

Tregitopy- nowe cząsteczki immunoregulatorowe w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem

Niezbędnym warunkiem rozwoju ciąży jest ustalenie prawidłowych interakcji między matką a płodem. Obecność w organizmie matczynym alogenicznego płodu wyzwała stan tolerancji immunologicznej, który umożliwia implantację, a następnie rozwój ciąży. Zaburzenia ciąży takie jak poronienia i stan przedrzucawkowy powiązane są z zakłóconymi mechanizmami tolerancji immunologicznej. Wśród poznanych typów komórek przyczyniających się do tolerancji antygenów płodu, główną rolę przypisuje się limfocytom T regulatorowym (Tregs). Dowiedziono, że zarówno u ludzi jak i u myszy podczas prawidłowej ciąży dochodzi do wzrostu liczby komórek regulatorowych, natomiast spadek ich liczby oraz aktywności jest obserwowany w przypadkach spontanicznych poronień. Efekt resorpcji płodów i poronień w typowym modelu poronnym myszy można odwrócić poprzez wczesny transfer adoptywny Tregs. Wykazano, że krótkie peptydy znajdujące się w ludzkich i mysich immunoglobulinach (IgG) mogą indukować ekspansję Tregs. Te naturalne, silnie konserwatywne epitopy Tregs, zwane tregitopami, mają wysokie powinowactwo do wiązania z ludzkimi antygenami głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHCII).

Stąd też, celami rozprawy doktorskiej było: **1)** zidentyfikowanie nowych tregitopów nie pochodzących z IgG, które mogą wiązać się z MHCII z wysokim powinowactwem i promować ekspansję Tregs *in vitro*; **2)** zbadanie czy znane w myszy tregitopy 167 (T167) i 289 (T289) oraz zaprojektowane *in silico* nowe peptydy (SGS i LKD) uczestniczą w rozwoju alotolerancji w przebiegu ciąży u myszy.

W pierwszej pracy, mysie naiwne limfocyty T pochodzące z myszy szczepu C57BL6Foxp3^{GFP} hodowano z komórkami prezentującymi antygen i stymulowano znanymi tregitopami i zaprojektowanymi *in silico* peptydami o potencjalnej aktywności stymulującej rozwój limfocytów Treg. Następnie, metodą cytometrii przepływowej analizowano odsetek komórek o fenotypie CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ i CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺.

W drugim i trzecim artykule, samicom myszy CBA/J skojarzonym z samcami myszy DBA/2J, (model ciąży zagrożonej poronieniem) tuż po kryciu, podawano dootrzewnowo, oddzielnie 100 µg każdego z tregitopów tj.: T167, T289 i SGS oraz peptydu LKD lub 150 µl soli fizjologicznej buforowanej fosforanem jako kontroli. W czternastym dniu ciąży oceniano

liczbę zresorbowanych i żywych zarodków. W trzecim i czternastym dniu ciąży zmierzono poziom cytokin za pomocą testu immunoenzymatycznego. Dodatkowo, za pomocą cytometrii przepływowej zbadano frekwencje limfocytów T i B regulatorowych oraz ekspresję cząsteczek kostymulujących (CD80, CD86, CD40) oraz głównego układu zgodności tkankowej klasy II na komórkach prezentujących antygen.

W pierwszej pracy, wykazano, że część zaprojektowanych *de novo* peptydów wykazywała właściwości tregitopów i indukowała ekspansję śledzionowych limfocytów Tregs. W kolejnych dwóch pracach wykazano, że podanie mysiego tregitopu 167 i 289 oraz nowo zaprojektowanego tregitopu SGS spowodowało statystycznie istotne zmniejszenie liczby zresorbowanych płodów w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie, w przedimplantacyjnym okresie ciąży zaobserwowano zwiększenie puli śledzionowych Tregs. Zademonstrowano również, że nowo zaprojektowany tregitop SGS i mysie tregitopy 167 i 289 obniżyły odpowiednio ekspresję cząsteczki kostymulującej CD80 lub CD86 na komórkach prezentujących antygen. Dodatkowo, w przedimplantacyjnym okresie ciąży tregitop SGS podwyższał poziom interleukiny 2 i interleukiny 10 w surowicy badanych myszy.

Przeprowadzone badania *in vitro* pozwoliły na identyfikację nowych peptydów o właściwościach tregitopów. Ponadto wykazano, że znane tregitopy 167 i 289 oraz nowy peptyd SGS mają korzystny wpływ na przebieg ciąży poprzez ograniczenie śmiertelności płodów. Skuteczność w przeciwdziałaniu poronieniom stosowanych tregitopów może wynikać ze zwiększenia puli Tregs oraz zmiany odpowiedzi kostymulacyjnej komórek prezentujących antygen po ich podaży. W przyszłości, właściwości immunomodulujące tregitopów mogą być wykorzystane w potencjalnych strategiach terapeutycznych w przypadku niepowodzeń ciąży wywołanych dysregulacją mechanizmów tolerancji immunologicznej.