediatr Res. 58:121-124.

17. Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R. (2004). Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. Infect Immun. 72:1223-1229.

18. Gold MC, Robinson TL, Cook MS, Byrd LK, Ehlinger HD, Lewinsohn DM, et al. (2007). Human neonatal dendritic cells are competent in MHC class I antigen processing and presentation. PLoS One. 2:957.

19. Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, Schultz C. (2004). Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. Pediatr Res. 56:219-226.

20. Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, et al. (2003). CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. Immunity. 19:877-889.

21. Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G, Lechler R. (2000). Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. J Immunol. 165:1175-1181.

22. Fehervari Z, Sakaguchi S. (2004). CD4+ Tregs and immune control. J Clin Invest. 114:1209-1217.

23. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. (2002). Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. Clin Exp Immunol. 128:118-123.

24. Elliott SR, Roberton DM, Zola H, Macardle PJ. (2000). Expression of the costimulator molecules, CD40 and CD154, on lymphocytes from neonates and young children. Hum Immunol. 61:378-388.

25. García Vela JA, Delgado I, Bornstein R, Alvarez B, Auray MC, Martin I, et al. (2000). Comparative intracellular cytokine production by in vitro stimulated T lymphocytes from human umbilical cord blood (HUCB) and adult peripheral blood (APB). Anal Cell Pathol. 20:93-98.

26. Kollár S, Sándor N, Molvarec A, Stenczer B, Rigó J Jr, Tulassay T, et al. (2012). Prevalence of intracellular galectin-1-expressing lymphocytes in umbilical cord blood in comparison with adult peripheral blood. Biol Blood Marrow Transplant. 18:1608-1613.

27. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, et al. (2003). Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. Biol Neonate. 84:297-303.

28. Adkins B. (1999). T-cell function in newborn mice and humans. Immunol Today. 220:330-335.

29. Adkins B, Biu Y, Guevara P. (2001). The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. J Immunol. 166:918-925.

30. Adkins B, Du RQ. (1998). Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondary responses. J Immunol. 160:4217-4224.

31. Adkins B, Biu Y, Cepero E, Perez R. (2000). Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates. J Immunol. 164:2347-2353.

32. Nitsche A, Zhang M, Clauss T, Siegert W, Brune K, Pahl A. (2007). Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. BMC Immunol. 8:18.

33. Kilpinen S, Henttinen T, Lahdenpohja N, Hulkkonen J, Hurme M. (1996). Signals leading to the activation of NF-kappa B transcription factor are stronger in neonatal than adult T lymphocytes. Scand J Immunol. 44:85-88.

34. Min B, Legge KL, Pack C, Zaghouani H. (1998). Neonatal exposure to a selfpeptide-immunoglobulin chimera circumvents the use of adjuvant and confers resistance to autoimmune disease by a novel mechanism involving interleukin 4 lymph node deviation and interferon gamma mediated splenic anergy. J Exp Med. 188:2007-2017.

35. Arulanandam BP, Van Cleave VH, Metzger DW. (1999). IL-12 is a potent neonatal vaccine adjuvant. Eur J Immunol. 29:256-264.

36. Schultz C, Strunk T, Temming P, Matzke N, Härtel C. (2007). Reduced IL-10 production and -receptor expression in neonatal T lymphocytes. Acta Paediatr. 96:1122-1125.

37. White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. (2002). Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. J Immunol. 168:2820-2827.

38. Luciano AA, Yu H, Jackson LW, Wolfe LA, Bernstein HB. (2011). Preterm labor and chorioamnionitis are associated with neonatal T cell activation. PLoS ONE. 6:16698.

39. Crespo M, Martinez DG, Cerissi A, Rivera-Reyes B, Bernstein HB, Lederman MM, et al. (2012). Neonatal T-cell maturation and homing receptor responses to Toll-like receptor ligands differ from those of adult naive T cells: relationship to prematurity. Pediatr Res. 71:136-143.

40. Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M, et al. (2009). Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells. J Immunol. 183:4360-4370.

41. Elliott SR, Macardle PJ, Roberton DM, Zola H. (1999). Expression of the costimulator molecules, CD80, CD86, CD28, and CD152 on lymphocytes from neonates and young children. Hum Immunol. 60:1039-1048.

42. Schelonka RL, Raaphorst FM, Infante D, Kraig E, Teale JM, Infante AJ. (1998). T cell receptor repertoire diversity and clonal expansion in human neonates. Pediatr Res. 43:396-402.

43. Chen L, Cohen AC, Lewis DB. (2006). Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells. Biol Blood Marrow Transplant. 12:160-171.

44. Schaub B, Liu J, Schleich I, Höppler S, Sattler C, von Mutius E. (2008). Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth. Allergy. 63:1438-1447.

45. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, et al. (2004). CD25+ CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. Exp Hematol. 32:622-629.

46. Wing K, Lindgren S, Kollberg G, Lundgren A, Harris RA, Rudin A, et al. CD4 (2003). T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells. Eur J Immunol. 33:579-587.

47. Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. (2004). Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. Cell Mol Life Sci. 61:567-579.

48. Chang CC, Satwani P, Oberfield N, Vlad G, Simpson LL, Cairo MS. (2005). Increased induction of allogeneic-specific cord blood CD4+CD25+ regulatory T (Treg) cells: a comparative study of naïve and antigenic-specific cord blood Treg cells. Exp Hematol. 33:1508-1520.

49. Black A, Bhaumik S, Kirkman RL, Weaver CT, Randolph DA. (2012). Developmental regulation of Th17-cell capacity in human neonates. Eur J Immunol. 42:311-319.

50. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. (2008). Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T-cell precursor. J Exp Med. 205:1903-1916.

51. Lee JH, Ulrich B, Cho J, Park J, Kim CH. (2011). Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. J Immunol. 187:1778-1787.

52. Palin AC, Ramachandran V, Acharya S, Lewis DB. (2013). Human neonatal naive CD4+ T cells have enhanced activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a. J Immunol. 190:2682-2691.

53. Li QJ, Chau J, Ebert PJR, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. Cell. 129:147-161.

54. Toldi G, Treszl A, Pongor V, Gyarmati B, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2010). T-lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in the neonate. Int Immunol. 22:769-774.

55. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, et al. (2002). Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Trends Immunol. 23:313-320.

56. Endharti AT, Zhou YW, Nakashima I, Suzuki H. (2005). Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation. Eur J Immunol. 35:86-97.

57. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, et al. (2006). Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. J Immunol. 176:778-789.

58. Rabinovich GA, Ariel A, Hershkoviz R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O. (1999). Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. Immunology. 97:100-106.

59. van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T, et al. (2004). Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. J Pathol. 204:511-518.

60. Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. Blood. 109:2058-2065.

61. Toldi G, Treszl A, Vásárhelyi B. (2011). T lymphocyte characteristics and immune tolerance during human pregnancy. In Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects. Edited by Mavragani C. Rijeka: Intech; 463-486.

62. Romagnani S. (1991) Human Th1 and Th2: doubt no more. Immunol Today. 12:256-257.

63. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F. (2009). Inflammation and pregnancy. Reprod Sci. 16:206-215.

64. Mor G, Cardenas I. (2010). The immune system in pregnancy: a unique complexity. Am J Reprod Immunol. 63:425-433.

65. Piccinni MP. (2010). T cell tolerance towards the fetal allograft. J Reprod Immunol. 85:71-75.

66. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. (1993). Synthesis of T helper 2-type cytokines at maternal–fetal interface. J Immunol. 151:4562-4573.

67. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mossmann TR. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal–fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? Immunol Today. 14:353-356.

68. Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. J Exp Med. 192:259-270.

69. Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli GF, Romagnani S. (1998). Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. Nat Med. 4:1020-1024.

70. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. (2006). Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. Reprod Biomed Online. 13:680-686.

71. von Rango U. (2008). Fetal tolerance in human pregnancy - a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. Immunol Lett. 115:21-32.

72. Bulmer JN. (1992). Immune aspects of pathology of the placental bed contributing to pregnancy pathology. Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 6:461-488.

73. Blaser C, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Picher H. (1998). Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. Eur J Immunol. 28:2311-2319.

74. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. J Exp Med. 198:1201-1212.

75. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE. (1998). Activated rat macrophages produce a galectin- 1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. J Immunol. 160:4831-4840.

76. Zuniga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A. (2001). Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. J Leukoc Biol. 70:73-79.

77. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. Nature. 378:736-739.

78. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA. (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. Nat Immunol. 8:825-834.

79. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y. (1999). Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen- induced arthritis via T cell apoptosis. J Exp Med. 190:385-398.

80. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, Hirabayashi J, Rizzo LV, Rabinovich GA. (2006). Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory- mediated anti-inflammatory responses. J Immunol. 176:6323-6332.

81. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. (2007). A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. Nat Med. 13:1450-1457.

82. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. (1999). Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 41:297-306.

83. Toldi G, Rigó J Jr, Stenczer B, Vásárhelyi B, Molvarec A. (2011). Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 66:223-229.

84. Saito S. (2010). Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. Immunol Cell Biol. 88:615-617.

85. Mjösberg J, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C. (2007). CD4+ CD25+ regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. Immunology. 120:456-466.

86. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. (2004). Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. Mol Hum Reprod. 10:347-353.

87. Heikkinen J, Möttönen M, Alanen A, Lassila O. (2004). Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. Clin Exp Immunol. 136:373-378.

88. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. Immunology. 112:38-43.

89. Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J. (2010). FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. Biol Reprod. 82:698-705.

90. Zenclussen AC. Regulatory T cells in pregnancy. (2006). Springer Semin Immunopathol. 28:31-39.

91. Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzelak B, Oleszczuk J. (2007). Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 58:39-45.

92. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. (2007). Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in preeclampsia. Clin Exp Immunol. 149:139-145.

93. Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toermer A, Meuer S, Sohn C. (2008). Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? Clin Immunol. 129:401-412.

94. Toldi G, Svec P, Vásárhelyi B, Mészáros G, Rigó J, Tulassay T, Treszl A. (2008). Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 87:1229-1233.

95. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. (2009). More stories on Th17 cells. Cell Res. 19:399-411

96. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol. 148:32-46.

97. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. (2009). Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. J Immunol. 183:7023-7030.

98. Ito M, Nakashima A, Hidaka T, Okabe M, Bac ND, Ina S, Yoneda S, Shiozaki A, Sumi S, Tsuneyama K, Nikaido T, Saito S. (2010). A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. J Reprod Immunol. 84:75-85.

99. Nakashima A, Ito M, Shima T, Bac ND, Hidaka T, Saito S. (2010). Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. Am J Reprod Immunol. 64:4-11.

100. Wang WJ, Hao CF, Lin Y, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, Lin QD. (2010). Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. J Reprod Immunol. 84:164-170.

101. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA. (2010). IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. J Immunol. 184:1776-1783.

102. Shin HC, Benbernou N, Esnault S, Guenounou M. (1999). Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. Cytokine. 11:257-266.

103. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. (2006). NK cells and human pregnancy-- an inflammatory view. Trends Immunol. 27:399-404.

104. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. (2007). NK cells and preeclampsia. J Reprod Immunol. 76:40-44.

105. Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hünig T, Mittrücker HW, Brüstle A, Kamradt T, Lohoff M. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. Eur J Immunol. 39:1716-1725.

106. Hojo M, Suthanthiran M, Helseth G, August P. (1999). Lymphocyte intracellular free calcium concentration is increased in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 180:209-214.

107. Thway TM, Shlykov SG, Day MC, Sanborn BM, Gilstrap LC 3rd, Xia Y, Kellems RE. (2004). Antibodies from preeclamptic patients stimulate increased intracellular Ca2+ mobilization through angiotensin receptor activation. Circulation. 110:1612-1619.

108. von Dadelszen P, Wilkins T, Redman CW. (1999). Maternal peripheral blood leukocytes in normal and pre-eclamptic pregnancies. Br J Obstet Gynaecol. 106:576-581.

109. Panyi G, Possani LD, Rodríguez de la Vega RC, Gáspár R, Varga Z. (2006). K+ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. Curr Pharm Des. 12:2199- 2220.

110. Toldi G, Stenczer B, Treszl A, Kollár S, Molvarec A, Tulassay T, Rigó J, Vásárhelyi B. (2011). Lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in healthy pregnancy and preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 65:154-163.

111. Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C. (1997). Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. Biol Reprod. 57:609-615.

112. Petroff MG, Perchellet A. (2010). B7 family molecules as regulators of the maternal immune system in pregnancy. Am J Reprod Immunol. 63:506-519.

113. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science. 281:1191-1193.

114. Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. J Reprod Immunol. 61:67-77.

115. Miwa N, Hayakawa S, Miyazaki S, Myojo S, Sasaki Y, Sakai M, Takikawa O, Saito S. (2005). IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes ⁄ macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-c increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. Mol Hum Reprod. 11:865-870.

116. Kaufman KA, Bowen JA, Tsai AF, Bluestone JA, Hunt JS, Ober C. (1999). The CTLA-4 gene is expressed in placental fibroblasts. Mol Hum Reprod. 5:84-87.

117. Herve C, Beyne P, Jamault H, Delacoux E. (1996). Determination of tryptophan and its kynurenine pathway metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and fluorimetric detection. J Chromatogr B. 675:157-161.

118. Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA. (2006). Defective antigen-presenting cell function in human neonates Clin Immunol. 121:251-259.

119. Lawn JE, Cousens S, Bhutta ZA, Darmstadt GL, Martines J, Vinod P, Knippenberg R, Fogstad H. (2005). Neonatal survival: a call for action. Lancet 365:1111-1202.

120. Kovarik J, Siegrist CA. (1998). Immunity in early life. Immunol Today. 19:150-152.

121. Wright PF. (1998). Infectious diseases in early life in industrialized countries. Vaccine. 16:1355-1359.

122. Siegrist CA. (2001). Neonatal and early life vaccinology. Vaccine. 19:3331-3346.

123. Wallet MA, Sen P, Tisch R. (2005). Immunoregulation of dendritic cells. Clin Med Res. 3:166-175.

124. Shreedhar V, Moodycliffe AM, Ullrich SE, Bucana C, Kripke ML, Flores-Romo L. (1999). Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. Immunity. 11:625-636.

125. Kuwana M. (2002). Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. Hum Immunol. 63:1156-1163.

126. Lutz MB, Schuler G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol. 23:445-449.

127. Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. (2001). Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. J Exp Med. 193:5-9.

128. Marodi L, Goda K, Palicz A, Szabo G. (2001). Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN-gamma. Clin Exp Immunol. 126:456-460.

129. Marodi L. (2002). Deficient interferon-gamma receptor-mediated signaling in neonatal macrophages. Acta Paediatr Suppl. 91:117-119.

130. Chougnet C, Kovacs A, Baker R, Mueller BU, Luban NL, Liewehr DJ, Steinberg SM, Thomas EK, Shearer GM. (2000). Influence of human immunodeficiency virus-infected maternal environment on development of infant interleukin-12 production. J Infect Dis. 181:1590-1597.

131. Liu E, Tu W, Law HK, Lau YL. (2001). Decreased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. Br J Haematol. 113:240-246.

132. Goriely S, Vincart B, Stordeur P, Vekemans J, Willems F, Goldman M, De Wit D. (2001). Deficient IL-12 (p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. J Immunol. 166:2141-2146.

133. Wong OH, Huang FP, Chiang AK. (2005). Differential responses of cord and adult blood-derived dendritic cells to dying cells. Immunology. 116:13-20.

134. Satwani P, Morris E, van de Ven C, Cairo MS. (2005). Dysregulation of expression of immunoregulatory and cytokine genes and its association with the immaturity in neonatal phagocytic and cellular immunity. Biol Neonate. 88:214-227.

135. Iwasaki A, Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol. 5:987-995.

136. Cederblad B, Riesenfeld T, Alm GV. (1990). Deficient herpes simplex virus-induced interferon-alpha production by blood leukocytes of preterm and term newborn infants. Pediatr Res. 27:7-10.

137. Neustock P, Kruse A, Bock S, Pierre B, Kirchner H. (1993). Deficient interferon-alpha response of newborns in comparison to adults. Lymphokine Cytokine Res. 12:109-114.

138. Ueda Y, Hagihara M, Okamoto A, Higuchi A, Tanabe A, Hirabayashi K, Izumi S, Makino T, Kato S, Hotta T. (2003). Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. Hum Immunol. 64:1144-1151.

139. Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. Nat Rev Immunol. 5:532-545.

140. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. J Exp Med. 184:747-752.

141. Gavin M, Rudensky A. (2003). Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. Curr Opin Immunol. 15:690-696.

142. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. (2003). The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. J Leukoc Biol. 74:471-478.

143. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat Immunol. 4:1206-1212.

144. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. J Immunol. 172:4100-4110.

145. Cederbom L, Hall H, Ivars F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. Eur J Immunol. 30:1538-1543.

146. Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA. (2006). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. Nat Immunol. 7:83-92.

147. Saito S, Sasaki Y, Sakai M. (2005). CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. J Reprod Immunol. 65:111-120.

148. Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. (2003). Phenotypic characterization of human decidual macrophages. Clin Exp Immunol. 131:498-505.

149. Mellor AL, Munn DH. (2001). Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti- fetal immune responses. J Reprod Immunol. 52:5-13.

150. Santoso DI, Rogers P, Wallace EM, Manuelpillai U, Walker D, Subakir SB. (2002). Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae. Placenta. 23:373-379.

151. Honig A, Rieger L, Kapp M, Sutterlin M, Dietl J, Kammerer U. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. J Reprod Immunol. 61:79-86.

152. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, Nakayama H, Sakaguchi S, Hara T. (2004). CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. Exp Hematol. 32:622-629.

153. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB. (2005). Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. Blood. 105:750-758.

154. Wing K, Larsson P, Sandstrom K, Lundin SB, Suri-Payer E, Rudin A. (2005). CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses. Immunology. 115:516-525.

155. Thornton CA, Upham JW, Wikstrom ME, Holt BJ, White GP, Sharp MJ, Sly PD, Holt PG. (2004). Functional maturation of CD4+CD25+CTLA4+CD45RA+ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens. J Immunol. 173:3084-3092.

156. Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA et al. (1995). Endogenous production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. J Clin Invest. 96:2578-82.

157. Trinchieri G, Perussia B. (1985). Immune interferon: a pleiotrophic lymphokine with multiple effects. Immunol Today. 6:131-136.

158. Su HC, Cousens LP, Fast LD et al. (1998). CD4+ and CD8+ T cell interactions in IFN-gamma and IL-4 responses to viral infections: requirements for IL-2. J Immunol. 160:5007-5017.

159. Neckers LM, Cossman J. (1983). Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. Proc Natl Acad Sci. 80:3494-3498.

160. Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P. (2000). Surface and intracellular IL-2 receptor expression on various resting and activated populations in human peripheral blood. Scand J Immunol. 51:67-72.

161. Spencer SJ, Galic MA, Pittman QJ. (2011). Neonatal programming of innate immune function. Am J Physiol Endocrinol Metab. 300:8-11.

162. Sato K, Fujita S. (2007). Dendritic cells: nature and classification. Allergol Int. 56:183-191.

163. Navarrete CV, Gómez J, Borràs FE. (2003). Cord blood dendritic cells: subsets, functional characteristics and in vitro generation. Leuk Lymphoma. 44:923-928.

164. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, Song Y, Jenmalm M, Gorman D, McClanahan T, Liu MR, Brown MH, Sedgwick JD, Phillips JH, Barclay AN. (2003). Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. J Immunol. 171:3034-3046.

165. Petroff MG, Kharatyan E, Torry DS, Holets L. (2005). The immunomodulatory proteins B7-DC, B7-H2, and B7-H3 are differentially expressed across gestation in the human placenta. Am J Pathol. 167:465-473.

166. Sica GL, Choi IH, Zhu G. (2003). B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. Immunity. 18:849-861.

167. Zou W, Chen L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 8:467-477.

168. Zhu G, Sica GL. (2003). Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family. J Immunol. 171:4650-4654.

169. Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, Jurd R, Rukavina D, Thomson AW, Klapp BF, Fernández N, Arck PC. (2007). Dendritic cells: key to fetal tolerance? Biol Reprod. 77:590-598.

170. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P. (2000). BDCA-2,BCDA-3 and BCDA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol. 165:6037-6046.

171. Gorczynski RM, Chen Z, Clark DA, Kai Y, Lee L, Nachman J, Wong S, Marsden P. (2004). Structural and functional heterogeneity in the CD200R family of immunoregulatory molecules and their expression at the feto-maternal interface. Am J Reprod Immunol. 52:147-163.

172. Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, Sugita S, Usui M, Goto H, Takeuchi M. (2008). Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. Exp Eye Res. 86:52-59.

173. Jonuleit H, Schmidtt E, Schuler G. (2000). Induction of interleukin 10-producing nonproliferating CD4 (+) T cell with regulatory properties by repetitive stimulation with allogenic immature human dendritic cells. J Exp Med. 192:1213-1222.

174. Mahnke K, Johnson TS, Ring S. (2007). Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: two way relationship. J Dermatol Sci. 46:159-167.

175. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J Exp Med. 194:769-779.

176. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. (1993). Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. J Immunol. 90:6586-6590.

177. Rueda CM1, Moreno-Fernandez ME1, Jackson CM1, Kallapur SG2, Jobe AH2, Chougnet CA1. (2015). Neonatal regulatory T cells have reduced capacity to suppress dendritic cell function. Eur J Immunol. 45:2582-2592.

178. Thornton CA1, Capristo CC, Power LL, Holloway J, Popplewell EJ, Diaper ND, Warner JO. (2003). The effect of labor on neonatal T-cell phenotype and function. Pediatr Res. 54:120-124.

179. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. Annu Rev Immunol. 19:565-594.

180. Wang S, Bajorath J, Flies DB, Dong H, Honjo T, Chen L. (2003). Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. J Exp Med. 197:1083-1091.

181. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif- carrying immunoreceptor. Immunity. 11:141-151.

182. Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, et al. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. Immunity. 13:95-105.

183. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. Nature. 397:263-266.

184. Tuettenberg A, Huter E, Hubo M, et al. (2009). The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. J Immunol. 182:3349-3356.

185. Wang S, Chen L. (2004). T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. Cell Mol Immunol. 1:37-42.

186. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat Immunol. 3:1097-1101.

187. Swartz KJ, During MJ, Freese A, Beal MF. (1990). Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors. J Neurosci. 10:2965-2973.

188. Vécsei L, Miller J, MacGarvey U, Beal MF. (1992). Kynurenine and probenecid inhibit pentylenetetrazol-induced and NMDA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain. Brain Res Bull. 28:233-238.

189. Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. (2013). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. Nat Rev Drug Discov. 12:64-82.

190. Mándi Y, Vécsei L. (2012). The kynurenine system and immunoregulation. J Neural Transm. 119:197-209.

191. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends Immunol. 24:242-248.

192. Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR. (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. J Neurochem. 56:2007-2017.

193. Toldi G, Vásárhelyi B, Biró E, Fügedi G, Rigó J Jr, Molvarec A. (2013). B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and preeclamptic women. Am J Reprod Immunol. 69:264-271.

194. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. (1999). Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. Clin Exp Immunol. 117:550-555.

195. Jin LP, Fan DX, Zhang T, Guo PF, Li DJ. (2011). The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal–fetal interface in human miscarriage. Am J Reprod Immunol. 66:270-278.

12 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Kumulatív impakt faktor: 5,594 Első szerzős cikk impakt faktor: 5,594

12.1 ÉRTEKEZÉS ANYAGÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. **Grozdics E**, Berta L, Gyarmati B, Veres G, Zádori D, Szalárdy L, Vécsei L, Tulassay T, Toldi G. (2014). B7 costimulation and intracellular indoleamine 2,3-dioxygenase expression in umbilical cord blood and adult peripheral blood. Biol Blood Marrow Transplant. 20:1659-1665. IF: 3,404
2. **Grozdics E**, Berta L, Bajnok A, Veres G, Ilisz I, Klivényi P, Rigó J Jr, Vécsei L, Tulassay T, Toldi G. (2014). B7 costimulation and intracellular indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression in peripheral blood of healthy pregnant and non-pregnant women. BMC Pregnancy Childbirth. 14:306. IF: 2,190
3. **Grozdics E**, Toldi G. (2014). Antigen presentation and T cell response in umbilical cord blood and adult peripheral blood. J Hematology Res. 1:16-26.

12.2 ÉRTEKEZÉS ANYAGÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. Orbán Cs, Bíró E, **Grozdics E**, Bajnok A, Toldi G. (2013). Modulation of T lymphocyte calcium influx patterns via the inhibition of Kv1.3 and IKCa1 potassium channels in autoimmune disorders. Front Immunol. 4:234.

13 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Három évvel ezelőtt kapcsolódtam be az I. számú Gyermekklinikán működő MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport munkájába. Köszönettel tartozom Tulassay Tivadar professzor úrnak és Szabó Attila professzor úrnak, amiért lehetőséget biztosítottak számomra, hogy csatlakozzak a kutatócsoporthoz. Külön köszönettel tartozom Vásárhelyi Barna professzor úrnak, aki a kezdetektől segítette munkámat.

Kutatómunkámat a kezdetektől irányítja témavezetőm, Toldi Gergely. Kimagasló eredményeivel, munkabírásával nemcsak példát mutatott, de ő tanított meg a tudományos gondolkodás alapjaira, az eredmények értelmezésére és a tudományos közlés technikájára is. Bevezetett az áramlási citométeres mérések és a laboratóriumi munka alapjaiba is. Hálás vagyok neki azért, hogy mindig készen állt arra, hogy tanácsokkal segítse kutatómunkámat.

Köszönöm továbbá kutatócsoportunk minden tagjának, különösen Berta Lászlónak és Bajnok Annának a hozzájárulást és a biztatást, amellyel munkánkat segítették.

Köszönetemet fejezem ki Rigó János professzor úrnak (I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika) és Gyarmati Béla főorvos úrnak (Uzsoki utcai Kórház), akik a várandós, illetve kzsv minták gyűjtésben nyújtottak segítséget.

Hálásan köszönöm Vécsei László professzor úr és munkatársai támogatását (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Neurológiai Klinika), akik a HPLC mérésekben nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget.

Végezetül ezúton szeretnék köszönetet mondani a vizsgálatban részt vevő önkénteseknek a vérmintákért, valamint az újszülöttek szüleinek, akik hozzájárultak a köldökzsinórvér felhasználásához.