



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Dräktighetsimmunologi hos häst

Frida Sjöberg

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:70

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Dräktighetsimmunologi hos häst

The immunology of pregnancy in the mare

Frida Sjöberg

Handledare:

Elisabeth Persson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Sara Wernersson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr: 2013:70
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: dräktighet, immunologi, häst, sto, embryo, trofoblast, MHC I, abort

Key words: pregnancy, gestation, immunology, horse, mare, embryo, trophoblast, MHC I, abortion

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Hästens placenta.....	3
Endometrial cups.....	3
Hur påverkar stoets immunförsvar fertilitet och dräktighet?	4
Immunförsvaret vid transplantation	4
Proinflammatoriska cytokiner	5
Antikroppar	5
Hur påverkar embryot moderns immunförsvar?	6
Maternal recognition of pregnancy	6
Nedreglering av MHC I.....	6
Immunsupprimerande faktorer	7
Cytokinpåverkan	7
Hur förändras stoets immunförsvar vid dräktighet?.....	8
Cytokiner.....	8
Cellmedierat svar.....	9
Antikroppsmedierat svar	10
Diskussion	11
Litteraturförteckning	14

SAMMANFATTNING

Under dräktigheten modulerar embryot stoets immunförsvar på flera sätt för att undvika att stötas bort. Embryots invasiva trofoblaster är de enda trofoblaster som uttrycker så kallade major histocompatibility complex class I (MHC I). Invasiva trofoblaster bildar endometrial cups och därefter nedregleras MHC I, vilket bedöms vara viktigt för embryots fortlevnad. Endometrial cups utsöndrar även immunsupprimerande faktorer och kan påverka de maternella cellernas cytokinuttryck på flera sätt.

Delade meningar råder om huruvida stoets immunförsvar går mot ett cellmedierat eller antikroppsmedierat svar under dräktighet. Senare studier har kunnat påvisa skillnader i hur immunförsvaret ser ut perifert i moderns system och lokalt i livmodern, där ett minskat antikroppsmedierat svar ses lokalt. Antalet celler i det cellmedierade svaret förändras varken systemiskt eller lokalt, men deras cytolytiska förmåga verkar försämrats lokalt i livmodern.

Tidig embryonal förlust kan bero på olika immunologiska felsteg. Befruktningen kan till exempel förhindras av antikroppar mot spermier eller mot äggets *zona pellucida*. Embryonala förluster kan också orsakas av ett överuttryck av proinflammatoriska cytokiner då embryot når livmodern, vilket gör att embryot stöts bort av NK-celler aktiverade av det cellmedierade immunförsvaret. Otillräcklig förändring av cytokinuttryck samt otillräcklig supprimering av det maternella immunförsvaret under dräktigheten tycks vara de vanligaste orsakerna till tidig embryonal förlust. En viktig förändring under dräktigheten som troligen spelar stor roll för fölets första dagar är att det antikroppsmedierade immunförsvaret mot paternella antigen hämmas, så att inte fölet utsätts för autoimmuna reaktioner när det dricker colostrum, eftersom stoets antikroppar ansamlas i colostrum.

SUMMARY

The fetus modulates the immune system of the mare in several ways during the pregnancy in order to prevent rejection. The invasive trophoblasts of the fetus are the only trophoblasts which express major histocompatibility complex class I (MHC I). Invasive trophoblasts form the endometrial cups and thereafter MHC I will be downregulated. This is probably important for the survival of the fetus. Endometrial cups also secrete immunosuppressive factors and can affect the cytokine expression of maternal cells in different ways.

It is not totally understood whether the immune system of the mare is taking a turn toward cell-mediated or humoral immunity during pregnancy. Recent research has shown differences between the peripheral immune response and the local immunity of the uterus, where the humoral immunity is suppressed locally. The number of cells in the cell-mediated immunity is unchanged but their cytolytic activity seems to be affected.

Early embryonic death (EED) may be caused by several different immunological failures. Antibodies against the sperm or the *zona pellucida* of the egg can affect the fertilization. Increased expression of proinflammatory cytokines during the time when the embryo reaches the uterus activates the cell-mediated immunity and NK-cells, which will reject the embryo. Insufficient alterations in cytokine expression or insufficient suppression of the maternal immune system may also lead to EED. One important change during pregnancy, which is probably important for the first days of the newborn foal, is that the humoral immunity against paternal antigens is inhibited. If not, the foal will suffer from autoimmune reactions when drinking colostrum, since antibodies from the mare are concentrated in the colostrum.

INLEDNING

Stoets dräktighet är lång och det är mycket som kan gå fel. Enligt Davies (2008) är det endast i genomsnitt 60% av dräktigheterna som leder till ett levande föl. Den låga siffran beror till stor del på idiopatiska embryonala förluster, så kallade early embryonic deaths (EED), där abortorsaken inte går att säkerställa. Kan det vara så att många av dessa tidiga aborter är immunmedierade?

Att låta ett embryo växa i *uterus* (livmodern) och samtidigt ha ett fungerande immunförsvar som skyddar mot potentiella patogener från omgivningen kräver moduleringar i moderns immunförsvar. I det här arbetet redogör jag för hur stoets immunförsvar styr fertilitet och dräktighet samt hur embryot påverkar det maternella immunförsvaret och vilka förändringar det leder till som upprätthåller dräktigheten, med avseende på hästens placentatyp.

MATERIAL OCH METODER

Detta är en litteraturstudie och databaserna PubMed, Web of Knowledge och Google Scholar har använts för att söka artiklar. I vissa fall har intressanta artiklar hittats genom referenslistan i artiklar eller länken "Relaterade artiklar" i PubMed. Sökord som har använts är *equin**, *horse*, *mare*, *placenta*, *immun**, *pregnant*, *gestation*, *abort**, *cause*, *mechanism*, *trophoblast*.

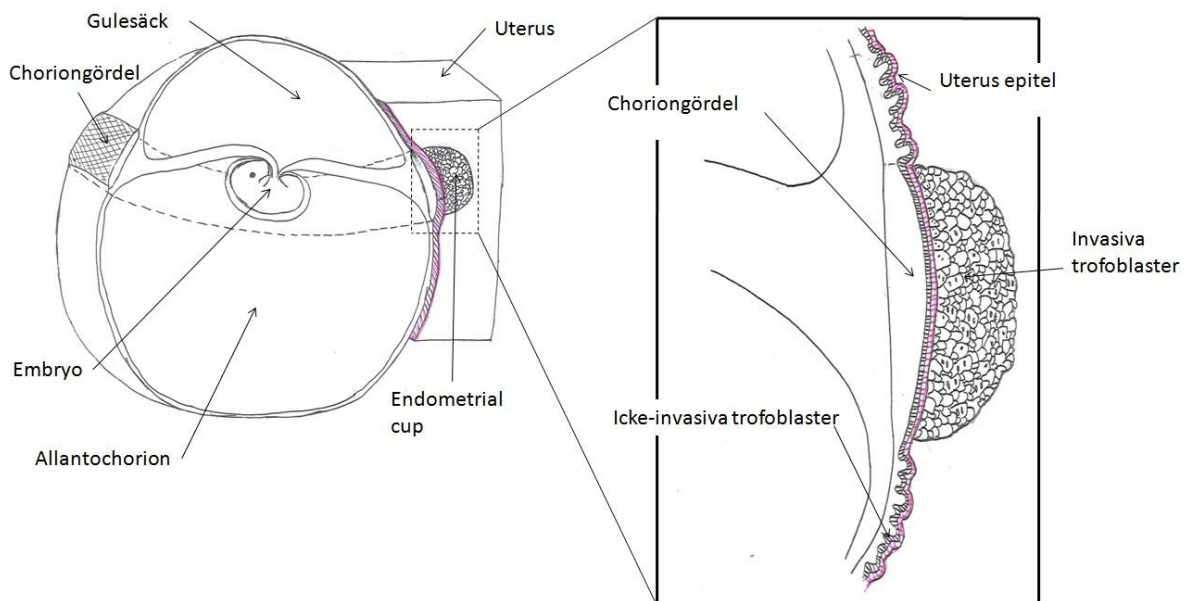
LITTERATURÖVERSIKT

Hästens placenta

Dräktigheten hos häst varar i ungefär 320-360 dagar. Hästens placenta är till största delen icke-invasiv med sex vävnadsskikt mellan moderns och fostrets blod, så kallad epiteliokorial interhemalbarriär. Placentans fetomaternella kontaktyta består av mikrovillipå cellnivå och på vävnadsnivå villi som tätt omsluts av kryptor i uterusepitelet, vilket gör att den totala ytan där näringsutbytet kan ske ökar (Noronha & Antczak, 2010). Eftersom hästens placentatyp är diffus kan näringsutbyte ske över hela kontaktytan.

Endometrial cups

En choriongördel bildas runt dag 25 i dräktigheten där allantochorion och gulesäcken möts (Noronha & Antczak, 2010). Choriongördeln består av snabbt prolifererande trofoblastceller som efterhand blir binukleära och invaderar uterus epitel och stroma runt dag 36-38 i dräktigheten. Dessa snabbt prolifererande trofoblaster kallas invasiva trofoblaster och bildar gruppvisa ansamlingar, så kallade endometrial cups. Endometrial cups utsöndrar kontinuerligt equine chorionic gonadotrophin (eCG), som är viktigt för att upprätthålla dräktigheten genom att upprätthålla progesteronhalten och på så vis förhindra luteolys (Katila, 2011). Från dag 43 kan tydliga nivåer av eCG uppmätas i moderns blod. Endometrial cups bryts ner ungefär 100-120 dagar in i dräktigheten, troligen av moderns immunförsvar (Noronha & Antczak, 2010).



Figur1. Hästens placenta. Modifierad efter Noronha & Antczak (2010).

Hur påverkar stoets immunförsvar fertilitet och dräktighet?

För att få en helhetsbild av stoets dräktighetsimmunologi är det viktigt att ta upp hur det maternella immunförsvaret reagerar från den dag då ägglossning sker. Det är även av intresse att sammanfatta hur immunförsvaret fungerar mot transplanterade organ, eftersom det växande embryot i början av dräktigheten ofta jämförs med just detta. Följande stycke beskriver hur immunförsvaret fungerar mot olika agens och vid befruktning, samt vad som kan gå fel.

Immunförsvaret vid transplantation

Major histocompatibility complex I (MHC I) är en receptor som sitter på i stort sett alla kroppens nukleära celler (Noronha & Antczak, 2010). Via dessa receptorer presenterar cellerna delar av endogena proteiner för kroppens immunförsvar. Om kroppen är angripen av en intracellulär infektion kan kroppens egna celler, med hjälp av MHC I, presentera proteiner från patogenen och på så sätt aktivera cytotoxiska T-lymfocyter (CTL) som dödar cellen (Baker *et al.*, 1999). CTL är en del av kroppens cellmedierade försvar som styrs av T-hjälpar 1 (Th₁)-celler med hjälp av cytokinerna interleukin-2 (IL-2) och interferon- γ (INF γ) (Tizard, 2009). Cytokiner är proteiner som kroppens immunceller använder för att kommunicera med varandra. Det cellmedierade svaret aktiverar T-celler, Natural killer-celler (NK-celler) och makrofager samtidigt som Th₂-svar inhiberas.

Th₂-celler styr istället immunförsvaret mot ett antikroppsmederat svar med hjälp av cytokinerna IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 och IL-13, som aktiverar B-celler, antikroppssekretion, mastceller och eosinofiler samtidigt som Th₁-svar inhiberas (Tizard, 2009). Th₂-svar är effektiva mot extracellulära patogener och aktiveras av dendritiska celler och makrofager som presenterar främmande antigen med hjälp av MHC klass II.

En frisk cell presenterar endast egna proteindelar på MHC I och dessa känner immunförsvaret igen som ”egna” och låter således cellen överleva (Tizard, 2009). MHC I som presenterar cellens eget protein inhiberar NK-celler, som är en del av det medfödda och cellmedierade immunförsvaret och framför allt är viktiga för att lysa tumörceller och virusinfekterade celler. Om en cell inte uttrycker MHC I dödas den av NK-celler.

Celler från andra individer ses också som främmande av kroppens eget immunförsvaret, trots att dessa celler är friska. Det är detta som sker vid en organtransplantation. Den främmande friska vävnaden uttrycker förutom andra proteiner också annorlunda MHC I, eftersom MHC I är en polymorfisk struktur som kan variera oändligt mellan individer. Dessa uppfattas som främmande i den nya kroppen, där immunförsvaret inducerar både ett antikroppsmedierat svar och ett cellmedierat svar för att bryta ner den nya vävnaden (Tizard, 2009).

Proinflammatoriska cytokiner

Efter parning kommer en lokal inflammation i livmodern att uppstå eftersom sperma och bakterier från penis triggar en snabb och ospecifik respons av neutrofiler (Krakowski *et al.*, 2010). Hos friska ston kan även högre nivåer av T-celler påvisas i livmodern runt ägglossning jämfört med diöstrus. Dessa T-celler har en viktig roll både som reglerande och cytotoxiska celler. Neutrofilerna fagocyterar sperma och bakterier och samtidigt frisätts prostaglandin- $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), som sätter igång en livmoderkontraktion så att överflödigt sperma, bakterier och inflammatoriska produkter trycks ut. Den lokala inflammationen är normalt snabbt övergående inom 48 timmar efter parning, vilket Krakowskiet *al.* (2010) kunde visa i form av minskade nivåer av T-celler. Därefter har livmodern goda förutsättningar att ta emot embryot.

Ston som hade en obalans i den typ av T-celler som rekryterades till livmodern runt ägglossningen drabbades ofta av EED (Risvanli, 2011; Krakowski *et al.*, 2010). Detta berodde på att för många proinflammatoriska cytokiner producerades och den tidiga inflammationen kvarstod under längre tid. Dessa proinflammatoriska cytokiner (IL-1, IL-2, IL-6 och $TNF\alpha$) producerades av Th_1 -celler och inducerade ett kraftigt NK-cellssvar som angrep embryonala trofoblaster och ledde till EED (Krakowski *et al.*, 2010). Under den tidiga dräktigheten uttrycker inte embryot något MHC I och attackeras därför av NK-celler (Donaldson *et al.*, 1990). Risvanli (2011) menar även att fel i denna cytokinproduktion skulle kunna leda till endometriell fibros och sekundär EED.

En annan viktig faktor för en lyckad dräktighet är den immunsupprimerande cytokinen transformering growth factor β 1 (TGF β 1) (Krakowski *et al.*, 2010). TGF β 1 utsöndras av makrofager, neutrofiler, trombocyter och lymfocyter och under den tidiga dräktigheten även av trofoblaster. Hos ston som drabbas av EED har minskande nivåer av TGF β 1 uppmätts efter ägglossning, vilket förklarar inflammationsreaktioner och ett kraftigare immunsvaret mot dessa embryon.

Antikroppar

Antikroppar mot själva sperman kan bildas då sperma innehåller många främmande antigen som det maternella immunförsvaret kan reagera på (Risvanli, 2011). Det är oklart varför detta

sker, men troligen måste antikropparna nå en viss titer i förhållande till antalet spermier för att vara effektiva. En annan teori är att antigen måste nå den maternella blodcirkulationen och att det därför är vanligare med antikroppsinfertilitet hos djur med genitala sjukdomar såsom vaginit och metrit där vävnadsbarriärerna brutits ner. Även antikroppar mot äggets *zona pellucida* kan bildas och sätta sig på dess yta och på så sätt blockera spermier från att ta sig in i oocytten. I dessa fall fertiliseras inte ägget alls och därmed kan ingen dräktighet uppstå.

Hur påverkar embryot moderns immunförsvar?

Maternal recognition of pregnancy

Efter att ovulationen har skett och ägget har blivit befruktat måste konstanta halter av det dräktighetsbevarande hormonet progesteron upprätthållas (Katila, 2011). Progesteron bildas i äggstockens *corpus luteum* (gulkropp) och är viktigt för att ge det befruktade ägget rätt förutsättningar för att kunna växa till. Om ägget inte befruktas kommer livmodern att utsöndra $\text{PGF}_{2\alpha}$, som inducerar luteolys av gulkroppen inom 14 dagar efter ovulationen. De mekanismer som förhindrar luteolys av gulkroppen, och därmed säkerställer en konstant halt av progesteron, leder till 'maternal recognition of pregnancy' (MRP) och gör att dräktigheten upprätthålls.

Det finns troligen flera sätt på vilka embryot förhindrar utsöndring av $\text{PGF}_{2\alpha}$ och på så sätt även luteolys. Hos idisslare bildar embryot interferoner som gör att $\text{PGF}_{2\alpha}$ inte når gulkroppen via blodet. Troligen fungerar det på samma sätt hos häst, men den antiluteolytiska substansen är okänd (Klein & Troedsson, 2011). Embryot kan även blockera COX-2, ett protein som omvandlar arachidonsyra till prostaglandiner och tromboxaner (Katila, 2011). Om COX-2 blockeras bildas bevisligen mindre mängd $\text{PGF}_{2\alpha}$ och luteolys uteblir.

Längre fram i dräktigheten har eCG, som utsöndras av endometrial cups, luteotrofiska effekter som förhindrar luteolys. Då spelar inte $\text{PGF}_{2\alpha}$ -halterna i blodet lika stor roll längre. Runt dag 60-90 i dräktigheten tar placenta över rollen som den viktigaste progesteronbildaren och gulkroppen är då inte längre nödvändig.

En annan viktig del av MRP hos häst är embryots rörelse innan implantation (Katila, 2011). Embryot rör sig runt med hjälp av livmoderkontraktioner. Eftersom hästens embryo är litet men ändå måste påverka en stor del av livmodern, som utsöndrar $\text{PGF}_{2\alpha}$, ser embryot till att hela tiden sprida små mängder antiluteolytisk substans under den tid som det förflyttar sig runt i livmodern. Troligtvis är det också genom fysisk kontakt som embryot nedreglerar COX-2, men det är fortfarande oklart exakt hur detta går till.

Nedreglering av MHC I

En viktig egenskap som de icke invasiva trofoblasterna i hästens placenta har är att de inte uttrycker MHC I (Donaldson *et al.*, 1990). Eftersom embryot ärver både maternella och paternella gener kan embryot bilda paternella proteiner, inklusive paternellt MHC I. Dessa paternella proteiner skulle kunna uttryckas på MHC I om de fanns och skulle då ses som främmande och cellerna skulle angripas av maternella CTL.

De invasiva trofoblasterna från choriongördeln uttrycker både maternellt och paternellt MHC I mellan dag 30 till 45 i dräktigheten (Noronha & Antczak, 2010). Speciellt mycket paternellt MHC I uttrycks vid dag 32-36, det vill säga alldeles innan invasion av endometriet (Donaldson *et al.*, 1990). Efter invasionen ansamlas stora mängder maternella lymfocyter kring endometrial cups (Noronha & Antczak, 2010). Framför allt CTL rekryteras på grund av de främmande MHC I som uttrycks, men de tycks inte agera mot de invasiva trofoblasterna. Detta tyder på att de invasiva trofoblasterna kan påverka CTLs aktivitet. Det är oklart varför de invasiva trofoblasterna uttrycker MHC I men en teori är att trofoblasterna på så sätt undviker NK-celler som vanligtvis lyserar celler som inte uttrycker MHC I (Flaminio & Antczak, 2005).

Efterhand som endometrial cups bildas och mognar minskar uttrycket av MHC I för att till slut försvinna helt runt dag 60 i dräktigheten. Det är oklart hur och varför detta sker. Donaldson *et al.* (1990) menar att nedreglering av MHC I kan vara ett sätt för endometrial cups att skydda sig mot CTL eftersom de då blir ”osynliga” för CTL, men studien kan inte visa hur detta går till.

Immunsupprimerande faktorer

En *in vitro*-undersökning visade att närvaro av equina invasiva trofoblaster hade en immunsupprimerande påverkan på mer än 50 % av maternella lymfocytens proliferation, medan embryonala fibroblaster inte hade någon sådan effekt (Flaminio & Antczak, 2005). Detta tyder på att invasiva trofoblaster, till skillnad från andra embryonala celler, kan påverka det maternella immunsvaret och att samtliga lymfocyttyper påverkas lika mycket. Några kända immunsupprimerande faktorer är α -fetoprotein, early pregnancy factor (EPF) och vissa cytokiner, men det är fortfarande oklart vilken faktor de invasiva trofoblasterna använder. Flaminio & Antczak (2005) kom fram till att det inte var membranbundna molekyler utan lösliga faktorer som behövdes konstant för att supprimera maternella lymfocytens proliferation. Det visade sig att den inhiberande faktorn inte var lika effektiv om lymfocytens proliferation redan hade satts igång, det vill säga faktorn var mer effektiv mot icke prolifererande lymfocyter. Trofoblasterna påverkar troligen lymfocyterna via deras vanliga och viktiga proliferations- och aktiveringsmekanismer. Lymfocytproliferationen kunde hämmas på både blastogenes-, cellcykel- och cytokinuttrycksstadium. En annan undersökning påvisade en immunsupprimerande faktor, horse conceptus derived immunosuppressive factor, som hämmade uttrycket av IL-2R receptorer på lymfocytens yta. IL-2R är nödvändig för att ta emot aktiveringssignaler från andra celler genom Th₁-cytokinen IL-2 (Noronha & Antczak, 2010).

Cytokinpåverkan

Förutom att själva uttrycka vissa cytokiner kan invasiva trofoblaster påverka maternella lymfocytens cytokinutsöndring genom att minska cellernas mRNA-uttryck eller genom att verka posttranskriptionellt så att proteinsyntesen minskar (Flaminio & Antczak, 2005). De invasiva trofoblasterna tycks också kunna hämma uttrycket av de receptorer som cytokinerna binder till (Noronha & Antczak, 2010).

Nyligen påvisade en studie att choriongördeln uttryckte höga och ökande halter IL-22 mellan dag 32-35 i dräktigheten (Brosnahan *et al.*, 2012). Ingen annan embryonal vävnad uttryckte IL-22 och interleukinen har förutom i hästens invasiva trofoblaster bara påvisats i immunceller. Studien visade ett mycket högre uttryck av IL-22 mRNA från invasiva trofoblaster jämfört med icke invasiva trofoblaster och stimulerade lymfocyter *in vivo*. IL-22's främsta uppgifter är att stimulera till celldifferentiering, cellmigration och epitelläkning samt att ge ett antimikrobiellt skydd. Detta kan förklara varför IL-22 uttrycks av invasiva trofoblaster runt tiden för invasion av endometriet, eftersom de invasiva trofoblasterna då genomgår en omfattande celldifferentiering till binukleära celler och de migrerar genom endometriet till stromat. Ett nytt epitel byggs därefter upp i endometriet. IL-22 kan också spela roll i livmoderns medfödda immunförsvar genom att uppreglera olika antimikrobiella proteiner, vilket kan vara bra då det förstörda epitelet ökar infektionsrisken i livmodern.

Hur förändras stoets immunförsvar vid dräktighet?

Lokalt i livmodern ansamlas stora mängder lymfocyter när endometrial cups bildas men de tycks inte reagera mot embryonala celler (Grunig *et al.*, 1995). Överlag kan en sämre cellmedierad aktivitet hos maternella CTL ses (Noronha & Antczak, 2012; De Mestre *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 1999) samtidigt som ökade nivåer av regulatoriska T-celler, T_{reg}, har påvisats lokalt i livmodern (De Mestre *et al.*, 2010). Färska studier tyder även på att det finns speciella NK-celler i hästens livmoder som har andra, trofoblasthjälpande, uppgifter än de normala NK-cellerna som förekommer systemiskt i kroppen (Noronha *et al.*, 2012). De Mestre *et al.* (2010) menar att det är viktigt att skilja på ett perifert immunförsvar hos stoet och lokalt immunförsvar i livmodern, eftersom embryot troligen påverkar immunförsvaret mest lokalt och det skulle kunna förklara hur modern fortfarande kan skydda sig mot exogena patogener systemiskt i kroppen.

Cytokiner

En nypublicerad studie visar på flera viktiga cytokinförändringar redan då embryot fäster till livmoderväggen (Tachibana *et al.*, 2013). Studien har påvisat ökade mRNA-uttryck av cytokinerna IL-15 och TGFβ1 i endometriet dag 19-25 hos dräktiga jämfört med icke dräktiga ston. IL-15 styr proliferationen av NK-celler medan TGFβ1 är en immunsupprimerande cytokin som inhiberar aktiveringen av NK-celler. Efter dag 25 minskade halterna av TGFβ1 och istället kunde ett ökat genuttryck av IFNγ och IL-4 påvisas hos de dräktiga stona. IFNγ är en typisk Th₁-cytokin medan IL-4 är en typisk Th₂-cytokin. Även mRNA-uttryck för olika cytokinreceptorer på Th₁ respektive Th₂ kunde uppmätas. Slutsatsen Tachibana *et al.* (2013) drog var att TGFβ1 styr NK-cellerna under de dagar då embryot fäster till livmoderväggen för att undvika att dessa lyserar trofoblasterna, för att sedan minska efter dag 25. Närvaron av IFNγ och IL-4 visar att både Th₁ och Th₂ aktiveras samtidigt under stoets dräktighet.

En *in vitro* studie har kunnat påvisa att lymfocyter i närvaro av invasiva trofoblaster uttrycker färre cytokiner jämfört med kontrollgrupper (Flaminio & Antczak, 2005). Detta betyder att lymfocyterna inte aktiveras i samma utsträckning. Flaminio & Antczak (2005) konstaterade även att celler som inte delar sig inte heller differentierar och producerar cytokiner. Studien

visade lägre mRNA-uttryck av IL-4 hos lymfocyterna i närvaro av invasiva trofoblaster jämfört med embryonala fibroblaster. Samma trend sågs för IL-10 och INF γ , men dessa resultat var ej statistiskt signifikanta. Vad gäller INF γ så har en annan studie kunnat visa ett ökat uttryck av INF γ hos lymfocyter i anslutning till endometrial cups (Noronha & Antczak, 2010). Vad gäller andra cytokiner ökade genuttrycket för IL-2 något i närvaro av invasiva trofoblaster, men inga skillnader sågs på mRNA-uttrycket av TGF β 1 och TNF α (Flaminio & Antczak, 2005).

Cytokinförändringarna förklarade ovan verkar bara gälla lokalt i livmodern, eftersom en studie av de Mestre *et al.* (2010) visade ett ökat antal perifera lymfocyter som uttryckte IL-4 hos dräktiga ston. Halten INF γ i perifert blod varierade mycket hos samtliga ston, både dräktiga och icke dräktiga. Studien kunde med hjälp av immunohistokemi visa att lymfocyter i och runt endometrial cups hos dräktiga ston uttryckte tre gånger så mycket INF γ jämfört med IL-4.

Cellmedierat svar

Grunig *et al.* (1995) har i en studie kartlagt de leukocyter som infiltrerar livmodern då endometrial cups bildas. Leukocyterna bevisades korrelera med de olika stegen i bildningen av endometrial cups. Framförallt T-celler infiltrerade livmodern vid invasionsstället, där Th-celler sågs inuti endometrial cups när de hade bildats. Ytterligare en studie styrker dessa uppgifter (De Mestre *et al.*, 2010). CTL kunde påvisas omge endometrial cups och hälften av stona hade även CTL i endometrial cups, men dessa påvisades bara tidigt i bildandet för att sedan försvinna. När endometrial cups väl hade etablerats fanns nästan inga lymfocyter inuti dem men när endometrial cups sedan tillbakabildades kunde lymfocyter återigen påvisas.

En undersökning har visat att perifera lymfocyter från dräktiga ston hade sämre förmåga att proliferera till aktiva CTL som kunde lysa trofoblaster med paternellt MHC I jämfört med hos icke dräktiga ston (Baker *et al.*, 1999). Denna försämring var reversibel och CTL återfick sin cytolytiska förmåga efter förlossningen. Inga skillnader i antalet CTL under stoets dräktighet har uppmätts och därför antogs deras cytolytiska förmåga avta (Noronha & Antczak, 2012). En tredje undersökning kunde påvisa att CTL visade minskad reaktivitet i blodprov 30 dagar in i dräktigheten jämfört med blodprov tagna innan befruktning hos 15 ston (De Mestre *et al.*, 2010). Antalet CTL minskade dock inte, vilket stärker idén om att det är själva reaktiviteten hos CTL som förändras hos dräktiga ston.

De Mestre *et al.* (2010) hävdar att T_{reg} kan ha en viktig roll i att skydda de invasiva trofoblasterna. T_{reg} är viktiga för att reglera immunförsvaret genom att styra T-celler så att balansen mellan perifer tolerans och immunitet bibehålls (Tizard, 2009). T_{reg} påverkar andra celler via immunsupprimerande cytokiner, IL-10 och TGF β , eller cytotoxiskt genom att använda perforin och granzymmer. Det kan vara så att T_{reg} rekryteras till endometrial cups när dessabildas. På plats förhindrar de nedbrytning av invasiva trofoblaster som uttrycker främmande MHC I genom att supprimera maternella lymfocyter (De Mestre *et al.*, 2010). Foxp3, en transkriptionsfaktor, ökade trefaldigt i lymfocyter vid endometrial cups jämfört med perifert (De Mestre *et al.*, 2010). Foxp3 uttrycks bland annat av T_{reg} och de stigande

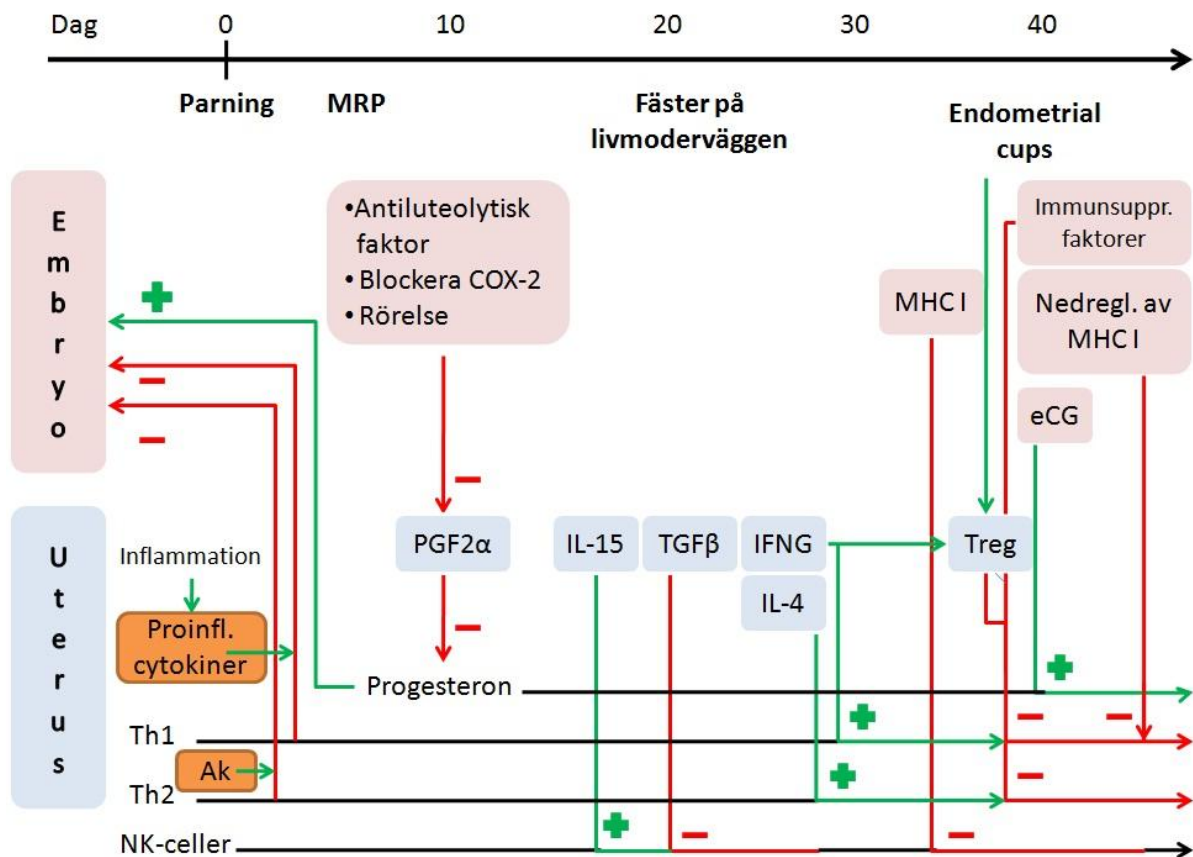
nivåerna av Foxp3 i endometrial cups representerade antagligen en ökning av T_{reg} . Även undersökningar på både gen- och proteinnivå visade på en ökning av T_{reg} runt om endometrial cups. En ökning av T_{reg} under dräktighet har påvisats även hos andra arter (Noronha & Antczak, 2010). En ökning av T_{reg} runt endometrial cups styrks av att $IFN\gamma$ styr bildandet av T_{reg} (De Mestre *et al.*, 2010). Hos mus har T_{reg} visat sig nödvändiga för acceptans av allogena transplantat (Feng *et al.*, 2008).

I samtliga undersökningar ovan har slutsatsen dragits att stoets perifera immunförsvar skiftar från ett cellmedierat till ett antikroppsmedierat svar då de invasiva trofoblasterna invaderar endometriet. De Mestre *et al.* (2010) har dock kunnat visa att så inte är fallet lokalt i livmodern, där högre halter av $INF\gamma$ samt lägre halter av IL-4 har uppmätts. Detta tyder istället på ett ökat cellmedierat svar och ett suppresserat antikroppsvar.

En färsk studie har påvisat uterina NK-celler i dräktiga stons endometrium (Noronha *et al.*, 2012). Detta har tidigare visats hos människa och mus, där uterina NK-celler uppvisar andra egenskaper än de perifera NK-cellerna (Croy *et al.*, 2006). Det är fortfarande oklart vad som gör att dessa NK-celler ändrar funktion och fenotyp under dräktigheten för att sedan återgå till normala NK-celler, men hormoner kan spela en stor roll. Studien tyder på att uterina NK-celler är svagt lytiska och istället hjälper till i säkerställandet och underhållandet av dräktighet. Noronha *et al.* (2012) har även påvisat interaktioner mellan paternellt MHC I hos embryot och uterina NK-celler. Detta skulle kunna förklara varför de invasiva trofoblasterna uttrycker paternellt MHC I. Normalt sett lyserar NK-celler nukleära celler som inte uttrycker något MHC I. Den här studien har istället visat att uterina NK-cellers kontakt med paternellt MHC I är viktig för trofoblastinvasion, vaskulär utveckling i livmodern och embryonal tillväxt hos både människa och mus. Noronha *et al.* (2012) föreslår att eventuella uterina NK-celler hos häst påverkar framför allt trofoblastinvasion och förändring av endometriet, eftersom hästar inte har samma vaskularisering av livmodern som människa och mus. Deras uppgift kan möjligen vara att hjälpa trofoblasterna vid deras invasion av livmodern och den ombyggnad av endometriet som detta medför. Om NK-cellerna i livmodern inte har den celldödande funktion som NK-celler vanligtvis har systemiskt i kroppen skulle det även kunna förklara varför placentans celler, som inte uttrycker MHC I, inte angrips av NK-celler.

Antikroppsmedierat svar

Stora mängder antikroppar mot paternellt MHC I har uppmätts under dräktighet hos ston (Noronha & Antczak, 2010). Studien som de Mestre *et al.* (2010) publicerade visade dock att uttrycket av IL-4 minskar runt endometrial cups, vilket tyder på att det antikroppsmedierade svaret lokalt i livmodern inhiberas då trofoblasterna invaderar endometriet. Det skulle kunna förklara varför de invasiva trofoblasterna, som då uttrycker paternellt MHC I, inte angrips av det antikroppsmedierade svaret. Studien visade också ett ökat antikroppsmedierat svar perifert hos stoet. B-cellsantalet verkar vara oförändrat både perifert och lokalt i livmodern (Baker *et al.*, 1999).



Figur 2. Den tidiga dräktighetsimmunologins tidslinje. Baserad på arbetets referenser.

DISKUSSION

Huruvida det förvärvade immunförsvaret går mot ett Th₁-svar eller ett Th₂-svar vid dräktighet har diskuterats länge och ofta inom forskningen kring dräktighetsimmunologi. Det har hävdats att immunförsvaret förskjuts mot ett Th₂-svar men senare studier tyder allt mer på att dessa teorier är överskattade och att det inte alls behöver vara så (De Mestre *et al.*, 2010; Croy *et al.*, 2006). De Mestre *et al.* (2010) påvisade ingen avgörande skillnad mellan cellmedierat och antikroppsmedierat maternellt immunsvaret perifert medan antikroppsmedierat och CTL lokalt i livmodern inhiberades. Detta kan förklara hur stoet klarar av att bekämpa infektioner under dräktighet. Lokalt i livmodern påvisades ett minskat antikroppsvar och ett cellmedierat svar som hade lika många CTL, men cellernas aktivitet var nedsatt (De Mestre *et al.*, 2010). Då fölet får i sig antikroppar i colostrum kan det finnas en risk omdet maternella immunförsvaret bildar antikroppar mot paternellt MHC I på de invasiva trofoblasterna, eftersom antikropparna skulle kunna överföras till fölet via colostrum och leda till autoimmuna reaktioner hos fölet. Det är en trolig anledning till att det antikroppsmedierade svaret trycks ner när MHC I uttrycks på de invasiva trofoblasterna.

När MHC I nedregleras efter bildningen av endometrial cups kan varken antikroppar eller CTL känna igen trofoblasterna. Även leukocytantalet minskar drastiskt jämfört med vid invasionen (Grunig, 1995). Grundat på de resultat de Mestre *et al.* (2010) kunde presentera, är min teori att cellmedierade CTL och antikroppar inhiberas lokalt i livmodern tills dess att

MHC I inte uttrycks längre, för att inte orsaka en avstötning av embryot. Flaminio och Antczak (2005) visade att lymfocyter som fick mitogena stimuli inte utvecklades i närvaro av invasiva trofoblaster. Frågan är då hur embryot undviker NK-celler? Det krävs fortfarande mycket forskning inom detta område på häst, men uppmärksamhet har nu riktats ditåt (Noronha *et al.*, 2012). När embryot fäster till livmoderväggen har en alldeles färsk studie visat att NK-celler inhiberas av TGFβ1 (Tachibana *et al.*, 2013). Detta skulle kunna förklaras av att embryot under dessa dagar utgör en större risk att trigga NK-celler när trofoblasterna sluter tätt till livmoderns epitel. Det skulle kunna vara så att endometrial cups undviker NK-cellangrepp genom att uttrycka TGFβ1 eller genom att minska uttrycket av IL-15, så att NK-celler inte rekryteras till livmodern.

Early embryonic death, EED, uppstår inom 40 dagar efter parning eller insemination och karakteriseras av att embryot aborteras i något av de olika utvecklingsstadierna det befinner sig i, från befruktning fram tills dess att endometrial cups bildats (Krakowski *et al.*, 2010). EED anses ofta vara idiopatisk (Davies Morel, 2008) men med tanke på alla de viktiga steg embryot måste gå igenom under befruktning, igenkänning, stabilisering vid livmoderväggen och bildandet av endometrial cups är det mycket som kan gå fel immunologiskt. Det är därför troligt att många av de idiopatiska tidiga aborterna beror på immunologiska felsvar hos stoet.

Oavsett när EED uppstår tycks cytokinbilden hos stoet inte se ut som den ska och därför moduleras det maternella immunförsvaret fel. Utifrån denna litteraturstudie kan slutsatser dras om att dessa förändringar i cytokinbilden kan bero dels på att embryot inte påverkar stoet i den omfattning det borde eller för att det maternella immunförsvaret inte uppför sig som det borde på grund av miljö, sjukdom eller genetiska och hormonella förändringar. Immunsupprimerande faktorer utsöndrade från invasiva trofoblaster verkar på lymfocyternas proliferations- och aktiveringsmekanismer medan cytokinförändringar kan påverka de naiva lymfocyterna på ett tidigare stadium. På det sättet får cytokinförändringarna en större effekt, men de kan också påverka fler celler eftersom de kan styra huruvida stoets immunsvaret ska ta en cellmedierad eller antikroppsmedierad riktning och därmed påverka hela populationer av lymfocyter. Immunsupprimerande faktorer och påverkan av cytokinuttryck kan tillsammans bidra till en fullständig kontroll av lymfocyternas olika utvecklingsstadierna och skyddar på så sätt embryot mot de reaktioner som vanligtvis stöter bort ett transplanterat organ.

När embryot fäster till livmoderväggen mellan dag 19-25 är det viktigt att NK-cellerna inhiberas på rätt sätt för att inte EED ska uppstå. Detta beror på att cytokiner uttrycks på fel sätt, exempelvis genom att TGFβ1 inte uttrycks i tillräckligt stor mängd så att NK-cellerna inte inhiberas eller att Th₁-cytokiner dominerar och utlöser ett större cellmedierat svar med fler NK-celler som angriper embryot. Minskade nivåer av T_{reg} har också visat sig leda till EED hos människa (Aluvihare *et al.*, 2004). Inga sådana studier har gjorts på häst, men eftersom T_{reg} har en viktig immunsupprimerande roll under hästens dräktighet verkar det troligt att minskade nivåer av T_{reg} kan leda till EED även hos häst. Ett förhöjt antikroppsmedierat svar är troligen inte lika allvarligt som ett cellmedierat svar under den här perioden, eftersom antikropparna inte kommer att känna igen embryot som främmande då embryot inte uttrycker MHC I. Det cellmedierade svaret har däremot NK-celler som aktiveras i frånvaro av MHC I.

EED i samband med bildningen av endometrial cups kan bero på att det antikroppsmedierade svaret inte supprimeras. Senare studier pekar på att det antikroppsmedierade svaret hämmas när de invasiva trofoblasterna invaderar endometriet, vilket är funktionellt då det kan reagera mot de MHC I som de invasiva trofoblasterna uttrycker (De Mestre *et al.*, 2010). NK-celler är under invasionen inget problem eftersom MHC I uttrycks och NK-cellerna då lämnar över den cytotoxiska aktiviteten till CTL. Eftersom CTL inhiberas utgör inte heller det cellmedierade svaret något hot, men om supprimeringen skulle vara inkonsekvent ökar risken för EED. Fler studier skulle vara bra i syfte att utreda hur länge det antikroppsmedierade svaret är supprimerat i samband med bildandet av endometrial cups, eftersom det logiskt borde vara så att det antikroppsmedierade svaret inte supprimeras längre än endometrial cups uttrycker MHC I. När endometrial cups inte längre uttrycker MHC I är det viktigt att det antikroppsmedierade svaret återfår sin funktion i uterus för att kunna skydda livmodern mot exogena patogener, till exempel bakterier som kan ta sig in i livmodern via vagina, som annars kan utgöra en stor infektions- och abortrisk för embryot.

Hur endometrial cups bryts ner och försvinner är fortfarande oklart. Det spelar dock inte någon större roll för embryots fortlevnad så länge de bryts ner när placentan kan producera progesteron. Eftersom endometrial cups befinner sig i endometriets stroma och inte har någon förbindelse med embryot eller själva placentan, det vill säga endometriets epitel och den icke-invasiva trofoblasten, kan stoets immunförsvar ta hand om dem utan att påverka embryot.

Det finns bevisligen många kritiska punkter under dräktigheten som kan orsaka EED om inte det maternella immunförsvaret supprimeras. Samtidigt sker en fin avvägning av när inhiberingen ska upphöra för att stoet ska kunna bekämpa exogena patogener. När embryot uttrycker MHC I inhiberas det förvärvade immunförsvaret hos stoet, men inhiberingen minskar då embryots MHC I-uttryck avtar, allt för att ge stoet de bästa förutsättningarna att förbli frisk och undvika infektioner hos sig själv och fostret under den resterande tiden av dräktigheten.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. & Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology* 5(3), 266-271.
- Baker, J.M., Bamford, A.I. & Antczak, D.F. (1999). Modulation of allospecific CTL responses during pregnancy in equids: An immunological barrier to interspecies matings? *Journal of Immunology* 162(8), 4496-4501.
- Brosnahan, M.M., Miller, D.C., Adams, M. & Antczak, D.F. (2012). IL-22 is expressed by the invasive trophoblast of the equine (*Equus caballus*) chorionic girdle. *Journal of Immunology* 188(9), 4181-7.
- Croy, B.A., van den Heuvel, M.J., Borzychowski, A.M. & Tayade, C. (2006). Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunological Reviews* 214, 161-185.
- Davies Morel, M.C.G. (2008). *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. 3. uppl. Cambridge. CABI Publishing.
- De Mestre, A., Noronha, L., Wagner, B. & Antczak, D.F. (2010). Split immunological tolerance to trophoblast. *International Journal of Developmental Biology* 54(2-3), 445-455.
- Donaldson, W.L., Zhang, C.H., Oriol, J.G. & Antczak, D.F. (1990). Invasive equine trophoblast expresses conventional class-1 major histocompatibility complex antigens. *Development* 110(1), 63-71.
- Feng, G., Wood, K.J. & Bushell, A. (2008). Interferon-gamma conditioning ex vivo generates CD25(+)CD62L(+)Foxp3(+) regulatory T cells that prevent allograft rejection: Potential avenues for cellular therapy. *Transplantation* 86(4), 578-589.
- Flaminio, M. & Antczak, D.F. (2005). Inhibition of lymphocyte proliferation and activation: a mechanism used by equine invasive trophoblast to escape the maternal immune response. *Placenta* 26(2-3), 148-159.
- Grunig, G., Triplett, L., Canady, L.K., Allen, W.R. & Antczak, D.F. (1995). The maternal leukocyte response to the endometrial cups in horses is correlated with the developmental stages of the invasive trophoblast cells. *Placenta* 16(6), 539-559.
- Katila, T. (2011). Maternal recognition of pregnancy in the horse. *Pferdeheilkunde* 27(3), 261-264.
- Klein, C. & Troedsson, M.H.T. (2011). Maternal recognition of pregnancy in the horse: a mystery still to be solved. *Reproduction Fertility and Development* 23(8), 952-963.
- Krakowski, L., Krawczyk, C.H., Wrona, Z., Dabrowski, R. & Jarosz, L. (2010). Levels of selected T lymphocyte subpopulations in peripheral blood of mares which experienced early embryonic death. *Animal Reproduction Science* 120(1-4), 71-77.
- Noronha, L.E. & Antczak, D.F. (2010). Maternal immune responses to trophoblast: the contribution of the horse to pregnancy immunology. *American Journal of Reproductive Immunology* 64(4), 231-244.
- Noronha, L.E. & Antczak, D.F. (2012). Modulation of T-cell reactivity during equine pregnancy is antigen independent. *American Journal of Reproductive Immunology* 68(2), 107-115.
- Noronha, L.E., Huggler, K.E., de Mestre, A.M., Miller, D.C. & Antczak, D.F. (2012). Molecular evidence for natural killer-like cells in equine endometrial cups. *Placenta* 33(5), 379-386.
- Risvanli, A. (2011). Reproductive immunology in mares. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6(6), 547-554.
- Tachibana, Y., Nakano, Y., Nagaoka, K., Kikuchi, M., Nambo, Y., Haneda, S., Matsui, M., Miyake, Y. & Imakawa, K. (2013). Expression of endometrial immune-related genes possibly functioning during early pregnancy in the mare. *The Journal of Reproduction and Development* 59(1), 85-91.

Tizard, I.R. (2008). *Veterinary immunology*. 8. uppl. St. Louis. Saunders.