

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Anna Škvorová

Vliv podávání progesteronu na T regulační buňky ve vztahu k předčasným porodům

The effect of progesteron administration on T regulatory cells in relation to preterm deliveries

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.
Konzultant: MUDr. Michal Koucký, Ph.D.

Praha 2019

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost a celému týmu laboratoře Obecné imunologie na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN v Praze za výuku, spolupráci a přátelskou podporu po celou dobu mého studia. Zvláště děkuji MUDr. Mgr. Viktoru Černému.

Děkuji konzultantovi MUDr. Michalu Kouckému, Ph.D. za získávání vzorků, zařazování žen do výzkumu a neutuchající snahu propojovat výzkum s klinickou praxí. Děkuji všem pracovníkům VFN v Praze, kteří se podíleli na získávání a předávání vzorků.

Děkuji všem ženám, které pro tuto práci darovaly vzorek své krve.

Děkuji svým přátelům, rodičům a partnerovi za poskytnuté zázemí a podporu při studiu a vypracování této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2019

Anna Škvorová

Abstrakt

Během těhotenství se mateřský organismus musí vypořádat s přítomností cizorodých paternálních antigenů, umožnit a podporovat v sobě vývoj semialogenního plodu, a přitom zachovat svou obranyschopnost vůči patogenům. Tento stav umožňuje dynamická rovnováha komplexních imuno-endokrinních interakcí. Na tolerogenním nastavení mateřského organismu v těhotenství se podílí množství buněk se specifickými vlastnostmi. Velmi významnou je populace T regulačních lymfocytů (Treg). Množství Treg v průběhu těhotenství fyziologicky stoupá a jejich pokles je spojen s porodem termínovým i předčasným. Předčasný porod představuje závažný socioekonomický problém, který se celosvětově týká přibližně 10 % porodů. V případě zvýšeného rizika předčasného porodu se v klinické praxi s úspěchem využívá podávání progesteronu. Jednou z hypotéz je, že progesteron indukuje zvýšení populace Treg a touto cestou oddaluje předčasný porod.

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv progesteronové terapie *in vivo* na množství a funkční vlastnosti $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^{+/-}$ Treg a ověřit, zda dlouhodobé vaginální podávání progesteronu pozitivně koreluje se zvýšením počtu Treg. Dalším cílem bylo zjistit, zda progesteron podporuje vznik Treg a tvorbu imunoregulačních cytokinů *in vitro*.

Hlavní použitou metodou je průtoková cytometrie. Analyzovány byly vzorky získané opakovanými odběry periferní krve těhotných žen s vysokým rizikem předčasného porodu, kterým lékař indikoval užívání progesteronu. Neméně významnou částí práce byla kultivace frakce mononukleárních leukocytů izolované z krve zdravých netěhotných žen s progesteronem *in vitro*. Koncentrace cytokinů (TGF- β , transformující růstový faktor β a IL-10, interleukin 10) byla detekována ve vzorcích krevní plazmy i v supernatantech buněčných kultur pomocí metody ELISA.

Vliv progesteronové terapie na zvýšení počtu Treg ani schopnost progesteronu indukovat Treg *in vitro* se nepodařilo prokázat. Nelze vyloučit, že progesteron ovlivňuje funkční vlastnosti Treg (expresi molekul s regulačními vlastnostmi). Jedním z hlavních limitů práce je nedostatek vzorků periferní krve těhotných žen, především pak nedostatek opakovaných odběrů důležitých pro sledování dynamiky Treg jednotlivých žen. Je také možné, že progesteron oddaluje předčasný porod jinými cestami nezávislými na Treg.

Klíčová slova:

T regulační lymfocyty, progesteron, předčasný porod, FoxP3, Helios, IL-10, TGF- β

Abstract

During pregnancy, the maternal organism has to cope with the presence of foreign paternal antigens, allow and support the development of a semiallogenic fetus, while maintaining its defense against pathogens. This condition is achieved by a dynamic balance of complex immuno-endocrine interactions. A number of cells with specific properties contributes to the tolerogenic setting during pregnancy. Very important role plays the population of T regulatory lymphocytes (Treg). Treg levels increase physiologically during pregnancy and their decline is associated with term and preterm labor. Premature birth is a serious socio-economic problem, affecting around 10 % of births worldwide. In the case of increased risk of premature labor, progesterone administration has been successfully used in clinical practice. One hypothesis says that progesterone induces an increase in Treg population and delays premature labor in this way.

The aim of the thesis was to monitor the effect of progesterone therapy *in vivo* on the amount and functional properties of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios^{+/-} Treg and to verify whether long-term vaginal administration of progesterone positively correlates with an increase in Treg counts. Another goal was to determine whether progesterone promotes Treg generation and the production of immunoregulatory cytokines *in vitro*.

The main method used is flow cytometry. The samples obtained by repeated collection of peripheral blood of pregnant women at high risk of premature birth, where the doctor indicated the use of progesterone, were analyzed. An equally important part of this study was the cultivation of a mononuclear cell fraction isolated from the blood of healthy non-pregnant women with progesterone *in vitro*. Cytokine concentrations (TGF- β , transforming growth factor β and IL-10, interleukin 10) were detected in both blood plasma and cell culture supernatants by ELISA.

The effect of progesterone therapy on Treg increase and progesterone's ability to induce Treg *in vitro* have not been demonstrated. It cannot be excluded that progesterone affects the functional properties of Treg (expression of molecules with regulatory properties). One of the main limitations of the study was an inability to obtain sufficient number of peripheral blood samples of pregnant women, especially in the case of repeated donations. These are important for monitoring the dynamics of Treg in individual women. It is also possible that progesterone postpones premature birth by other mechanisms independent on Treg.

Keywords: regulatory T cells, progesterone, preterm labor, FoxP3, Helios, IL-10, TGF- β

Obsah

Seznam zkratk	1
1 Úvod	1
2 Současný stav poznání	2
2.1 Imunologie těhotenství	2
2.1.1 Fetomaternální rozhraní	2
2.1.2 Mechanismy tolerance	6
2.2 T regulační lymfocyty	10
2.2.1 T regulační lymfocyty v reprodukci	12
2.3 Předčasný porod	17
2.4 Progesteron	20
2.5 Vliv progesteronu na T regulační lymfocyty	24
2.6 Progesteronová terapie při riziku předčasného porodu	25
3 Cíle práce	28
4 Materiál a metody	29
4.1 Materiál	29
4.1.1 Roztoky	29
4.1.2 Reagencie, kity, chemikálie	29
4.1.3 Spotřební materiál	30
4.1.4 Použité přístroje	30
4.1.5 Použitý software	31
4.2 Metody	31
4.2.1 Schéma experimentu	31
4.2.2 Kritéria výběru dárkyň a odběr vzorků	33
4.2.3 Izolace frakce mononukleárních leukocytů	35
4.2.4 Kultivace <i>in vitro</i>	36
4.2.5 Průtoková cytometrie	37
4.2.6 Průtoková cytometrie – detekce procentuálního zastoupení Treg	39
4.2.7 Průtoková cytometrie – detekce absolutního zastoupení Treg	41
4.2.8 ELISA	44
5 Výsledky	47
5.1 Stanovení Treg v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie	47
5.1.1. Dynamika Treg u žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu	47
5.1.2. Dynamika Treg u žen s nízkým rizikem předčasného porodu	49

5.1.3 Porovnání Treg v periferní krvi rizikových a nízkorizikových žen	51
5.2 Schopnost progesteronu indukovat Treg <i>in vitro</i>	53
5.2.1 Vývoj metodiky.....	53
5.2.2 Závěrečný experiment.....	57
5.3 Stanovení cytokinů s regulační funkcí metodou ELISA.....	60
5.3.1 Stanovení IL-10 a TGF- β v krevní plazmě rizikových a nízkorizikových žen	60
5.3.2 Stanovení IL-10 a TGF- β v supernatantech buněčných kultur	62
5.4 Korelace výsledků s klinickými údaji	63
6 Diskuse	66
7 Závěr.....	74
8 Literatura.....	75

Seznam zkratek

APC – antigen presenting cells, antigen prezentující buňky

BSA – bovine serum albumin, hovězí sérový albumin

CD – cluster of differentiation

DC – dendritic cells, dendritické buňky

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid, ethylendiamintetraoctová kyselina

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FBS – fetal bovine serum, fetální telecí sérum

FoxP3 – forkhead box P3

FSB – Flow cytometry Staining Buffer

FSC – forward scatter, přímý rozptyl

GFP – green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein

GR – glucocorticoid receptor, glukokortikoidový receptor

hCG – human chorionic gonadotropin, lidský choriový gonadotropin

HLA – human leukocyte antigen

IDO – indolamin 2,3 dioxygenáza, indoleamine 2,3dioxygenase

IFN- γ – interferon γ

IL – interleukin

iTreg – induced Treg, indukované T regulační lymfocyty

IUGR – intrauterine growth restriction, intrauterinní růstová restrikce

MHC – major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

mPR – membrane progesterone receptor, membránový progesteronový receptor

NICE – National Institute for Health and Care Excellence

NK – natural killer cells, NK buňky

NKT – natural killer T cells, NKT lymfocyty

nPR – nuclear progesterone receptor, jaderný membránový receptor

nTreg – natural Treg, přirozené T regulační lymfocyty

PBMC – peripheral blood mononuclear cells, mononukleární buňky periferní krve

PBS – phosphate buffered saline, fyziologický roztok pufovaný fosfáty

PD-1 – programmed cell death 1

PDL-1 – programmed cell death 1 ligand

PGRMC – progesterone receptor membrane component

PIBF – progesterone induced blocking factor

pPROM – preterm prelabour rupture of membranes, předčasný odtok vody plodové před termínem porodu

rh – recombinant human, rekombinantní lidský

RU-486 – mifepriston

SSC – side scatter, boční rozptyl

TGF- β – transforming growth factor β , transformující růstový faktor β

Th – helper T cells, pomocné T lymfocyty

TNF- α – tumor necrosis factor α

Treg – regulatory T cells, T regulační lymfocyty

tt – týden těhotenství

uNK – uterine natural killer cells, děložní NK buňky

WHO – World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

1 Úvod

Těhotenství představuje imunologicky velmi specifický stav, během kterého se uvnitř matčina těla vyvíjí plod, který je semialogenní, v případě náhradního mateřství nebo použití darovaných vajíček dokonce alogenní. Buňky a tkáně vyvíjející se z oplozeného vajíčka produkují cizí paternální antigeny, plod není však odhojen, je naopak vyživován a chráněn. Přitom imunitní reakce v těhotenství nemohou být potlačeny na úkor obranyschopnosti mateřského organismu. Růst plodu je regulován, nedochází ani k toleranci antigenů plodu obecně, to by vedlo k poškození tkání matky imunokompetentními buňkami plodu. Jedná se o toleranci pouze v kontextu těhotenství, tzv. fetomaternální toleranci.

Úspěšnou reprodukci umožňuje rovnováha komplexních imuno-endokrinních interakcí. Lokálně (intrauterinně) i v celém těle se na tolerogenním nastavení v těhotenství podílí množství buněk se specifickými vlastnostmi. Th1/Th2/Th17/Treg paradigma popisuje posun od prozánětlivých imunitních reakcí důležitých během implantace blastocysty, směrem k tolerogennímu prostředí v průběhu těhotenství až k porodu, který se dá charakterizovat opět jako druh zánětlivého procesu. Porucha těchto procesů souvisí s různými patologiemi reprodukce od poruch plodnosti až po předčasný porod.

Předčasný porod je závažný a aktuální problém, se kterým se potýkají rozvojové i rozvinuté země světa. Neznáme spolehlivý znak umožňující včas diagnostikovat blížící se předčasný porod, ani způsob, jak předčasný porod zastavit či dostatečně spolehlivě oddálit. Zvýšené riziko předčasného porodu se stanovuje na základě zkrácení děložního hrdla anebo dalších příznaků a běžnou terapií při tomto riziku je vaginální podávání progesteronu.

Progesteron je jeden z hlavních hormonů ženského reprodukčního cyklu a hlavní hormon působící přestavbu tkání a další změny v těhotenství. Přípravuje děložní sliznici na implantaci blastocysty, spouští diferenciaci stromálních buněk v deciduální (decidualizaci), stabilizuje interakce plodu s dělohou. Bylo popsáno mnoho cest, kterými působí na imunitní buňky a zvyšuje zastoupení jejich tolerogenních fenotypů. Jednou z hypotéz je, že způsobuje zvýšení populace T regulačních lymfocytů (Treg) a tímto způsobem oddaluje předčasný porod.

Treg působí na ostatní buňky nejen fetomaternálního rozhraní a pomáhají navozovat specifické cytokinové prostředí. V toleranci těhotenství hrají klíčovou roli, i krátkodobý pokles hladiny Treg je spojen s předčasným porodem. Studie věnující se dynamice Treg v těhotenství

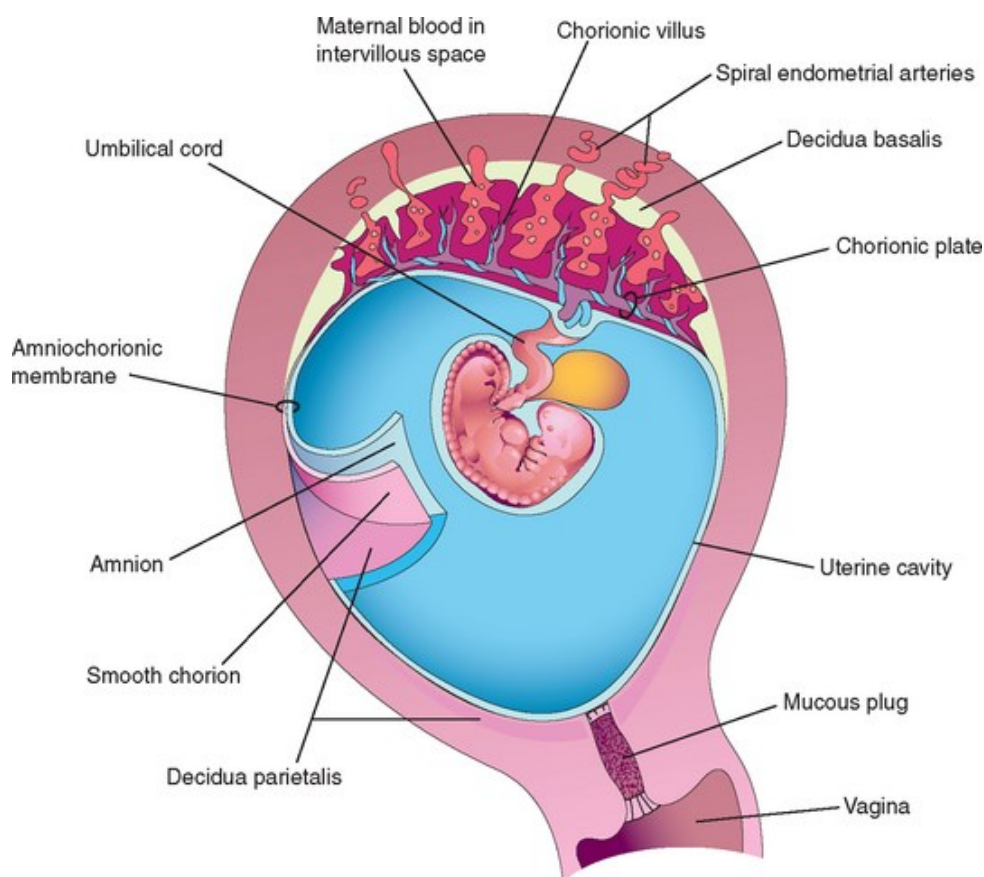
a mechanismům působení progesteronu jsou rozporuplné a není dosud dostatek klinických studií *in vivo*. Problematika interakce progesteronu a Treg v těhotenství vyžaduje další výzkum.

2 Současný stav poznání

2.1 Imunologie těhotenství

2.1.1 Fetomaternální rozhraní

V těhotenství se vyvíjí dvě základní skupiny buněk semialogenního původu: embryoblast, ze kterého se později vyvíjí vlastní plod, a trofoblast, vnější masa buněk, ze které vznikají plodové obaly a velká část placenty. Hranice mezi tkáněmi matky a tkáněmi plodu neboli fetomaternální rozhraní, je tvořeno děložní sliznicí a trofoblastem, z jehož části vznikají na sebe přiléhající plodové obaly – vnější chorion a vnitřní amnion. Amniochoriová membrána je v těsném anatomickém a funkčním kontaktu s děložní sliznicí (viz obr. 1).



Obrázek 1: Plod, placenta a plodové obaly v kontaktu s děložní sliznicí. Choriové klky pronikají hluboko do sliznice a jsou omývány mateřskou krví uvolněnou ze spirálních arterií. Převzato z: (Moore et al., 2019)

Děložní sliznice v těhotenství (a také na konci sekreční fáze menstruačního cyklu) má specifické vlastnosti a nazývá se decidua. Decidua je tvořena velkými polyedrickými

(mnohostěnnými) deciduálními buňkami, zajišťuje výměnu plynů, živin a zplodin a po porodu se odlučuje. V místě implantace blastocysty a invaze trofoblastu do děložní stěny později vzniká placenta. Je tvořena částí decidui zvanou decidua basalis a chorionem, který v tomto místě vytváří choriové klky (Cunningham et al., 2014).

Nedochází k mísení krevních oběhů, ale plod savců není od těla matky zcela izolován. Přes fetomaternální rozhraní mohou obousměrně procházet nejen alogenní antigeny, ale i celé buňky, které jsou schopny v druhém organismu následně dlouhodobě přežít (Ebrahim and Leach, 2016).

Řada experimentů ukazuje, že fetální buňky v těle matky migrují do míst, kde se vyskytuje patologie, mají schopnost diferencovat do daného buněčného typu a tuto tkáň reparovat. Nejčastěji se jedná o myší/kryší modely, s využitím samce homozygotního pro GFP (green fluorescent protein). Fluorescenční fetální buňky se poté nachází s nejvyšší koncentrací právě v místě experimentálního poškození březí samice. Diferencují např. do kardiomyocytů, což je pozorováno i u lidí. Fetální kmenové buňky se vyplavují do krve nedlouho po početí a usídlují se v mnoha různých orgánech, překonávají i hematoencefalickou bariéru a mohou v mozku dlouhodobě přetrvávat. Vzniká tak chimérismus feto-maternální, maternálně-fetální (včetně buněk případných předchozích dětí/embryí, sourozenců matky) případně fetálně-fetální (i z buněk zaniklého dvojčete). Zdá se, že jistý stupeň feto-maternálního chimérismu je nutný pro úspěšné těhotenství, neboť pomáhá navodit toleranci plodu, naopak pokud je fetálních buněk v těle matky příliš mnoho, zvyšuje se po porodu riziko rozvoje autoimunity (Boddy et al., 2015).

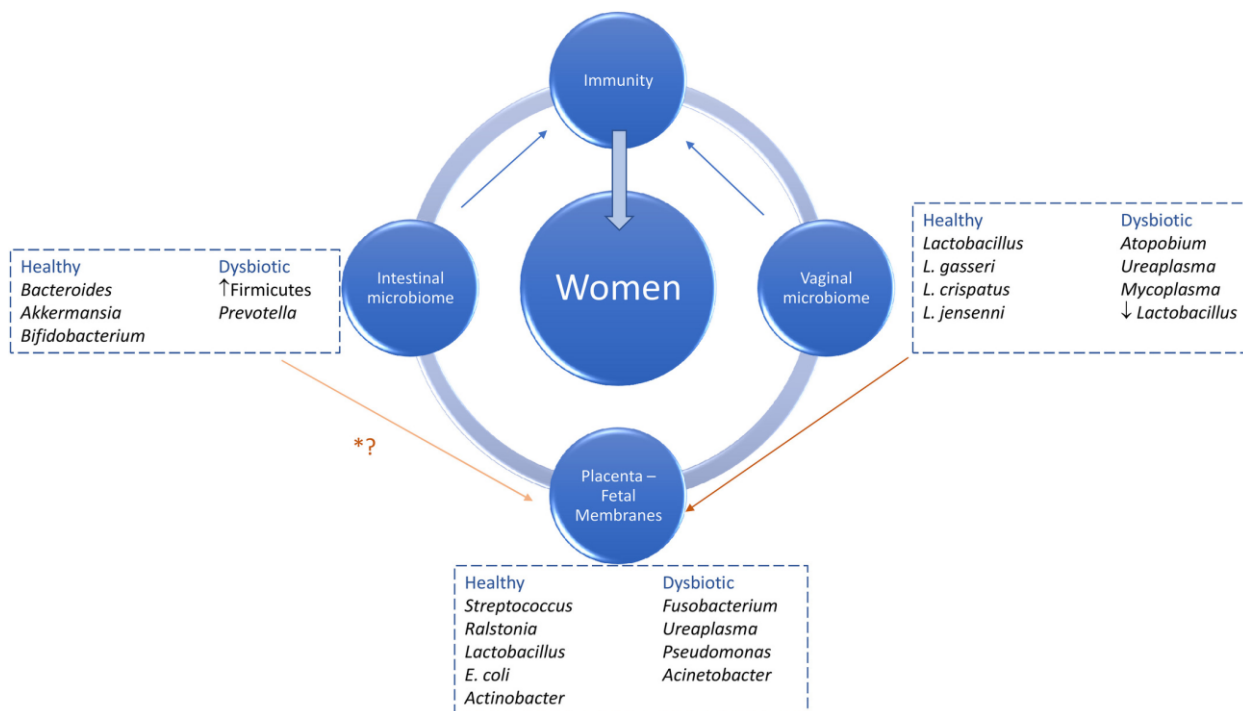
Zároveň intrauterinní prostředí není sterilní, jak se dlouho předpokládalo, placenta a děložní sliznice jsou osídleny svou specifickou mikrobiotou i během fyziologického těhotenství. Její složení je změněné (dysbióza) u různých patologií těhotenství. Zánět plodových obalů a placenty (chorioamnionitida) je spojen s výrazným rizikem potratu či předčasného porodu a zvýšenou morbiditou a mortalitou dětí i matek. Všechny faktory vedoucí ke vzniku tohoto zánětu však ještě nejsou dostatečně známy, změněné složení mikrobioty bylo identifikováno i u žen s fyziologickým těhotenstvím rodičích v termínu (Pelzer et al., 2017).

Vaginální, děložní i střevní mikrobiota ženy se mění v závislosti na gestačním stáří a vlivech vnějšího prostředí. Vaginální mikrobiotu zdravých žen v reprodukčním věku tvoří především bakterie rodu *Lactobacillus* (zhruba z 85 %), které vytváří kyselé pH (mezi 3,5 a 4,5)

a hrají klíčovou roli v ochraně proti patogenům. Stabilita a množství bakterií rodu *Lactobacillus* je ovlivněna hormonálně a mění se během menstruačního cyklu. Estrogen způsobuje uvolňování glykogenu, jehož produkty tyto bakterie použijí ve fermentačním procesu k vytváření kyseliny mléčné a udržování nízkého pH. Placenta produkuje množství estrogenu, což vede ke zvýšení populace rodu *Lactobacillus* ve vaginální mikrobiotě v těhotenství, zastoupení jednotlivých druhů se však mění. Častá je také přítomnost *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*. Jako riziková dysbióza se projevuje zvýšení bakterií *Mycoplasma* a *Ureaplasma* (Taddei et al., 2018).

Hormonální a imunologické faktory proměňují během těhotenství také složení střevní mikrobioty. Střevní mikrobiota souvisí se zdravým průběhem těhotenství. Např. zvýšení počtu mikroorganismů produkujících butyrát v počátku těhotenství může přispívat ke zvýšení počtu T regulačních lymfocytů, a tím se podílet na ochraně plodu před maternální rejekcí. Výraznější změny ve složení nastávají během třetího trimestru. Vyšší množství bakterií *Actinobacteria* a *Proteobacteria Phyla* v tomto trimestru odpovídají také mikrobiotám, které se vyskytují u obézních jedinců. Metabolické změny pozorované u žen během zdravého těhotenství jsou velmi podobné změnám u pacientů s metabolickým syndromem (vysoká adipozita, zvýšení hmotnosti a inzulínové rezistence). Nízká diverzita a dysbióza střevního mikrobiomu může vést k produkci prozánětlivých markerů a podílet se na patologiích těhotenství včetně předčasného porodu. S předčasným porodem je spojeno např. snížené množství bakterií *Bifidobacterium* a *Streptococcus* (Dahl et al., 2017).

Několik nedávných studií popisuje bakteriální kolonizaci placenty, plodových obalů, plodové vody i mekonie (první stolice plodu/dítěte). Složení intrauterinní mikrobioty se u zdravého těhotenství podobá mikrobiotě vaginální a orální. Předpokládá se přenos mikrobioty ze střev (viz obr. 2). Většina studií věnující se mikrobiotě v těhotenství se zaměřuje na souvislost s předčasným porodem. Předčasný porod je dáván do asociace s výskytem bakterií *Ureaplasma*, *Megaesphaera phylotype*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* aj. Ukazují se ale také etnické rozdíly ve složení mikrobioty předčasně rodících žen (Taddei et al., 2018).



Obrázek 2: Znázornění vztahů v rámci maternálního mikrobiomu. Současné poznatky o zdravém, resp. dysbiotickém osídlení střev, pochvy a děložní dutiny v těhotenství. Do dělohy se dostávají bakterie z mikrobioty vaginální a velmi pravděpodobně také střevní. Převzato z Taddei et al., 2018.

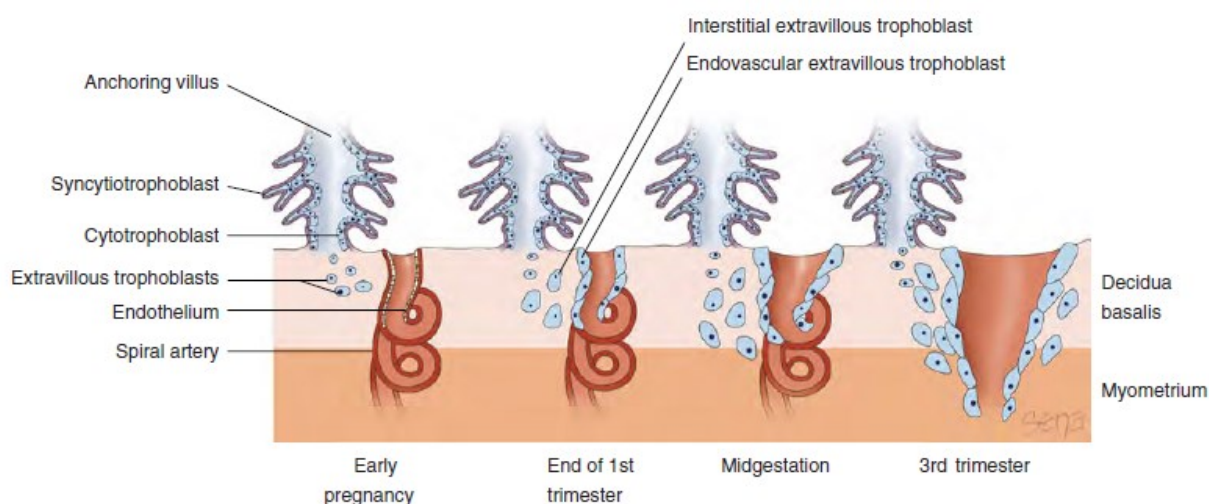
Intrauterinní mikrobiota zasluhuje další výzkum. Někteří autoři zpochybňují fyziologickou intrauterinní přítomnost bakterií nebo jejich životnost. Poukazují na možnosti kontaminace vzorků a nedostatečnou kontrolu kontaminace, použití molekulárních metod s nedostatečným detekčním limitem pro studium mikrobiálních populací s nízkou biomasou, rozdíly mezi dětmi narozenými vaginálně a císařským řezem, mechanismy bránící průniku bakterií deciduu a chybnou interpretaci dat (Lauder et al., 2016; Perez-Muñoz et al., 2017).

Během těhotenství můžeme nejen na fetomaternálním rozhraní rozlišit tři fáze: prozánětlivou implantaci, decidualizaci a začátek placentace, protizánětlivou homeostázu druhého a třetího trimestru a porod opět jako zánětlivý proces. Množství, lokalizace a především vlastnosti imunitních buněk se v průběhu těhotenství a porodu výrazně mění (Gomez-Lopez et al., 2014; Keelan, 2018).

Decidua obsahuje mnoho různých typů buněk, její složení se liší v závislosti na stádiu těhotenství. Je tvořena stromálními deciduálními buňkami, které vznikly diferenciací buněk endometria (slizniční vrstva dělohy), je výrazně osídlena leukocyty a velká část důležitých imunologických jevů se odehrává právě zde. Více než 30 % buněk decidui exprimuje společný leukocytární antigen CD45. Hlavními populacemi leukocytů v decidui jsou:

uNK (uterinní NK buňky), makrofágy, dendritické buňky a T lymfocyty. Většina leukocytů v decidui má odlišné vlastnosti – jsou více tolerogenní (Chen et al., 2012).

U lidí dochází k hlubokému pronikání trofoblastu do děložní stěny. Jedná se o tzv. hemochoriální typ placentace, u kterého choriové klky placenty rozrušují endotel cév mateřského organismu a jsou přímo omývány mateřskou krví. To umožňuje výměnu plynů a živin s fetální krví v kapilárách ve středu choriových klků. Invazivní extravilózní (tj. v prostoru mimo choriové klky) buňky trofoblastu v průběhu těhotenství transformují spirální arterie tak, aby byl zajištěn plynulý tok krve s nízkým odporem. Extravilózní buňky trofoblastu pronikají do děložní stěny, přes endometrium až do myometria (střední – svalová vrstva děložní stěny; viz obr. 3) a jsou v těsném kontaktu s maternálními imunitními buňkami. Nedostatečná invaze trofoblastu vede k nízkému průtoku krve placentou, intrauterinním růstovým retardacím (IUGR, intrauterine growth restriction) a hypoxii plodu. Tímto způsobem je nejčastěji vysvětlována etiologie preeklampsie, postihující druhy s hemochoriální placentací (Burton and Fowden, 2015; Cunningham et al., 2014).



Obrázek 3: Extravilózní trofoblast. Buňky extravilózního trofoblastu pronikají do tkání dělohy a transformují spirální arterie v průběhu těhotenství tak, aby vznikl tok krve s nízkým odporem. Převzato z: (Cunningham et al., 2014)

2.1.2 Mechanismy tolerance

Zdárný průběh těhotenství vyžaduje pozoruhodnou rovnováhu imunologické reaktivity a tolerance, ta je zajištěna mnoha různými způsoby na straně trofoblastu, matky i plodu.

V přímém kontaktu s maternálními tkáněmi jsou především buňky trofoblastu. Trofoblast představuje imunoprivilegovanou tkáň. Má pozoruhodně neutrální antigenní identitu, specifickou expresi HLA (human leukocyte antigen) a schopnost vyhýbat

se cytotoxické aktivitě NK (natural killer) buněk. Buňky lidského trofoblastu exprimují jednu molekulu z klasických MHC (major histocompatibility complex) Ia molekul (HLA-C) a všechny tři molekuly z neklasických molekul MHC Ib (HLA-E, -F, a -G). Exprese klasických MHC molekul I. třídy HLA-A a -B buňkami trofoblastu by vedla k rychlé reakci maternálních T lymfocytů na cizí antigeny, absence molekul MHC I. třídy by vedla k aktivaci maternálních NK. Neklasické MHC Ib zabraňují aktivaci T lymfocytů a inhibují cytotoxickou aktivitu NK (Chen et al., 2012).

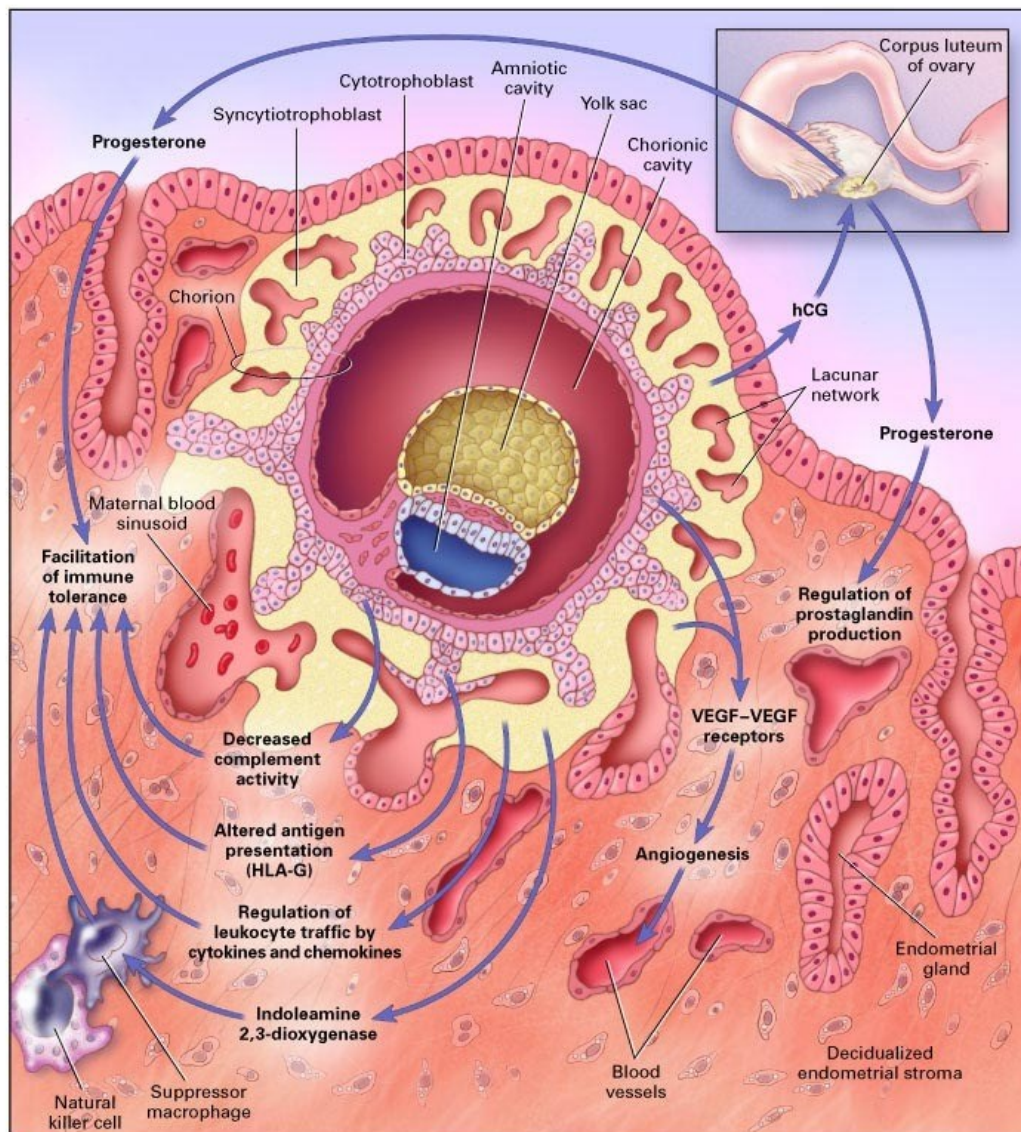
Interakce mezi HLA-C a NK pravděpodobně usnadňují invazi trofoblastu do maternální tkáně. Gen HLA-C je mírně polymorfní a mohl by stimulovat maternální reakci proti plodu. Pokud plod nese odlišnou alelu HLA-C, během těhotenství se skutečně zvyšuje procento aktivovaných T lymfocytů v deciduální tkáni. Zároveň se během těhotenství při neshodném HLA-C zvyšuje množství Treg, ve srovnání s těhotenstvími s odpovídajícím HLA-C. To naznačuje, že deciduální T buňky specificky rozpoznávají fetální HLA-C, ale destruktivní imunitní odpovědi brání Treg a další mechanismy. Alelické rozdíly na HLA-C lokusu podle všeho nejsou faktorem přispívajícím k potratům/předčasným porodům (Tilburgs et al., 2009).

HLA-G je na fetomaternálním rozhraní exprimován v mnoha izoformách, jeho volné formy jsou přítomny také v plodové vodě a krevním oběhu matky, ovlivňuje široké množství buněk. Potlačuje proliferaci a cytotoxicitu NK, jejich migraci a produkci IFN γ (interferon γ). Po vazbě na HLA-G na povrchu buněk trofoblastu se spustí diferenciací NK v tolerogenní tzv. uterinní NK (uNK, uterine natural killer). U cytotoxických T lymfocytů HLA-G snižuje produkci molekuly CD8 a může vyvolat i jejich apoptózu. U pomocných T lymfocytů (Th, helper T cells) snižuje proliferaci a indukuje vznik tolerogenního fenotypu. HLA-G inaktivuje také dendritické buňky (DC, dendritic cells) a ovlivňuje cytokinovou produkci, např. stimuluje produkci TGF- β (transforming growth factor β) u monocytů (Hunt et al., 2006) i cytokinu IL-10 (interleukin 10), který potlačuje aloreaktivitu (Norwitz et al., 2001).

Buňky trofoblastu v prvním trimestru těhotenství exprimují cytoplazmatickou formu Fas ligandu, který konstitutivně uvolňuje a působí tím apoptózu efektorových T lymfocytů (Abrahams et al., 2004).

Zdá se, že trofoblast i buňky decidui produkují také enzym IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), který odbourává tryptofan a tím brání aktivaci T lymfocytů (Chang et al., 2018). Pro úspěšnou implantaci blastocysty jsou významné procesy angiogeneze a diferenciací trofoblastu. Tyto procesy jsou řízeny progesteronem a významně se na nich podílí imunitní

system (viz obr. 4), především IL-1 a 6 (IL, interleukin), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor), placentární růstový faktor (PGF, placental growth factor), leukemický inhibiční faktor (LIF, leukemia inhibitory factor), heparin vázající epidermální růstový faktor (HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor) a TGF- β (Norwitz et al., 2001).



Obrázek 4: Proces implantace embrya zhruba 14 dní po koncepci. Syncytiotrofoblast produkuje hCG (human chorionic gonadotropin), ten stimuluje produkci progesteronu žlutým tělískem a progesteron řídí procesy angiogeneze. Cytotrofoblast prorůstá do tkáně a svou specifickou antigenní prezentací, produkcí indolamin dioxygenázy a cytokinovou produkcí vytváří tolerogenní prostředí. Převzato z (Norwitz et al., 2001).

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, HLA-G – lidský leukocytární antigen

Mechanismy tolerance na straně matky

Především pod vlivem progesteronu a dalších hormonů se mění množství a vlastnosti imunitních buněk mateřského organismu a produkce cytokinů a chemokinů nejen imunitními buňkami. Změny probíhají již v rámci menstruačního cyklu. V období ovulace se v děloze začíná koncentrovat množství imunitních buněk s tolerogenním fenotypem a pokud dojde k oplodnění a těhotenství, jejich hladiny dále stoupají. Naproti tomu aktivita většiny efektorových leukocytů je potlačena, a to zejména lokálně v děloze (Schumacher et al., 2014).

uNK jsou nejčtenější z leukocytů v decidui v ranném těhotenství. Oproti klasickým NK, jejichž hladina v periferní krvi v těhotenství klesá, nevykazují cytotoxickou aktivitu. Regulují pronikání trofoblastu do decidui a remodelaci spirálních arterií.

Další výraznou populací v decidui jsou makrofágy. Tyto makrofágy vykazují tolerogenní M2 fenotyp, mimo jiné mají sníženou produkci IL-12, zvýšenou produkci antagonisty IL-1 a arginázy, která brání syntéze oxidu dusnatého (Chen et al., 2012).

Tolerogenní vlastnosti v decidui mají i DC, někdy také nazývané jako uterinní či deciduální. Část této populace tvoří DC nezralé nebo jen částečně zralé, část produkuje vysoké hladiny IL-10 (DC-10 cells). Vyvolávají aktivaci a proliferaci Treg a Treg udržují tolerogenní fenotyp DC. Interakce DC a Treg jsou tedy vzájemné, což je v síti imunologických reakcí v těhotenství typické (Ghaebi et al., 2017).

Významnou roli v těhotenství hrají T lymfocyty, lokálně i v rámci celého organismu. Pomocné T lymfocyty mají několik podskupin odlišných vlastností, důležitou roli hrají Th1 a Th2 lymfocyty. Th1 lymfocyty produkují IL-2 a IFN- γ a aktivují buněčný typ imunitní reakce, Th2 lymfocyty produkující IL-4, IL-5 a IL-13, jsou součástí humorální odpovědi. Th1 a Th2 směřování imunitní reakce jsou vzájemně v opozici, cytokiny produkované Th1 inhibují Th2 a naopak. Ve zdravém organismu jsou oba typy v rovnováze. V 80. a 90. letech byla maternální tolerance v těhotenství vysvětlována dominancí Th2 odpovědi nad Th1 odpovědí, tzv. Th1/Th2 paradigmatickým. Ve fyziologickém těhotenství je Th2 skutečně predominantním typem odpovědi (vlivem progesteronu), ovšem k vysvětlení tolerance těhotenství toto paradigma není dostačující, proto bylo rozšířeno na **Th1/Th2/Th17/Treg paradigma**. Th17 produkují prozánětlivý IL-17 a ve fyziologické graviditě jejich množství v periferní krvi klesá, zatímco hladina Treg stoupá. Převaha Th1 či Th17 a nedostatek Th2 či Treg jsou spojeny s preeklampsií, předčasným porodem a dalšími patologiemi (Saito et al., 2010). Na Treg se zaměřuji v další kapitole.

Th1/Th2/Th17/Treg paradigma neplatí bez výhrad. Th1/Th2 rovnováha je dynamická, během implantace blastocysty v počátku těhotenství převažuje Th1 prozánětlivý profil, užitečný při remodelaci cév. Th1 odpověď převažuje také v období porodu (Mor et al., 2011). Překvapivé vyšší množství Th17 v děloze oproti periferní krvi, může být vysvětleno rolí v boji proti extracelulárním bakteriím a houbovým patogenům (Saito et al., 2011).

T lymfocyty můžeme rozdělit podle řetězců jejich TCR (T-cell receptor) na většinové $\alpha\beta$ T lymfocyty a menšinové $\gamma\delta$ T lymfocyty. Množství $\gamma\delta$ T lymfocytů v decidui a periferní krvi v průběhu zdravého těhotenství stoupá, v případě alogenního těhotenství více než v případě syngenního. Produkují vysoké hladiny IL-10 a TGF- β , čímž podporují toleranci těhotenství (Ghaebi et al., 2017).

NKT (natural killer T cells) představují specifickou populaci lymfocytů spojující vlastnosti NK a T lymfocytů. Nebyly nalezeny v děloze mimo těhotenství, během raného těhotenství však jejich počet stoupá. Jejich aktivace způsobuje potrat/předčasný porod (Ghaebi et al., 2017).

B lymfocyty pod vlivem Th2 cytokinů produkují zvýšené množství asymetrických protilátek. Tyto protilátky mají na jedné ze svých Fab oblastí oligosacharidové zbytky, které znemožňují aktivaci efektorových mechanismů imunity. Váží se na paternální antigeny a brání tak vazbě klasických protilátek. V decidui je také populace B regulačních lymfocytů, která produkuje vysoké hladiny IL-10, čímž mimo jiné inhibuje produkci TNF- α efektorovými T lymfocyty (Fettke et al., 2014).

2.2 T regulační lymfocyty

Treg popsal v roce 1995 Sakaguchi et al. a zavedl také jejich označení, přestože již v 70. letech byla popisována populace supresorových T lymfocytů, lymfocytů s původem v thymu, které regulují ostatní imunitní buňky a mají schopnost působit imunosupresivně (Gershon and Kondo, 1970). Sakaguchi a jeho tým popsali Treg jako populaci s povrchovými znaky CD (cluster of differentiation) 4 a CD25 (α řetězec vysokoafinního receptoru pro IL-2). Na myším modelu prokázali, že při depleci Treg se rozvíjí škála orgánových i systémových autoimunitních onemocnění, zatímco přidáním Treg po transplantaci lze potlačit reakci proti alogennímu štěpu. Jejich práce ukázala význam této populace pro udržování centrální tolerance vůči tělu vlastním tkáním (Sakaguchi et al., 1995).

U lidí trpících IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked) syndromem a myších mutantů „scurfy“ byla na chromozomu X objevena mutace v genu pro transkripční faktor FoxP3 (forkhead box P3) (Wildin et al., 2001). Exprese FoxP3 je významným intracelulárním znakem pro identifikaci Treg. Odstranění FoxP3 prostřednictvím retroviru vedlo ve zralých Treg ke ztrátě supresivní funkce a získání vlastností efektorových T lymfocytů. To naznačuje, že pro udržení fenotypu Treg je nezbytná kontinuální exprese FoxP3 (Williams and Rudensky, 2007).

Pro běžnou klinickou praxi je detekce intracelulárního znaku příliš náročná, intracelulární značení také nelze použít pro izolaci Treg do funkčních studií. Samotné znaky CD4 a CD25 nejsou pro určení Treg dostatečné, CD25 je exprimován i na běžných T lymfocytech. Využívá se tedy ještě kombinace se značením CD127. CD127 je α -řetězec receptoru pro IL-7. Efektorové T lymfocyty mají vysokou expresi CD127, zatímco pro Treg je typická nízká míra exprese CD127, popř. k expresi vůbec nedochází. Značení $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ vychází v porovnání s jiným povrchovým značením jako neefektivnější. Takto značené buňky mají vysokou míru exprese FoxP3 a korelace s $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ značením (Yu et al., 2012).

Dalšími znaky Treg jsou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related gene), GARP (glycoprotein A repetitions predominant), PD-1 (programmed cell death 1), ICOS (inducible T cell costimulator), OX40, CD62L, CD45RO (Sakaguchi et al., 2010).

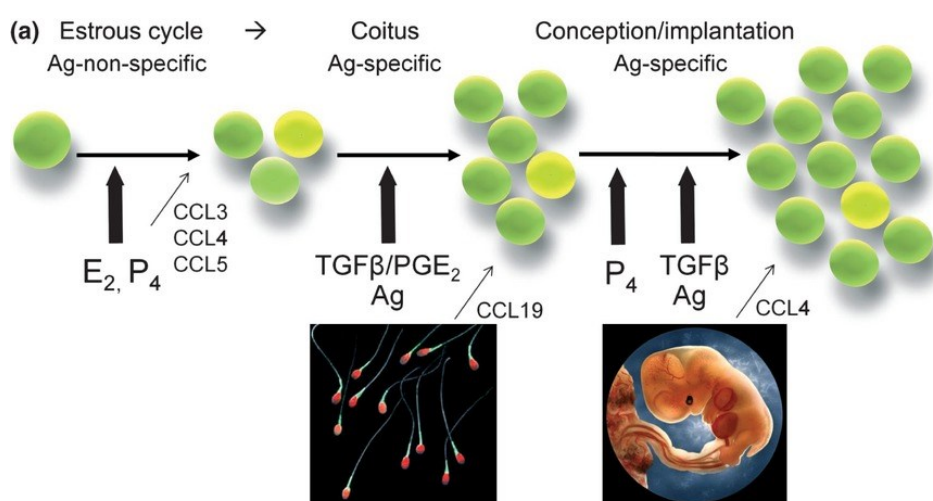
$CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg lze dále rozdělit na přirozené (nTreg, natural Treg) a indukované (iTreg, induced Treg). nTreg vznikají v thymu, zatímco iTreg vznikají na periférii vlivem cytokinového prostředí, především působením TGF- β , které dokáže v naivních $CD4^+$ lymfocytech indukovat expresi FoxP3 (Gabryšová et al., 2011). iTreg mohou být indukovány také *in vitro*. Do skupiny iTreg dále patří podskupina Tr1, charakterizovaná velkou produkcí IL-10 a podskupina Th3, která produkuje TGF- β (Schumacher and Zenclussen, 2014).

Pro rozlišení populací nTreg a iTreg bývá využíván transkripční faktor Helios z rodiny Ikaros. Helios exprimují nTreg pocházející z thymu, zatímco při diferenciaci iTreg k indukci exprese Helios nedochází (Thornton et al., 2010).

2.2.1 T regulační lymfocyty v reprodukci

Treg tvoří okolo 14 % z $CD4^+$ T lymfocytů v decidui (Chen et al., 2012). Hladina Treg stoupá již v období ovulace a jejich přítomnost je důležitá pro plodnost. Diagnóza opakovaného potrácení je spojená s podobně nízkými hladinami Treg ve folikulární i luteální fázi menstruačního cyklu, zároveň srovnatelnými s hladinami u žen po menopauze (Arruvito et al., 2007). U žen s idiopatickou neplodností je detekovatelná snížená exprese FoxP3 (Jasper et al., 2006).

K dalšímu nárůstu Treg dochází po kontaktu se seminální tekutinou. Seminální tekutina obsahuje $TGF\beta$, PGE_2 (prostaglandin E2) a paternální antigeny, připravuje tak dělohu na implantaci embrya (viz obr. 5). Opakované vystavení samičího traktu aloantigenům v seminální tekutině vede k (pro těhotenství žádoucím) zvyšování antigen-specifické populace Treg i v případě, že nedojde k oplodnění. Implantace embrya a vznik trofoblastu vede k dalšímu nárůstu Treg (Robertson et al., 2013).

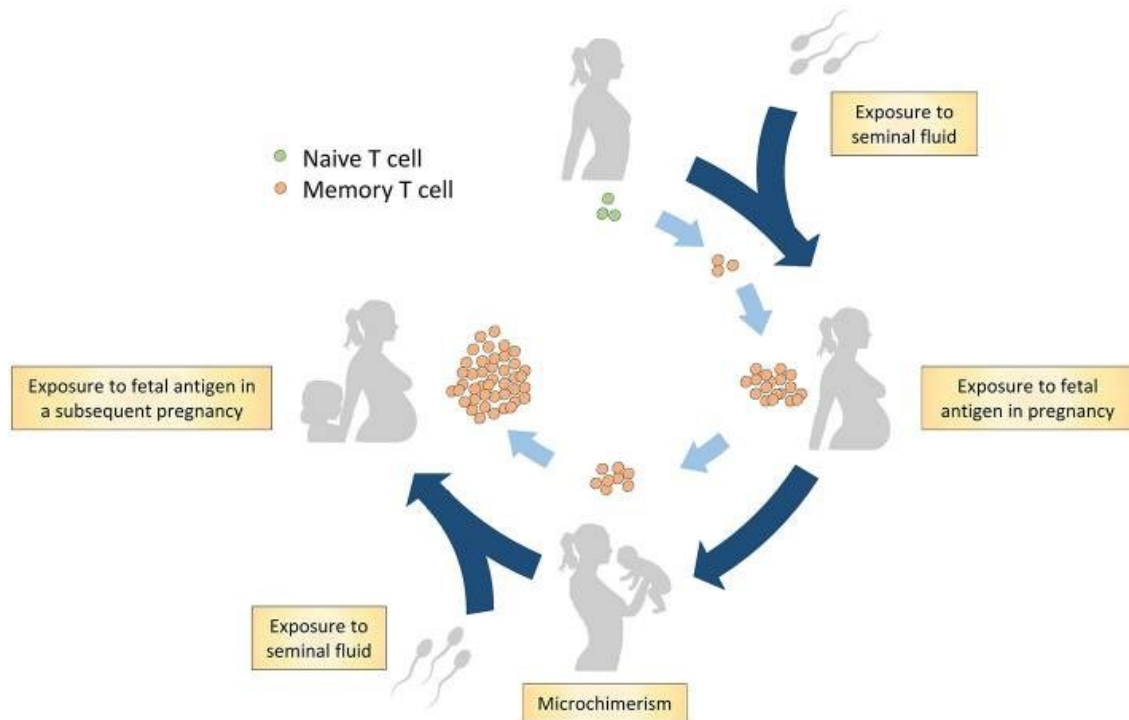


Obrázek 5: Schéma nárůstu populace Treg v reprodukčním traktu. V době ovulace estrogen zvyšuje expresi FoxP3 u T lymfocytů a expresi chemokinů CCL3, CCL4 a CCL5 v děloze. Po ovulaci působí progesteron rozšíření populace Treg prostřednictvím jaderných progesteronových receptorů. Při koitu se do reprodukčního traktu dostává semenná tekutina spolu s paternálními aloantigeny, $TGF-\beta$ a PGE_2 , což pod vlivem CCL19 vede k chemotaxi a maturaci tolerogenních dendritických buněk (DC) a další expanzi již antigen-specifických Treg v lymfatických uzlinách dělohy. Po implantaci uvolňuje trofoblast další aloantigeny, cytokiny a chemokin CCL4, což působí jako chemotaxe a indukce pro další Treg.

Převzato z: (Robertson et al., 2013)

E₂ – estrogen; P₄ – progesteron; CCL – chemokinový (C-C motiv) ligand; Ag – antigen; $TGF-\beta$ – transformující růstový faktor β ; PGE_2 – prostaglandin E2

Po kontaktu s paternálními antigeny v seminální tekutině a v těhotenství zůstává množství paměťových T lymfocytů včetně Treg, které indukují toleranci v případě dalších těhotenství se stejnými aloantigeny (viz obr. 6). Přestože dříve panovalo přesvědčení, že Treg po konci imunitní reakce prochází apoptózou, nyní se ukazuje, že vznikají populace paměťových Treg, schopných v organismu dlouhodobě přežít. Značení paměťových Treg bývá použita kombinace značení Treg ($CD25^+ CD127^{low/-} FoxP3^+$) a znaků paměťových buněk ($CD45RO^+$ and $CD45RA^-$) (Kieffer et al., 2019).



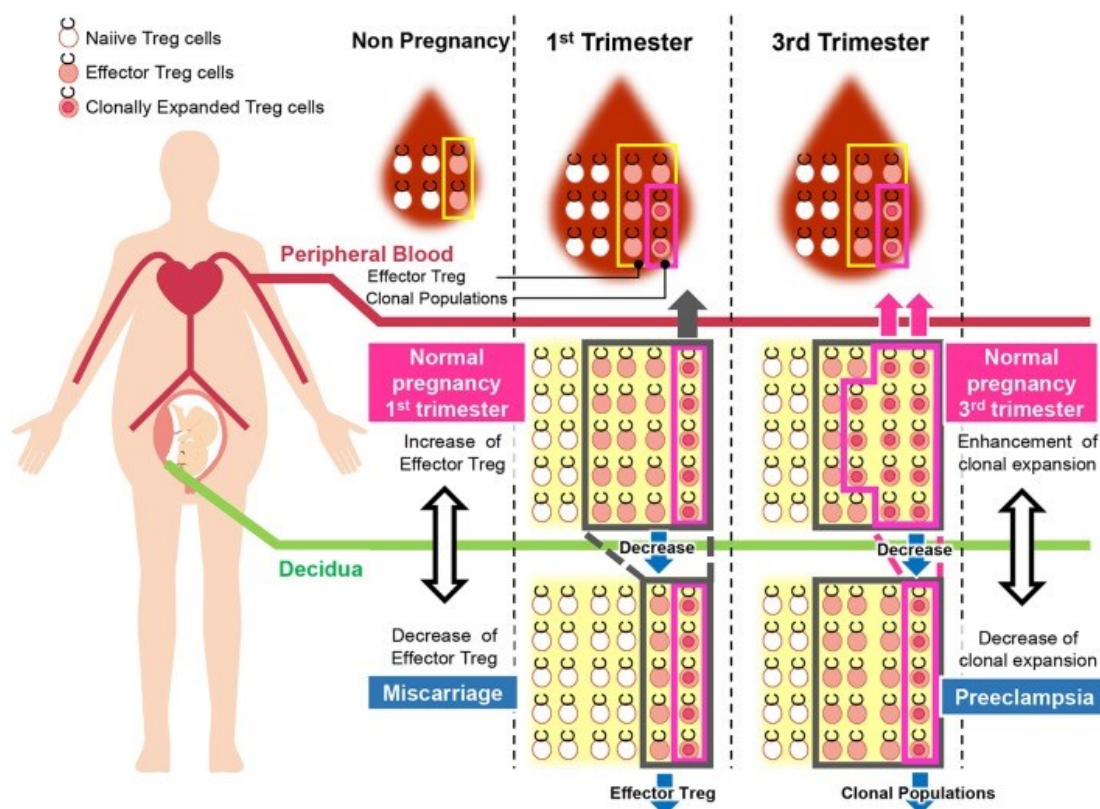
Obrázek 6: Vznik paměťových T lymfocytů včetně Treg, po kontaktu s paternálními antigeny v seminální tekutině a během těhotenství. Paměťové Treg napomáhají navození tolerance v dalších těhotenstvích a jejich množství s nimi narůstá.

Převzato z: (Kieffer et al., 2019)

Rowe a kolektiv ukázali význam paměťových Treg na myších modelech. Populace paměťových Treg se výrazně zvýšila s dalším těhotenstvím. V případě, že byly paměťové Treg odstraněny, docházelo k častějšímu vstřebání myšího embrya. Populace paměťových Treg je tedy důležitá pro regulaci sekundární odpovědi vůči paternálním antigenům (Rowe et al., 2012). Pozitivní přínos paměťových Treg je pravděpodobně především ve střední části těhotenství. Pro úspěšné udržení těhotenství po použití technik asistované reprodukce se ukázaly jako výhodnější naopak nižší hladiny paměťových Treg (Schlossberger et al., 2013). Jiná studie u lidí zase ukázala souvislost vysokých hladin paměťových Treg v ranném těhotenství a preeklampsie (Nguyen et al., 2017).

Způsob vzniku antigenní specifity Treg zajišťujících fetální toleranci je předmětem výzkumů. Zdá se, že hlavní roli hrají na periférii (v reprodukčním traktu) indukované iTreg. Při depleci iTreg u myších modelů dochází k potratům, následné odstranění nTreg množství potratů již dále nezvyšuje. Pro indukcii antigen specifických Treg je podle všeho důležitá spolupráce uNK a deciduálních DC, které prezentují paternální aloantigeny (Ruocco et al., 2014).

Doposud není zcela zřejmé, zda s patogenezí preeklampsie souvisí snížení celkového množství Treg nebo pouze Treg specifických pro paternální antigeny. Tsuda a kolektiv ukázali, že v případě preeklampsie je snižená klonální expanze Treg v decidui (viz obr. 7), což je v souladu s přesvědčením, že příčinou preeklampsie je nedostatečná tolerance paternálních antigenů. Hlavní populací efektorových Treg v decidui v počátku těhotenství jsou nTreg, k jejich poklesu při preeklampsii nedošlo. To naznačuje, že klonálně expandované Treg mohou být iTreg (Tsuda et al., 2018).



Obrázek 7: Schéma znázorňující aktuální pohled na fyziologické a patologické zastoupení Treg v periferní krvi a decidui v průběhu lidského těhotenství. Klonální expanzi efektorových Treg autoři pozorovali pouze v decidui, nikoli v periferní krvi. V případě potratu (plodu bez chromozomálních aberací) je snížený počet deciduálních efektorových Treg, v případě preeklampsie je nižší klonální expanze v decidui. Převzato z: (Tsuda et al., 2019)

Během fyziologického těhotenství dochází k rychlému nárůstu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg během prvního trimestru, jejich množství vrcholí v průběhu druhého trimestru a v třetím trimestru začíná mírně klesat. S výrazným poklesem Treg je spojen předčasný porod i porod v termínu. Pokles Treg je výraznější u žen po vaginálním porodu resp. akutním císařským řezu oproti ženám s plánovaným císařským řezem, který je proveden ženám bez rozběhlého procesu porodu (Xiong et al., 2010). Na základě nízké hladiny Treg lze stanovit také zvýšené riziko potratu (Winger and Reed, 2011).

Působení Treg na fetomaternálním rozhraní

Treg produkují cytokiny IL-10 a TGF- β , potlačují efektorové T a B lymfocyty, DC a makrofágy, čímž navozují tolerogenní prostředí na fetomaternálním rozhraní (Clark and Chaouat, 2012; Kieffer et al., 2019). Studie, v rámci které byly přesunuty Treg březích myší myším trpícím opakovanými potraty, ukázala, že Treg vytváří toto imunoprotektivní mikroprostředí prostřednictvím vysokých hladin TGF- β , LIF a HO-1 (Heme oxygenase 1) (Zenclussen et al., 2006).

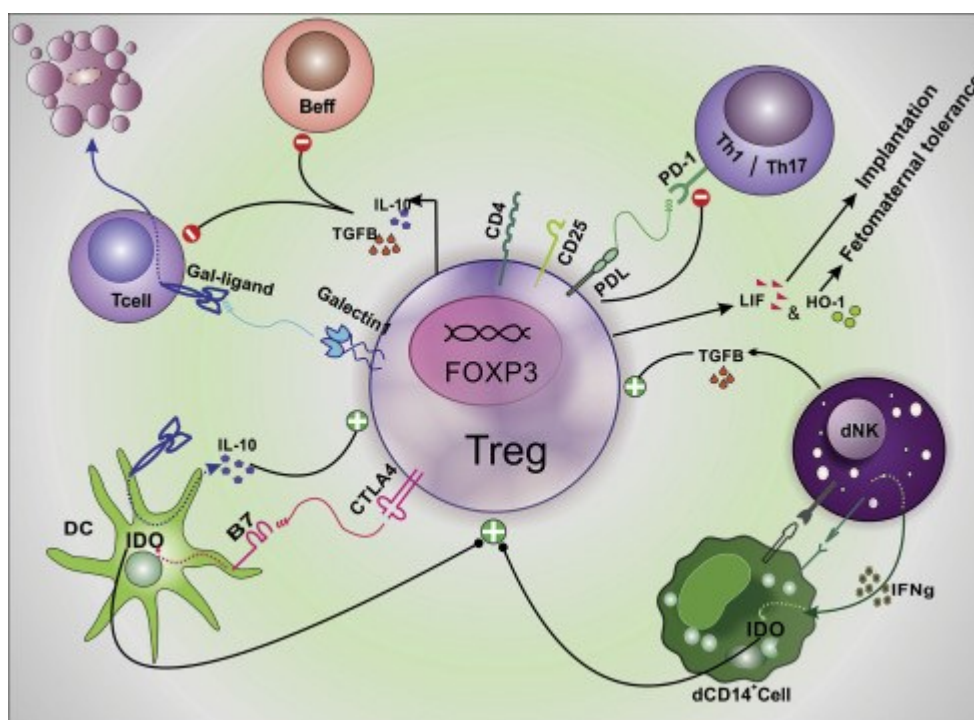
V počátku těhotenství je i díky působení progesteronu LIF jedním z převládajících cytokinů v placentě. Je důležitý pro invazi trofoblastu a správnou remodelaci spirálních arterií (Winship et al., 2015). Polymorfismus jednoho nukleotidu v genu pro LIF u lidských Treg je spojen s idiopatickými opakovanými potraty (Sharif et al., 2016).

Jak již bylo zmíněno u popisu tolerogenních vlastností trofoblastu, důležitým procesem v toleranci těhotenství je rozklad tryptofanu enzymem IDO. DC produkují IDO a následný pokles množství tryptofanu vede k potlačení reakcí efektorových T lymfoctů. CTLA-4 má schopnost po vazbě na receptor B7 stimulovat v APC (antigen prezentující buňky) expresi IDO (Fallarino et al., 2003). Během fyziologického těhotenství má populace CD4⁺CD25^{high} v lidské decidui vysokou míru exprese CTLA-4, zatímco CD4⁺CD25^{high} populace v periferní krvi CTLA neexprimuje. Snížená exprese CTLA-4 u deciduálních CD4⁺CD25^{high} Treg je spojena s potratem (Sasaki et al., 2004).

Transmembránový protein PD-1 (programmed cell death 1) z rodiny B7-CD28 je koinhibiční molekula exprimována řadou aktivovaných imunitních buněk: T lymfocyty (CD4⁺, CD8⁺, NKT-like, Treg), B lymfocyty, monocyty a DC. PDL (programmed cell death ligand)-1 je exprimován i v různých tkáních na periférii. Vazba PD-1/PDL-1 vede k inhibici efektorových buněk. Ukazuje se, že PD-1 (programmed cell death 1) a jeho ligand PDL-1 hrají významnou roli v toleranci těhotenství. Exprese PDL-1 lidskými deciduálními Treg a dalšími

buňkami v decidui je během těhotenství zvýšena (Meggyes et al., 2019). PD-1/PDL-1 dráha potlačuje Th17 a podporuje Treg. Na fetomaternálním rozhraní žen s preeklampsií byla pozorována snížená exprese PD-1 a PD-L1 vedoucí k porušení Th17/Treg rovnováhy (Zhang et al., 2018).

V těhotenství hraje roli také produkce regulační molekuly Galectin1, která reguluje aktivaci a produkci cytokinů T lymfocytů, působí apoptózu efektorových T lymfocytů a inhibuje buněčný růst (Ghaebi et al., 2017). Působení Treg v těhotenství shrnuje obrázek 8.



Obrázek 8: Mechanismy Treg zajišťující fetomaternální toleranci.

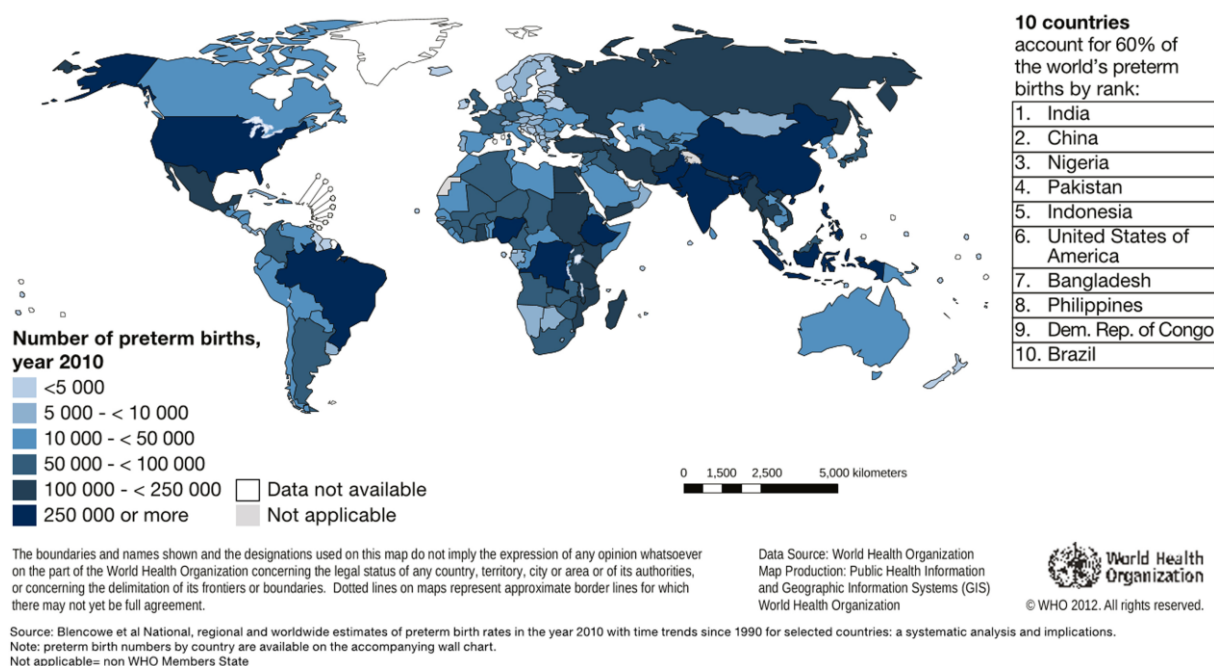
Treg produkují IL-10 a TGFβ, čímž potlačují efektorové lymfocyty. Dále produkují LIF a HO-1. Interakce CTLA-4 na povrchu Treg a B7 na DC vyvolává u DC produkci IDO a štěpení tryptofanu, což vede k potlačení aktivity T lymfocytů. (Deciduální NK také produkují TGFβ a způsobují prostřednictvím IFNγ produkci IDO u CD14⁺ monocytů). TGF-β a IDO vede k diferenciaci Treg. Galectin-1 Treg působí apoptózu aktivovaných T lymfocytů a produkci IL-10 u DC, interakce PD1/PD-L1 udržují rovnováhu Th1/Th2/Th17/Treg paradigmatu. Převzato z: (Ghaebi et al., 2017)

TGF-β: transformující růstový faktor β, IL: interleukin, PDL: Programmed death-ligand, PD-1: Programmed cell death protein 1, LIF: leukemický inhibiční faktor, HO-1: Heme oxygenase-1, IFNγ: interferon γ, IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase, CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, Treg: T regulační lymfocyt, Beff: efektorový B lymfocyt, Th: pomocný T lymfocyt, dNK: deciduální NK buňka, dCD14⁺ cell: deciduální CD14⁺ buňka, DC: dendritická buňka, Foxp3: Forkhead box protein P3

2.3 Předčasný porod

Předčasný porod je definován jako porod před ukončeným 37. tt (týdnem těhotenství). Dle dosaženého gestačního týdne lze porod rozdělit na mírně předčasný (32.-37. tt), velmi předčasný (28.-31. tt) a extrémně předčasný (pod 28. tt). Dále je možné rozlišit porod pozdně předčasný (34.-37. tt). Rizika předčasného porodu jsou vyšší s nižším gestačním týdnem, v současnosti jsou však uznávána také rizika porodu v 37. a 38. tt oproti porodu v 40. tt (Blencowe et al., 2013). Podle způsobu porodu rozlišujeme předčasný porod spontánní, který tvoří okolo 70 % předčasných porodů, a porod lékařsky vedený, tzv. iatrogenní, indukovaný či vedený císařským řezem, kterých je okolo 30 %, tento poměr se však liší v jednotlivých státech a regionech (Vogel et al., 2018).

Celosvětová incidence předčasného porodu je okolo 10 % a stoupá. Země s nízkými a středními příjmy představují většinu předčasně narozených dětí na světě – 60% předčasně narozených se vyskytuje v subsaharských afrických nebo jihoasijských zemích (viz obr. 9) (Vogel et al., 2018). Každý rok se předčasně narodí odhadem 15 milionů dětí a 1 milion na následky komplikací předčasného porodu zemře. Předčasný porod je hlavní příčinou neonatální mortality, která má v současnosti významný podíl na úmrtnosti dětí do 5 let. Předčasný porod tak byl v roce 2015 nejčastější příčinou úmrtí dětí v kategorii do věku 5 let (Liu et al., 2016).



Obrázek 9: Znázornění počtu předčasných porodů v jednotlivých zemích v roce 2010.

Převzato z: (Purisch and Gyamfi-Bannerman, 2017)

Předčasně narozeným dětem hrozí závažné komplikace: patologie dýchacího a trávicího traktu, sepse, neurologické poruchy (krvácení, mozková obrna, hypoxie, nekrózy), potíže s kmením. Mezi dlouhodobými následky spojenými s předčasným porodem jsou specifické poruchy učení, dyslexie, kardiovaskulární onemocnění, hyperaktivita, poruchy motoriky, snížená kapacita plic, astma, poruchy zraku a sluchu. Předčasný porod představuje psychosociální zátěž rodin a také ekonomickou zátěž rodin a společnosti. Předčasně narozené děti si nesou řadu následků, přičemž některá jejich onemocnění představují zátěž i pro generaci jejich vlastních potomků (Vogel et al., 2018).

WHO (Světová zdravotnická organizace) zařadila předčasný porod mezi 10 prioritních výzkumných cílů do roku 2025 (Medley et al., 2018).

Podíl předčasně narozených dětí v ČR klesá, v roce 2018 se narodilo 7,2 % dětí s nízkou porodní hmotností (pod 2500 gramů), která je nejčastěji důsledkem předčasného porodu.¹

Riziko předčasného porodu u asymptomatických těhotných žen je stanovováno na základě anamnestických údajů a délky děložního hrdla. Rizikové faktory můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné rizikové faktory patří: „předchozí předčasný porod, afroamerická rasa, věk nad 18 nebo pod 40 let, špatná výživa, nízká tělesná hmotnost před těhotenstvím, nízký socioekonomický status, výkony na děložním hrdle, anatomické anomálie dělohy, předčasné zkrácení a dilatace hrdla dělohy, nadměrně rozepjatá děloha (vícečetná těhotenství, polyhydramnion), onemocnění parodontu.“ Ovlivnitelnými rizikovými faktory jsou: „kouření, abúzus drog, chybějící prenatální péče, krátký interval mezi porody, anémie, infekce močových cest, stres těhotné“ (Kacerovský et al., 2017).

Doporučené klinické postupy pro prevenci a management předčasného porodu se v různých státech se liší. Shrnutí 46 doporučených postupů vytvořených v letech 2013-2017 ukázalo minimálně 70 % shodu v následujících doporučeních: screening délky děložního hrdla u rizikových žen, krátkodobá tokolyza (umožňující přípravu plodu k porodu), podávání steroidů pro maturaci plic plodu, magnesium sulfátu pro neuroprotektci plodu a antibiotik ženám s předčasným odtokem plodové vody. Postupy se shodovaly v doporučení vaginálního

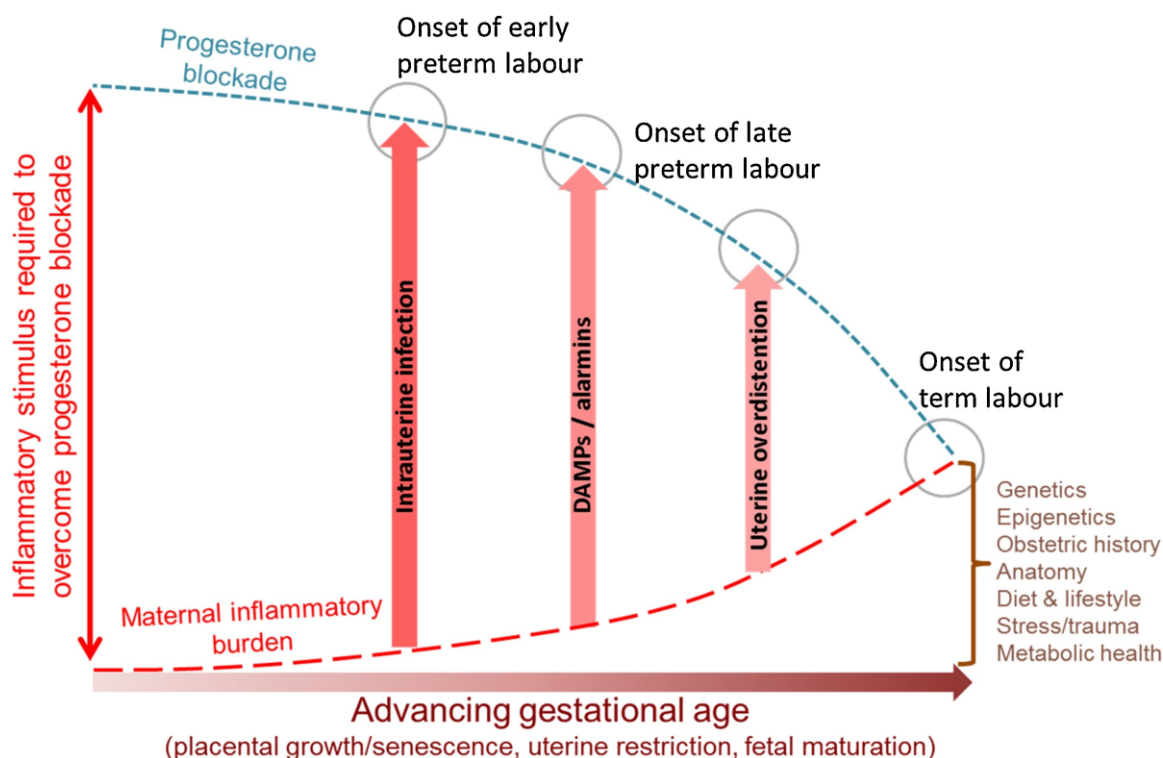
¹ Tisková zpráva Ministerstva zdravotnictví ČR, publikováno 12.06.2019, dostupné z: http://www.mzcr.cz/dokumenty/v%C2%A0roce-2018-klesl-pocet-predcasnych-porodu-a-cisarskych-rezuukazala-data-ze-vs_17429_3970_1.html

podávání progesteronu asymptomatickým těhotným se zkráceným děložním hrdlem (<20 mm) před 24. tt. V dalších doporučeních týkajících se podávání progesteronu byl nesoulad, postupy se např. neshodovaly v otázce, zda podávat progesteron ženám s nezkráceným děložním hrdlem a předchozím předčasným porodem v anamnéze (Medley et al., 2018).

Screening délky děložního hrdla pomocí ultrasonografické sondy (cervikometrie) je v současnosti nejužívanější metodou pro diagnostiku rizika předčasného porodu. Za inkompetenci děložního hrdla je označováno zkrácení funkční délky děložního hrdla pod 25 mm a/nebo dilatace děložního hrdla více než 1 cm v celém rozsahu (tzv. kompletní funneling) (Crane and Hutchens, 2008). Pro predikci předčasného porodu se dle doporučení v ČR používá „transvaginálně ultrazvukem zjištěné funkční zkrácení děložního hrdla (< 25 mm) do 30. tt“ (Kacerovský et al., 2017). Screening délky děložního hrdla u asymptomatických žen s jednočetným těhotenstvím je doporučován u rizikových žen (tzn. především v případě předchozích předčasných porodů/potratů v anamnéze). Plošný screening všech asymptomatických těhotných žen v mezinárodních doporučeních nefiguruje, nejví se jako efektivní. Ve Francii nebo Velké Británii, kde je míra předčasného porodu kolem 7,4 %, by tato strategie pravděpodobně umožnila snížit ji pouze na 7,0 % (Rozenberg, 2017).

V současnosti je známo, že významnou roli v průběhu předčasného i termínového porodu hrají prozánětlivé procesy. V placentě předčasně rodících žen je nejčastěji detekovanou bakterií *Ureoplasma* a míra zánětu je přímo úměrná množství této bakterie (Sweeney et al., 2016).

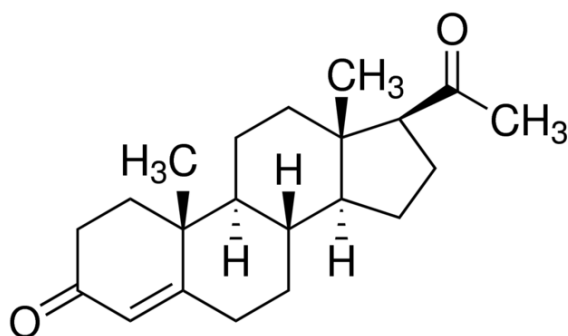
Intrauterinní infekce je významnou příčinou předčasného porodu, většina předčasných porodů s intrauterinní zánětlivou aktivací však není spojena s infekcí. Zátěž mateřského organismu se v průběhu těhotenství zvyšuje, vlivem endokrinních, metabolických, fyzikálních a biochemických faktorů a postupem vede až k porodu. Různost v povaze, síle a načasování těchto faktorů je určující pro pravděpodobnost předčasného porodu (viz obr. 10). Patologické prozánětlivé faktory (infekce, oxidační stres, stárnutí a reakce proti aloantigenům plodu) mohou vyvolat předčasný porod, často prostřednictvím běžných signálních drah. Klíčovou roli pro průběh těhotenství, imunologickou toleranci či zánětlivou aktivaci a načasování porodu hraje progesteron (Keelan, 2018).



Obrázek 10: Schéma vztahu mezi prozánětlivou zátěží v těhotenství, funkčním poklesem progesteronu a nástupem porodní činnosti. S postupem těhotenství stoupá zátěž mateřského organismu a velikost zánětlivého podnětu nutná k překonání vlivu progesteronu klesá. Zánětlivá aktivace může být fyziologická i patologická, přičemž s nižším gestačním stářím těhotenství je vyšší pravděpodobnost patologické příčiny. Stupeň zátěže a bod, kdy je překonán vliv progesteronu, ovlivňuje více faktorů, např. stárnutí tkání, zkrácení telomer, obezita, diabetes, dubióza, oxidační stres, zrání plodu aj. Převzato z: (Keelan, 2018)

2.4 Progesteron

Progesteron (pregn-4-en-3,20-dion, P4) je steroidní pohlavní hormon, který se podílí především na vzniku, udržení a rozvoji těhotenství. Od této progestační role je odvozen i jeho samotný název, pocházející z latinského *pro gestationem* (*pro těhotenství*). Dále se podílí na regulaci ženského či samičího reprodukčního cyklu, ale má i řadu dalších funkcí, může být označován i jako neurosteroid. Roku 1933 Allen popsal molekulární vzorec progesteronu. Základem všech steroidních hormonů je steran ze 17 uhlíků tvořící 4 cykly. Progesteron patří do skupiny gestagenů, jejichž kostra čítá 21 uhlíků (viz obr. 11). Je syntetizován z cholesterolu (viz obr. 9) především buňkami žlutého tělíska (Taraborrelli, 2015).



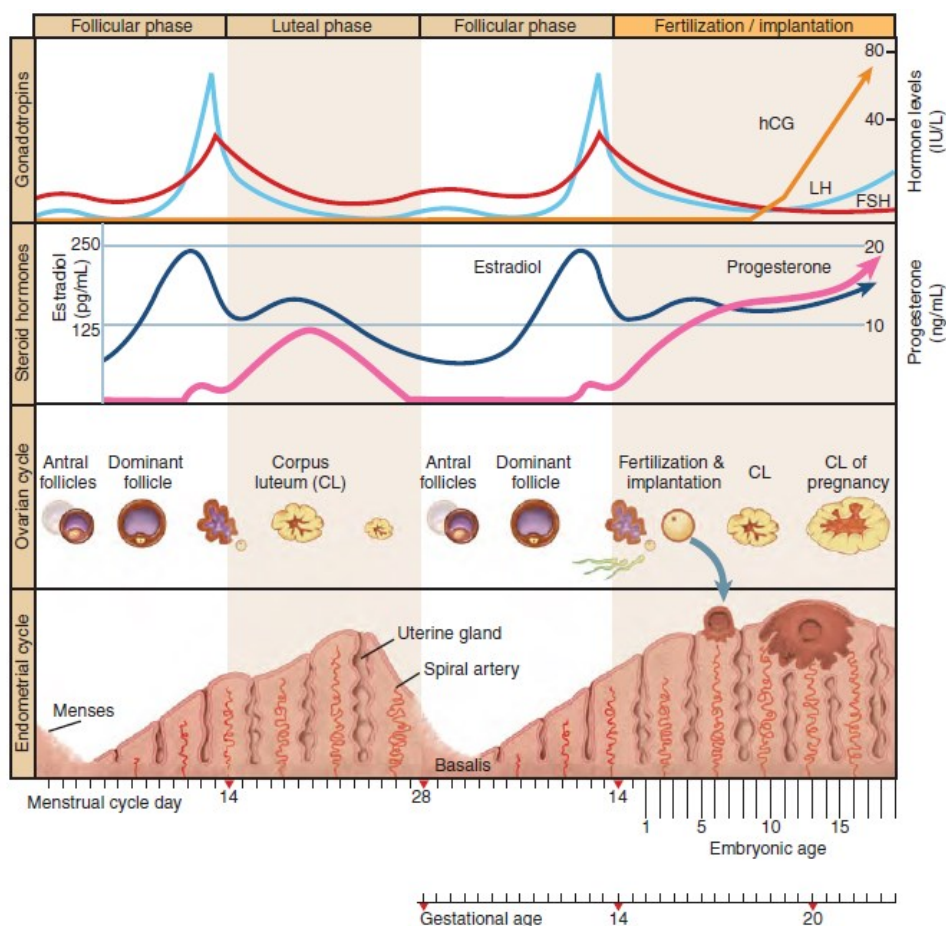
Obrázek 11: Chemická struktura progesteronu. Převzato z:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0130?lang=en®ion=CZ>

Progesteron koluje cévním řečištěm vázán na bílkovinné nosiče sérový albumin a transkortin (corticosteroid binding globulin). V játrech je rychle metabolizován – inaktivován konjugací s kyselinou glukuronovou. Hlavním metabolitem progesteronu je pregnandiol, metabolity jsou vyloučeny močí. Má nízkou biologickou dostupnost a krátký biologický poločas rozpadu. Kvůli aktivnímu metabolismu v játrech je *per os* podávání progesteronu velmi málo účinné a vyžaduje zvýšené dávkování. Při vaginálním podávání se dostává do dělohy a působí tak lokálně, jen málo prostupuje do krevního oběhu (Taraborrelli, 2015).

Před ovulací produkují progesteron folikulární buňky ovarií obklopující zrající oocyt. Po uvolnění oocytu (ovulaci) se folikul promění ve žluté tělísko (corpus luteum), které produkuje progesteron ve vyšší míře. V průběhu menstruačního cyklu tedy stoupá hladina progesteronu v době ovulace, zůstává zvýšená v následující luteální fázi cyklu (viz obr. 12) a připravuje děložní sliznici na možné těhotenství. V případě těhotenství hCG (human chorionic gonadotropin) produkovaný po uhníždění blastocysty syncytiotrofoblastem udržuje existenci žlutého tělíska a jeho produkci progesteronu až do zhruba 8. tt, kdy produkci progesteronu postupně přebírá placenta. Hladina progesteronu během lidského těhotenství stále stoupá, jeho pokles by vedl ke spuštění potratu resp. (předčasného) porodu. Po spontánní koncepci s embryem uloženým v dutině děložní by hladina progesteronu v séru měla být cca 20–25 ng/ml (Cunningham et al., 2014).

Progesteron vytváří prostředí vhodné pro implantaci embrya a udržení těhotenství. Ovlivňuje většinu procesů morfologické přestavby tkání v počátku těhotenství, řídí přeměnu buněk děložní stěny v buňky deciduální (decidualizaci) a angiogenezi. Stimuluje produkci HLA-G buňkami trofoblastu. V pozdějším těhotenství tlumí děložní stahy (Szekeres-Bartho et al., 2009). Podporuje dominanci Th2 nastavení, potlačuje produkci zánětlivých cytokinů

a alogenní reakce (Chen et al., 2012). Progesteron má klíčový vliv na celou řadu populací imunitních buněk. Stimuluje vznik a udržení jejich tolerogenních fenotypů (viz kapitola 2.1.2 Mechanismy tolerance) a řídí jejich přesun do dělohy prostřednictvím chemokinů (Szekeres-Bartho et al., 2009).



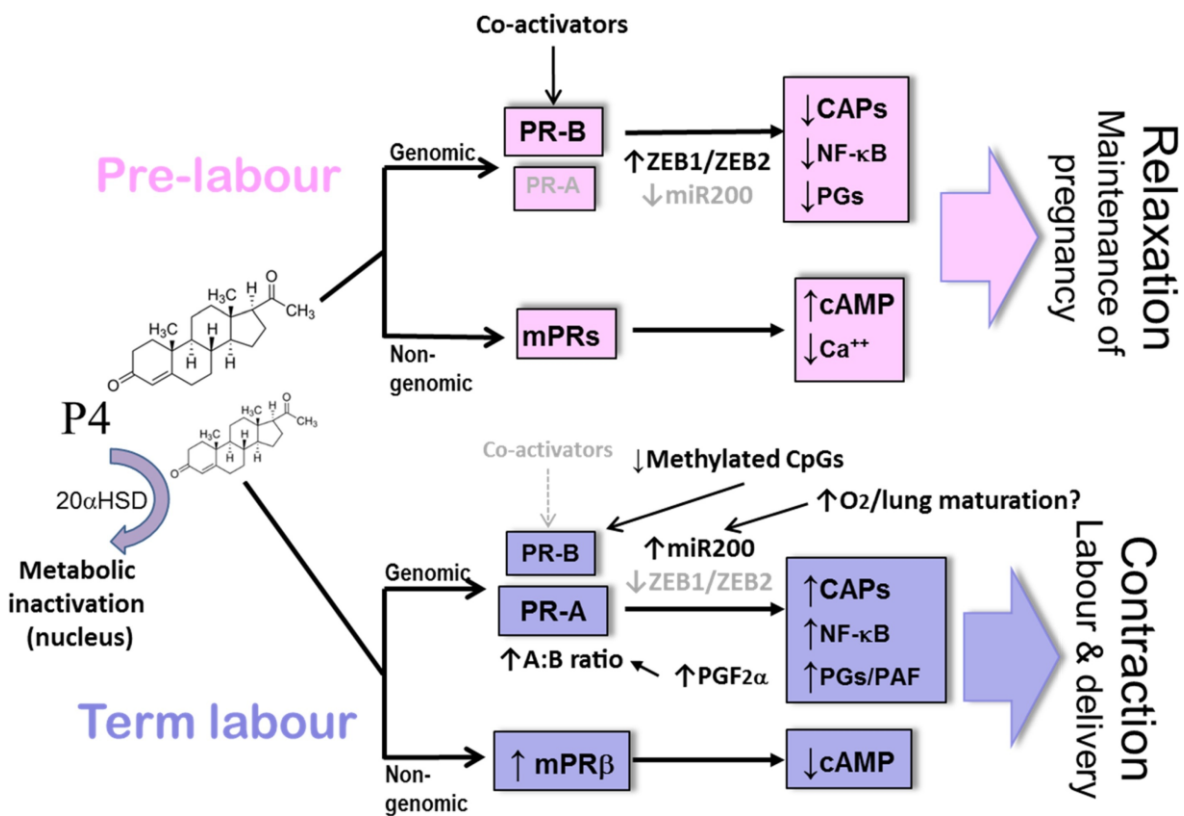
Obrázek 12: Průběh menstruačního cyklu (Cunningham et al., 2014)

Své působení progesteron realizuje mnoha způsoby. Dá se rozdělit na genomové působení, negenomové přímé, prostřednictvím klasických i neklasických receptorů, i nepřímé působení prostřednictvím neklasických receptorů a interakcí. Po průchodu do buňky působí jako transkripční faktor vazbou na své klasické jaderné receptory nPR (nuclear progesterone receptor). Základní izofomy nPR, nPR-A a nPR-B, mají odlišné působení, negativní zpětnou vazbou působí proti sobě a udržují se v dynamické rovnováze (Rekawiecki et al., 2008). Dále se může progesteron vázat na cytoplazmatické frakce nPR a další mimojaderné izofomy PR, membránové progesteronové receptory mPR (membrane progesterone receptor) α - ϵ , PGRMC (progesterone receptor membrane component) 1,2 i jiné receptory: GABA-A (γ -aminobutyric acid), MAP2 (mikrotubule-associated protein 2), σ 1R (sigma 1 receptor), OXTR (oxytocin

receptor) atd. Působí pomocí drah cAMP/PKA (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A), Ca²⁺/PKC (protein kinase C), c-SRC/MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase/AKT) a dalších (Garg et al., 2017; Grimm et al., 2016; Kowalik et al., 2013; Valadez-Cosmes et al., 2016).

Velkou část působení progesteronu zprostředkovává molekula PIBF (progesterone induced blocking factor). Tvorbu PIBF progesteron indukuje v trofoblastu, což napomáhá jeho invazi do endometria (Miko et al., 2011). PIBF v těhotenství také inhibuje cytotoxicitu NK (Hudić et al., 2015).

U lidí během začátku porodu nedochází ke snížení koncentrace progesteronu, ale k omezení jeho funkcí, funkčnímu poklesu. Tento komplexní fenomén není ještě zcela popsán, zdá se, že progesteron v jádrech buněk myometria (svalová vrstva dělohy) je odbouráván pomocí aktivace enzymu 20αHSD (20α hydroxysteroid dehydrogenase) (Keelan, 2018).



Obrázek 13: Působení progesteronu v těhotenství a funkční pokles progesteronu při porodu prostřednictvím 20αHSD (20 alpha hydroxysteroid dehydrogenase). CAP, contractile-associated proteins; PG, prostaglandiny; PR, progesteronový receptor; mPR, membránový progesteronový receptor; P4, progesteron. Převzato z: (Keelan, 2018)

2.5 Vliv progesteronu na T regulační lymfocyty

Progesteron působí na diferenciaci, proliferaci, migraci a supresivní funkčnost Treg. Působí na ně přímo pomocí svých receptorů i nepřímo prostřednictvím interakcí s jinými tolerogenními buněčnými populacemi v decidui. Vliv progesteronu je závislý nejen na jeho koncentraci, ale také na kapacitě receptorů cílových buněk.

Fyziologické hladiny progesteronu indukují přeměnu $CD4^+CD25^-$ v $CD4^+CD25^+$ T lymfocyty a stimulují v nich expresi FoxP3 a IL-10. Tím progesteron způsobuje výrazný nárůst populace Treg v děloze i v periferní krvi, především v polovině těhotenství u myši. Tyto účinky, zjištěné u myši *in vivo* i při kultivaci $CD4^+CD25^-$ izolovaných z myši sleziny s progesteronem *in vitro*, blokuje přidání RU-486 *in vitro* a injekční podání RU-486 (mifepriston) *in vivo* následně navíc vyvolá potrat. RU-486 je antagonist progesteronu, představuje účinnou látku v tzv. potratové pilulce. Potratu předchází snížení exprese FoxP3 a IL-10, pokles množství $CD4^+CD25^+$ populace a vzestup prozánětlivých cytokinů IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-17. Mao a kolektiv předpokládali, že použitý RU-486 se váže na nPR a že tedy tento vliv progesteronu na Treg myši je zprostředkován nPR (Mao et al., 2010). Chien a kolektiv však ukázali, že RU-486 blokuje i rychlé negenomové účinky progesteronu přes mPR u lidských T lymfocytů (Chien et al., 2009).

Další možnou cestou pro působení progesteronu je vazba na glukokortikoidový receptor (GR, glucocorticoid receptor), na který se progesteron silně váže a indukuje vznik Treg *in vitro*. Vedlejším efektem těhotenství je potlačení projevů některých autoimunitních onemocnění, jako je například roztroušená skleróza. U myšího modelu roztroušené sklerózy je pro tento efekt přítomnost GR nezbytná. U myši s delecí GR specifickou pro T lymfocyty nedošlo k nárůstu Treg a potlačení autoimunity během březosti (Engler et al., 2017).

Hierweger a kolektiv kultivovali buňky ze slezin březích a nebřezích myši s progesteronem ve fyziologických koncentracích *in vitro*. Progesteron indukoval apoptózu T lymfocytů, zatímco Treg byly vůči tomuto působení odolné, což vedlo k jejich výslednému vyššímu zastoupení v buněčné kultuře. Tyto účinky progesteronu pravděpodobně umožňuje GR, protože jen buňky bez tohoto receptoru byly odolné vůči působení progesteronu, nikoli buňky bez progesteronových receptorů (Hierweger et al., 2019).

Také u lidí indukuje progesteron vznik Treg *in vitro*, konkrétně u naivních T lymfocytů pupečnickové krve, ne u periferní krve dospělých jedinců. Populace Treg indukovaná v přítomnosti progesteronu má zvýšenou expresi znaků paměťových T lymfocytů. Diferenciaci

naivních T lymfocytů pupečnickové krve do Th17 naopak progesteron potlačuje (Lee et al., 2011). Ve vzorcích periferní krve odebraných před a po progesteronové terapii žen, kterým byl tokolytika zastaven předčasný porod, došlo k vzestupu procentuálního i absolutního zastoupení Treg (Areia et al., 2016b).

Přestože vliv progesteronu na imunitní procesy je nepopiratelný, mechanismy tohoto působení stále nejsou dostatečně známy. Práce věnující se existenci a významu klasických nPR u lidských i savčích T lymfocytů jsou nekonzistentní, shrnuto v: (Dressing et al., 2011). U lidských T lymfocytů byla potvrzena exprese mPR α a β , skrze které progesteron aktivoval inhibiční G-protein (Dosiou et al., 2008). Skrze mPR α,β,γ progesteron zvyšuje intracelulární hladiny Ca $^{2+}$ a snižuje intracelulární pH, čímž inhibuje fytohemaglutininem vyvolanou aktivaci lidských T lymfocytů (Chien et al., 2009).

Na povrchu lidských CD4 $^{+}$ CD25 high CD127 low FoxP3 $^{+}$ Treg byla pomocí monoklonální protilátky zjištěna exprese mPR α (Areia et al., 2015). V průběhu těhotenství dochází ke zvýšení počtu Treg exprimujících mPR α v periferní krvi. V období porodu se množství Treg lymfocytů v periferní krvi snižuje a zároveň klesá i míra exprese mPR α na jejich povrchu, což může být jeden ze spouštěcích mechanismů porodu u lidí (Areia et al., 2016a).

Některé studie naopak uvádí, že progesteron na hladinu Treg lymfocytů nemá žádný významný vliv (Mjösberg et al., 2010; Thuere et al., 2007; Zhao et al., 2007).

2.6 Progesteronová terapie při riziku předčasného porodu

Hlavní současnou možností v sekundární prevenci předčasného porodu představuje vaginální podávání progesteronu, které úspěšně prodlužuje těhotenství a tím zlepšuje výsledky perinatální mortality a morbidit (Kuon et al., 2015; Romero et al., 2016, 2018).

Progesteron může být podáván především perorálně, intramuskulárně nebo vaginálně. Orálně podávaný progesteron je vstřebáván trávicím traktem a následně velmi rychle metabolizován v játrech (účinek prvního průchodu neboli first pass effect). Odbouráním exogenního progesteronu je zachována endogenně regulovaná hladina progesteronu v těle. Pro dosažení určité koncentrace progesteronu v krevní plazmě touto cestou jsou nutné vysoké dávky a častější podávání léku oproti intramuskulárnímu podávání. Intramuskulární podání progesteronu umožňuje sledovat jeho koncentraci v plazmě (Byrns, 2014; Taraborrelli, 2015).

Vaginální podávání obchází efekt prvního průchodu játry, progesteron je dobře dostupný a je rychle absorbován. Nedostává se snadno, rychle a konzistentně do krevní plazmy,

proto se množství působícího progesteronu nedá prostřednictvím plazmy snadno sledovat, zato působí lokálně a trvaleji přímo v děloze. Tato cesta také způsobuje nižší množství vedlejších účinků (How and Sibai, 2009; Taraborrelli, 2015).

V klinické praxi i v experimentálních modelech je využíván přírodní progesteron nebo jeho různé odvozené syntetické formy (17 α -hydroxyprogesteron kaproát, 2 α -hydroxyprogesteron, 6 β -hydroxyprogesteron, dydrogesteron atd.) Souhrnně je skupina těchto hormonů označovaná jako progestiny, progestageny či gestageny. Strukturně odlišné syntetické formy progesteronu ale neaktivují všechny signální dráhy stejně jako endogenní progesteron, mohou mít odlišné působení (Furcron et al., 2015). Např. progesteron i 17 α hydroxyprogesteron kaproát tlumí sílu a frekvenci oxytocinem vyvolaných kontrakcí, avšak pouze progesteron tlumí i sílu spontánních kontrakcí (Patil et al., 2015). Intramuskulární podávání 17 α -hydroxyprogesteron kaproátu je spojeno s častějšími vedlejšími účinky jako je nauzea či trávicí potíže (Kuon et al., 2015).

Mikronizovaný přírodní progesteron, tj. účinná látka léčiva Utrogestanu sledovaného v této práci, odpovídá progesteronu syntetizovanému žlutým tělískem a placentou. Proto je také v těle snadno odbourán bez významnějších vedlejších účinků (Byrns, 2014).

Systematický přehled Cochrane Library ukazuje, že studie vlivu gestagenů podávaných ženám s hrozícím nebo probíhajícím předčasným porodem se velmi liší ve způsobu podání, dávkování, použité látky a případně druhu dalších použitých tokolytik (léky tlumícími děložní stahy). Přináší jen omezené důkazy svědčící o tom, že gestageny podávané s dalšími tokolytiky snižují počet předčasných porodů (před 37. týdnem) a vedou k vyšší průměrné porodní hmotnosti dítěte (Su et al., 2014). Dle tohoto přehledu zatím nebyl efekt gestagenů prokázán na dostatečném počtu žen a jeho podávání tak mezi doporučenými intervencemi WHO pro zlepšení výsledků předčasného porodu z roku 2015 nefiguruje.²

Doporučení NICE (National Institute for Health and Care Excellence) nabízí profylaktické podávání progesteronu ženám s předchozím předčasným porodem/pozdním

² WHO, 2015: WHO recommendations on interventions to improve preterm birth outcomes, dostupné z:

https://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal_perinatal_health/preterm-birth-guideline/en/

potratem v anamnéze, anebo ženám, u kterých bylo zjištěno zkrácení děložního hrdla pod 25 mm mezi 16+0 a 24+0 tt.³

Česká gynekologická a porodnická společnost doporučuje denní podávání 200 mg progesteronu na noc vaginálně a uvádí: „Jeho podání je indikované u asymptomatických těhotných s krátkým děložním hrdlem. U žen s anamnézou předčasného porodu či pozdního potratu ve II. trimestru je možno zvážit podávání progesteronu od týdne těhotenství 16+0 do 35+0. Doporučuje se podávání progesteronu ve formě tablet v celkové dávce 200 mg vaginálně na noc.“ (Kacerovský et al., 2017)

Mechanismy, kterými progesteron působí proti předčasnému porodu, nejsou ještě dostatečně známy. Je jisté, že jeho vliv se skládá z více složek, nejen z působení na imunitní systém. Mezi další studované mechanismy jeho působení patří: antagonismus oxytocinu vedoucí k relaxaci hladkého svalstva, vliv na snížení tvorby vodivých mezibuněčných spojů (gap junctions), vliv na udržení integrity děložního hrdla a vliv na mikrobiotu. Předčasný porod může souviset se ztrátou některých těchto inhibičních účinků progesteronu (Norwitz and Caughey, 2011).

Je známo, že progesteron významně snižuje frekvenci a sílu děložních stahů, stabilizuje interakce plodu s dělohou. Progesteron obecně potlačuje kontraktilitu hladkého svalstva a produkci prostaglandinu. Progesteron brání i kontrakcím vyvolaným exogenně podaným oxytocinem (Patil et al., 2015).

V poslední době je zkoumán také vztah mezi progesteronem a vaginální mikrobiotou, jejíž různé složení souvisí s rizikem předčasného porodu. Koucký a kolektiv ukázali, že dlouhodobé vaginální podávání progesteronu snižuje zastoupení *Ureaplasma urealyticum*. Vaginální kolonizace *Ureaplasma urealyticum* je spojená s předčasným porodem (Koucký et al., 2016). Kindinger a kolektiv naopak vliv progesteronové terapie na vaginální mikrobiotu popírá (Kindinger et al., 2017).

³ NICE, 2015: dostupné z: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng25/resources/preterm-labour-and-birth-pdf-1837333576645>

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- ověřit, zda dlouhodobé vaginální podávání progesteronu pozitivně koreluje se zvýšením počtu T regulačních lymfocytů
- sledovat vliv progesteronové terapie *in vivo* na proporční zastoupení indukovaných a přirozených Treg a funkční vlastnosti Treg (produkci cytokinů)
- sledovat souvislost délky podávání progesteronu a množství Treg s délkou těhotenství a vlastnostmi děložního hrdla
- ověřit schopnost progesteronu indukovat Treg *in vitro* a sledovat jeho vliv na proporční zastoupení indukovaných a přirozených Treg a funkční vlastnosti Treg (produkci cytokinů)
 - optimalizovat metodu indukce Treg progesteronem *in vitro*

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Roztoky

Blokovací roztok pro metodu ELISA: 5 % sacharózy, 1 % BSA (bovinní sérový albumin) v PBS (phosphate buffered saline)

Citrátový pufr: 0,1M citronan sodný v destilované vodě, pH 4,2 upraveno pomocí nasycené kyseliny citronové

PBS: 9 % NaCl, 3,35mM Na₂HPO₄.12 H₂O, 1,28mM NaH₂PO₄.2 H₂O

Ředící roztok pro stanovení IL-10 metodou ELISA (Duoset IL-10): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 1 % BSA

Ředící roztok pro stanovení TGF-β metodou ELISA: 20mM Trisma, 150 mM NaCl v H₂O, pH 7,3, 0,1 % BSA, 0,05 % Tween

Suplementované medium RPMI 1640 obsahující L-glutamin pro buněčné kultury: 2mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 40 mg/ml gentamycin (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)

Türkův roztok (Vakos, Praha) – koncentrovaný roztok 5x ředěný v destilované vodě pro finální použití

4.1.2 Reagencie, kity, chemikálie

Progesteron – užívané léčivo: Utrogestan, tobolky po 100 mg progesteronum, pomocné látky: čištěný slunečnicový olej, sójový lecithin, registrovaný SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv) (Laboratoires Besins-International, Paříž, Francie)

Progesteron – pro kultivaci *in vitro*:

- Agolutin – injekční roztok k intramuskulárnímu podání, progesteronum 30 mg v 1 ml, pomocné látky: benzylalkohol, benzyloáát, olej na injekci (BB Pharma a.s., Praha)
- Progesterone powder – progesteronum vyprodukované *corpus luteum*, pro buněčné kultury rozpustný v absolutním etanolu, (BioReagent, Sigma-Aldrich, USA)
- Progesterone-Water Soluble – ve vodě rozpustný progesteron pro buněčné kultivace, obsahuje progesterone: methyl-β-cyclodextrin complex (Sigma-Aldrich, USA)

75% etanol (Lékárna Všeobecné fakultní nemocnice)

BSA – hovězí sérový albumin, Trisma (SERVA, Německo)

Citronan sodný (Lachema, Česká Republika)

FBS – fetální bovinní sérum (Cambrex, USA)

Gentamycin (Pharmaceuticals dd, Slovinsko)

Histopaque®1077; β-merkaptoetanol; Tween; H₂O₂; HCl, TMB - 3,3,5,5-tetrametylbenzidin (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)

Kit Human IL-10 DuoSet ELISA DY217B-05 (R&D Systems Inc. USA)

Primární navazovací a sekundární biotinylované protilátky, rekombinantní cytokiny pro detekci cytokinů pomocí metody ELISA (R&D Systems Inc. USA)

Streptavidin s navázanou křenovou peroxidázou (Immunotech Inc., USA)

TregFlowEx® Kit (Exbio a.s., Česká Republika)

Zkumavky pro měření absolutních počtů Treg: BD Trucount™ Absolute Counting Tubes (BD Biosciences, USA), katalogové číslo 340334

Zkumavky s kalibračními kuličkami 7-Color Setup Beads, BD FACST™ (BD Biosciences, USA)

Kalibrační kuličky CS&T – Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (BD Biosciences, USA)

4.1.3 Spotřební materiál

Destičky ELISA: F96 Maxisorp, Nunc™ (Sigma – Aldrich, USA)

Odběrové zkumavky: BD Vacutainer® EDTA tubes (BD Biosciences, USA)

Mikrozkumavky Eppendorf (Thermo Fisher Scientific, USA)

Zkumavky pro přípravu a měření: BD FALCON™ Pharmingen™ (BD Biosciences, USA)

4.1.4 Použité přístroje

Analytické váhy: AB204 (Mettler Toledo Inc., Švýcarsko)

Boxy s laminárním prouděním

- Labculture® Class II (ESCO, Singapur)
- MSC 12 (Jouan SA, Francie)

Centrifugy: Micro 22 R, Universal 30 RF, Universal 320R (Hettich, Německo)

Fotometr mikrotitračních destiček: Sunrise™ (Tecan, Švýcarsko)

Inkubátor: CelCulture® CO₂ incubator (ESCO, Singapur)

Magnetická míchačka: Are (VELP Scientifica, Itálie)

Mikroskop: Olympus BX41(Olympus Corporation, Japonsko)

Mrazicí box: Sanyo Ultra-low freezer (Sanyo Electric Company Limited, Japonsko)

pH metr: PL-600, Bench Top pH mV/Temp/Meter (EZDO, Taiwan)

Pipety

- automatické jedno a vícekanálové Finnpipette (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- automatické jednonálové Pipetman Classic, Concept (Gilson Inc., USA)
- elektrický regulátor Macroman + skleněná pipeta (Gilson Inc., USA)

Promývačka mikrotitračních destiček: MRW AM60 (Dynex® Technologies, USA)

Průtokový cytometr: BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, USA)

Předvážky: EK-400H (A&D Company, Limited, Japonsko)

Vortexy: Vortex Genie K550-GE, Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., USA)

Výrobník ledu: Brema Ice Flaker GB 902A (Brema IceMakers, Itálie)

4.1.5 Použitý software

Vyhodnocení výsledků z průtokového cytometru

- BD FACS Diva Software v6.1.2 (BD Biosciences, USA)
- FlowJo 7.6.5 (FlowJo LLC, USA)

Vyhodnocení hodnot výsledků ELISA

- KIM Immunochemical Processing (Daniel Kittrich, ČR)

Grafické a statistické zpracování naměřených dat

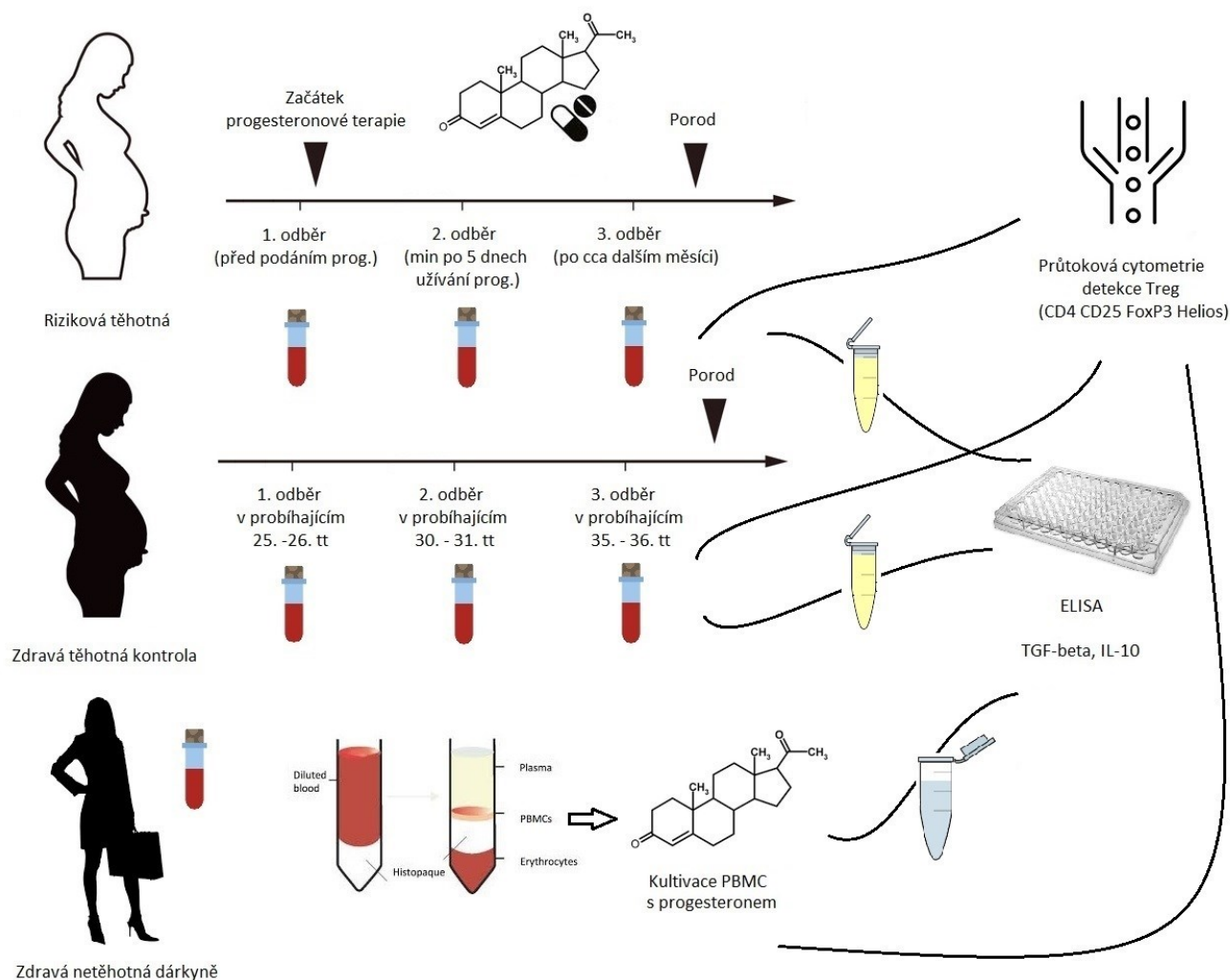
- GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., USA)

4.2 Metody

4.2.1 Schéma experimentu

Stěžejní částí práce byla analýza vzorků získaných opakovanými odběry periferní krve těhotných žen. Krev byla odebírána ženám s vysokým rizikem předčasného porodu, kterým lékař indikoval progesteronovou terapii, a to před začátkem této terapie a dvakrát v jejím průběhu, a nízkorizikovým těhotným ve třech odpovídajících časových intervalech. Neméně významnou částí práce byla kultivace mononukleární frakce izolované z krve zdravých netěhotných žen s progesteronem *in vitro*. Všechny vzorky byly analyzovány do 24 hodin pomocí průtokové cytometrie (detekce CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios^{+/-} Treg) a krevní plazma byla zamražena pro následné stanovení cytokinů pomocí metody ELISA. Koncentrace cytokinů ve vzorcích krevní plazmy a supernatantech z buněčných kultur byla detekována pomocí

metody ELISA (detekce cytokinů TGF- β a IL-10). Schéma experimentu znázorňuje obrázek 14, metodika je popsána detailněji v dalších kapitolách.



Obrázek 14: Schéma experimentu. V této práci byla analyzována periferní krev těhotných žen s vysokým rizikem předčasného porodu, kterým lékař indikoval progesteronovou terapii, a to na počátku této terapie a dvakrát v jejím průběhu, a nízkorizikových těhotných žen také ve třech odpovídajících časových intervalech. Další částí práce byla kultivace mononukleární frakce izolované z krve zdravých netěhotných žen s progesteronem *in vitro*. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie (detekce CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺/Treg). Koncentrace cytokinů ve vzorcích krevní plazmy a supernatantech z buněčných kultur byla detekována pomocí metody ELISA (detekce cytokinů TGF- β a IL-10). Vlastní tvorba.

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, IL – interleukin, PBMC – mononukleární buňky periferní krve, TGF- β – transformující růstový faktor β

4.2.2 Kritéria výběru dárkyň a odběr vzorků

Rizikové a nízkorizikové těhotné ženy

Do studie byly zařazeny ženy, které byly vyšetřeny na Gynekologicko-porodnické klinice VFN v Praze a 1. LF UK, a které po podání písemných i ústních informací o studii se svou účastí souhlasily a poskytly také písemný informovaný souhlas se svým zařazením do této studie.

V první skupině šlo o rizikové těhotné pacientky hospitalizované na oddělení rizikového těhotenství či navštěvující rizikovou poradnou, s hrozícím předčasným porodem, kterým lékař předepsal vaginální užívání progesteronu (léčivo Utrogestan) v dávce 200 mg denně na noc. Ženy byly v rámci gynekologické prohlídky vyšetřeny gynekologem (certifikovaným sonografistou) pomocí ultrazvukové vaginální sondy (standardní vybavení kliniky, Acuson XP128, Mountain View, CA), kterou byla změřena délka děložního hrdla, tj. provedena cervikometrie. Zvýšené riziko předčasného porodu bylo stanoveno při inkompetenci děložního hrdla (délka pod 25 mm anebo otvírající se) anebo jiných známkách předčasného porodu (výrazná děložní činnost, bolest apod.). Do kontrolní skupiny žen byly zařazeny těhotné s nekomplikovaným těhotenstvím a normální délkou děložního hrdla, které navštěvují běžnou ambulanci pro těhotné na témže pracovišti.

Vždy se jednalo o ženy ve věku od 18 let výše. Pro vyřazení žen z účasti ve studii byla zvolena následující kritéria.

Vyřazeny byly ženy:

- s vícečetným těhotenstvím
- trpící některou z autoimunitních chorob, včetně diabetes I. typu
- s prodělanou/probíhající chorobu spojenou s nádorovým bujením
- s neléčenou anebo dekompenzovanou alergií, astmatem
- s probíhajícím infekčním onemocněním
- s odtékající plodovou vodou (pPROM; preterm prelabor rupture of membranes)

U těhotných žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu, u kterých lékař indikoval vaginální užívání progesteronu (léčivo Utrogestan, 2 kapsle po 100 mg na noc *per vaginam*), byly provedeny v ideálním případě tři opakované odběry ze žíly v loketní jamce v následujících časových intervalech:

1. odběr: v době před prvním vaginálním podáním progesteronu nebo krátce po začátku jeho užívání
2. odběr: zhruba po 2 až 3 týdnech užívání progesteronu
3. odběr: zhruba za další 3 až 4 týdny užívání progesteronu, ovšem s ohledem na délku těhotenství a individuální stav ženy tak, aby se odběry stihly zrealizovat před porodem

Těhotným ženám s nízkým rizikem předčasného porodu, se zavřeným děložním hrdlem s minimální délkou 25 mm a bez jiných příznaků blížícího se porodu (krvácení, výraznější děložní činnost), byla v průběhu těhotenství také odebrána krev ze žíly v loketní jamce ve třech časových intervalech:

1. odběr v probíhajícím 25.-26. tt (týdnu těhotenství)
2. odběr v probíhajícím 30.-31. tt
3. odběr v průběhu 35.-36. tt

Tyto časové intervaly byly stanoveny jako nejvíce odpovídající týdnům těhotenství, ve kterých byly nejčastěji prováděny odběry rizikových žen. Také jako období, ve kterých je možné odběry spojit s dalšími odběry běžnými při pravidelných gynekologických kontrolách v těhotenství.

Všem ženám byly odebírány 3 ml periferní krve z loketní jamky do zkumavky Vacutainer© s protisrážlivým činidlem EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Krev byla zpracována do 24 hodin od odběru. Osobní údaje všech žen ve studii jsou anonymizovány. Vzorky a anamnestické údaje žen byly označeny číselnými kódy, ke kterým je schopno přiřadit identifikační údaje žen jen několik kompetentních zdravotníků.

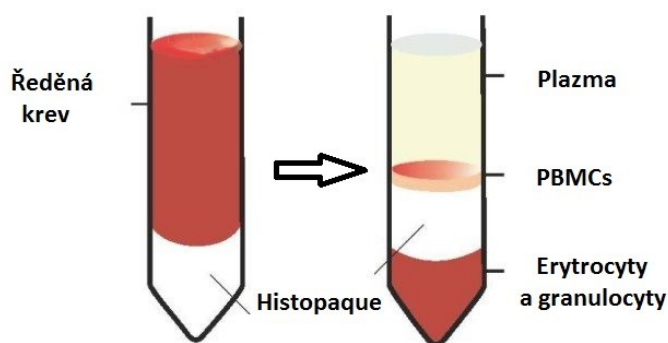
Netěhotné ženy – vzorky pro stimulaci PBMC progesteronem *in vitro*

K získání vzorků pro stimulaci Treg *in vitro* a optimalizaci této metody byly osloveny netěhotné zdravé ženy, většinou studentky Přírodovědecké fakulty UK – přítelkyně autorky. Těm, které se rozhodly zapojit do studie, byla odebrána krev z loketní jamky zdravotnicí pracující na ÚIM, kompetentní k odběrům krve. Krev byla odebírána do zkumavek Vacutainer© s protisrážlivým činidlem EDTA a vzápětí zpracovávána. Vzorky byly označeny číselnými kódy a data anonymizována.

4.2.3 Izolace frakce mononukleárních leukocytů

Pro získání mononukleární frakce leukocytů z periferní krve (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) byla používána gradientová centrifugace s použitím média Histopaque o hustotě 1,077 g/ml. Krev s protisrážlivým činidlem EDTA byla ředěna v poměru 1:1 vytemperovaným PBS (phosphate buffered saline, fyziologický roztok pufrovaný fosfátem). Do 15ml zkumavek byly nanесeny 3 ml vytemperovaného Histopaque, které byly převrstveny 6 ml naředěné krve. Zkumavky byly sterilně uzavřeny a centrifugovány po dobu 30 min, při 20 °C a 450 g. Po centrifugaci se vlivem gradientu vytvořeného mediem Histopaque rozdělila krev na plazmu, frakci mononukleárních buněk, Histopaque a frakci granulocytů a erytrocytů (viz obr. 15). Pomocí sterilních Pasteurových pipet byly odsáty prstence s mononukleární frakcí leukocytů PBMC a přeneseny do nových 15ml zkumavek. Zkumavky byly 2 cm pod okraj doplněny PBS o pokojové teplotě, opět sterilně uzavřeny a centrifugovány po dobu 10 min, při teplotě 20 °C a 1 000 g.

Následně byly buňky promývány: po stočení byl slit supernatant, peleta s buňkami byla resuspendována v PBS o pokojové teplotě a suspenze buněk byla přenesena do polovičního počtu zkumavek (suspenze ze dvou zkumavek do jedné zkumavky). Zkumavky byly opět doplněny PBS 2 cm pod okraj, sterilně uzavřeny a centrifugovány po dobu 10 min, při teplotě 20 °C a 500 g. Resuspendování pelet a promytí PBS bylo ještě jednou zopakováno. Po další centrifugaci (po dobu 10 min, při teplotě 20 °C a 500 g) byla peleta resuspendována v 1 ml chladného media RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) a zkumavky s buněčnou suspenzí umístěny na led.



Obrázek 15: Rozdělení krve na frakce po gradientové centrifugaci s médiem Histopaque.

Erytrocyty a granulocyty s vyšší hustotou projdou médiem na dno zkumavky, zatímco mononukleární buňky PBMC s nižší hustotou utvoří prstencovitou frakci nad ním.

Upraveno podle: <https://bio-protocol.org/e1300> (Reeves and Sinclair, 2014)

Po resuspendování pelety v mediu RPMI 1640 následovalo počítání počtu buněk v Bürkerově komůrce pro zjištění počtu získaných PBMC. 50 μ l z promíchané buněčné suspenze bylo přidáno k 950 μ l Türkova roztoku pro obarvení, směs byla promíchána pomocí vortexu a přenesena do Bürkerovy komůrky. Pomocí optického mikroskopu byly spočítány počty PBMC v 50 čtvercích z jedné a 50 čtvercích z druhé strany Bürkerovy komůrky. Pomocí aritmetického průměru byl získán počet buněk v suspenzi na základě vzorce: průměrný počet buněk v 50 čtvercích $\times 10^5$ = počet buněk v 1 ml buněčné suspenze.

4.2.4 Kultivace *in vitro*

Po oddělení PBMC pomocí média Histopaque a zjištění jejich počtu v suspenzi byly připraveny jednotlivé zkumavky pro kultivaci, každá s milionem PBMC. Jako kultivační médium bylo použito suplementované medium RPMI 1640 obsahující L-glutamin pro buněčné kultury, 10 % FBS (fetální bovinní sérum), 40 mg/ml gentamycin, 2mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) a 5 μ M β -merkaptotanol. Buňky byly inkubovány v termostatu udržujícím teplotu 37 °C a koncentraci CO₂ 5,5 %.

Metoda stimulace progesteronem *in vitro* dosud nebyla na pracovišti používána, proto probíhala její postupná optimalizace. Nejprve byl vyzkoušen Agolutin – injekční roztok progesteronu určený k intramuskulárnímu podání, obsahující 30 mg progesteronu v 1 ml a pomocné látky: benzylalkohol, benzyl-benzoát, olej na injekci (BB Pharma a.s., Praha). Práce s Agolutinem byla obtížná. Byl rozpouštěn pomocí dimethylsulfoxidu a u vzorků s jeho vysokou koncentrací (100 μ M) byla pozorována buněčná lýza vyšší než u kontrolních vzorků se samotným dimethylsulfoxidem. Potíže se stabilní rozpustností provázely i práci s přírodním progesteronem vyprodukovaným corpus luteum v práškové formě rozpustným v absolutním etanolu (Progesterone powder, BioReagent, Sigma-Aldrich, USA).

Pro další práci byl vybrán Progesterone-Water Soluble – ve vodě rozpustný progesteron (progesterone: methyl- β -cyclodextrin complex) pro buněčné kultivace (Sigma-Aldrich). Po vyzkoušení jeho 3 koncentrací (0,5, 5 a 50 μ M) byla vybrána 5 μ M koncentrace. Po analýze výsledků kultivace po 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7 dnech byla zvolena jako ideální délka kultivace doba 4 dnů. Kromě zkumavek s nestimulovanou kontrolou a vzorků s progesteronem byly vytvořeny vzorky s následující stimulací: rekombinantní lidský IL-2 (rh IL-2, recombinant human IL-2); CD3/CD28; CD3/CD28 společně s rh IL-2; rh IL-2 společně s progesteronem; CD3/CD28 s rh IL-2 i progesteronem. Pro závěrečný pokus byly kromě samotného progesteronu použity

stimulace CD3/CD28 s rh IL-2 a CD3/CD28 s rh IL-2 i progesteronem. Více viz kapitola Výsledky.

Po proběhlé kultivaci byly buněčné suspenze přemístěny do zkumavek určených pro měření na průtokovém cytometru a stočeny 10 min při 20 °C a 700 g. Byly odebrány a zamraženy supernatanty kultur pro stanovení produkce cytokinů (viz dále). Po promytí 2 ml PBS (odmytí kultivačního média) byly buňky připravovány pro analýzu průtokovou cytometrií dle stejného protokolu jako buňky periferní krve, s rozdílem množství použitého lyzačního roztoku sníženého na 1 ml. Vždy byl analyzován také kontrolní vzorek v den odběru krve, krátce po izolaci pomocí média Histopaque.

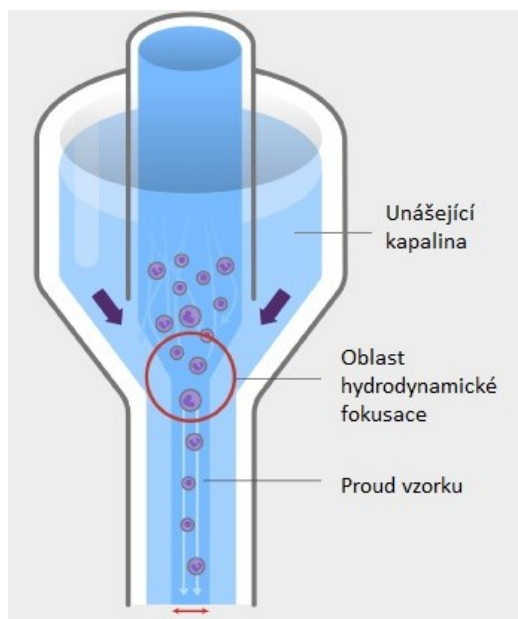
Před měřením pomocí průtokové cytometrie byla ve všech vzorcích spočítána životnost buněk obarvených trypanovou modří pomocí světelného mikroskopu.

4.2.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry) je metoda umožňující analýzu optických, fyzikálních a chemických vlastností částic, především buněk. Má široké využití ve výzkumu i klinické praxi, v tomto výzkumu je hlavní používanou metodou. Pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek je možné detekovat různé intra i extracelulární znaky jednotlivých buněčných subpopulací, znaky fází buněčného cyklu, intracelulární cytokiny atp. Průtokový cytometr provádí analýzu velkého množství částic v krátkém čase. Jeho hlavními částmi jsou fluidika, optika a elektronika.

Fluidika

Analyzované částice musí být připraveny ve formě suspenze. Vzorek je nasáván podtlakem sací jehlou a dále veden unášecí tekutinou do místa měření. Měřícím bodem musí částice procházet jednotlivě, což je zajištěno hydrodynamickou fokusací (viz obr. 16). Správná rychlost proudění, šířka trubice a vlastnosti kapaliny zajišťují konstantní laminární proudění vzorku úzkou střední částí proudu (Rahman, 2014).



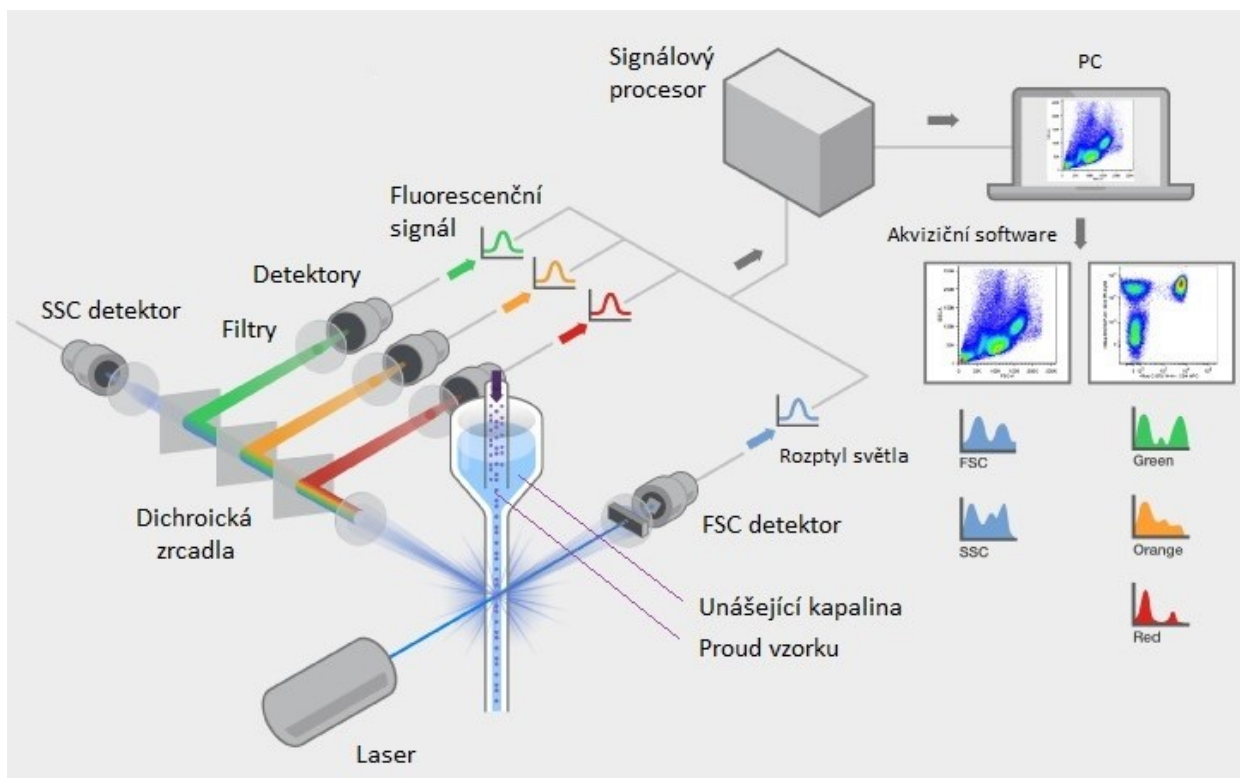
Obrázek 16: Schéma fluidiky průtokového cytometru. Upraveno podle <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>

Optika a detekce

Částice jsou v jednom místě vystaveny laserovému paprsku. Světlo, které prochází přímo, je tzv. přímý rozptyl, FSC (forward scatter). Tento signál je detekován FSC kanálem, nese informace o velikosti částice a umožňuje rozlišit živou a mrtvou buňku a buňku od nečistoty. Světlo odražené částicí, tzv. boční rozptyl, SSC (side scatter), podává informace o vnitřní členitosti buňky (komplexitě) a je detekováno v úhlu 90° k ose laserového paprsku. V cestě tomuto paprsku stojí soustava dichroických zrcadel, filtrů a čoček. Dichroické filtry postavené vůči paprsku v úhlu 45° odrazí světlo o konkrétní vlnové délce a vyšší vlnové délky propouštějí dále. Fotony emitované fluorescenčními barvami protilátek jsou tak směřovány do jednotlivých kanálů a detekovány příslušnými detektory jako intenzita fluorescence (viz. obr. 17). U SSC a fluorescence je signál ještě třeba zesílit pomocí fotonásobičů.

Elektronika

Optické signály jsou převedeny na elektrické a vyjádřeny graficky. Je možné zobrazit jednoparametrové histogramy (zobrazující četnost a intenzitu signálu) nebo dvouparametrové dotploty zobrazující proti sobě dva z měřených parametrů. Každý bod grafu představuje jednu měřenou událost, buňku. Po dalším zpracování dat je možné v grafech rozlišit jednotlivé buněčné populace a data statisticky analyzovat (Rahman, 2014).



Obrázek 17: Schéma principů průtokové cytometrie – fluidika, optika, elektronika. Upraveno podle: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>

4.2.6 Průtoková cytometrie – detekce procentuálního zastoupení Treg

Periferní krev byla odebírána do zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA. Z promíchané krve bylo odebráno 100 μ l krve na každý vzorek. PBMC buňky oddělené pomocí média Histopaque a po *in vitro* kultivaci byly po promytí 2 ml PBS (kromě použití polovičního množství lyzačního roztoku) připravované podle shodného protokolu.

Povrchové barvení a lýza erytrocytů

Povrchové barvení bylo provedeno přidáním 10 μ l směsi Exbio protilátek proti znakům CD4 (FITC) a CD25 (PE), promícháním a následnou 15min inkubací při pokojové teplotě a ve tmě. Následně byly přidány 2 ml lyzačního roztoku RBC Lysis Buffer (eBioscience) a po promíchání probíhala inkubace 10 minut v pokojové teplotě a ve tmě. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při teplotě 20 $^{\circ}$ C a 450 g. Supernatant byl slit. Buňky byly promyty přidáním 2 ml FSB (Flow cytometry Staining Buffer; eBioscience), centrifugací 5 minut 450 g při teplotě 4 $^{\circ}$ C a slitím supernatantu.

Fixace, permeabilizace a intracelulární barvení

Poté byl přidán 1 ml čerstvě připraveného fixačně/permeabilizačního roztoku Fixation/Permeabilization Buffer working solution (eBioscience). Po promíchání následovala inkubace po dobu 40 min ve tmě při 4 °C, centrifugace 450 g 5 minut při 4 °C a slití supernatantu. Dále byly buňky permeabilizovány přidáním 2 ml Permeabilization Buffer (eBioscience, koncentrát byl naředěn 10x destilovanou vodou). Po promíchání a inkubaci 10 minut ve tmě při 4 °C proběhla opět centrifugace 450 g 5 minut při 4 °C a slití supernatantu.

Intracelulárně byly buňky barveny přidáním 2 µl FoxP3 (APC) a 5 µl Helios (PE-Cy7) monoklonálních protilátek, Exbio (protilátky používané pro průtokovou cytometrii viz Tabulka 2), promícháním a inkubací 40 minut ve tmě při 4 °C. Buňky byly 2x promyty 2 ml PBS a centrifugovány 450 g 5 minut při 4 °C. Supernatant byl slit, do zkumavky bylo přidáno 300 µl PBS a vzorek byl měřen na průtokovém cytometru BD FACS Canto™ v softwaru BD FACS Diva™ za stálého nastavení (viz tabulka 1).

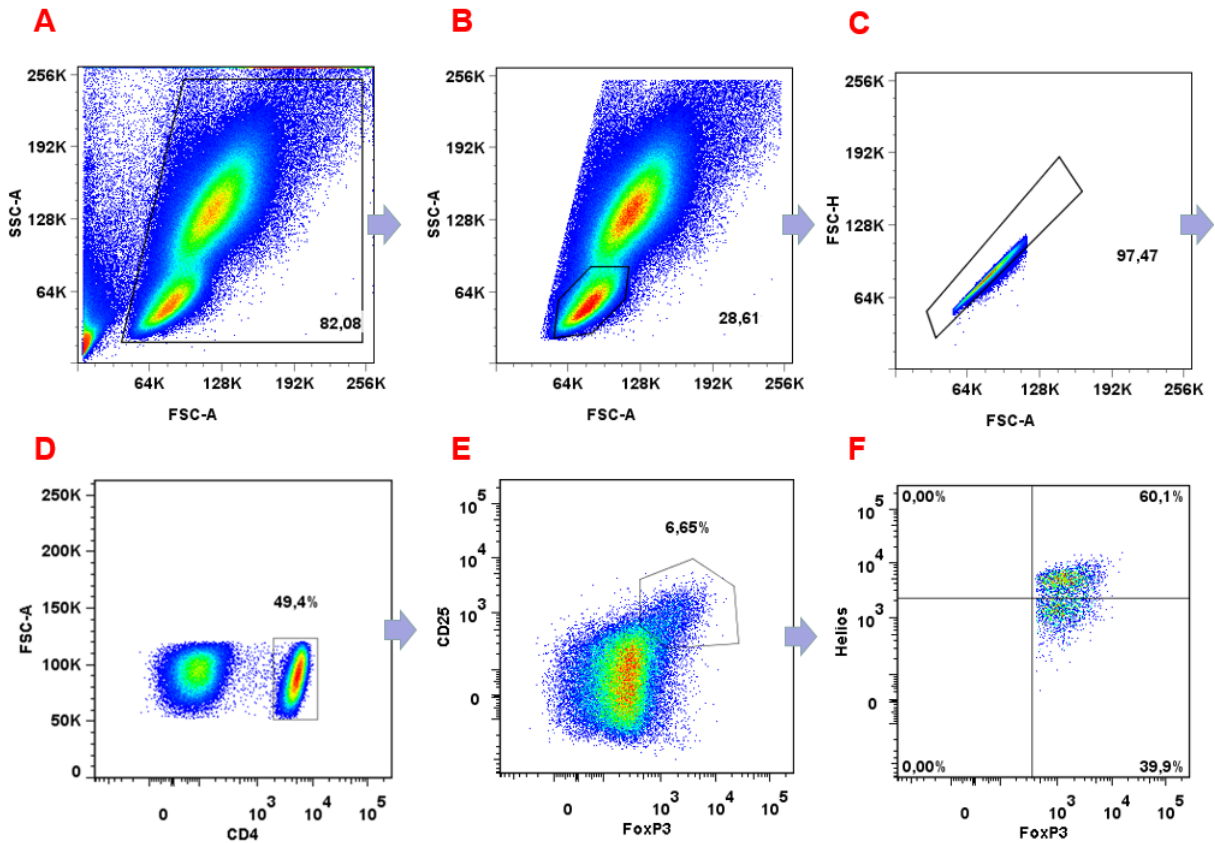
Tabulka 1: Napětí na detektorech

Detekce znaků	Napětí (volty)		
FSC	320	Lin (lineární)	A (area, plocha) H (high, výška)
SSC	530	Lin	A H
FITC	485	Log (logaritmické)	A
PE	570	Log	A
PerCP	585	Log	A
PE-Cy7	570	Log	A
APC	660	Log	A
APC-Cy7	544	Log	A

Strategie výběru populací

Data byla zpracována pomocí softwaru FlowJo s použitím kompenzačních a FMO (fluorescence minus one) kontrol, které byly připraveny zvlášť pro plnou krev a zvlášť pro vzorky PBMC po *in vitro* kultivaci.

Strategie výběru populací byla následující: v prvním kroku byly odděleny buňky od ostatních událostí. V dalších krocích byla vybrána populace lymfocytů a z ní vybrány singlety. Poté byly vybrány CD4⁺ buňky a z nich CD25⁺ a zároveň FoxP3⁺ pozitivní populace Treg. V posledním kroku byly odděleny populace Helios⁺ přirozených Treg a Helios⁻ indukovaných Treg (viz obr. 18).



Obrázek 18: Strategie výběru populací. Procenta v reprezentativních dot-plot grafech znázorňují zastoupení jednotlivých vybraných populací. A – rozdělení událostí dle FSC a SSC, z událostí vybrány buňky, B – vybrána populace lymfocytů, C – vybrány singlety, D – vybrány $CD4^+$ buňky, E – vybrána $CD25^+FoxP3^+$ populace, F – rozdělení $CD25^+FoxP3^+$ populace na $Helios^+$ přirozené Treg a $Helios^-$ indukované Treg

FSC – přímý rozptyl, SSC – boční rozptyl, Treg – T regulační lymfocyty

4.2.7 Průtoková cytometrie – detekce absolutního zastoupení Treg

Absolutní počet $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$ Treg a $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$ Treg rizikových těhotných žen byl přepočítán podle procentuálního zastoupení jednotlivých populací z údaje o absolutním počtu $CD3^+CD4^+$ lymfocytů, který byl získán z anamnestických údajů. Absolutní počet $CD3^+CD4^+$ lymfocytů byl u těchto žen zjištěn jako součást stanovení krevního obrazu Ústavem lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, a to v závislosti na době odběru a svozu na následujících akreditovaných pracovištích: Hematologie – Laboratoř fakultní polikliniky, Hematologie – Statimová laboratoř, Hematologie – Morfologická laboratoř. Toto měření bohužel neproběhlo u všech žen, proto je počet žen se zjištěnými absolutními hodnotami nižší než počet žen se změřenými procentuálními hodnotami.

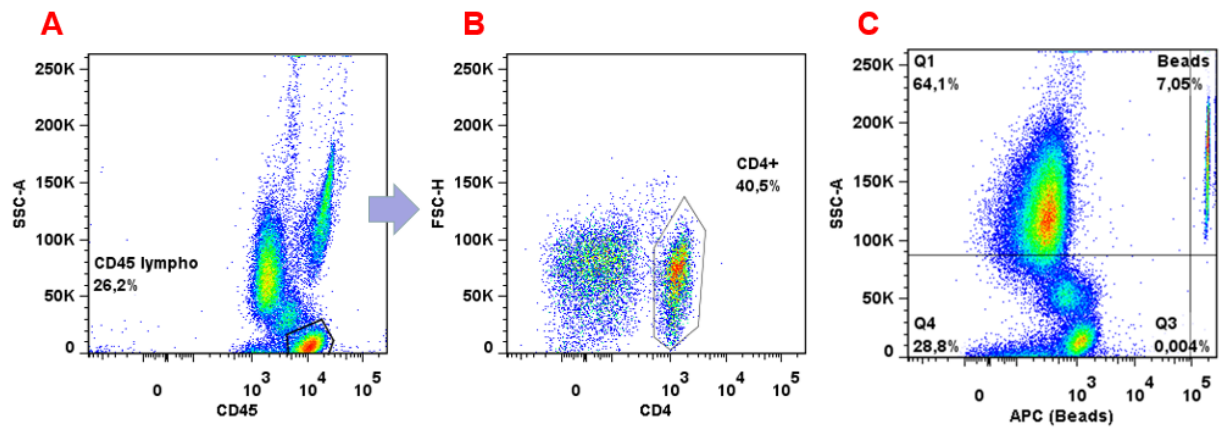
U periferní krve nízkorizikových těhotných žen byl zjišťován absolutní počet Treg přepočtem z absolutního počtu CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů, který byl změřen autorkou na průtokovém cytometru BD FACS Canto™ v softwaru pro klinické měření BD FACSCanto™ za použití zkumavek BD Trucount™ dle následujícího protokolu:

Byl zkontrolován stav zkumavky Trucount a volná pohyblivost pelety s kuličkami v její spodní části. Na stěnu zkumavky byly opatrně napipetovány následující monoklonální protilátky: 10 µl CD25 (PE)/ CD4 (FITC) a 5 µl CD45 (PerCP). Další údaje k protilátkám viz tabulka 2. Protilátky se nedotýkaly pelety, byly k ní spláchnuty až společně s následným přidáním 50 µl čerstvě promíchané plné krve. Bylo přidáno 5 µl PBS (pro doplnění celkového objemu), krev byla promíchána s peletou pomocí vortexu a následně inkubována 15 minut ve tmě při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 450 µl lyzačního roztoku BD FACS Lysing solution. Pro promíchání na vortexu následovalo dalších 15 minut inkubace ve tmě při pokojové teplotě. Poté byl vzorek ihned měřen (bez promývání, protokol tzv. „lyse no wash“).

V tomto protokolu bylo používáno přesné reverzní pipetování a před každým měřením v softwaru BD FACSCanto™ byl cytometr nastaven pomocí zkumavek obsahujících kalibrační kuličky 7-Color Setup Beads. Tento software měří při manuálně neměnitelném nastavení. Dot ploty výsledného protokolu a strategie výběru populací znázorňuje obrázek 19.

Tabulka 2: Protilátky pro průtokovou cytometrii

Specifita	Konjugát	Klon	Výrobce
CD4/ CD25	FITC/PE	MEM-241/181	Exbio
FoxP3	APC	3G3	Exbio
Helios	PE-Cy7	22F6	Exbio
CD45	PerCP	2D1	BD Bioscience

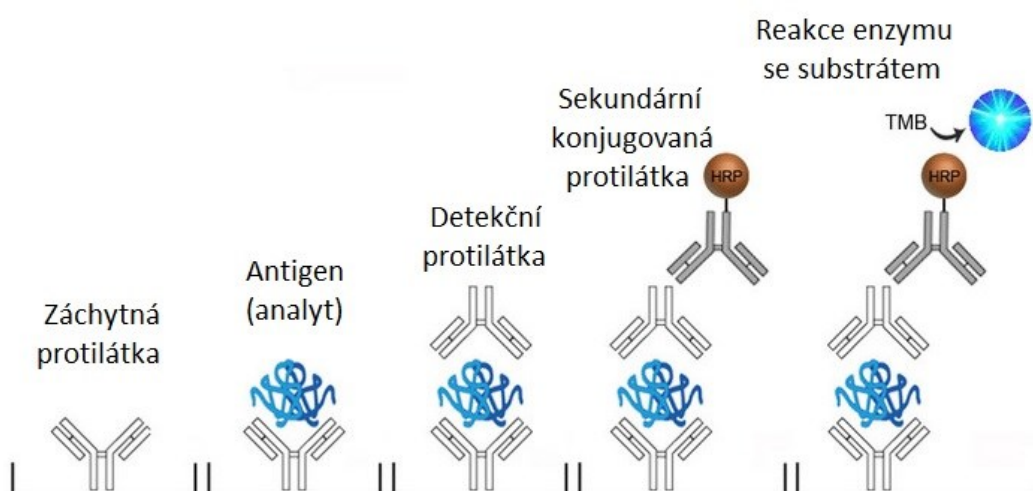


Obrázek 19: Strategie výběru populací pro získání absolutní hodnoty $CD4^+$ populace.
 Absolutní počet $CD4^+$ populace byl měřen s pomocí zkumavek BD Trucount a klinického softwaru BD FACS Canto. Tento software nezobrazuje FSC vs SSC a neumožňuje měnit jejich nastavení, není možný ani výběr singletů. Nejprve byla vybrána populace lymfocytů (A), následně populace $CD4^+$ (B). Pro výpočet absolutního počtu byly vybrány také Trucount kuličky pomocí APC, buňky v APC značeny nejsou (C).
 FSC – přímý rozptyl, SSC – boční rozptyl, APC – antigen prezentující buňky

4.2.8 ELISA

ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) je snadná analytická technika využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých analytů v diagnostice, výzkumu i kontrole kvality v průmyslu. Metodu lze použít v několika různých uspořádáních. Všechny jsou založeny na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně vázán enzym. Po přidání substrátu do směsi katalyzuje enzym přeměnu substrátu na produkt, který je barevný a stanovuje se spektrofotometricky či na základě fluorescence. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu ve vzorku. Odstranění nenavázaných molekul umožňuje zakotvení antigenu nebo protilátky na nosiči, kterou je nejčastěji povrch mikrotitrační destičky z pevného polystyrenu, polyvinylu a polypropylenu. Použité nosiče musí být schopny vhodně absorbovat antigen či záchytnou protilátku, ale nesmí absorbovat složky v ostatních fázích (Aydin, 2015).

Jedním z nejcitlivějších typů metody je tzv. sendvičová ELISA. V tomto uspořádání je nejprve navázána zachycovací protilátka na podklad, po odmytí nefixovaných protilátek je přidán vzorek, který se během inkubace naváže na protilátku a po dalším pomytí je detekován pomocí detekční protilátky. Ta může být přímo konjugovaná s enzymem nebo slouží jako antigen pro sekundární protilátku konjugovanou s enzymem (viz obr. 20). Po odmytí nenavázaných protilátek a přidání substrátu dojde k reakci měnící zbarvení vzorku v závislosti na koncentraci antigenu (Aydin, 2015).



Obrázek 20: Schéma průběhu nepřímé sendvičové formy metody ELISA. Upraveno podle: <https://www.lsbio.com/elisakits/human-antithrombin-iii-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f10410/10410>

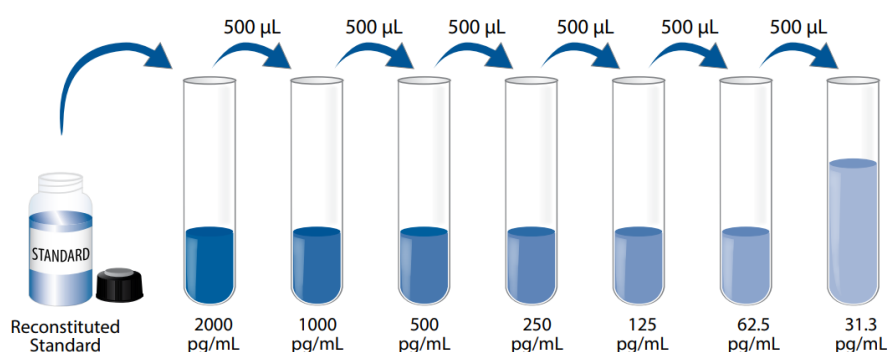
V této práci byla použita přímá sendvičová ELISA (tzn. za použití detekční protilátky přímo konjugované s enzymem) pro stanovení koncentrace cytokinů v supernatantech kultur PBMC a v plazmách periferní krve. Byly použity detekční biotinylované protilátky (viz tabulka 3), jako funkční enzym křenová peroxidáza vázaná na streptavidinu a jako substrát peroxidázy byl použit 3,3,5,5-tetramethylbenzidin (TMB).

Tabulka 3: Protilátky pro metodu ELISA

Detekce cytokinu	Vyvazovací protilátka	Detekční protilátka	Rekombinantní standard	Výrobce
IL-10	DY217B (Duoset)			R&D Systems
TGF- β	MAB 240	BAF 240	240 IL	R&D Systems

Na destičku byla navázána primární monoklonální protilátka anti-human IL-10 resp. TGF- β po 75 μ l na jamku, ředěná v PBS dle údajů od výrobce. Destička byla inkubována přes noc při pokojové teplotě.

Druhý den byla destička 3x promyta PBS s 0,05% roztokem Tween. Na destičku byl nanesen blokovací roztok po 300 μ l na jamku a byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následně byla destička 3x promyta PBS s 0,05% roztokem Tween. Vzorky supernatantů buněčných kultur/krevní plazmy byly pro nanesení na destičku ředěny v TBS (Tris buffered saline, Trisem pufovaný fyziologický roztok) pro TGF- β ředícím roztoku pro IL-10. Standardy byly naředěny dle údajů od výrobce (viz obr. 21). Vzorky byly na destičky nanášeny v dubletech po 50 μ l. Destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a přes noc uložena do lednice.



Obrázek 21: Návod na sériové ředění standardu pro sestavení sedmibodové kalibrační křivky pro rekombinantní IL-10. Převzato z:

<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy217b.pdf>

Následující den byla destička 3x promyta PBS s 0,05 % roztokem Tween. Na destičku byla nanášena detekční biotinylovaná protilátka ředěná v TBS ředícím roztoku pro IL-10 dle údajů od výrobce. Destička byla inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě a 3x promyta PBS s 0,05% roztokem Tween. Na destičku byl nanášen v TBS 1000x ředěný streptavidin značený křenovou peroxidázou po 50 µl na jamku. Destička byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě 3x promyta PBS s 0,05% roztokem Tween. Vyvolávací roztok byl připraven z 3 ml citrátového pufru, 3 ml roztoku TMB a 1 µl H₂O₂ na jednu destičku. Na destičku bylo nanášeno po 50 µl vyvolávacího roztoku, se kterým byla inkubována v temnu po dobu 20-30 minut. Reakce byla zastavena přidáním 50 µl 1M H₂SO₄ na jamku.

Absorbance byla změřena při 450 nm fotometrem mikrotitračních destiček Sunrise a pomocí kalibrační křivky byla odečtena koncentrace cytokinů.

5 Výsledky

5.1 Stanovení Treg v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie

5.1.1. Dynamika Treg u žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu

Ve skupině žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu, kterým lékař indikoval vaginální užívání progesteronu (podrobněji viz kapitola 4.2.2 Kritéria výběru dárkyň a odběr vzorků), byly v letech 2016-2018 pomocí průtokové cytometrie zpracovány vzorky periferní krve 32 žen ve věku od 23 do 46 let, z toho u 7 žen 2x a u 3 žen 3x. Odběry probíhaly v následujících 3 intervalech:

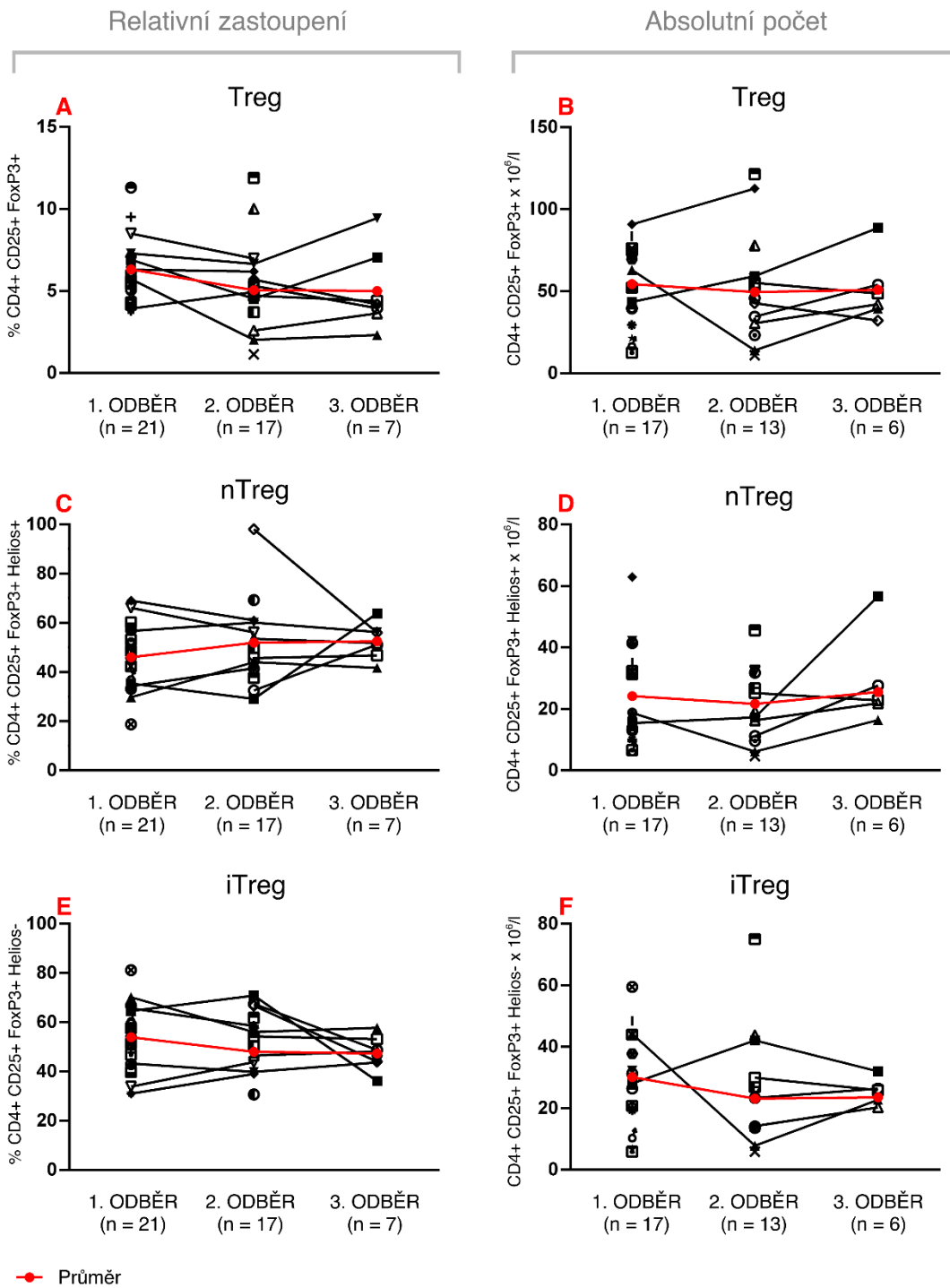
1. odběr: v době před začátkem progesteronové terapie nebo krátce po začátku jeho užívání (n = 21)
2. odběr: po 2-3 týdnech užívání progesteronu (n = 17)
3. odběr: po dalších 3-4 týdnech užívání progesteronu (n = 7)

Přepočtem hodnot podle údaje o absolutním počtu $CD3^+CD4^+$ lymfocytů v periferní krvi byly získány hodnoty absolutních počtů celkové populace Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$), populací nTreg a iTreg. U žen s rizikem předčasného porodu byl absolutní počet $CD3^+CD4^+$ lymfocytů měřen jako součást stanovení krevního obrazu na klinickém pracovišti (viz kapitola 4.2.7 Průtoková cytometrie – detekce absolutního zastoupení Treg), toto měření bohužel neproběhlo u všech žen, a proto je počet subjektů, u kterých byl stanoven absolutní počet Treg, následující:

1. odběr: v době před začátkem progesteronové terapie nebo krátce po začátku jeho užívání (n = 17)
2. odběr: po 2-3 týdnech užívání progesteronu (n = 13)
3. odběr: po dalších 3-4 týdnech užívání progesteronu (n = 6)

V těchto třech sledovaných obdobích není v průběhu progesteronové terapie pozorovatelný rozdíl v procentuálním ani absolutním zastoupení $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg (obr. 22A a 22B), v procentuálním ani absolutním zastoupení $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$ nTreg (obr. 22C a 22D) a v procentuálním ani absolutním zastoupení $CD25^+FoxP3^+Helios^-$ iTreg (obr. 22E a 22F). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem jednofaktorová ANOVA s následným využitím Tukeyho post-hoc testu.

RIZIKOVÉ ŽENY



Obrázek 22: Detekce Treg v periferní krvi rizikových žen užívajících progesteron pomocí průtokové cytometrie. Procentuální zastoupení a absolutní počet $CD4^+CD25^+FoxP3^+Treg$ (A resp. B), $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$ nTreg (C resp. D) a $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$ iTreg (E resp. F) v periferní krvi žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu v průběhu progesteronové terapie. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem jednofaktorová ANOVA s následným využitím Tukeyho post-hoc testu. Treg – regulační T lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg, n – počet žen

5.1.2. Dynamika Treg u žen s nízkým rizikem předčasného porodu

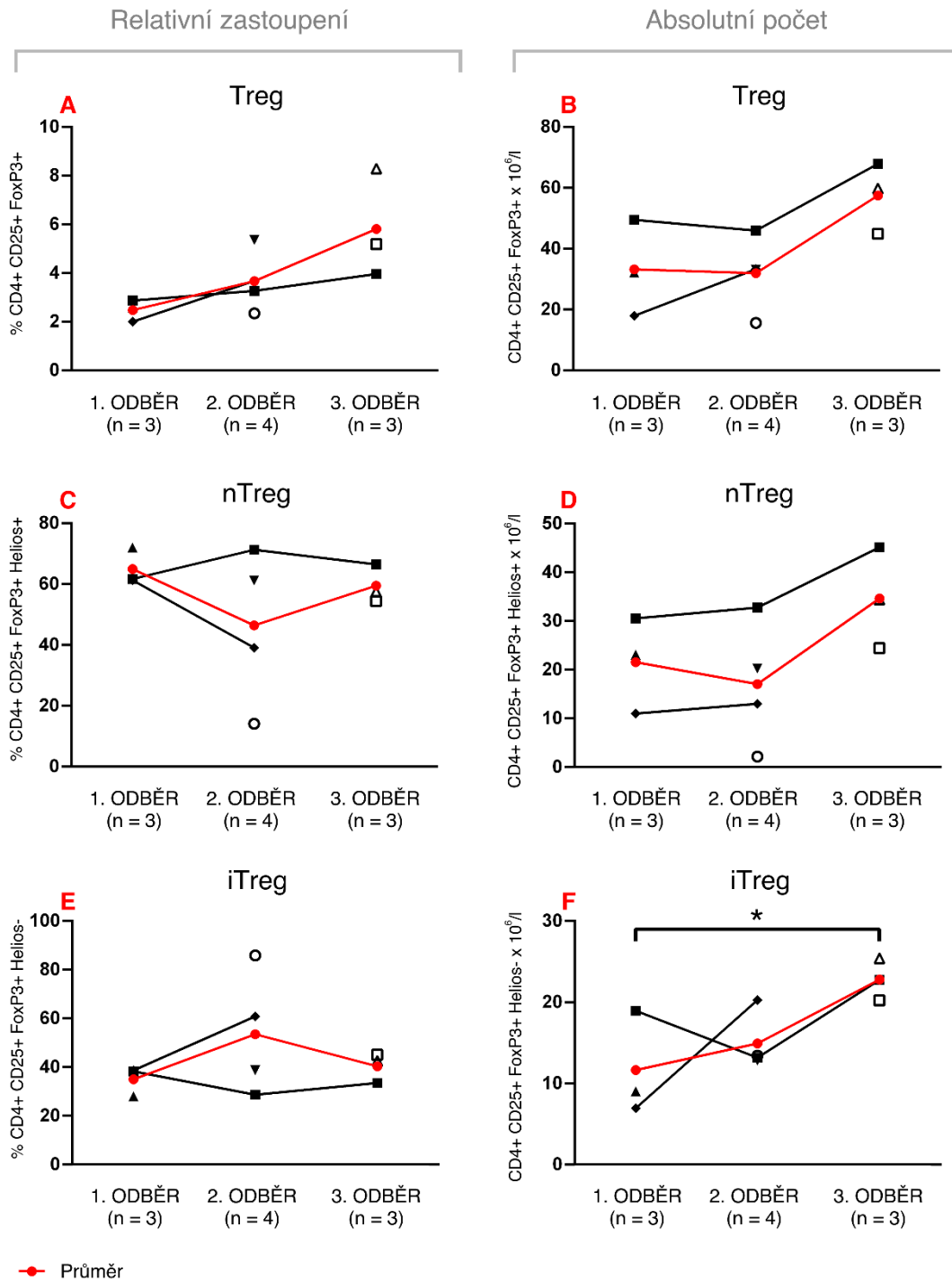
Nízkorizikovým těhotným ženám byla v průběhu těhotenství odebrána krev ze žíly v loketní jamce v následujících třech časových intervalech:

1. interval: v probíhajícím 25.-26. tt
2. interval: v probíhajícím 31.-32. tt
3. interval: v probíhajícím 35.-36. tt

Hodnoty absolutních počtů jednotlivých Treg, nTreg a iTreg populací byly přepočteny podle hodnot absolutního počtu CD4⁺ lymfocytů. Absolutní počet CD4⁺ lymfocytů byl měřen autorkou na průtokovém cytometru BD FACS Canto™ v softwaru pro klinické měření BD FACSCanto™ za použití zkumavek BD Trucount™ (viz kapitola 4.2.7 Průtoková cytometrie – detekce absolutního zastoupení Treg).

Skupinu nízkorizikových těhotných tvoří 7 žen, z nichž u jedné proběhl odběr 3x a u jedné 2x. Ve třech sledovaných intervalech nebyl v průběhu těhotenství stanoven statisticky významný rozdíl v procentuálním ani absolutním zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg (obr. 23A a 23B), v procentuálním ani absolutním zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺ nTreg (obr. 23C a 23D) ani v procentuálním zastoupení CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻ iTreg (obr. 23E). V absolutním zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻ iTreg v periferní krvi nízkorizikových žen (obr. 23F) je statisticky významný nárůst mezi 1. obdobím odběru v intervalu 25. - 26. tt a 3. obdobím v intervalu 35. - 36. tt ($p \leq 0.05$). Pro statistické zhodnocení získaných výsledků byla použita jednofaktorová ANOVA s následným využitím Tukeyho post-hoc testu.

NÍZKORIZIKOVÉ ŽENY



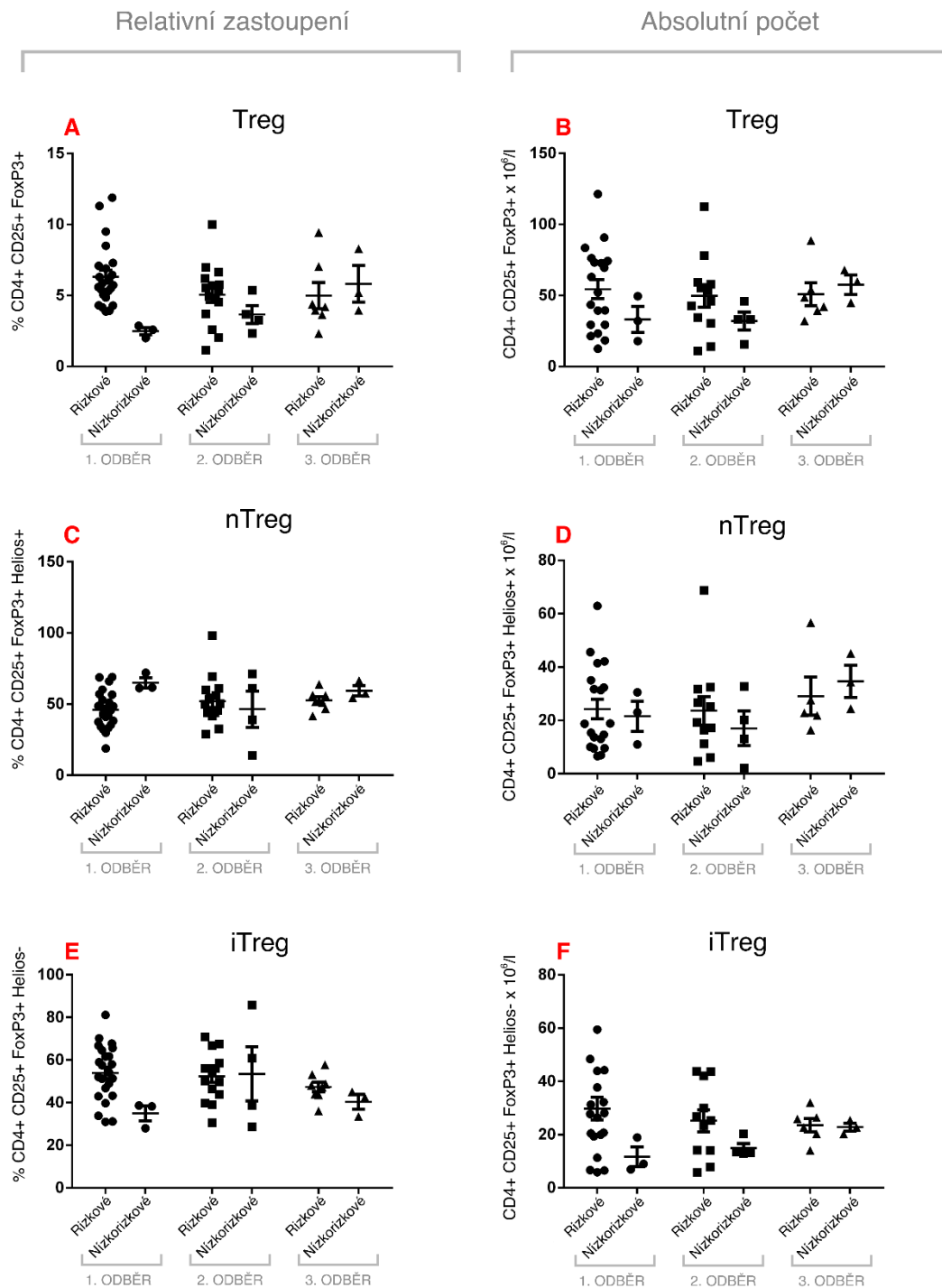
Obrázek 23: Stanovení Treg v periferní krvi nízkorizikových žen pomocí průtokové cytometrie. Procentuální zastoupení a absolutní počet CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg (A resp. B), CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺ nTreg (C resp. D) a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻ iTreg (E resp. F) v periferní krvi žen s nízkým rizikem předčasného porodu v průběhu těhotenství (1. odběr 25.-26. tt, 2. odběr 31.-32. tt, 3. odběr 35.-36. tt). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem jednofaktorová ANOVA s následným využitím Tukeyho post-hoc testu. *p ≤ 0.05, Treg – regulační T lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg, n – počet žen

5.1.3 Porovnání Treg v periferní krvi rizikových a nízkorizikových žen

Těhotným ženám s nízkým rizikem předčasného porodu (podrobněji viz kapitola 4.2.2 Kritéria výběru dárkyň a odběr vzorků) byla v průběhu těhotenství odebrána krev ve třech časových intervalech. Ty byly stanoveny na základě intervalů těhotenství, ve kterých byla nejčastěji odebírána krev ženám s vysokým rizikem předčasného porodu.

V těchto třech sledovaných obdobích byly pomocí průtokové cytometrie porovnány procentuální zastoupení a absolutní počet buněk populací $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg (obr. 24A a 24B), $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$ nTreg (obr. 24C a 24D) a $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$ iTreg (obr. 24E a 24F) mezi periferní krví žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu a periferní krví žen s nízkým rizikem předčasného porodu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem jednofaktorová ANOVA s použitím Dunnova testu pro mnohonásobné porovnání.

Mezi ženami se zvýšeným rizikem předčasného porodu a ženami s nízkým rizikem předčasného porodu nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v procentuálním zastoupení ani absolutních počtech populací Treg, nTreg a iTreg.



Obrázek 24: Srovnání Treg v periferní krvi nízkorizikových žen a žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu. Porovnání procentuálního zastoupení a absolutních počtů $CD4^+CD25^+FoxP3^+Treg$ (A resp. B), $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$ nTreg (C resp. D) a $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$ iTreg (E resp. F) v periferní krvi žen se zvýšeným rizikem resp. nízkým rizikem předčasného porodu v průběhu těhotenství. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem jednofaktorová ANOVA s následným použitím Dunnova testu pro mnohonásobné porovnání. Treg – regulační T lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg

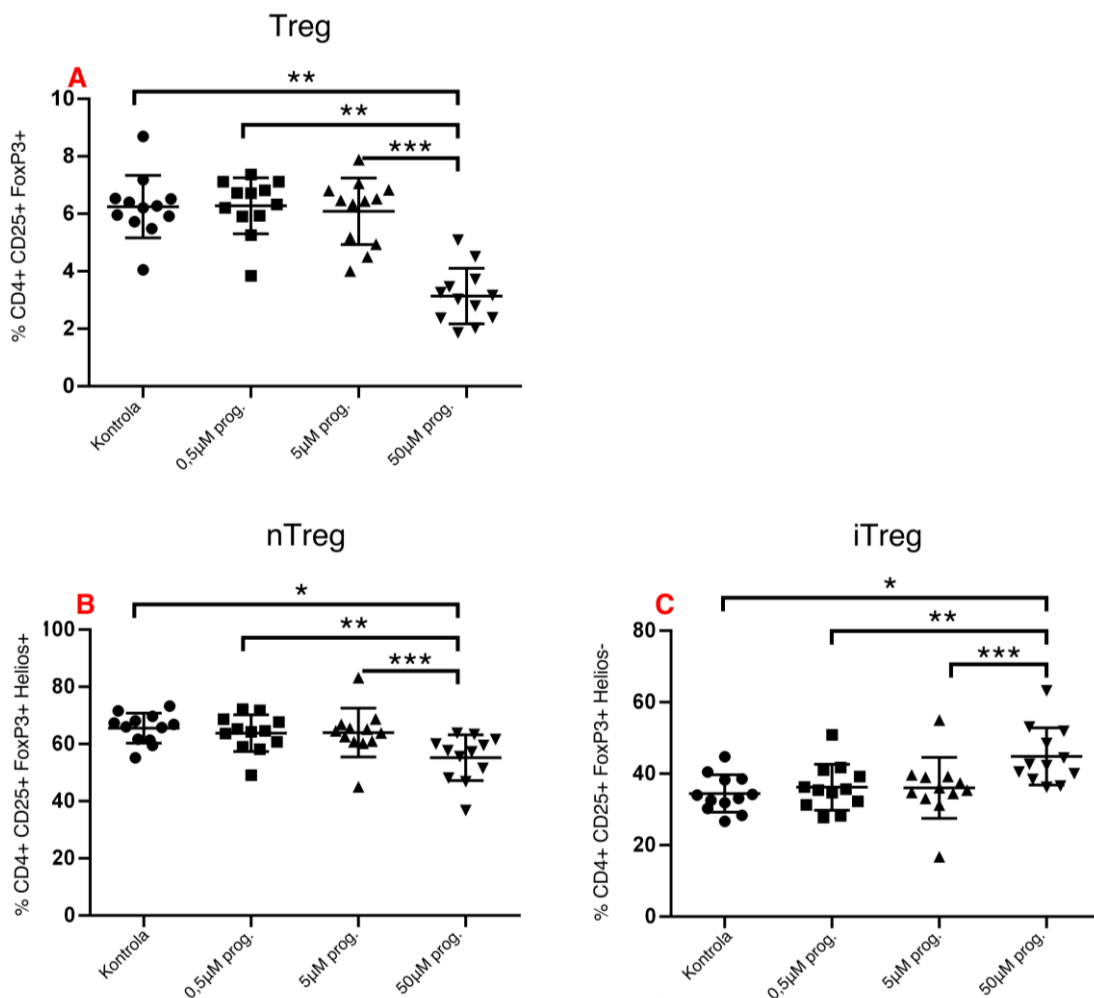
5.2 Schopnost progesteronu indukovat Treg *in vitro*

5.2.1 Vývoj metodiky

Pro ověření schopnosti progesteronu indukovat Treg *in vitro* bylo třeba nejdříve zavést a optimalizovat podmínky stimulace PBMC a vybrat vhodnou formu progesteronu pro buněčné kultivace. Po vyzkoušení práce s různými druhy progesteronu (viz Kapitola 4.2.4 Kultivace *in vitro*) byl pro další práci zvolen Progesterone-Water Soluble – ve vodě rozpustný progesteron pro buněčné kultivace (Sigma-Aldrich).

Pro výběr vhodné koncentrace progesteronu a délky kultivace buněk byla frakce PBMC izolovaná z periferní krve netěhotné ženy stimulována po dobu 1-7 dní různými koncentracemi progesteronu (0,5 μ M, 5 μ M a 50 μ M). Byly provedeny dva samostatné experimenty. Pro první experiment se nepodařilo získat dostatek buněk pro všechny časové intervaly a koncentrace, proto byly testovány pouze časové intervaly po 1, 2, 3, 4 a 6 dnech stimulace. Při druhém experimentu byla PBMC frakce z periferní krve další netěhotné ženy stimulována 0,5 μ M, 5 μ M a 50 μ M koncentrací progesteronu po dobu 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7 dní.

Průměrné hodnoty procentuálního zastoupení Treg, nTreg a iTreg ve stimulovaných vzorcích PBMC a nestimulované kontrole ze všech 7 dnů kultivace z obou experimentů znázorňuje obrázek 25. Ve vzorcích stimulovaných 50 μ M koncentrací progesteronu bylo ve srovnání se vzorky stimulovanými 5 μ M koncentrací progesteronu ($p \leq 0,05$), ve srovnání se vzorky stimulovanými 0,5 μ M koncentrací progesteronu ($p \leq 0,01$) a ve srovnání s kontrolními vzorky ($p \leq 0,001$) významně nižší procentuální zastoupení Treg (obr. 26A) a nTreg (obr. 25B) a významně vyšší procentuální zastoupení iTreg (obr. 25C).

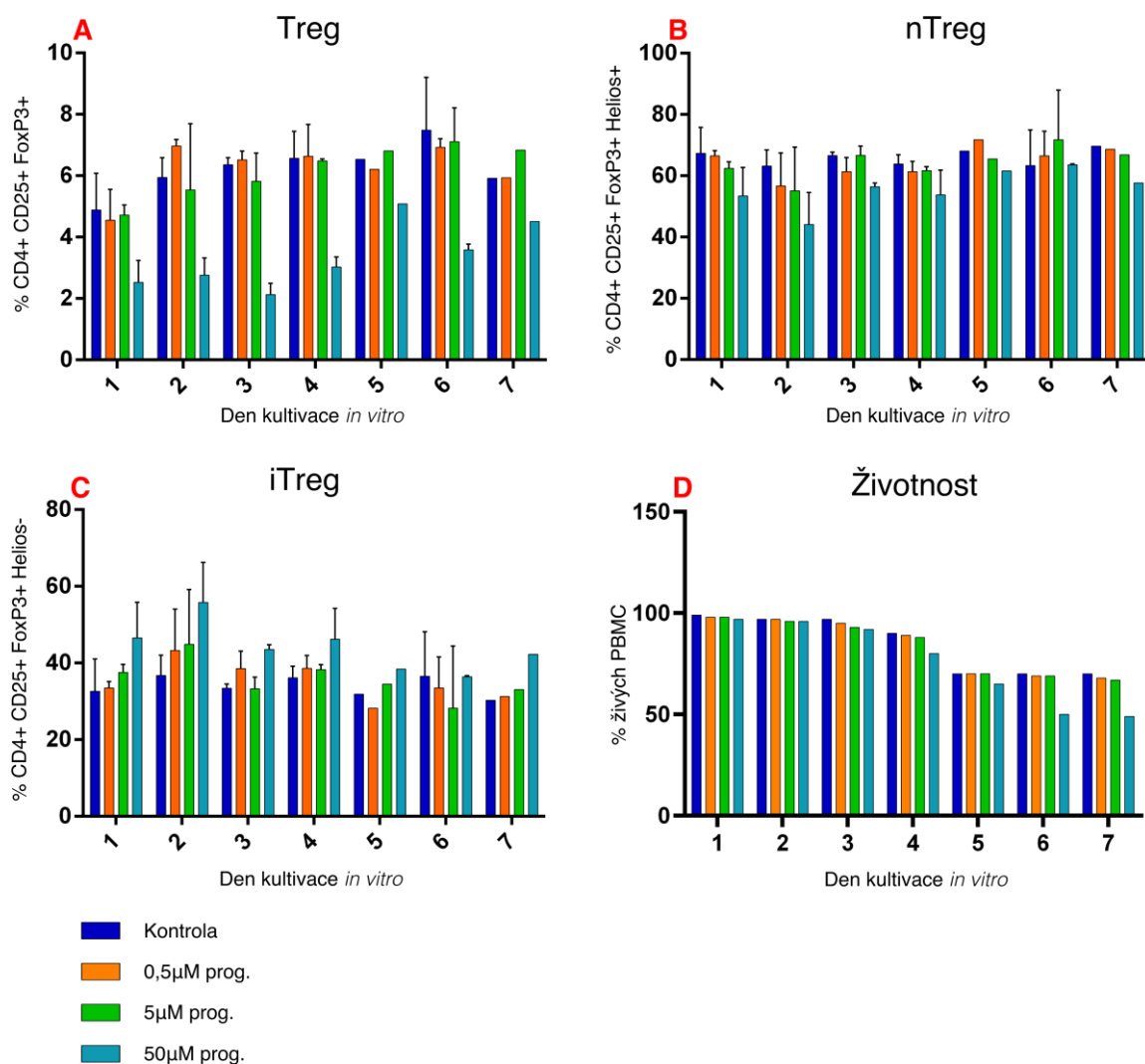


Obrázek 25: Optimalizace indukce Treg v PBMC progesteronem *in vitro*. Pomocí průtokové cytometrie byly stanoveny průměrné hodnoty procentuálního zastoupení Treg (A), nTreg (B) a iTreg (C) ve stimulovaných vzorcích PBMC izolovaných z krve 2 netěhotných žen po 1-7 dnech kultivace. Vzorky ($n = 12$) byly stimulovány 0,5μM, 5μM a 50μM koncentrací progesteronu a kultivovány samostatně jako kontrola. Ve výsledcích je zobrazen průměr a směrodatné odchylky.

Data byla vyhodnocena testem jednofaktorová ANOVA a následně Tuckeyho testem pro mnohonásobné porovnání. Treg – regulační T lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg, n – počet vzorků

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Změny procentuálního zastoupení Treg, nTreg a iTreg a životnosti izolovaných PBMC v průběhu všech 7 dní stimulace progesteronem *in vitro* znázorňuje obrázek 26. Jedná se o PBMC izolované z krve dvou netěhotných žen, v případě časových intervalů po 5 a 7 dnech byla provedena stimulace buněk pouze jedné netěhotné ženy, z toho důvodu nebyl proveden žádný statistický test. Obrázek ilustruje také pokles životnosti po 4. dni kultivace (26C), který byl pozorován pomocí optického mikroskopu s využitím trypanové modři.

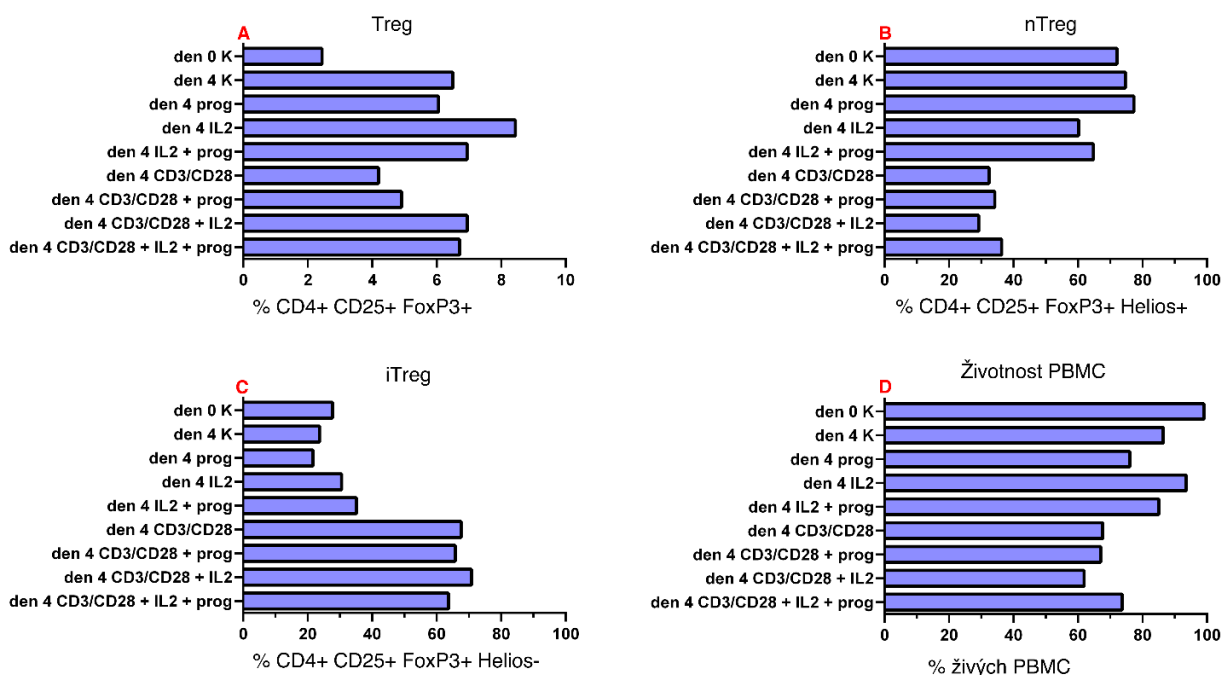


Obrázek 26: Optimalizace indukce Treg v PBMC progesteronem in vitro. Vliv stimulace PBMC dvou žen různými koncentracemi progesteronu v odlišných časových intervalech. Procentuální zastoupení $CD25^+FoxP3^+$ Treg z $CD4^+$ populace (A), procentuální zastoupení $Helios^+$ nTreg z populace $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (B), procentuální zastoupení živých PBMC (C) a procentuální zastoupení $Helios^-$ iTreg z $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ populace (D) ve vzorcích PBMC po 1-7 dnech stimulace 0,5 μ M, 5 μ M a 50 μ M koncentrací progesteronu a nestimulované kontrolní kultivaci stanovené pomocí průtokové cytometrie. Ve výsledcích je zobrazen průměr a směrodatné odchylky. Statisticky nevyhodnocováno. Treg – T regulační lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg, PBMC – mononukleární buňky periferní krve

Na základě těchto dvou experimentů byla pro další pokusy zvolena 5 μ M koncentrace progesteronu a délka stimulace 4 dny. 50 μ M koncentrace vedla k poklesu relativního zastoupení $CD25^+FoxP3^+$ Treg z $CD4^+$ populace. 5 μ M koncentrace také zhruba odpovídá fyziologickým koncentracím progesteronu v těhotenství, které jsou zhruba 1 μ M v séru a 10 μ M v placentě (Cunningham et al., 2014). Po 4. dni stimulace docházelo k poklesu životnosti.

Zvolené 4 dny a 5µM koncentrace progesteronu byly použity pro stimulaci PBMC izolovaných z periferní krve 3 dalších netěhotných žen, výsledky z tohoto experimentu jsou zahrnuty v grafech shrnujících výsledky z více experimentů (obr. 30).

V dalším pokusu byly stimulovány vzorky PBMC další netěhotné ženy po dobu 4 dní s progesteronem v 5µM koncentraci a dalšími stimulanty. Kromě vzorků s nestimulovanou kontrolou a vzorků se samotným progesteronem byly PBMC stimulovány rh IL-2; CD3/CD28; CD3/CD28 společně s rh IL-2; rh IL-2 společně s progesteronem; CD3/CD28 s rh IL-2 i progesteronem. Ve vzorcích bylo pomocí průtokové cytometrie analyzováno procentuální zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg (obr. 27A), procentuální zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Helios⁺ nTreg (obr. 27B), procentuální zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻ iTreg (obr. 27C) a procentuální zastoupení živých PBMC (obr. 27D).



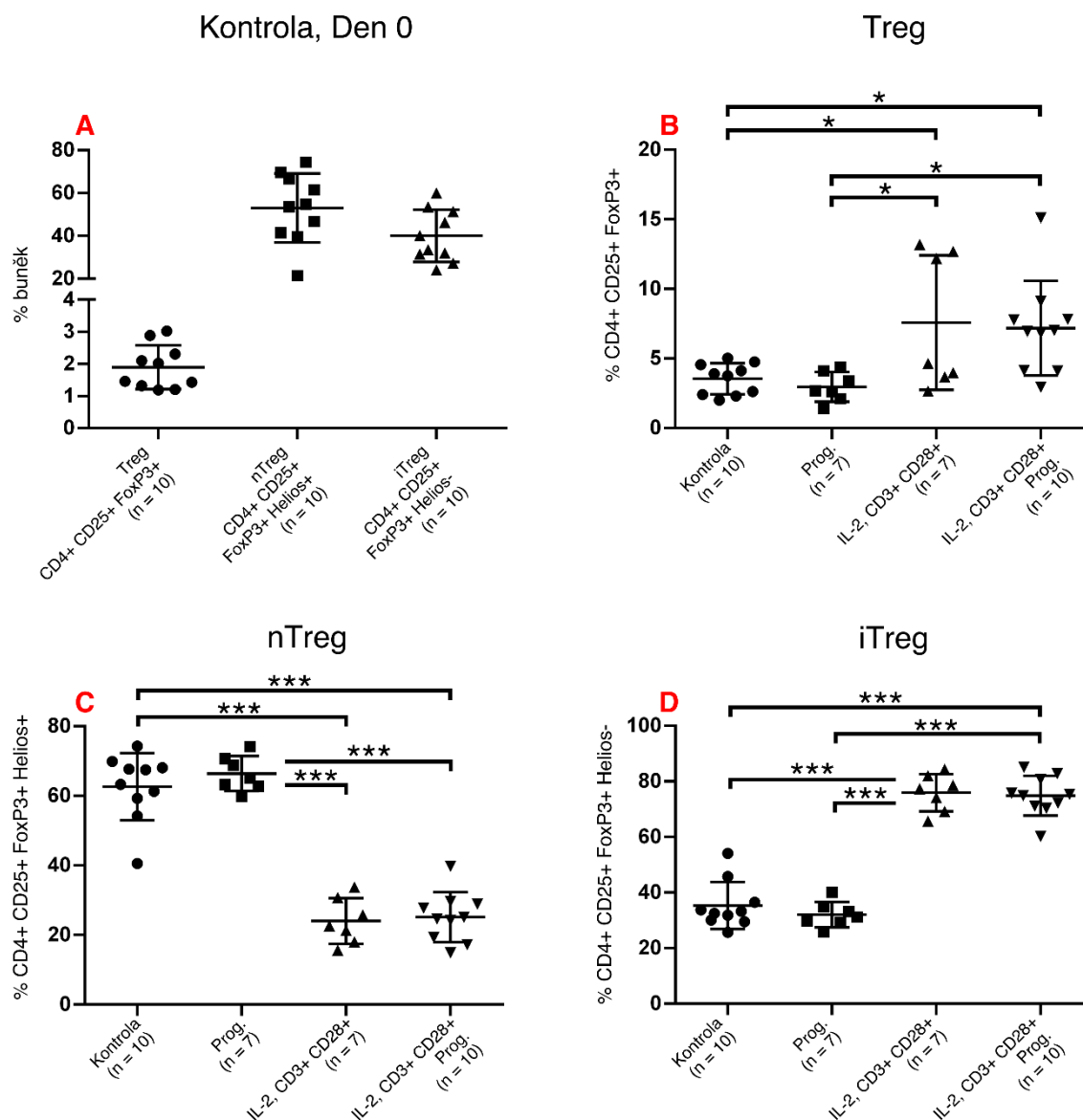
Obrázek 27: Optimalizace indukce Treg v PBMC progesteronem in vitro. Procentuální zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg (A), CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Helios⁺ nTreg (B), CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻ iTreg (C) a procentuální zastoupení živých PBMC (D) ve vzorcích PBMC izolovaných z periferní krve netěhotné ženy a stimulovaných po dobu 4 dní následujícími stimulanty: progesteron, rh IL-2; CD3/CD28; CD3/CD28 společně s rh IL-2; rh IL-2 společně s progesteronem; CD3/CD28 s rh IL-2 i progesteronem. Progesteron je v 5µM koncentraci. Nebyl proveden žádný statistický test, jedná se o vzorky PBMC jedné netěhotné ženy.

K – nestimulovaná kontrola, prog – progesteron, Treg – T regulační lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg, PBMC – mononukleární buňky periferní krve, IL – interleukin, rh IL-2, rekombinantní lidský IL-2

5.2.2 Závěrečný experiment

Závěrem byly stimulovány PBMC izolované z periferní krve dalších 10 netěhotných žen. Pokus byl proveden ve dvou experimentech, přičemž v každém z nich byly stimulovány vzorky PBMC 5 žen. Vzorky byly stimulovány 4 dny, analyzována byla také nestimulovaná kontrola v den izolace PBMC (obr. 28A). Použity byly následující stimulanty: 5 μ M progesteron, rh IL-2 s CD3/CD28; rh IL-2 s CD3/CD28 a 5 μ M progesteronem. Bohužel se nepodařilo získat dostatek PBMC pro všechny stimulační podmínky, proto je méně vzorků stimulovaných 4 dny rh IL-2 s CD3/CD28 a samotným progesteronem (n = 7). Pomocí průtokové cytometrie bylo ve vzorcích stanoveno procentuální zastoupení Treg (obr. 28B), nTreg (obr. 28C) a iTreg (obr. 28D).

Pro statistické zhodnocení získaných výsledků byla použita jednofaktorová ANOVA s následným využitím Tukeyho post-hoc testu. Relativní zastoupení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg z CD4⁺ populace bylo významně vyšší u PBMC stimulovaných rh IL-2 s CD3/CD28 a rh IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem oproti PBMC stimulovaným pouze samotným progesteronem a nestimulované kontrole ($p \leq 0,05$, obr. 28B). Relativní zastoupení Helios⁺ nTreg z populace CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg bylo významně nižší u PBMC stimulovaných rh IL-2 s CD3/CD28 a rh IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem oproti PBMC stimulovaným pouze samotným progesteronem a nestimulované kontrole ($p \leq 0,001$, obr. 28C). Relativní zastoupení Helios⁺ iTreg z populace Treg bylo analogicky opačné k relativnímu zastoupení nTreg (obr. 28D).

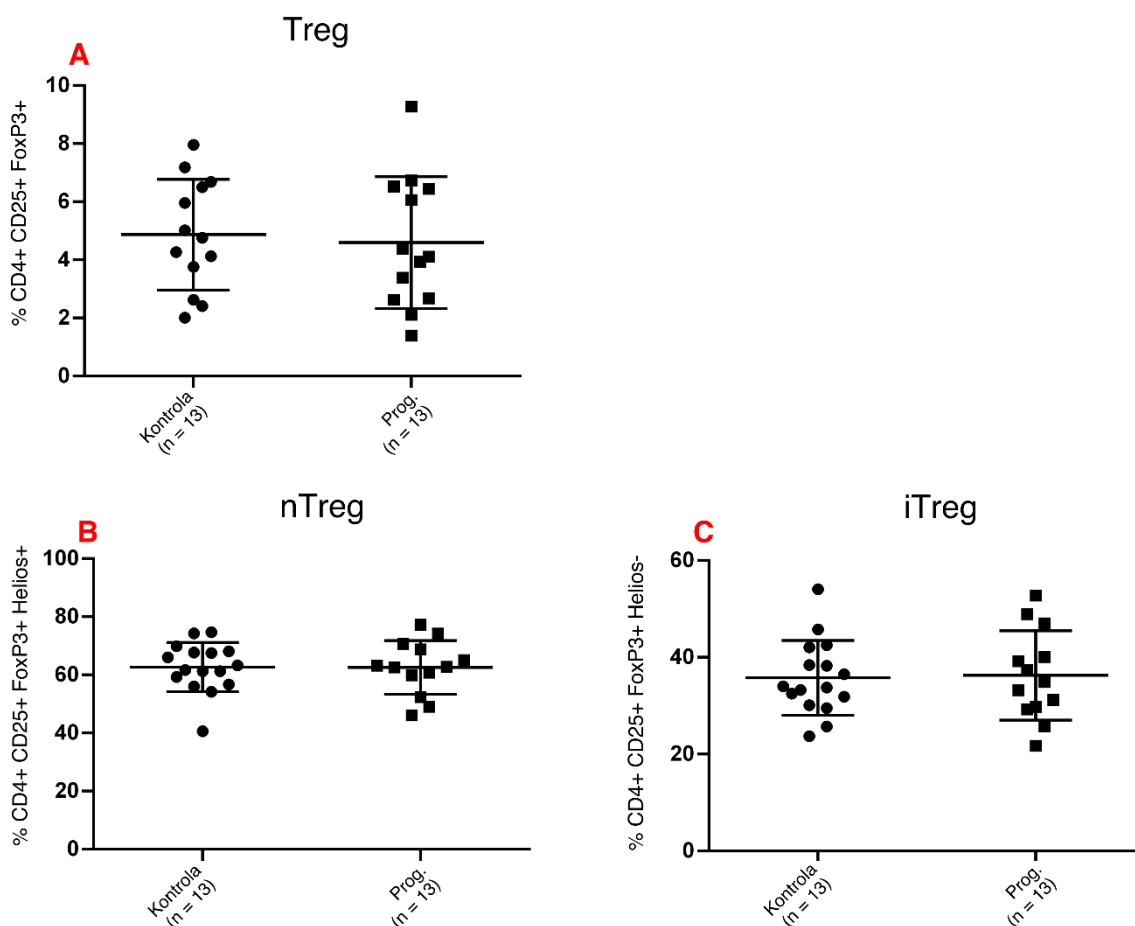


Obrázek 28: Závěrečný experiment indukce Treg progesteronem in vitro. PBMC izolované z periferní krve 10 netěhotných žen byly stimulovány po dobu 4 dní. Pomocí průtokové cytometrie bylo analyzováno procentuální zastoupení Treg, nTreg a iTreg v PBMC krátce po izolaci (A), relativní zastoupení CD25⁺FoxP3⁺ Treg z CD4⁺ populace (B), relativní zastoupení Helios⁺ nTreg z populace CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (C) a relativní zastoupení Helios⁻ iTreg z CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ populace (D) po 4 dnech kultivace s následujícími stimulanty: progesteron, rh IL-2 společně s CD3/CD28; rh IL-2 s CD3/CD28 a progesteronem. Progesteron je v 5μM koncentraci. Ve výsledcích je zobrazen průměr a směrodatné odchylky.

Pro statistické zhodnocení získaných výsledků byla použita jednofaktorová ANOVA s následným využitím Tukeyho mnohonásobného porovnání.

IL – interleukin, rh – rekombinantní lidský, Treg – T regulační lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg, PBMC – mononukleární buňky periferní krve, prog – progesteron, n – počet žen, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

Hodnoty procentuálního zastoupení Treg, nTreg a iTreg získané analýzou vzorků PBMC stimulovaných 4 dny 5 μ M progesteronem ze všech proběhlých experimentů byly sloučeny a statisticky vyhodnoceny párovým t-testem (n = 13). Mezi vzorky PBMC stimulovanými progesteronem a nestimulovanou kontrolou nebyl zjištěn žádný rozdíl v procentuálním zastoupení Treg (obr. 29A), nTreg (obr. 29B) ani iTreg (obr. 29C).



Obrázek 29: Indukce Treg progesteronem in vitro – souhrn všech experimentů. PBMC zdravých netěhotných žen po 4 dnech stimulace 5 μ M progesteronem a nestimulované kontroly. Sloučení výsledků ze všech provedených stimulací in vitro (n = 13). Procentuální zastoupení Treg (A), nTreg (B) a iTreg (C).

Ve výsledcích je zobrazen průměr a směrodatné odchylky.

Statisticky vyhodnoceno párovým t-testem.

Treg – T regulační lymfocyty, nTreg – přirozené Treg, iTreg – indukované Treg, PBMC – mononukleární buňky periferní krve, prog – progesteron, n – počet vzorků

5.3 Stanovení cytokinů s regulační funkcí metodou ELISA

5.3.1 Stanovení IL-10 a TGF- β v krevní plazmě rizikových a nízkorizikových žen

Pomocí metody přímá sendvičová ELISA byla stanovena koncentrace cytokinů IL-10 a TGF- β v plazmách periferní krve těhotných žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu odebírané ve třech sledovaných intervalech v průběhu progesteronové terapie (1. odběr: před začátkem progesteronové terapie nebo krátce po jejím začátku, 2. odběr: po 2-3 týdnech užívání progesteronu, 3. odběr: po dalších 3-4 týdnech užívání progesteronu).

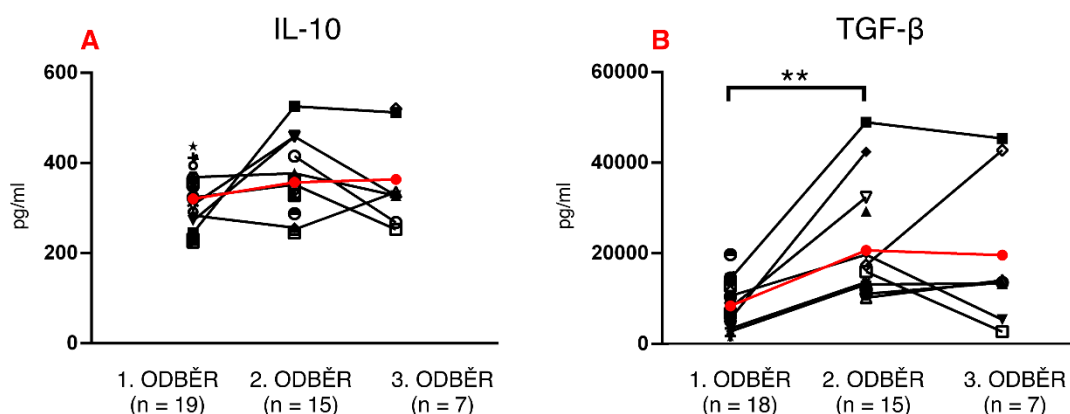
Koncentrace IL-10 kolísala u jednotlivých žen v průběhu progesteronové terapie s rozdílnou dynamikou. Koncentrace IL-10 byla celkově nízká a v souhrnu se mezi jednotlivými odběry statisticky významně nelišila (obr. 30A).

Koncentrace TGF- β v plazmě rizikových žen statisticky významně vzrostla mezi prvním a druhým odběrem ($p \leq 0,01$) a na podobné úrovni zůstala i v době 3. odběru, kde je však menší množství analyzovaných vzorků (obr. 30B).

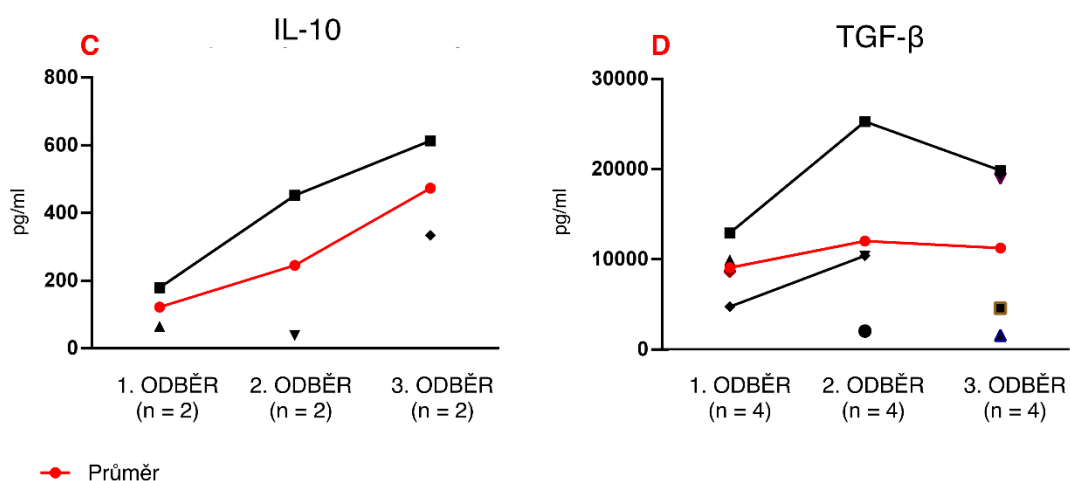
Koncentrace cytokinů IL-10 a TGF- β byla stanovena také v plazmách periferní krve zdravých těhotných žen s nízkým rizikem předčasného porodu ve třech intervalech (1. interval: 25.-26. tt, 2. interval: 31.-32. tt, 3. interval: 35.-36. tt). Koncentrace IL-10 byla opět celkově nízká a v průběhu těhotenství vykazovala stoupající tendenci bez statistické signifikance, ovšem dat je velice málo (obr. 30C). Ani v koncentraci TGF- β nebyl mezi jednotlivými sledovanými obdobími zjištěn významný rozdíl (obr. 30D).

V některých analyzovaných vzorcích byla koncentrace cytokinů pod detekčním limitem metody, proto je počet zjištěných hodnot v jednotlivých časových intervalech nižší v porovnání s počtem odebraných vzorků periferní krve. Pro statistické zhodnocení dat byl použit Kruskal-Wallis test a následně Dunnovo mnohonásobné porovnání.

RIZIKOVÉ ŽENY



NÍZKORIZIKOVÉ ŽENY



Obrázek 30: Stanovení IL-10 a TGF-β v krevní plazmě rizikových a nízkorizikových žen pomocí metody ELISA. V krevní plazmě žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu byly v průběhu progesteronové terapie stanoveny koncentrace cytokinů IL-10 (A) a TGF-β (B). V krevní plazmě žen s nízkým rizikem předčasného porodu byly v průběhu těhotenství také stanoveny koncentrace cytokinů IL-10 (C) a TGF-β (D). Pro statistické zhodnocení dat byl použit Kruskal-Wallis test a následně Dunnův test pro mnohonásobné porovnání.

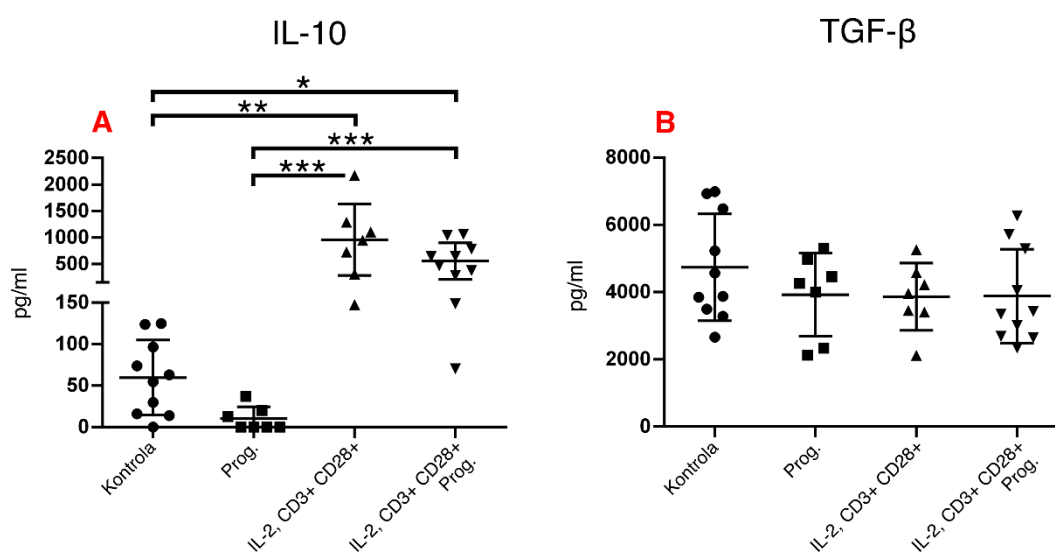
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, IL – interleukin, n – počet vzorků,
TGF-β - transformující růstový faktor β, ** $p \leq 0,01$

5.3.2 Stanovení IL-10 a TGF- β v supernatantech buněčných kultur

Pomocí metody přímá sendvičová ELISA byla stanovena koncentrace cytokinů IL-10 a TGF- β v supernatantech kultur PBMC zdravých netěhotných žen stimulovaných 4 dny 5 μ M progesteronem, rh IL-2 s CD3/CD28; rh IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem (viz kapitola 5.2.2 Závěrečný experiment).

Pro statistické zhodnocení dat byl použit Kruskal-Wallis test a následně Dunnovo mnohonásobné porovnání. Koncentrace IL-10 byla statisticky významně vyšší v supernatantech vzorků PBMC stimulovaných rh IL-2 s CD3/CD28 oproti kontrole ($p \leq 0,01$) i supernatantům vzorků stimulovaných samotným progesteronem ($p \leq 0,001$). Také v supernatantech vzorků stimulovaných rh IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem byla koncentrace IL-10 významně vyšší ve srovnání s kontrolou ($p \leq 0,05$) a vzorky stimulovanými samotným progesteronem ($p \leq 0,001$, obr. 31A).

Koncentrace TGF- β se mezi vzorky po jednotlivých stimulacích nelišila (obr. 31B).



Obrázek 31: Stanovení IL-10 a TGF- β v supernatantech buněčných kultur pomocí metody ELISA. V supernatantech PBMC zdravých netěhotných žen stimulovaných 4 dny 5 μ M progesteronem ($n = 7$), rh IL-2 s CD3/CD28 ($n = 7$); rh IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem ($n = 10$) a nestimulované kontrole ($n = 10$) byly stanoveny koncentrace cytokinů IL-10 (A) a TGF- β (B). Pro statistické zhodnocení dat byl použit Kruskal-Wallis test a následně Dunnův test pro mnohonásobné porovnání. Ve výsledcích je zobrazen průměr a směrodatné odchytky.

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, IL – interleukin, TGF- β – transformující růstový faktor β , PBMC – mononukleární buňky periferní krve, prog – progesteron, n – počet vzorků * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.4 Korelace výsledků s klinickými údaji

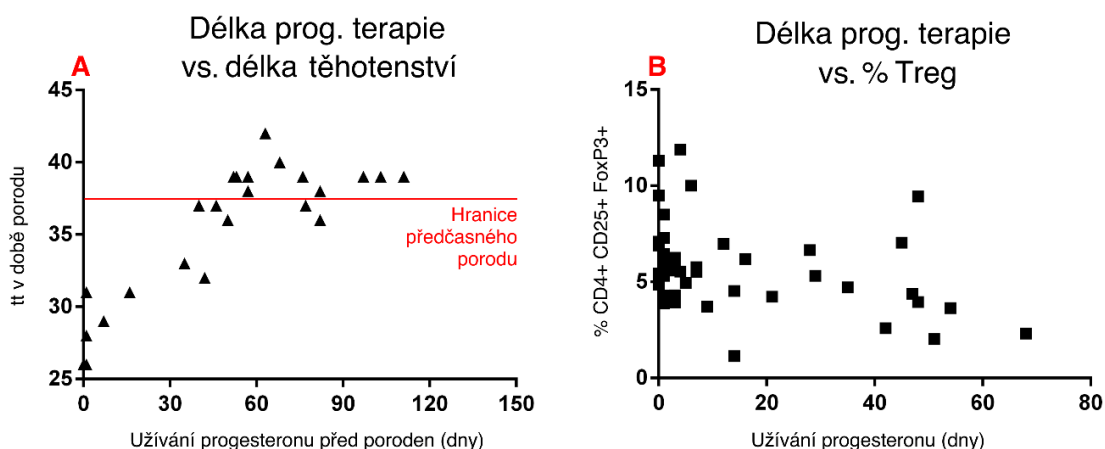
U žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu byly zjištěny následující anamnestické údaje: probíhající týden těhotenství v době odběru, hodnoty funkční délky děložního hrdla (mm) zjištěné cervikometrií v době co nejbližší době odběru vzorku periferní krve, délka užívání progesteronu (dny), probíhající týden těhotenství v době porodu. Ne všechny údaje byly zjištěny u všech žen, např. údaj o tt v době porodu nemohl být získán, pokud ženy rodily na jiném než spolupracujícím pracovišti. Tyto získané klinické údaje byly korelovány s hodnotami laboratorními, tzn. absolutních počtů a procentuálního zastoupení $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg, $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$ nTreg a $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$ iTreg zjištěnými pomocí průtokové cytometrie. Při korelacích údajů, které nebyly zjišťovány společně ve stejném časovém úseku, byly samostatně porovnány údaje zahrnující hodnoty Treg zjištěné při prvním resp. posledním odběru v případě žen s opakovanými odběry periferní krve. Dále byly tyto údaje porovnány se zjištěnými koncentracemi cytokinů IL-10 a TGF- β a některé klinické údaje byly porovnány mezi sebou.

Konkrétně jsme korelovali následující údaje:

- hodnoty Treg a délku užívání progesteronu (dny)
- hodnoty Treg a délku děložního hrdla (mm)
- hodnoty Treg a délku těhotenství (tt v době porodu)
- hodnoty Treg a tt v době odběru vzorku periferní krve
- délku děložního hrdla a délku užívání progesteronu (dny)
- délku děložního hrdla a délku těhotenství (tt v době porodu)
- délku užívání progesteronu a délku těhotenství (tt v době porodu)
- koncentrace cytokinů a délku užívání progesteronu (dny)
- koncentrace cytokinů a délku děložního hrdla (mm)
- koncentrace cytokinů a délku těhotenství (tt v době porodu)
- koncentrace cytokinů a tt v době odběru vzorku periferní krve

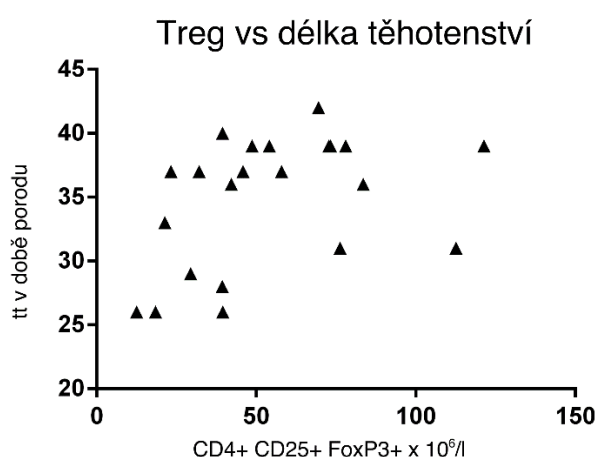
Pro zjištění korelace byl použit Pearsonův korelační koeficient. Statisticky významná byla pozitivní korelace mezi délkou progesteronové terapie a délkou těhotenství ($p \leq 0,0001$, $r = 0,8487$), tedy čím déle ženy užívaly progesteron, tím delší bylo jejich těhotenství (obr. 32A). Mezi délkou užívání progesteronu a procentuálním zastoupením Treg se ukázala statisticky

významná negativní korelace ($p = 0,0205$, $r = -0,3484$, obr. 32B). Mezi koncentrací IL-10 resp. TGF- β a jinými klinickými údaji nebyla zjištěna žádná korelace.



Obrázek 32: Korelace délky progesteronové terapie a délky těhotenství, resp. procentuálního zastoupení Treg. Mezi délkou užívání progesteronu a týdnem těhotenství v době porodu byla pozitivní korelace, tedy čím delší dobu před porodem ženy užívaly progesteron, tím delší bylo jejich těhotenství ($p \leq 0,0001$, $r = 0,8487$, A). Mezi procentuálním zastoupením Treg a délkou užívání progesteronu byla negativní korelace, tedy ženy užívací progesteron déle měly nižší procentuální zastoupení Treg ($p = 0,0205$, $r = -0,3484$, B). Pro statistické zhodnocení dat byl použit Pearsonův korelační koeficient. Treg – T regulační lymfocyty

Korelace mezi absolutním počtem Treg a délkou těhotenství dosahovala hodnoty blízké signifikanci ($p = 0,0656$, $r = 0,3969$, obr. 33).



Obrázek 33: Korelace absolutního počtu Treg s délkou těhotenství. Mezi absolutním počtem Treg a délkou těhotenství byla téměř signifikantní pozitivní korelace ($p = 0,0656$, $r = 0,3969$). Pro statistické zhodnocení dat byl použit Pearsonův korelační koeficient.

Treg – T regulační lymfocyty

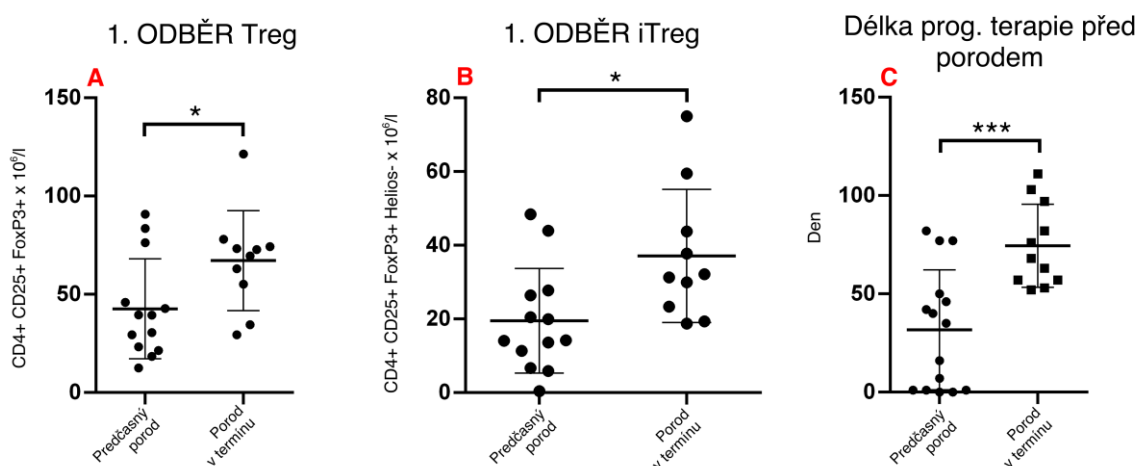
Ve skupině žen s vysokým rizikem předčasného porodu (32 žen) je znám údaj o době porodu u 26 žen, z nich 15 žen porodilo předčasně, tedy před ukončeným 37. tt. Z předčasných porodů bylo 10 spontánních a 5 císařským řezem. Mezi skupinou rizikových žen, které porodily předčasně, a skupinou rizikových žen, které porodily v termínu, byly porovnány následující údaje:

- absolutní počty a procentuální zastoupení Treg, nTreg, iTreg
- délka děložního hrdla (u žen s opakovanými odběry zvolena hodnota při 1. odběru)
- délka užívání progesteronu

Pro statistické zhodnocení byl použit nepárový t-test. Statisticky významné vyšly následující rozdíly:

- absolutní počet Treg při 1. odběru vyšší u žen rodících v termínu (obr. 34A)
- absolutní počet iTreg nehledě na dobu odběru vyšší u žen rodících v termínu (obr. 34B)
- analogicky nižší počet nTreg u žen rodících v termínu
- delší doba užívání progesteronu u žen rodících v termínu (obr. 34C)

Mezi ženami s vysokým rizikem předčasného porodu které porodily předčasně a které porodily v termínu nevyšel žádný rozdíl v délce děložního hrdla v době prvního odběru.



Obrázek 34: Některé významné rozdíly mezi rizikovými ženami rodícími v termínu a ženami rodícími předčasně. Ze skupiny žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu měly ženy, které porodily v termínu, vyšší absolutní počet Treg v periferní krvi (A) a vyšší absolutní počet iTreg v periferní krvi (B) v době prvního odběru jejich krve a delší dobu užívání progesteronové terapie před porodem (C). Ve výsledcích je zobrazen průměr a směrodatné odchylky. Pro statistické zhodnocení dat byl použit nepárový t-test.

Treg – T regulační lymfocyty, iTreg – indukované Treg, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

6 Diskuse

Hlavním cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv progesteronu na procentuální zastoupení a absolutní počet populací Treg, iTreg, nTreg a koncentraci tolerogenních cytokinů IL-10 a TGF- β při progesteronové terapii *in vivo* a stimulaci PBMC progesteronem *in vitro*. Schopnost progesteronu indukovat Treg se neprokázala. V procentuálním zastoupení a absolutních počtech populací CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺ nTreg a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻ iTreg v periferní krvi rizikových žen nebyl v průběhu progesteronové terapie pozorovatelný rozdíl. Také při kultivaci *in vitro* se vliv progesteronu na indukci Treg nepodařilo prokázat. V procentuálním zastoupení Treg, nTreg a iTreg nebyl žádný rozdíl mezi vzorky PBMC stimulovanými progesteronem a nestimulovanou kontrolou. Koncentrace TGF- β po 2-3 týdnech vaginální progesteronové terapie statisticky významně vzrostla, koncentrace IL-10 zůstala v jejím průběhu průměrně neměnná. Po stimulaci PBMC progesteronem *in vitro* nebyl zjištěn rozdíl v koncentracích IL-10 a TGF- β oproti kontrole.

Dále byly sledovány souvislosti mezi délkou užívání progesteronu, délkou těhotenství, délkou děložního hrdla, zjištěným procentuálním a absolutním zastoupením populací Treg a regulačních cytokinů. Mezi délkou progesteronové terapie a délkou těhotenství byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace. Mezi absolutním počtem Treg a délkou těhotenství byla pozitivní korelace s hodnotou blížící se statistické signifikanci ($p = 0,0656$). Mezi délkou progesteronové terapie a procentuálním zastoupením Treg však byla zjištěna korelace negativní. Ženy se zvýšeným rizikem předčasného porodu byly rozděleny na ženy, které skutečně porodily předčasně a ženy, které porodily v termínu. Ženy, které porodily v termínu měly vyšší absolutní počty Treg a iTreg a delší dobu užívání progesteronu v době porodu.

Zvýšené riziko předčasného porodu je v současnosti stanovováno na základě zkrácení děložního hrdla. Bohužel zatím neexistuje spolehlivější způsob včasné diagnostiky předčasného porodu, ani způsob, jak počínající předčasný porod zastavit či dostatečně oddálit. V současnosti sílí výzkumné snahy po nalezení vhodného markeru předčasného porodu. Včasná diagnostika by mohla vést i k vyšší účinnosti používané léčby. Vhodným prediktivním znakem by mohla být hladina Treg, která by spolu s údaji o délce děložního hrdla mohla zpřesnit míru rizika předčasného porodu (Koucký et al., 2014).

V této diplomové práci jsou Treg charakterizovány pomocí kombinace povrchových znaků CD4, CD25 a intracelulárního transkripčního faktoru FoxP3. V klinické praxi se intracelulární značení pro detekci Treg nepoužívá z důvodů vyšší technické, časové

a finanční náročnosti, Treg jsou značeny pouze povrchovým barvením jako populace $CD3^+CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$. Toto povrchové barvení Treg, založené na jejich nízké expresi CD127 u lidí, vychází pro dosavadní klinické účely jako nejefektivnější a koreluje se značením znaku FoxP3⁺ (Yu et al., 2012). Pro vědecké účely je však využíváno značení povrchových znaků CD4 a CD25 v kombinaci s intracelulárním transkripčním faktorem FoxP3, jako průkaznější identifikace Treg. Pro udržení fenotypu Treg se exprese FoxP3 jeví jako nepostradatelná, odstranění FoxP3 vede ke ztrátě supresivní funkce Treg a získání vlastností efektorových T lymfocytů (Williams and Rudensky, 2007).

V této diplomové práci jsou v rámci $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg dále rozlišovány subpopulace nTreg a iTreg pomocí intracelulárního znaku Helios. Transkripční faktor Helios je považován za dostatečně specifický pro rozlišení nTreg pocházejících z thymu a iTreg indukovaných na periférii (Thornton et al., 2016). Objevují se však také studie, které jednoznačnost znaku Helios pro rozlišení nTreg a iTreg vyvracejí (Szurek et al., 2015).

Mezi procentuálním zastoupením a absolutním počtem populací $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg, $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^+$ nTreg a $CD4^+CD25^+FoxP3^+Helios^-$ iTreg v periferní krvi nízkorizikových žen nebyl ve sledovaných intervalech těhotenství zjištěn statisticky významný rozdíl, s výjimkou nárůstu populace iTreg mezi 1. intervalem s odběry ve 25.-26. tt (druhý trimestr) a 3. intervalem s odběry ve 35.-36. tt (třetí trimestr).

Studii věnujících se dynamice Treg v průběhu fyziologického těhotenství u lidí dosud není mnoho. Je známo, že Treg jsou nezbytné pro úspěšný průběh těhotenství (Winger and Reed, 2011) a snížení jejich hladiny je spojeno s porodem (Lima et al., 2017). Xiong a kolektiv pozorovali nárůst $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg v periferní krvi v průběhu prvního trimestru, vrchol jejich množství ve druhém trimestru a postupný pokles v průběhu třetího trimestru, s dalším snížením v období porodu (Xiong et al., 2010). Somerset a kolektiv detekovali procentuální zastoupení $CD4^+CD25^+$ populace (u které následně ověřoval expresi FoxP3) z lymfocytů v periferní krvi netěhotných žen 4,4 %, vzestup na 6,7 % v krvi těhotných žen v prvním trimestru, další vzestup ve druhém trimestru na 10,9 % a žádný signifikantní rozdíl ve třetím trimestru (8,9 %) (Somerset et al., 2004). Areia a kolektiv detekovali nárůst $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ Treg v periferní krvi žen mezi druhým a třetím trimestrem těhotenství, a pokles během porodu (Areia et al., 2016a). V rozporu s většinou ostatních prací Mjösberg a kolektiv naopak popsali snížení populace $CD4^{dim}CD25^{high}FoxP3^+$ Treg ve druhém trimestru těhotenství (Mjösberg et al., 2009). Kopřivová a kolektiv analyzovali dynamiku

populace CD4⁺CD25^{high}CD127^{dim}FoxP3⁺ Treg v průběhu těhotenství pomocí odběrů periferní krve ženám v prvním, druhém a třetím trimestru těhotenství a v období porodu. Většinu této populace tvořily Helios⁺PD-1⁺ nTreg. Opakované odběry ukázaly velké rozdíly v dynamice jednotlivých žen (Kopřivová et al., 2019).

V souladu s předpokladem, že snížená hladina Treg je určitým prediktivním znakem předčasného porodu (Koucký et al., 2014), byla v této práci zjištěna pozitivní korelace blížící se signifikanci ($p = 0,0656$) mezi absolutním počtem CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg v periferní krvi rizikových žen stanoveným v době zařazení žen do studie a týdnem těhotenství v době porodu. Ženám se zvýšeným rizikem předčasného porodu se v klinické praxi s úspěchem předepisuje vaginální podávání progesteronu. V této práci vyšla statisticky velmi významná korelace mezi délkou užívání progesteronu a týdnem těhotenství v době porodu. To je v souladu s dalšími studiemi, které ukazují, že vaginální podávání progesteronu úspěšně prodlužuje těhotenství (Kuon et al., 2015; Romero et al., 2016, 2018). Tento vliv progesteronu na oddálení předčasného porodu však nemusí být zprostředkován populací Treg.

Jedním z hlavních cílů práce bylo ověřit, zda vaginální podávání progesteronu indukuje vznik Treg. Schopnost progesteronu indukovat Treg během progesteronové terapie *in vivo* se v této diplomové práci neprokázala. V průběhu progesteronové terapie nebyl pozorován žádný rozdíl v procentuálním ani absolutním zastoupení populací Treg, nTreg a iTreg v periferní krvi žen se zvýšeným rizikem předčasného porodu. Tyto výsledky jsou v rozporu s prací doktorky Areia. Areia a kolektiv studovali vliv progesteronové terapie na množství Treg u žen, kterým byl tokolytikem zastaven předčasný porod. Ve vzorcích periferní krve 10 žen odebraných před a po 24 hodinách po vaginálním podání progesteronu pozorovali vzestup procentuálního (4,9 vs. 53 %) i absolutního (14,8 vs. 56,5 buněk/ μ l) zastoupení CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺ Treg. Treg byly značeny povrchovým barvením CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} a následně byla v této populaci zjišťována střední intenzita fluorescence FoxP3 (Areia et al., 2016b). Ve studii Areia bylo pouze 10 žen, což je v případě klinických studií nízký počet. Výzkum vlivu progesteronové terapie v těhotenství na Treg u lidí *in vivo* je v počátcích.

V této práci nebyla žádná korelace mezi délkou užívání progesteronu a absolutním počtem Treg. Zjištěná korelace mezi délkou užívání progesteronu a procentuálním zastoupením CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg byla dokonce záporná, tedy čím déle užívaly ženy progesteron, tím nižší bylo procentuální zastoupení Treg zjištěné v jejich periferní krvi. Tento výsledek je zcela

v rozporu s původním předpokladem, že progesteron zvyšuje populaci Treg. Procentuální zastoupení populace Treg v periferní krvi rizikových žen však mohlo klesat z důvodu blízkého se předčasného či termínového porodu navzdory progesteronové terapii. Jinými slovy nevíme, jaké by byly hladiny Treg v periferní krvi rizikových žen, pokud by progesteronovou terapii neužívaly.

Pro charakterizaci vlivu progesteronové terapie na populace Treg, nTreg a iTreg a koncentraci cytokinů IL-10 a TGF- β byly odebírány vzorky periferní krve těhotných žen, neboť periferní krev byla jediným relativně snadno dostupným biologickým materiálem. Otázkou zůstává, nakolik se v periferní krvi odráží změny na fetomaternálním rozhraní a vliv vaginální progesteronové terapie. Z možných způsobů podávání progesteronu je využíváno vaginální podávání právě z důvodu jeho efektivního lokálního působení.

Tsuda a kolektiv popsali rozdílné hladiny $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}CD45RA^-$ Treg ve vzorcích periferní krve v porovnání se vzorky z decidui žen po potratu či umělém přerušení těhotenství. Klonální expanzi Treg pozorovali především v decidui zdravých žen, nikoli v periferní krvi, v decidui žen s preeklamsií byla klonální expanze Treg nižší (Tsuda et al., 2018). Areia a kolektiv imunohistochemicky analyzovali přítomnost znaku FoxP3 ve tkáních fetomaternálního rozhraní (v placentě) po předčasném a termínovém porodu. Expresi FoxP3 identifikovali v obou skupinách pouze ve svrchní vrstvě děložní sliznice, tedy v decidui, a to pouze ve 12 % vzorků (Areia et al., 2017).

Působení progesteronu na úspěšné prodloužení těhotenství nemusí být zprostředkováno pomocí Treg. Progesteron působí na celou řadu dalších imunitních buněk a indukuje jejich tolerogenní fenotypy, má schopnost významně tlumit děložní kontrakce (Patil et al., 2015). V poslední době je zkoumán také vztah mezi progesteronem a vaginální mikrobiotou (Koucký et al., 2016). Ať již jsou mechanismy působení progesteronu jakékoli, množství studií ukazuje, že délka těhotenství se při vaginálním užívání progesteronu prodlužuje. Ani v této otázce však nepanuje úplná shoda, objevují se studie, které účinnost progesteronové terapie zpochybňují. Norman a kolektiv provedli randomizovanou dvojitě slepou placebem kontrolovanou studii na velkém souboru žen, se závěrem, že vaginální podávání progesteronu nesnižuje riziko předčasného porodu (Norman et al., 2016). Tyto výsledky vzbudily reakce a podnítily vznik dalších studií, které potvrzují pozitivní přínos vaginální progesteronové terapie. Romero a kolektiv zahrnuli výsledky Normanovy studie do své metaanalýzy, která i po tomto přepracování ukazuje pozitivní význam užívání progesteronu. Upozornili také

na nedostatečnou prezentaci některých dat a vysoké riziko statistického zkreslení v Normanově studii (Romero et al., 2016, 2018). Boelig a kolektiv ukázali, že v případě délky děložního hrdla pod 15 mm zůstává vysoké riziko předčasného porodu navzdory vaginálnímu podávání progesteronu (Boelig et al., 2018). Nemalou roli v procesu spuštění porodu mohou hrát progesteronové receptory (Areia et al., 2016a; Zachariades et al., 2012). V hypotetickém případě předčasného poklesu exprese progesteronových receptorů by užívání progesteronové terapie předčasnému porodu nemohlo zabránit.

Významnou částí této diplomové práce byla stimulace PBMC izolovaných z periferní krve zdravých netěhotných žen progesteronem *in vitro*. Ze tří testovaných koncentrací progesteronu (0,5, 5 a 50 μ M) byla pro další používání zvolena 5 μ M koncentrace progesteronu. Kultivace PBMC s progesteronem v 50 μ M koncentraci vedla ke statisticky významnému poklesu v procentuálním zastoupení populace Treg ve srovnání se sledovanými nižšími koncentracemi progesteronu a nestimulovanou kontrolou. Na základě výsledků pilotního pokusu, při kterém byly PBMC stimulovány progesteronem po dobu 1-7 dní, byla pro další testy vybrána délka kultivace 4 dny, především na základě životnosti. V závěrečném experimentu byly vzorky PBMC 10 zdravých netěhotných žen stimulovány 5 μ M progesteronem a dalšími stimulanty po dobu 4 dnů. Procentuální zastoupení Treg se ve vzorcích s jednotlivými stimulacemi významně nelišilo. Statisticky významný byl nárůst populace iTreg ve vzorcích stimulovaných rh IL-2 s CD3/CD28 a vzorcích stimulovaných rh IL-2 s CD3/CD28 a progesteronem oproti nestimulované kontrole. Nebyl pozorován rozdíl v zastoupení Treg mezi vzorky PBMC stimulovanými rh IL-2 s CD3/CD28 a vzorky stimulovanými rh IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem. Vliv progesteronu na indukci Treg *in vitro* se tedy nepodařilo prokázat. Tyto výsledky jsou v rozporu s našimi očekáváními a výsledky některých dalších autorů, viz níže.

Treg mohou působit na buňky ve svém okolí přímým kontaktem, nebo produkcí tolerogenních cytokinů, především IL-10 a TGF- β . V této práci byly pomocí metody ELISA detekovány hladiny IL-10 a TGF- β v plazmě získané ze vzorků periferní krve rizikových těhotných žen užívajících progesteron, nízkorizikových těhotných žen a v supernatantech buněčných kultur po stimulaci progesteronem *in vitro*.

V plazmě rizikových žen užívajících progesteron ani v plazmě nízkorizikových těhotných nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v koncentraci IL-10 ve třech sledovaných obdobích, jeho koncentrace byly celkově nízké. V plazmě rizikových žen byl

zjištěn statisticky významný nárůst v koncentraci TGF- β mezi prvním a druhým sledovaným obdobím, tedy mezi vzorky žen před či v počátku progesteronové terapie a vzorky žen po zhruba 2–3 týdnech užívání progesteronu. Tento nárůst koncentrace TGF- β tedy mohl být způsoben podáváním progesteronu, ovšem není zjištěn, které buňky ho produkovaly.

V supernatantech buněčných kultur byla statisticky významně vyšší koncentrace IL-10 ve vzorcích po stimulaci IL-2 s CD3/CD28 a vzorcích po stimulaci IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem ve srovnání s nestimulovanou kontrolou a vzorky stimulovanými samotným progesteronem. Koncentrace IL-10 ve vzorcích po stimulaci samotným progesteronem byla dokonce nižší oproti samotné kontrole, i když ne statisticky významně. V koncentraci TGF- β nebyl žádný rozdíl mezi vzorky po stimulaci IL-2 s CD3/CD28, vzorcích po stimulaci IL-2 s CD3/CD28 v kombinaci s progesteronem a vzorcích s nestimulovanou kontrolou. Znamená to, že kultivace s progesteronem *in vitro* nestimulovala produkci IL-10 ani TGF- β . Tyto výsledky jsou v rozporu s našimi původními předpoklady. Vliv progesteronu na indukci Treg *in vitro* však byl dosud studován především v kulturách buněk myšího původu. Menší množství studií se zabývalo kultivací lidských PBMC *in vitro* a vliv progesteronu na indukci Treg se jim rovněž nepodařilo prokázat, podobně jako v naší práci.

Lee a kolektiv ukázali schopnost progesteronu indukovat Treg *in vitro* v lidské pupečnickové krvi, nikoli v periferní krvi dospělého (Lee et al., 2011). Shirshv a kolektiv kultivovali buňky lidské periferní krve s progesteronem *in vitro* v koncentracích odpovídajících 1. a 2.-3. trimestru těhotenství. Progesteron neměl žádný významný vliv na expresi FoxP3 u CD4⁺CD25⁺T lymfocytů (Shirshv et al., 2011). Lissauer a kolektiv kultivovali lidské PBMC s progesteronem *in vitro*, progesteron v koncentraci odpovídající fyziologické koncentraci v těhotenství v séru (1 μ M) a v placentě (10 μ M) vedl k poklesu produkce IL-10 (Lissauer et al., 2015). Mjösberg a kolektiv dokonce uvádí, že progesteron způsobuje pokles CD4^{dim}CD25^{high}FoxP3⁺ populace v lidských PBMC při kultivaci *in vitro* (Mjösberg et al., 2009).

Mao a kolektiv ukázali, že progesteron ve fyziologické koncentraci indukuje u myší vznik CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg a stimuluje v nich expresi IL-10, a to v děloze i na periférii *in vivo* i při kultivaci izolovaných CD4⁺CD25⁻ *in vitro* (Mao et al., 2010). Lee a kolektiv izolovali myší naivní CD4⁺ buňky a stimulovali je 6-7 dní progesteronem a dalšími stimulanty *in vitro*. Progesteron indukoval vznik iTreg, které zůstávaly stabilní v prozánětlivých podmínkách a měly vysokou expresi TGF- β (Lee et al., 2012).

Hierweger a kolektiv přináší jiný pohled na indukci Treg progesteronem. Kultivovali buňky ze slezin březích a nebřezích myší 48 hodin s fyziologickými koncentracemi progesteronu (10 μ M) *in vitro*. Progesteron vyvolával apoptózu T lymfocytů, zatímco Treg byly vůči tomuto působení odolné, což vedlo k jejich výslednému vyššímu zastoupení v buněčné kultuře (Hierweger et al., 2019). Jiné studie vliv progesteronu na indukci Treg *in vitro* v buňkách myšího původu popírají (Thuere et al., 2007; Zhao et al., 2007). Rozpory mezi studii zabývajícími se působením progesteronu *in vitro* mohou být způsobeny mnoha faktory, např. použitím kombinace progesteronu s dalšími stimulanty, odlišnou délkou kultivace, použitím jiného druhu progesteronu atd.

Mezi skupinou rizikových žen, které porodily předčasně, a skupinou rizikových žen, které porodily v termínu, byly porovnány zjištěné údaje o absolutních počtech a procentuálním zastoupení Treg, nTreg a iTreg, délka děložního hrdla v době zařazení do studie a délka užívání progesteronu v době porodu. Statisticky významné byly následující rozdíly: skupina žen, které porodily v termínu, měla vyšší absolutní počty Treg a iTreg, a především delší dobu užívání progesteronu v době porodu. Tyto výsledky podporují naši hypotézu.

Riziko předčasného porodu je v současnosti stanovováno na základě anamnestických údajů a délky děložního hrdla, měřené ultrasonografickou sondou. Za rizikovou inkompetenci děložního hrdla se považuje zkrácení délky děložního hrdla pod 25 mm, a/nebo dilatace děložního hrdla více než 1 cm v celém rozsahu (tzv. kompletní funneling), tyto hranice jsou používány i v ČR a byly použity pro zařazení žen do této studie. Údaje o spolehlivosti predikce předčasného porodu pomocí délky děložního hrdla se liší, určitou roli mohou hrát rozdíly mezi jednotlivými státy, zdravotnickými zařízeními i zkušenostmi zdravotníků. Např. studie porovnávající transvaginální a transabdominální měření délky děložního hrdla mezi 20. a 29. tt (hranicí pro určení rizika předčasného porodu byla stanovena délka hrdla pod 20 mm), uvádí sensitivitu 28,57 % a specifitu 94,94 % pro transvaginální měření a sensitivitu 21,4 % a specifitu 98,68 % transabdominálního měření pro predikci předčasného porodu (Cho and Roh, 2016).

Metaanalýza porovnávající studie, které určovaly riziko předčasného porodu s pomocí opakovaných měření na základě změn děložního hrdla (zkracování) v průběhu času, se studii hodnotícími riziko předčasného porodu na základě jednorázového měření, ukázala, že nejlepší prediktivní hodnoty má jednorázové měření délky děložního hrdla mezi 18. a 24. tt (Conde-

Agudelo and Romero, 2015). Příčinou tohoto výsledku však může být také nejednotný přístup k opakovanému měření délky děložního hrdla.

V této práci se neprokázala souvislost mezi délkou děložního hrdla a týdnem těhotenství v době porodu. Žádoucí příčinou by mohl být vliv progesteronu, který skupina rizikových žen užívala. Mezi délkou užívání progesteronu a týdnem těhotenství v době porodu se skutečně ukázala signifikantně pozitivní korelace, tedy čím déle ženy progesteron užívaly, tím delší bylo těhotenství. Mezi délkou děložního hrdla a dobou užívání progesteronu se souvislost neprokázala, ovšem výsledky je třeba interpretovat s opatrností. Pro sledování vlivu progesteronu na délku děložního hrdla by pravděpodobně bylo vhodnější sledovat dynamiku u opakovaně měřených jednotlivých žen nebo na velkém množství žen.

V průběhu studie se bohužel postupně ukázalo množství komplikací spojených se získáváním vzorků a anamnestických údajů. Na spolupracující pracoviště byly svými obvodními gynekology předávány také rizikové ženy, které již progesteron užívaly delší dobu, proto u nich chybí odběr v prvním intervalu. Ženy, u kterých došlo ke zlepšení zdravotního stavu, byly následně znovu předány do péče svého obvodního gynekologa, jiné předčasně porodily, proto u nich chybí další opakované odběry. Samozřejmě ne všechny oslovené ženy potenciálně vhodné pro zařazení do této studie se svou účastí souhlasily. Klinické stanovení absolutního počtu Treg bohužel neproběhlo u všech sledovaných žen ve všech časových intervalech. Na pracoviště Gynekologicko-porodnické kliniky VFN v Praze a 1. LF UK dochází i rizikové ženy ze vzdálenějších měst, pokud ženy nakonec porodily na jiném pracovišti, nejsou k nim dostupné další údaje včetně údaje o tom, zda porodily předčasně či nikoli. V neposlední řadě je překážkou vysoká pracovní vyčílenost zdravotnického personálu a malé množství času vyhrazené pro péči a komunikaci s jednou pacientkou. Vzhledem k tomu, že nelze předem příliš předvídat příchod rizikové ženy vhodné pro zařazení do studie a její souhlas s účastí ve studii, kladla tato studie vyšší nároky na časovou a místní flexibilitu autorky, z důvodu nutnosti včasného zpracování vzorku. I přes snahu celého týmu se nakonec podařilo získat jen málo především opakovaných odběrů. Pro studie tohoto druhu je potřebné zapojení většího množství zdravotníků.

7 Závěr

Vliv podávání progesteronu na množství a proporční zastoupení populací CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁺ nTreg a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Helios⁻ iTreg *in vivo* se v této práci nepodařilo prokázat. V průběhu vaginální progesteronové terapie nebyly zjištěny rozdíly v absolutních počtech a procentuálním zastoupení populací Treg, nTreg a iTreg v periferní krvi rizikových žen.

Schopnost progesteronu indukovat Treg v lidských PBMC *in vitro* se také neprokázala. Při stimulaci PBMC zdravých netěhotných žen 5μM progesteronem *in vitro* nebyly pozorovány žádné rozdíly v procentuálním zastoupení populací Treg, nTreg a iTreg oproti kontrole.

Dále byl sledován vliv progesteronu na produkci imunoregulačních cytokinů IL-10 a TGF-β. V krevní plazmě rizikových žen statisticky významně vzrostla koncentrace TGF-β zhruba po 2–3 týdnech užívání progesteronu. Tento vzestup koncentrace TGF-β mohl být způsoben podáváním progesteronu, TGF-β však mohl být produkován různými buněčnými populacemi. Koncentrace IL-10 v krevní plazmě rizikových žen se v průběhu progesteronové terapie neměnila. Po stimulaci PBMC progesteronem *in vitro* nebyl v supernatantech buněčných kultur zjištěn rozdíl v koncentracích IL-10 a TGF-β oproti nestimulované kontrole.

Mezi délkou progesteronové terapie a délkou těhotenství se prokázala statisticky významná pozitivní korelace. Mezi absolutním počtem Treg a délkou těhotenství byly hodnoty pozitivní korelace blížíící se signifikanci. Mezi délkou progesteronové terapie a procentuálním zastoupením Treg však byla zjištěna korelace negativní. Progesteron může oddalovat předčasný porod více způsoby, nezávislými na Treg.

Pro tuto práci se nepodařilo získat dostatečný počet především opakovaných odběrů periferní krve, proto je třeba výsledky interpretovat s opatrností. Vliv vaginální progesteronové terapie na Treg byl sledován prostřednictvím vzorků periferní krve. Lokální působení progesteronu na fetomaternálním rozhraní se však nemusí dostatečně odrážet v periferní krvi.

K dispozici je jen velmi málo údajů o vztahu mezi podáváním progesteronu a počtem Treg *in vivo* u těhotných žen. Většina prací studujících vliv progesteronu na Treg byla prováděna u zvířat. Problematika předčasného porodu, jeho včasné diagnostiky a vhodné terapie je aktuální a vyžaduje další výzkum.

8 Literatura

* review, ** metaanalýza, *** kniha

Abrahams, V.M., Straszewski-Chavez, S.L., Guller, S., and Mor, G. (2004). First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 55–63.

Areia, A., Vale-Pereira, S., Alves, V., Rodrigues-Santos, P., Moura, P., and Mota-Pinto, A. (2015). Membrane progesterone receptors in human regulatory T cells: A reality in pregnancy. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* *122*, 1544–1550.

Areia, A., Vale-Pereira, S., Alves, V., Rodrigues-Santos, P., Santos-Rosa, M., Moura, P., and Mota-Pinto, A. (2016a). Can membrane progesterone receptor α on T regulatory cells explain the ensuing human labour? *J. Reprod. Immunol.* *113*, 22–26.

Areia, A.L., Vale-Pereira, S., Vaz-Ambrósio, A., Alves, V., Rodrigues-Santos, P., Rosa, M.S., Moura, P., and Mota-Pinto, A. (2016b). Does progesterone administration in preterm labor influence Treg cells? *J. Perinat. Med.* *44*, 605–611.

Areia, A.L., Rodrigues, P., Alarcão, A., Ladeirinha, A., Moura, P., and Carvalho, L. (2017). Is Preterm Labor Influenced by the Maternal–Fetal Interface? *Fetal Pediatr. Pathol.*

Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A.H., and Fainboim, L. (2007). Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Implications for Human Reproduction. *J. Immunol.* *178*, 2572–2578.

*Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.*

*Blencowe, H., Cousens, S., Chou, D., Oestergaard, M., Say, L., Moller, A.-B., Kinney, M., Lawn, J., and Born Too Soon Preterm Birth Action Group (2013). Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod. Health* *10 Suppl 1*, S2.

*Boddy, A.M., Fortunato, A., Wilson Sayres, M., and Aktipis, A. (2015). Fetal microchimerism and maternal health: A review and evolutionary analysis of cooperation and conflict beyond the womb. *BioEssays* *37*, 1106–1118.

Boelig, R.C., Hecht, N., and Berghella, V. (2018). 698: Cervical length <15mm is the most important risk factor for early preterm birth in women with short cervix treated with vaginal progesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.*

*Burton, G.J., and Fowden, A.L. (2015). The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*

*Byrns, M.C. (2014). Regulation of progesterone signaling during pregnancy: Implications for the use of progestins for the prevention of preterm birth. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *139*, 173–181.

*Chang, R.-Q., Li, D.-J., Li, M.-Q., and Ming-Qing Li, C. (2018). The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol* *79*.

*Chen, S.-J., Liu, Y.-L., and Sytwu, H.-K. (2012). Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 258391.

- Chien, C.H., Lai, J.N., Liao, C.F., Wang, O.Y., Lu, L.M., Huang, M.I., Lee, W.F., Shie, M.C., and Chien, E.J. (2009). Mifepristone acts as progesterone antagonist of non-genomic responses but inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation in human T cells. *Hum. Reprod.* *24*, 1968–1975.
- Cho, H.J., and Roh, H.J. (2016). Correlation between cervical lengths measured by transabdominal and transvaginal sonography for predicting preterm birth. *J. Ultrasound Med.*
- *Clark, D.A., and Chaouat, G. (2012). Regulatory T cells and reproduction: How do they do it? *J. Reprod. Immunol.*
- **Conde-Agudelo, A., and Romero, R. (2015). Predictive accuracy of changes in transvaginal sonographic cervical length over time for preterm birth: A systematic review and metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*
- **Crane, J.M.G., and Hutchens, D. (2008). Transvaginal sonographic measurement of cervical length to predict preterm birth in asymptomatic women at increased risk: a systematic review. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* *31*, 579–587.
- ***Cunningham, F., Leveno, K., Bloom, S., Spong, C., Dashe, J., Barbara, B., Cassey, B., and Sheffield, J. (2014). *Williams Obstetrics, 24th Edition* (New York, USA: McGraw-Hill Education).
- Dahl, C., Stanislawski, M., Iszatt, N., Mandal, S., Lozupone, C., Clemente, J.C., Knight, R., Stigum, H., and Eggesbø, M. (2017). Gut microbiome of mothers delivering prematurely shows reduced diversity and lower relative abundance of Bifidobacterium and Streptococcus. *PLoS One* *12*, e0184336.
- Dosiou, C., Hamilton, A.E., Pang, Y., Overgaard, M.T., Tulac, S., Dong, J., Thomas, P., and Giudice, L.C. (2008). Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J. Endocrinol.* *196*, 67–77.
- *Dressing, G.E., Goldberg, J.E., Charles, N.J., Schwertfeger, K.L., and Lange, C.A. (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: A review of regulation and physiological implications. *Steroids.*
- Ebrahim, N.A., and Leach, L. (2016). Transendothelial migration of human umbilical mesenchymal stem cells across uterine endothelial monolayers: Junctional dynamics and putative mechanisms. *Placenta* *48*, 87–98.
- Engler, J.B., Kursawe, N., Solano, M.E., Patas, K., Wehrmann, S., Heckmann, N., Lühder, F., Reichardt, H.M., Arck, P.C., Gold, S.M., et al. (2017). Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 1206–1212.
- *Fettke, F., Schumacher, A., Costa, S.D., and Zenclussen, A.C. (2014). B cells: The old new players in reproductive immunology. *Front. Immunol.*
- Furcron, A.E., Romero, R., Plazyo, O., Unkel, R., Xu, Y., Hassan, S.S., Chaemsaitong, P., Mahajan, A., and Gomez-Lopez, N. (2015). Vaginal progesterone, but not 17 α -hydroxyprogesterone caproate, has antiinflammatory effects at the murine maternal-fetal interface. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *213*, 846.e1-846.e19.

- Gabryšová, L., Christensen, J.R., Wu, X., Kissenpfennig, A., Malissen, B., and O'Garra, A. (2011). Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF- β -dependent differentiation and maintenance of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1242–1248.
- *Garg, D., Ng, S.S.M., Baig, K.M., Driggers, P., and Segars, J. (2017). Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* *28*, 656–668.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*.
- *Ghaebi, M., Nouri, M., Ghasemzadeh, A., Farzadi, L., Jadidi-Niaragh, F., Ahmadi, M., and Yousefi, M. (2017). Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomed. Pharmacother.* *88*, 61–73.
- *Gomez-Lopez, N., StLouis, D., Lehr, M.A., Sanchez-Rodriguez, E.N., and Arenas-Hernandez, M. (2014). Immune cells in term and preterm labor. *Cell. Mol. Immunol.* *11*, 571–581.
- *Grimm, S.L., Hartig, S.M., and Edwards, D.P. (2016). Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J. Mol. Biol.* *428*, 3831–3849.
- Hierweger, A.M., Engler, J.B., Friese, M.A., Reichardt, H.M., Lydon, J., DeMayo, F., Mittrücker, H.W., and Arck, P.C. (2019). Progesterone modulates the T-cell response via glucocorticoid receptor-dependent pathways. *Am. J. Reprod. Immunol.*
- *How, H.Y., and Sibai, B.M. (2009). Progesterone for the prevention of preterm birth: indications, when to initiate, efficacy and safety. *Ther. Clin. Risk Manag.* *5*, 55–64.
- Hudić, I., Stray-Pedersen, B., Szekeres-Bartho, J., Fatušić, Z., Dizdarević-Hudić, L., Tomić, V., Polgar, B., Hadžiefendić, B., and Fatušić, J. (2015). Maternal serum progesterone-induced blocking factor (PIBF) in the prediction of preterm birth. *J. Reprod. Immunol.* *109*, 36–40.
- *Hunt, J.S., Langat, D.K., McIntire, R.H., and Morales, P.J. (2006). The role of HLA-G in human pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.*
- Jasper, M.J., Tremellen, K.P., and Robertson, S.A. (2006). Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol. Hum. Reprod.* *12*, 301–308.
- Kacerovský, Kokrdová, Koucký, Křepelka, Lamberská, Mašata, Měchurová, Pařízek, Smíšek, Šimják, et al. (2017). Spontánní předčasný porod Doporučený postup. *ČGPS ČLS JEP*.
- *Keelan, J.A. (2018). Intrauterine inflammatory activation, functional progesterone withdrawal, and the timing of term and preterm birth. *J. Reprod. Immunol.*
- *Kieffer, T.E.C., Laskewitz, A., Scherjon, S.A., Faas, M.M., and Prins, J.R. (2019). Memory T cells in pregnancy. *Front. Immunol.*
- Kindinger, L.M., Bennett, P.R., Lee, Y.S., Marchesi, J.R., Smith, A., Cacciatore, S., Holmes, E., Nicholson, J.K., Teoh, T.G., and MacIntyre, D.A. (2017). The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. *Microbiome* *5*, 6.
- Kopřivová, H., Hájková, M., Koucký, M., Malíčková, K., Holáň, V., and Krulová, M. (2019). Kinetics of Helios(+) and Helios(-) T regulatory cell subsets in the circulation of healthy pregnant women. *Scand. J. Immunol.*

- Koucký, M., Malíčková, K., Cindrová-Davies, T., Germanová, A., Pařízek, A., Kalousová, M., Hájek, Z., and Zima, T. (2014). Low levels of circulating T-regulatory lymphocytes and short cervical length are associated with preterm labor. *J. Reprod. Immunol.* *106*, 110–117.
- Koucký, M., Malíčková, K., Cindrová-Davies, T., Smíšek, J., Vráblíková, H., Černý, A., Šimják, P., Slováčková, M., Pařízek, A., and Zima, T. (2016). Prolonged progesterone administration is associated with less frequent cervicovaginal colonization by *Ureaplasma urealyticum* during pregnancy - Results of a pilot study. *J. Reprod. Immunol.*
- *Kowalik, M.K., Rekawiecki, R., and Kotwica, J. (2013). The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. *Reprod. Biol.* *13*, 279–289.
- **Kuon, R.-J., Abele, H., Berger, R., Garnier, Y., Maul, H., Schleussner, E., and Rath, W. (2015). Progesterone for Prevention of Preterm Birth-Evidence-based Indications. *Z. Geburtshilfe Neonatol.*
- Lauder, A.P., Roche, A.M., Sherrill-Mix, S., Bailey, A., Laughlin, A.L., Bittinger, K., Leite, R., Elovitz, M.A., Parry, S., and Bushman, F.D. (2016). Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome* *4*, 29.
- Lee, J.H., Ulrich, B., Cho, J., Park, J., and Kim, C.H. (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.
- Lee, J.H., Lydon, J.P., and Kim, C.H. (2012). Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability. *Eur. J. Immunol.* *42*, 2683–2696.
- Lima, J., Martins, C., Nunes, G., Sousa, M.-J., Branco, J.C., and Borrego, L.-M. (2017). Regulatory T Cells Show Dynamic Behavior During Late Pregnancy, Delivery, and the Postpartum Period. *Reprod. Sci.* *24*, 1025–1032.
- Lissauer, D., Eldershaw, S.A., Inman, C.F., Coomarasamy, A., Moss, P.A.H., and Kilby, M.D. (2015). Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2858–2872.
- **Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., Lawn, J.E., Cousens, S., Mathers, C., and Black, R.E. (2016). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet (London, England)* *388*, 3027–3035.
- Mao, G., Wang, J., Kang, Y., Tai, P., Wen, J., Zou, Q., Li, G., Ouyang, H., Xia, G., and Wang, B. (2010). Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4⁺CD25⁺ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology* *151*, 5477–5488.
- **Medley, N., Poljak, B., Mammarella, S., and Alfirevic, Z. (2018). Clinical guidelines for prevention and management of preterm birth: a systematic review. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*
- Meggyes, M., Miko, E., Szigeti, B., Farkas, N., and Szereday, L. (2019). The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth.*
- Miko, E., Halasz, M., Jericevic-Mulac, B., Wicherek, L., Arck, P., Arató, G., Skret Magierlo,

- J., Rukavina, D., and Szekeres-Bartho, J. (2011). Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J. Reprod. Immunol.* *90*, 50–57.
- Mjösberg, J., Svensson, J., Johansson, E., Hellström, L., Casas, R., Jenmalm, M.C., Boij, R., Matthiesen, L., Jönsson, J.-I., Berg, G., et al. (2009). Systemic Reduction of Functionally Suppressive CD4^{dim} CD25^{high} Foxp3⁺ Tregs in Human Second Trimester Pregnancy Is Induced by Progesterone and 17 β -Estradiol. *J. Immunol.*
- Mjösberg, J., Berg, G., Jenmalm, M.C., and 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.
- ***Moore, K.L., Persaud, T.V.N., and Torchia, M.G. (2019). The developing human: clinically oriented embryology.
- *Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., and Guller, S. (2011). Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- Nguyen, T.A., Kahn, D.A., and Loewendorf, A.I. (2017). Maternal—Fetal rejection reactions are unconstrained in preeclamptic women. *PLoS One.*
- *Norwitz, E.R., and Caughey, A.B. (2011). Progesterone supplementation and the prevention of preterm birth. *Rev. Obstet. Gynecol.* *4*, 60–72.
- *Norwitz, E.R., Schust, D.J., and Fisher, S.J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *N. Engl. J. Med.* *345*, 1400–1408.
- Patil, A.S., Swamy, G.K., Murtha, A.P., Heine, R.P., Zheng, X., and Grotegut, C.A. (2015). Progesterone Metabolites Produced by Cytochrome P450 3A Modulate Uterine Contractility in a Murine Model. *Reprod. Sci.* *22*, 1577–1586.
- *Pelzer, E., Gomez-Arango, L.F., Barrett, H.L., and Dekker Nitert, M. (2017). Review: Maternal health and the placental microbiome.
- *Perez-Muñoz, M.E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A.E., and Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.*
- Purisch, S.E., and Gyamfi-Bannerman, C. (2017). Epidemiology of preterm birth. *Semin. Perinatol.*
- Rahman, M. (2014). *Introduction to Flow Cytometry* (Oxford: AbD Serotec).
- Reeves, M., and Sinclair, J. (2014). Isolation and Characterisation of Dendritic Cells from Peripheral Blood. *BIO-PROTOCOL* *4*.
- *Rekawiecki, R., Kowalik, M.K., Slonina, D., and Kotwica, J. (2008). Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum.
- *Robertson, S.A., Prins, J.R., Sharkey, D.J., and Moldenhauer, L.M. (2013). Seminal Fluid and the Generation of Regulatory T Cells for Embryo Implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*
- **Romero, R., Nicolaides, K.H., Conde-Agudelo, A., O’Brien, J.M., Cetingoz, E., Da Fonseca, E., Creasy, G.W., and Hassan, S.S. (2016). Vaginal progesterone decreases preterm birth \leq 34 weeks of gestation in women with a singleton pregnancy and a short cervix: an updated meta-analysis including data from the OPPTIMUM study. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* *48*, 308–317.

- **Romero, R., Conde-Agudelo, A., Da Fonseca, E., O'Brien, J.M., Cetingoz, E., Creasy, G.W., Hassan, S.S., and Nicolaidis, K.H. (2018). Vaginal progesterone for preventing preterm birth and adverse perinatal outcomes in singleton gestations with a short cervix: a meta-analysis of individual patient data. *Am. J. Obstet. Gynecol.*
- Rowe, J.H., Ertelt, J.M., Xin, L., and Way, S.S. (2012). Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* 490, 102–106.
- Rozenberg, P. (2017). Universal cervical length screening for singleton pregnancies with no history of preterm delivery, or the inverse of the Pareto principle. *BJOG* 124, 1038–1045.
- *Ruocco, M.G., Chaouat, G., Florez, L., Bensussan, A., and Klatzmann, D. (2014). Regulatory T-cells in pregnancy: historical perspective, state of the art, and burning questions. *Front. Immunol.* 5, 389.
- *Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., and Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 601–610.
- *Saito, S., Nakashima, A., Ito, M., and Shima, T. (2011). Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 7, 649–657.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*
- *Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.*
- Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., and Saito, S. (2004). Decidual and peripheral blood CD4 +CD25 + regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.*
- Schlossberger, V., Schober, L., Rehnitz, J., Schaiyer, M., Zeier, M., Meuer, S., Schmitt, E., Toth, B., Strowitzki, T., and Steinborn, A. (2013). The success of assisted reproduction technologies in relation to composition of the total regulatory T cell (Treg) pool and different Treg subsets. *Hum. Reprod.*
- *Schumacher, A., and Zenclussen, A.C. (2014). Regulatory T cells: Regulators of life. *Am. J. Reprod. Immunol.*
- *Schumacher, A., Costa, S.D., and Zenclussen, A.C. (2014). Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Front. Immunol.* 5.
- Sharif, F.A., Ashour, M.J., Badawi, N.T., Al-Ashi, S.F., and Al, S.F. (2016). Polymorphism in Regulatory T-cell (Treg)-Related Genes Is Associated with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Am. J. Clin. Exp. Med.* 4, 63–67.
- Shirshv, S. V., Orlova, E.G., Zamorina, S.A., and Nekrasova, I. V. (2011). Influence of reproductive hormones on the induction of CD4+CD25brightFoxP3+ regulatory T cells. *Dokl. Biol. Sci.* 440, 343–346.
- Somerset, D.A., Zheng, Y., Kilby, M.D., Sansom, D.M., and Drayson, M.T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 112, 38–43.

- **Su, L.-L., Samuel, M., and Chong, Y.-S. (2014). Progesterone agents for treating threatened or established preterm labour. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Sweeney, E.L., Kallapur, S.G., Gisslen, T., Lambers, D.S., Chouhnet, C.A., Stephenson, S.-A., Jobe, A.H., and Knox, C.L. (2016). Placental Infection With *Ureaplasma* species Is Associated With Histologic Chorioamnionitis and Adverse Outcomes in Moderately Preterm and Late-Preterm Infants. *J. Infect. Dis.* *213*, 1340–1347.
- *Szekeres-Bartho, J., Halasz, M., and Palkovics, T. (2009). Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. *J. Reprod. Immunol.* *83*, 60–64.
- Szurek, E., Cebula, A., Wojciech, L., Pietrzak, M., Rempala, G., Kisielow, P., and Ignatowicz, L. (2015). Differences in expression level of Helios and neuropilin-1 do not distinguish thymus-derived from extrathymically-induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *PLoS One.*
- *Taddei, C.R., Cortez, R. V., Mattar, R., Torloni, M.R., and Daher, S. (2018). Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview. *Am. J. Reprod. Immunol.* *80*, e12993.
- *Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* *94 Suppl 1*, 8–16.
- Thornton, A.M., Kerty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* *184*, 3433–3441.
- Thornton, A.M., Kerty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2016). Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3 + T Regulatory Cells.
- Thuere, C., Zenclussen, M.L., Schumacher, A., Langwisch, S., Schulte-Wrede, U., Teles, A., Paeschke, S., Volk, H.-D., and Zenclussen, A.C. (2007). Kinetics of Regulatory T Cells During Murine Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* *58*, 514–523.
- Tilburgs, T., Scherjon, S.A., van der Mast, B.J., Haasnoot, G.W., Versteeg-v.d.Voort-Maarschalk, M., Roelen, D.L., van Rood, J.J., and Claas, F.H.J. (2009). Fetal–maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. *J. Reprod. Immunol.* *82*, 148–157.
- Tsuda, S., Zhang, X., Hamana, H., Shima, T., Ushijima, A., Tsuda, K., Muraguchi, A., Kishi, H., and Saito, S. (2018). Clonally Expanded Decidual Effector Regulatory T Cells Increase in Late Gestation of Normal Pregnancy, but Not in Preeclampsia, in Humans. *Front. Immunol.*
- *Tsuda, S., Nakashima, A., Shima, T., and Saito, S. (2019). New paradigm in the role of regulatory T cells during pregnancy. *Front. Immunol.*
- *Valadez-Cosmes, P., Vázquez-Martínez, E.R., Cerbón, M., and Camacho-Arroyo, I. (2016). Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* *434*, 166–175.
- *Vogel, J.P., Chawanpaiboon, S., Moller, A.-B., Watananirun, K., Bonet, M., and Lumbiganon, P. (2018). The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *52*, 3–12.

- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27, 18–20.
- Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.*
- Winger, E.E., and Reed, J.L. (2011). Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. *Am. J. Reprod. Immunol.* 66, 320–328.
- Winship, A., Correia, J., Zhang, J.G., Nicola, N.A., and Dimitriadis, E. (2015). Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibition during mid-gestation impairs trophoblast invasion and spiral artery remodelling during pregnancy in mice. *PLoS One* 10.
- Xiong, H., Zhou, C., and Qi, G. (2010). Proportional changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in maternal peripheral blood during pregnancy and labor at term and preterm. *Clin. Investig. Med. Médecine Clin. Exp.* 33, E422.
- Yu, N., Li, X., Song, W., Li, D., Yu, D., Zeng, X., Li, M., Leng, X., and Li, X. (2012). CD4 + CD25 + CD127 low/- T cells: A more specific treg population in human peripheral blood. *Inflammation.*
- Zachariades, E., Mparmpakas, D., Pang, Y., Rand-Weaver, M., Thomas, P., and Karteris, E. (2012). Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. *Placenta.*
- Zhang, Y., Liu, Z., Tian, M., Hu, X., Wang, L., Ji, J., and Liao, A. (2018). The altered PD-1/PD-L1 pathway delivers the ‘one-two punch’ effects to promote the Treg/Th17 imbalance in pre-eclampsia. *Cell. Mol. Immunol.*
- Zhao, J., Zeng, Y., and Liu, Y. (2007). Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell pool during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 75, 71–81.