

Българска Академия на Науките

Институт по Биология и Имунология на Размножаването

„Акад. Кирил Братанов”

*Изследване на имуномодулиращия цитокин IL-10,
в кръвната рециркулация и на майчино-феталната граница,
при нормална и патологична бременност*

АВТОРЕФЕРАТ

на

дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен

„доктор”

на

Боряна Петкова

Научен ръководител: доцент Цветелина Орешкова

Научна специалност „Имунология” шифър 01.06.23

София, 2018 г.

Настоящият дисертационен труд е разписан на 127 страници, съдържа 15 фигури, 1 таблица и 3 схеми. Цитирани са 309 литературни източника.

Изследванията са проведени в секция „Молекулярна имунология” на ИБИР-БАН.

Дисертационният труд е преминал успешно процедура за предварително обсъждане и е насочен за защита на заседание на Научния съвет на ИБИР-БАН, проведено на 11.09.2018 г.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 20.12.2018г. от 11.00 часа в Заседателната зала на ИБИР-БАН, бул. „Цариградско шосе” 73, гр. София, пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Сорен Хайрабемян, дбн /ИБИР-БАН/
2. Проф. д-р Доброслав Кюркчиев, дмн /УМБАЛ „Свети Иван Рилски”/
3. Проф. д-р Искра Алтънкова, дмн /Б-ца Лозенец, МФ, СУ/
4. Проф. Стефка Делимитрева /Катедра Биология, МУ-София/
5. Доц. д-р Иванка Цачева /Катедра Биохимия, БФ, СУ/

Забележка: Номерацията на фигурите и схемите в автореферата не съответства на номерацията в дисертационния труд.

Използвани съкращения

г.с.	гестационна седмица
ДСК	децидуални стромални клетки
л.м.	лунарен месец
МПА	медроксипрогестерон ацетат
ПМК	периферни мононуклеарни клетки
РНК	рибонуклеинова киселина
цАМФ	цикличен аденозинмонофосфат
ЧХГ	човешки хорионгонадотропин
CD	cluster of differentiation (клъстер на диференциация)
E2	17 β -estradiol (естрадиол)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (ензимно-свързан имуносорбентен анализ)
FACS	fluorescence activated cells sorting (флуоресцентно-активирано клетъчно сортиране, проточна цитометрия)
IL	interleukin (интерлевкин)
PRL	prolactin (пролактин)
RT-PCR	real time polymerase chain reaction (полимеразна верижна реакция в реално време)
Th	T-helper (Т-хелпер, Т-помощник)
Treg/s	regulatory T-cell/s (регулаторна/и Т-клетка/и)

Съдържание

Въведение.....	4
2. Цел и задачи.....	5
3. Материали и методи.....	6
4. Резултати и дискусия.....	8
5. Заключение.....	39
6. Изводи.....	43
7. Приноси.....	44
8. Публикации и участия.....	45
9. Литературни източници.....	47

1. Въведение

Бременността е състояние, свързано с установяване на нова имунна хомеостаза в женския организъм. Иммунната система на майката разпознава и толерира присъствието на алогенния плод, като същевременно е в състояние да осигури необходимата защита от патогени. Иммунната система е важен участник в основни процеси, свързани с бременността, а именно подготовката на ендометриума за евентуална бременност, имплантацията на ембриона, образуването на плацентата и родовия процес. За осъществяването на важните роли на иммунната система по време на бременността, както и за адаптирането ѝ към специфичното физиологично състояние на женския организъм, е необходимо модулиране на механизмите на вродения и придобития имунитет, както на локално (децидуа), така и на системно (кръвна циркулация) ниво. Едно от отраженията на адаптацията на иммунната система към бременността е промяната на цитокиновия баланс: проинфламаторен (Th1) профил по време на имплантацията и раждането, антиинфламаторен (Th2) профил през гестационния период.

Интерлевкин 10 (IL-10) е един от имуномодулаторните цитокини със значение за нормалния ход на бременността. Той участва в различни процеси, отговорни за нормалното ѝ протичане, които включват поддържане на имунна толерантност към плода, регулация на растежа и ремоделирането на плацентата, контрол на диференциацията на трофобласта и неговата инвазия в децидуалната строма, а също така изпълнява и вазопротективна функция. Отклонения от нормалните нива на IL-10 се установяват при репродуктивни усложнения, сред които настъпване на спонтанен аборт, развитие на преекламписия, както и при пациенти с ендометриоза, което подчертава значението на строгата регулация на нивата на този имуномодулаторен цитокин за поддържане на нормалното състояние на репродуктивната система на жената, както и за протичането без усложнения на бременността, и успешния ѝ завършек.

Предвид имуномодулиращата функция на IL-10, установяването на неговата концентрация в периферната кръв и локално в матката, включително при подготовката на ендометриума за имплантацията на ембриона, в случаите на нормално протичаща и неуспешна бременност, може да разкрие нови имунни механизми с потенциал за приложение в диагностиката и терапията на имунно-обусловена патологична бременност.

2. Цел и задачи

Целта на настоящия труд е да се определи значението на имуномодулиращия цитокин Интерлевкин 10 като предиктивен и диагностичен биомаркер за спонтанен аборт, да се установят нови аспекти на неговото участие в поддържане на обща и локална имунотолерантност по време на бременността, както и да се определи значението му за изграждането на рецептивността на ендометриума.

За осъществяване на горепосочената цел са изпълнени следните задачи:

1. Определяне на стойностите на плазмена концентрация на IL-10 при нормално протичаща бременност в сравнение със стойностите при спонтанен аборт и при небременни жени в репродуктивна възраст.
2. Определяне на нивата на генна експресия на IL-10 в периферни мононуклеарни клетки (ПМК) в горепосочените групи жени.
3. Определяне на нивата на генна експресия на IL-10 в децидуална тъкан от проби на жени с нормална бременност (елективен аборт) и спонтанен аборт.
4. Оценка на белтъчната експресия на IL-10 в децидуални клетъчни популации в проби на жени с нормална бременност и спонтанен аборт.
5. Определяне на нивата на експресия на IL-10 в хода на децидуализация на стромални клетки от децидуални проби на жени с нормална бременност и спонтанен аборт.

3. Материали и методи

Реактивите, необходими за осъществяването на експерименталната работа, са закупени по проекти:

- Basic and practical training of young scientists in the field of biotechnology, European social fund 2007-2013, BG051PO001-3.3.06-0059, 2013
- ДФНП175/13.05.2016 г., Програма за подпомагане на младите учени в БАН, 13.05.2016 г.- 30.07.2017 г.

Благодарим на екипа на болница Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда за предоставянето на експерименталните проби и на всички жени, чиито проби са включени в изследванията.

Благодарим на лаборатория Цибалаб за анализа на концентрацията на пролактин.

3.1. Материали

- проби кръвна плазма от 91 жени и проби ПМК от 58 жени (Таблица 1), разпределени в пет групи: небременни жени в репродуктивна възраст (контролна група), жени в първи триместър на бременността (II-III лунарен месец, л.м.), във втори-трети триместър (VI-VII л.м.), непосредствено преди раждане (X л.м.) и жени диагностицирани със спонтанен аборт до 12-та гестационна седмица.

Таблица 1. Проби кръвна плазма и ПМК

Група	Проба	Средна възраст *	Брой
Небременни жени	Кръвна плазма	28,8 ±5,8	21
	ПМК	30,9 ±7,4	14
II-III л.м.	Кръвна плазма	32,2 ±6,7	13
	ПМК	31,0 ±5,3	11
VI-VII л.м.	Кръвна плазма	32,4 ±4,2	11
	ПМК	32,6 ±6,5	5
X л.м.	Кръвна плазма	30,4 ±4,1	21
	ПМК	33,0 ±2,8	8
Спонтанен аборт	Кръвна плазма	32,2 ±5,3	25
	ПМК	32,0 ±5,2	20

**средна възраст на жените ±стандартната девиация (SD); няма статистически значима разлика във възрастта на жените между различните изследвани групи (Mann-Whitney U-test).*

- проби от човешка децидуа от първи триместър (до 12-та гестационна седмица) при елективно (n=6) или спонтанно (n=6) прекъсване на бременността, от жени на възраст 18-43г.
- първични клетъчни линии човешки децидуални стромални клетки (n=15), изолирани от 8 проби децидуа от елективен и 7 проби децидуа от спонтанен аборт до 12-та гестационна седмица.

3.2. Методи

- клетъчно-биологични методи: изолиране на ПМК, клетъчно култивиране, *in vitro* децидуализация на стромални клетки от човешка децидуа (Схема 1), получаване на тъканни криосрези

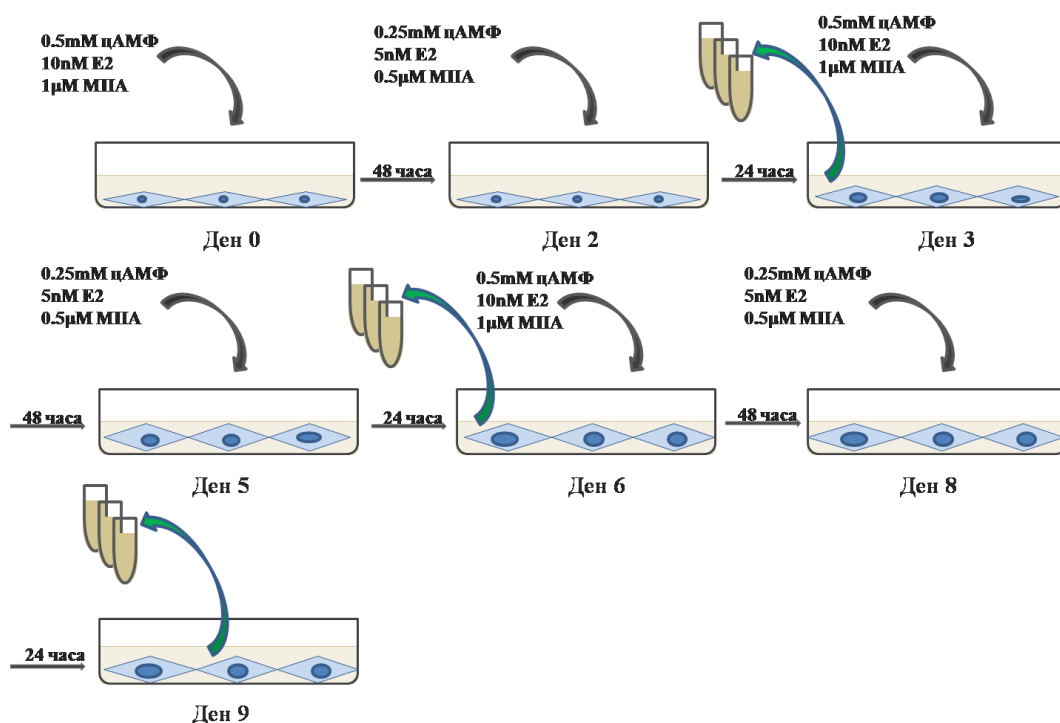


Схема 1. In vitro децидуализация на стромални клетки от човешка децидуа

- молекулярно-биологични методи: изолиране на РНК, обратна транскрипция, полимеразна верижна реакция в реално време (RT-PCR)
- имунологични методи: ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), имунофлуоресценция, проточна цитометрия (FACS)
- статистически анализ и графично представяне на данните: GraphPad Prism 6.0 и Excel (Microsoft)

4. Резултати и дискусия

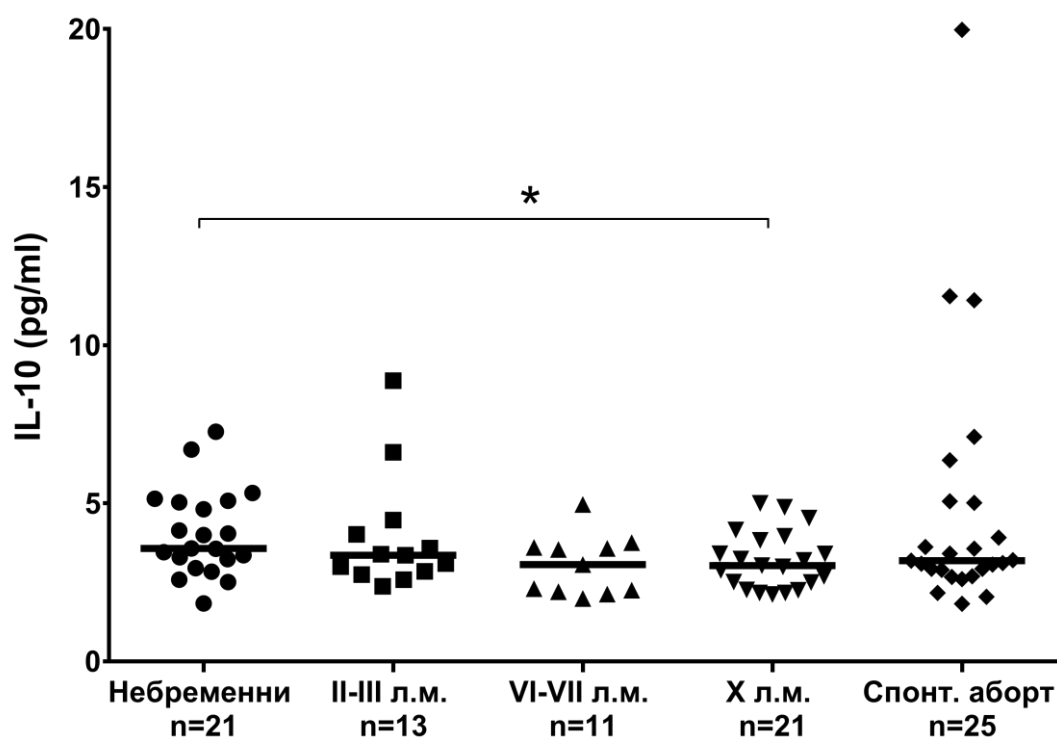
В настоящия труд са проведени изследвания за установяване на плазмените нива на IL-10 в хода на бременността и при настъпване на спонтанен аборт. Мононуклеарните клетки, включващи лимфоцити (Т-, В-, НК-клетки) и моноцити, са основен клетъчен компонент на периферната кръв, докато децидуата се разполага локално в матката, и е в контакт с фетални клетки. Проведен е анализ на генната експресия на IL-10 в ПМК и децидуа, който цели установяване на локализацията на основния източник на IL-10 по време на бременността и при спонтанен аборт - дали това са периферни левкоцити или децидуа. За детайлно разглеждане на децидуалните клетъчни популации, експресиращи IL-10 на майчино-феталната граница, е проведен имунофлуоресцентен анализ.

Децидуализацията е процес, имащ ключово значение за рецептивността на ендометриума и за последващите имплантацията на ембриона етапи. Неправилното протичане на процеса на децидуализация може да доведе до загуба на бременността или усложнения в нейния ход. Предвид важността на процеса на децидуализация и многостранното действие на IL-10 на майчино-феталната граница, са изследвани нивата на секрецията на IL-10 в хода на *in vitro* децидуализация на стромални клетки от децидуа, като са сравнени секреторните нива при стромални клетки от проби нормална бременност и спонтанен аборт.

4.1. Нива на IL-10 в периферна кръв

4.1.1. Анализ на нивата на IL-10 в кръвна плазма от жени с нормална бременност, при спонтанен аборт и небременни жени

Разнопосочните данни относно нивата на IL-10 в кръвна плазма по време на бременността и при свързани с нея патологии предполагат осъществяването на допълнителни изследвания, които да допринесат за изграждането на по-ясна картина на разпределението на този имуномодулаторен цитокин. Поради тази причина и с цел обвързване на плазмените нива на IL-10 с настъпването на спонтанен аборт, е проведен анализ на концентрацията на IL-10 в кръвна плазма на бременни жени, разпределени в три групи: II-III лунарен месец (л.м.), VI-VII л.м. и X л.м., жени, непосредствено след установяване на спонтанен аборт и контролна група от небременни жени в репродуктивна възраст.

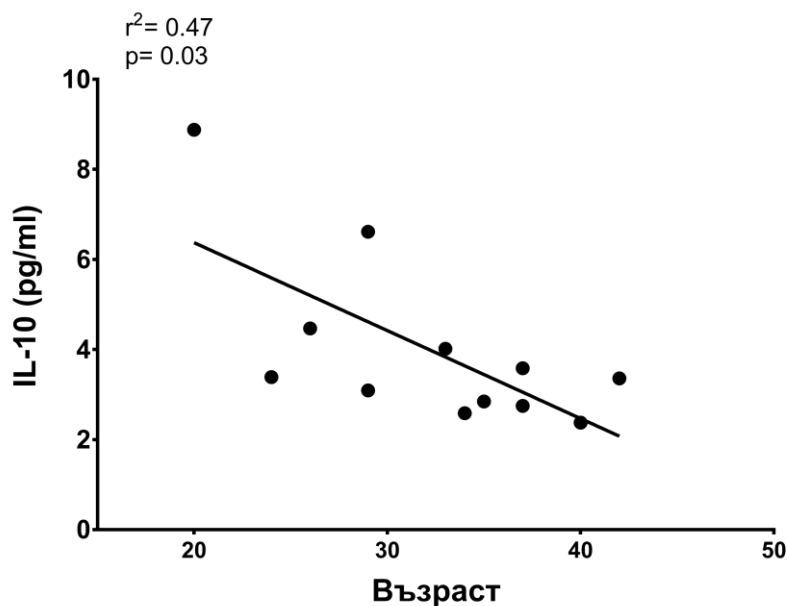


Фигура 1. Нива на IL-10 в кръвна плазма от небременни жени (n=21), бременни жени в II-III л.м., в VI-VII л.м., в X л.м. и жени, непосредствено след установяване на настъпил спонтанен аборт. Концентрацията (pg/ml) на IL-10 е измерена чрез ELISA. Графиката представя медианата на концентрацията на IL-10.

* $p < 0.05$ (Mann-Whitney U-test)

Концентрацията на IL-10 в кръвна плазма е измерена посредством метода на ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA).

Изследването на групата на небременните жени в репродуктивна възраст показва разпределение на стойностите на IL-10 между 1.83 pg/ml и 7.26 pg/ml (Фиг. 1). Преобладаващият брой небременни контроли имат количество под 5 pg/ml и само в 7 от 21 случая (33%) тази стойност е близка до 5 pg/ml или малко по-висока. Това показва оформяне на сравнително хомогенна група, с медиана на концентрацията 3.57 pg/ml, спрямо която са сравнени стойностите в останалите групи. В групата жени в ранна бременност (II-III л.м.), стойностите на IL-10 варират между 2.37 pg/ml и 8.88 pg/ml, медиана на концентрацията 3.36 pg/ml - малко по-ниска от тази в контролната група, но без статистическа значимост. Тези резултати са в противовес с публикувани от други групи данни, които показват повишение на нивата на IL-10 през първи триместър [1]. В групата на ранна бременност, поради отличаващите се стойности на две от пробите, е проведен анализ на корелацията между възрастта на пациентките и нивата на IL-10, за установяване на връзка между тези два параметъра (Фиг. 2). Въпреки не много отчетливата зависимост ($r^2=0.47$), анализът показва, че в тази група нивата на IL-10 в кръвна плазма статистически значимо ($p=0.03$) намаляват с нарастването на възрастта на бременните жени. Съответно високите стойности на IL-10 се наблюдават при жени на възраст под 31 години, каквито са двете отличаващи се проби в тази група. При тези две жени бременността е протекла нормално и е завършила успешно. Статистически значима корелация между параметрите възраст и плазмена концентрация на IL-10 не е открита в останалите изследвани групи: небременни жени, VI-VII л.м., X л.м. и спонтанен аборт.



Фигура 2. Корелационен анализ на връзката между нивата на IL-10 в кръвна плазма от бременни жени в II-III л.м. (n=13) и тяхната възраст. Графиката представя възрастта в години на бременните жени, съпоставена с концентрацията на IL-10 (pg/ml), непараметрична корелация на Spearman.

Възможно е по-високите стойности на IL-10 при по-млади жени да са свързани с по-високите нива на човешки хорионгонадотропин при тях [2]. ЧХГ може да стимулира пролиферацията на регулаторни Т-клетки, които са основен източник на IL-10 в периферната кръв [3]. Имайки предвид важната роля на IL-10 в началните стадии на бременността, получените резултати са в съгласие с наблюденията, че при по-млади жени, в преобладаващия брой случаи, регулаторните механизми свързани с гестационния период, сред които е и поддържане на необходимите нива на IL-10, се осъществяват по-ефективно в сравнение с тези при по-възрастни жени. В съответствие с това твърдение, най-ниски стойности на IL-10 са установени при жени над 35 години (Фиг. 2), но е необходимо изследване на по-голям брой проби, за да може да се направи категорично заключение.

През останалите етапи на бременността се наблюдава понижаване на плазмените нива на IL-10 в сравнение с контролите. Статистическата обработка на данните показва значима разлика от $p < 0.05$ между групата на небременните жени и тези на бременни в X л.м ($p = 0.025$). При жените в VI-VII л.м. на бременността, медианата на концентрацията на IL-10 е 3.06 pg/ml (стойности в групата между 1.99 pg/ml и 4.96 pg/ml), докато непосредствено преди раждането (X л.м) е 3.03 pg/ml (стойности в

групата между 2.12 pg/ml и 5 pg/ml) (Фиг. 1). Резултатите при тези две групи са сравнително хомогенни. При групата VI-VII л.м., тази хомогенност и понижение на концентрацията на IL-10 вероятно се дължат на вече стабилизираните процеси през този етап от бременността, след динамичните начални месеци. Преди раждането, очаквано нивата на IL-10 са понижени, тъй като този процес е свързан с проинфламаторна реакция [4].

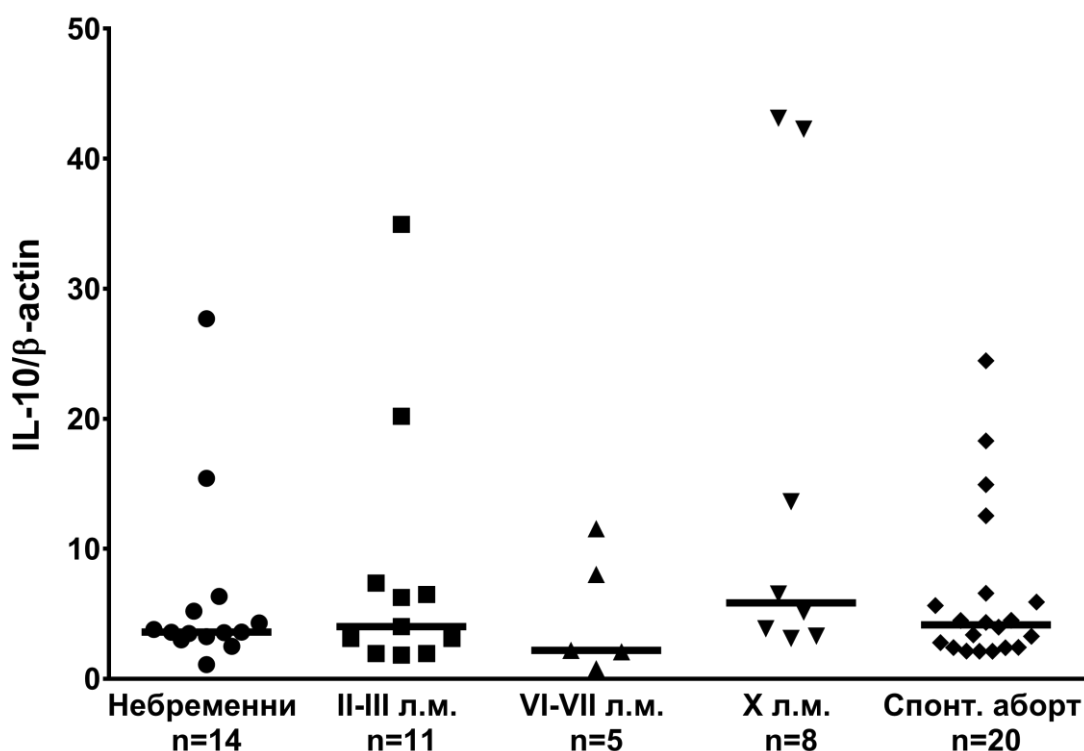
В групата на спонтанните аборти са включени 25 пациентки. В нея, освен сравнително компактно, преобладаващо по-ниско в сравнение с контролите и II-III л.м. разпределение на IL-10, медиана на концентрацията 3.18 pg/ml, се открояват три случая със стойности над 10 pg/ml (Фиг. 1). От направената малка извадка се установява, че честотата на тези случаи в групата на спонтанните аборти е 8.3%. В групата на спонтанните аборти се обособяват две подгрупи: подгрупа 1 - пациентки с високи плазмени нива на IL-10, с медиана на разпределението на концентрацията 11.55 pg/ml и подгрупа 2 - пациентки с ниски плазмени нива на IL-10, с медиана на разпределението на концентрацията 3.1 pg/ml. При отделен анализ на тези подгрупи, в подгрупа 1 се установява статистически значимо повишение на стойности на IL-10 спрямо всички останали анализирани групи, включително спрямо подгрупа 2 (небременни жени $p=0.001$, II-III л.м. $p=0.004$, VI-VII л.м. $p=0.006$, X л.м. $p=0.001$ и подгрупа 2 $p=0.0009$). Между стойностите на IL-10 в подгрупа 2 и останалите групи няма статистически значими разлики. Според литературните данни, често се наблюдава корелационна връзка между различни репродуктивни усложнения и променени серумни/плазмени нива на IL-10. Например, повишена концентрация на IL-10 се съобщава при спонтанен аборт [5], ендометриоза [6] и прееклампсия [7]. Също така, завишена секреция на IL-10 е установена при стимулация на периферни мононуклеарни клетки от бременни жени с поне три предходни спонтанни аборта [8]. Имайки предвид, че мононуклеарните клетки са един от основните компоненти на периферната кръв и включват левкоцити с висок секреторен потенциал, то е възможно те да имат принос за промяната на нивата на IL-10 в периферната кръв.

На базата на литературните данни и нашите резултати, открояването на проби с високи нива на IL-10 в групата на изследваните пациентки с неизяснена етиология на спонтанния аборт дават основание да се допусне, че е възможно присъствие на пациентки с недиагностицирани патологии. Бъдещото обвързване на нивата на IL-10 с конкретни репродуктивни дисфункции/патологии би дало възможност за провеждане

на диагностичен IL-10 скрининг при пациентки с висок риск, за подпомагане навременното определяне на диагнозата и предприемането на превантивно лечение.

4.1.2. Анализ на нивата на генна експресия на IL-10 в периферни кръвни мононуклеарни клетки

За да отговорим на въпроса дали клетки от децидуата или имунни клетки в кръвообращението са източник на IL-10 в кръвна плазма на бременни жени и при спонтанен аборт, е направен анализ на генната експресия на този цитокин в периферни мононуклеарни клетки.



Фигура 3. Нива на генна експресия на IL-10 в ПМК от небременни жени, бременни жени в II-III лунарен месец (л.м.), в VI-VII л.м., в X л.м. и жени, непосредствено след установяване на настъпил спонтанен аборт. Генната експресия на IL-10 е анализирана посредством Real Time PCR, като стойностите са нормализирани към нивата на експресия на β -actin. Графиката представя медианата на относителните нива на експресия на IL-10.

Генната експресия на IL-10 в ПМК е измерена чрез полимеразна верижна реакция в реално време (Real Time PCR). Стойностите на неговата експресия са нормализирани към стойностите на конститутивно експресирания цитоскелетен

протеин β -actin. Представената графика показва сравнение на генна експресия на IL-10 при бременни жени в II-III л.м., VI-VII л.м. и X л.м., жени, след установяване на спонтанен аборт и контролна група от небременни жени в репродуктивна възраст. Тези групи съответстват на групите, в които е изследвана плазмената концентрация на IL-10. Пациентките, при които са анализирани плазмените нива на IL-10 (Фиг. 1), не съвпадат с пациентките, при които е анализирана генната експресия на този фактор.

Анализът на нивата на генна експресия на IL-10 показва нехомогенно разпределение на този параметър в групите (Фиг. 3). Изключение прави групата VI-VII л.м., в която стойностите при различните пациентки не варират в много голям интервал. Важно е да се отбележи, че броят на пациентките в тази група е по-малък в сравнение с този в останалите групи и е възможно, ако бъдат прибавени нови проби, вариациите в стойностите на генна експресия на IL-10 да нарастнат. Подобно на плазмените нива на IL-10 в тази група бременни жени в VI-VII л.м. (Фиг. 1), хомогенността на стойностите на експресия може да се дължи на вече стабилизирания в този етап ход на бременността.

В останалите анализирани групи е установено наличие на пациентки както с много високи нива на експресия, така и с много ниски, без видима системност или статистически значими разлики между изследваните групи. За разлика от плазмените нива (Фиг. 1), най-високи стойности на генна експресия на IL-10 са измерени в групата на жени в края на бременността. В тази група високи нива на експресия на IL-10 се установява при 25% от пациентките.

Поради факта, че високи нива на експресия на IL-10 се наблюдават както при небременни жени, така и при част от бременните жени, тези резултати не биха могли да бъдат директно обвързани с бременността. Една от вероятните причини за наличието на такава вариабилност на генната експресия на IL-10 при контролите и при бременните жени, е наличието на недетектирани или недокументирани инфекции или алергии, които повлияват имунния отговор и водят до силното изместване на цитокиновия баланс в посока Th2 [9]. Съществува хипотетична възможност при изследване на по-голям брой пациентки в групите, да се обособят подгрупи с високи и ниски стойности на генна експресия на IL-10. Това би позволило обвързване на експресията на IL-10 с физиологичното състояние на пациентките, съответно установяване на връзки между генната експресия на IL-10 в ПМК и начина, по който протича бременността.

Получените резултати от анализа на генната експресия на IL-10 не могат да послужат за категорично заключение, поради липсата на статистически значими разлики и хетерогенността в групите. Съгласно получените резултати, изследването на плазмените нива на IL-10 (Фиг. 1) има по-висока аналитична стойност.

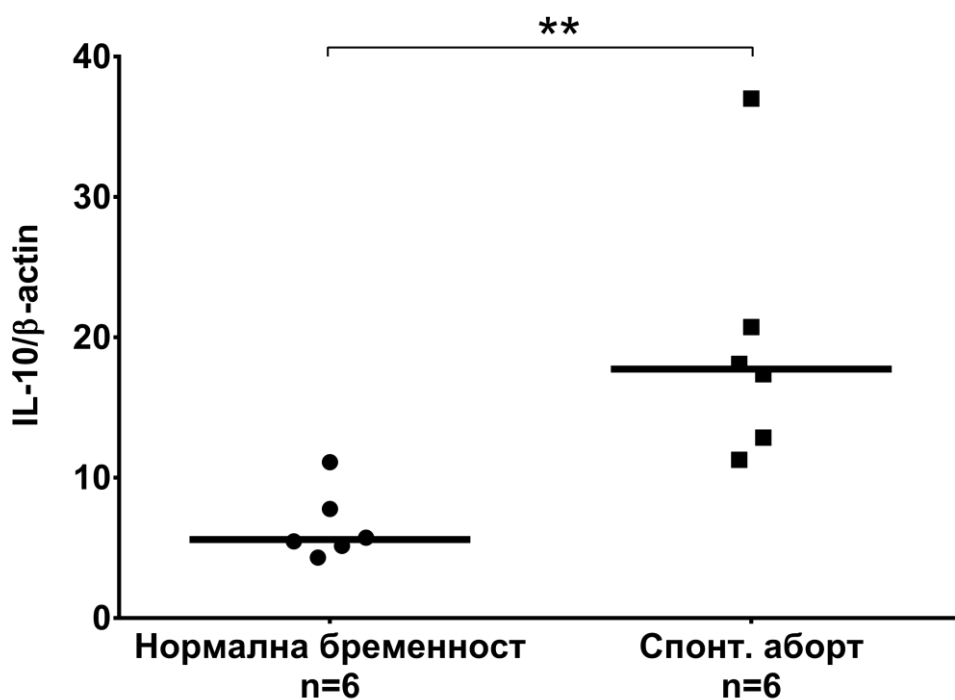
Периферната кръв има широко приложение в извършването на клинични анализи поради представителността на получените резултати за протичащи в организма процеси и също така, защото е леснодостъпен източник на аналитичен материал. Изследването на нивата на имуномодулиращия фактор IL-10 в два от компонентите на периферната кръв, кръвна плазма и периферни мононуклеарни клетки, има за цел да установи дали настъпват значими промени в изследваните кръвни компартименти и дали те могат да се използват като системен индикативен маркер, отразяващ рискови състояния свързани с бременността, които могат да доведат до спонтанен аборт. Резултатите от проведените до момента анализи показват, че при валидирането на IL-10 като потенциален предиктивен и/или диагностичен маркер за спонтанен аборт, изследването на неговите нива в кръвна плазма (Фиг. 1) биха могли имат по-висока аналитична стойност в сравнение с тази на генната експресия в ПМК (Фиг. 3), тъй като при някои от пациентките в групите концентрацията му е отчетливо завишена (от три до шест пъти), в сравнение с медианата на концентрацията на IL-10 в контролната група и групата II-III л.м. Също така, плазмената концентрация на IL-10 отразява цялостно нивата на този цитокин в периферната циркулация, тъй като източник на IL-10, освен периферните левкоцити, могат да бъдат и клетъчни популации в децидуата, докато изследването на генната експресия на IL-10 в ПМК предоставя информация само за определни периферни левкоцити. Значение има и фактът, че изследването на плазмените нива на факторите има предимството да преминава към анализ без допълнителна обработка на пробите, докато за изследване на генната експресия са необходими две допълнителни стъпки: изолиране на РНК от клетките и реакция на обратна транскрипция.

Анализът на генната експресия на IL-10 (Фиг. 3) в периферни мононуклеарни клетки има значение за изучаването на източника на този фактор в периферната циркулация, а именно дали това са децидуални клетъчни популации или са циркулиращи имунни клетки. Съответно, следващите изследвания са съсредоточени върху експресията на IL-10 майчино-феталната граница.

4.2. Експресия на IL-10 в децидуалната ниша

4.2.1. Измерване на нивата на генна експресия на IL-10 в децидуална тъкан от нормална бременност и спонтанен аборт

Повишените нива на IL-10 в кръвна плазма в някои случаи на спонтанен аборт могат да бъдат резултат от повишената му секреция в периферни левкоцити, децидуални клетъчни популации или и двете. С цел установяване на източника на IL-10, след като е проведен анализ на генната му експресия в ПМК (Фиг. 3), генната експресия на IL-10 е изследвана в децидуална тъкан от нормална бременност (елективен аборт) и спонтанен аборт.



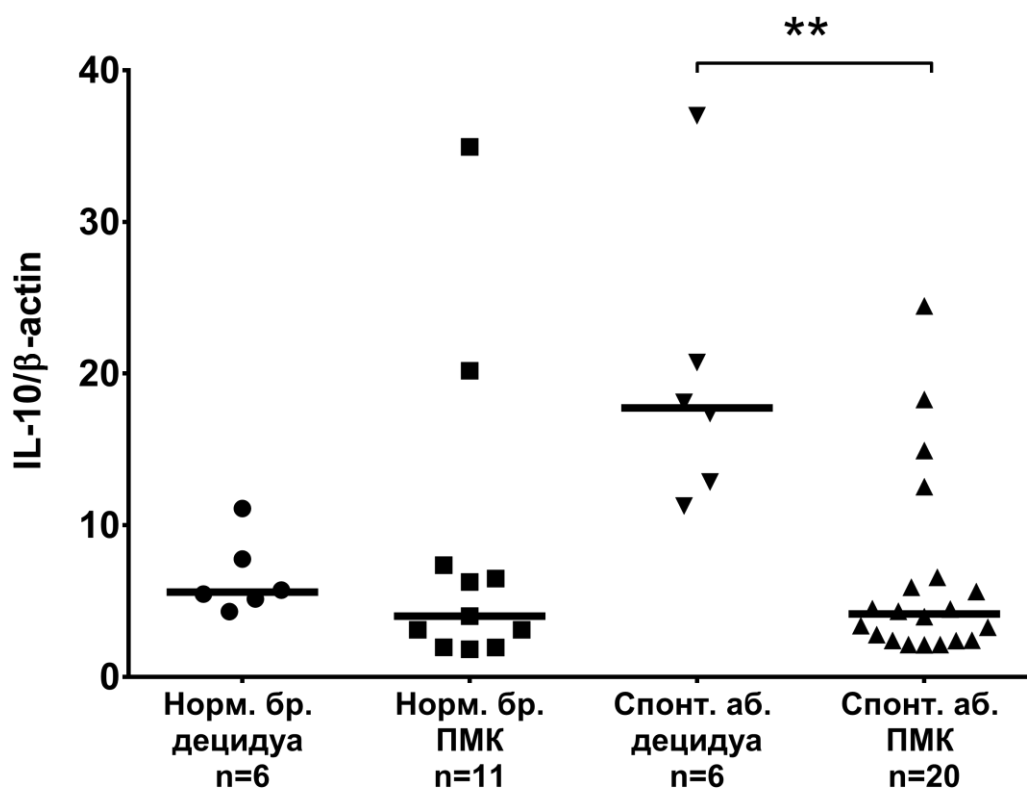
Фигура 4. Нива на генна експресия на IL-10 в децидуа от нормална бременност и спонтанен аборт. Генната експресия на IL-10 е анализирана посредством Real Time PCR. Нивата на експресия на IL-10 са нормализирани към нивата на експресия на β -actin. Графиката представя медианата на относителните нива на експресия на IL-10. ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

Нивата на генна експресия на IL-10 в децидуална тъкан от първи триместър от нормална бременност (елективен аборт) и спонтанен аборт са изследвани чрез Real Time PCR. Анализът показва отчетливи резултати (Фиг. 4). Нивата на експресия са статистически значимо по-високи в групата на спонтанните аборти ($p=0.0022$).

По време на бременността IL-10 участва в различни процеси отговорни за нормалното ѝ протичане, които включват поддържане на имунна толерантност към плода [10], регулация на растежа и ремоделирането на плацентата [11], контрол на диференциацията на трофобласта и неговата инвазия в децидуалната строма [12], а също така изпълнява и вазопротективна функция [13]. Всичко това предполага строга регулация на неговите нива в периферната циркулация и локално в децидуата. Високите нива на IL-10, както в кръвна плазма (Фиг. 1), така и локално (Фиг. 4) на границата майка-фетус (децидуа), биха могли да са свързани с определена патология, която води до загуба на бременността или да са повишени в резултат на настъпил аборт. Едно от възможните обяснения за неочаквано високите нива на експресия на IL-10 при спонтанен аборт е участието му в компенсаторни механизми, целящи да овладеят противоположния за бременността Th1-имунен отговор [14], чиято активация се наблюдава при спонтанна или повтаряща се загуба на бременността [15]. Важно е да се отбележи, че проведенният по този начин анализ на генната експресия на IL-10 в децидуална тъкан не позволява установяването на клетъчните популации, при които неговата експресия се променя.

4.2.2. Сравнителен анализ на нивата на генна експресия на IL-10 в децидуална тъкан и периферни мононуклеарни клетки

За да можем да отговорим на въпроса дали по време на бременността и при спонтанен аборт източник на IL-10 в кръвната плазма са периферните имунни клетки или децидуални клетъчни популации, е направено сравнение на резултатите от анализа на генна експресия в периферни левкоцити в група първи триместър и спонтанен аборт съответно с децидуа от нормална бременност и аборт.



Фигура 5. Сравнителен анализ на нивата на генна експресия на IL-10 в децидуа и ПМК от първи триместър на нормална бременност и спонтанен аборт. Генната експресия на IL-10 е анализирана посредством Real Time PCR. Стойностите са нормализирани към нивата на експресия на β-actin. Графиката представя медианата на относителните нива на експресия на IL-10.

** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

Пробите използвани в двата вида изследвания (на децидуална тъкан и ПМК) не са от едни и същи пациенти.

Нивата на IL-10 РНК в децидуална тъкан (Фиг. 4) и ПМК от пациентки в първи триместър на нормално протичаща бременност (Фиг. 3) задават границите на експресия, спрямо които се определят отклоненията, настъпващи при спонтанен аборт.

Анализът показва, че независимо от това дали бременността протича без усложнения или приключва със спонтанен аборт, експресията на IL-10 е по-висока локално в децидуата, отколкото в периферията (Фиг. 5). При нормална бременност няма статистически значими разлики, което не ни позволява да направим заключение кои клетъчни популации, периферни или ендометриални, са негов основен източник в кръвната плазма по време на бременността. При спонтанен аборт обаче, нивата на експресия са четирикратно и статистически значимо по-високи в децидуа, в сравнение с периферни моноклеарни клетки. Тези резултати дават основание да се предположи, че възможен източник на установените високи плазмени нива на IL-10 при някои случаи на спонтанен аборт са децидуални клетъчни популации. Съответно, анализът на този маркер в кръвна плазма би могъл да послужи като индикатор за протичащи в децидуата противоположни за бременността процеси и риск от спонтанен аборт.

Ако допуснем, че при спонтанен аборт негов източник са децидуални клетъчни популации, то би следвало да очакваме директно отражение на повишаването на децидуалните нива на IL-10 в периферната циркулация. Но, въпреки че всички проби децидуална тъкан от спонтанен аборт показват по-висока експресия на IL-10 в сравнение с пробите от нормална бременност (Фиг. 4), плазмените му нива са завишени само в някои от случаите в групата на спонтанните аборти (Фиг. 1). Възможно обяснение за това наблюдение са разликите в етиологията и/или момента, в който е установен настъпилият спонтанен аборт. Точна информация за причината и времето на настъпване на спонтанния аборт при различните пациентки нямаме, но бихме могли да предположим, че открояващите се случаи са изследвани в клиничната лаборатория в момент от настъпването на спонтанния аборт различен от този на останалите жени в групата.

Друго възможно обяснение за този резултат е, че за да се достигнат завишени нива на IL-10 в кръвната плазма по време на спонтанен аборт при открояващите се случаи, освен децидуата, има и друг негов източник, какъвто могат да бъдат ПМК [8]. При 20% от пробите ПМК (4 от 20 проби) от спонтанен аборт, нивата на експресия на IL-10 са близки до тези при децидуалните проби (Фиг. 5) и е възможно да се допусне, че както периферните левкоцити, така и клетки в децидуата допринасят за повишаването на неговите нива в кръвната циркулация (Фиг. 1) при спонтанно прекъсване на бременността. В 80% от пробите ПМК (16 от 20 проби) от спонтанен аборт, генната експресия на IL-10 е пет пъти по-ниска от медианата на експресия в децидуа от спонтанен аборт (Фиг. 5), което показва, че при спонтанен аборт се

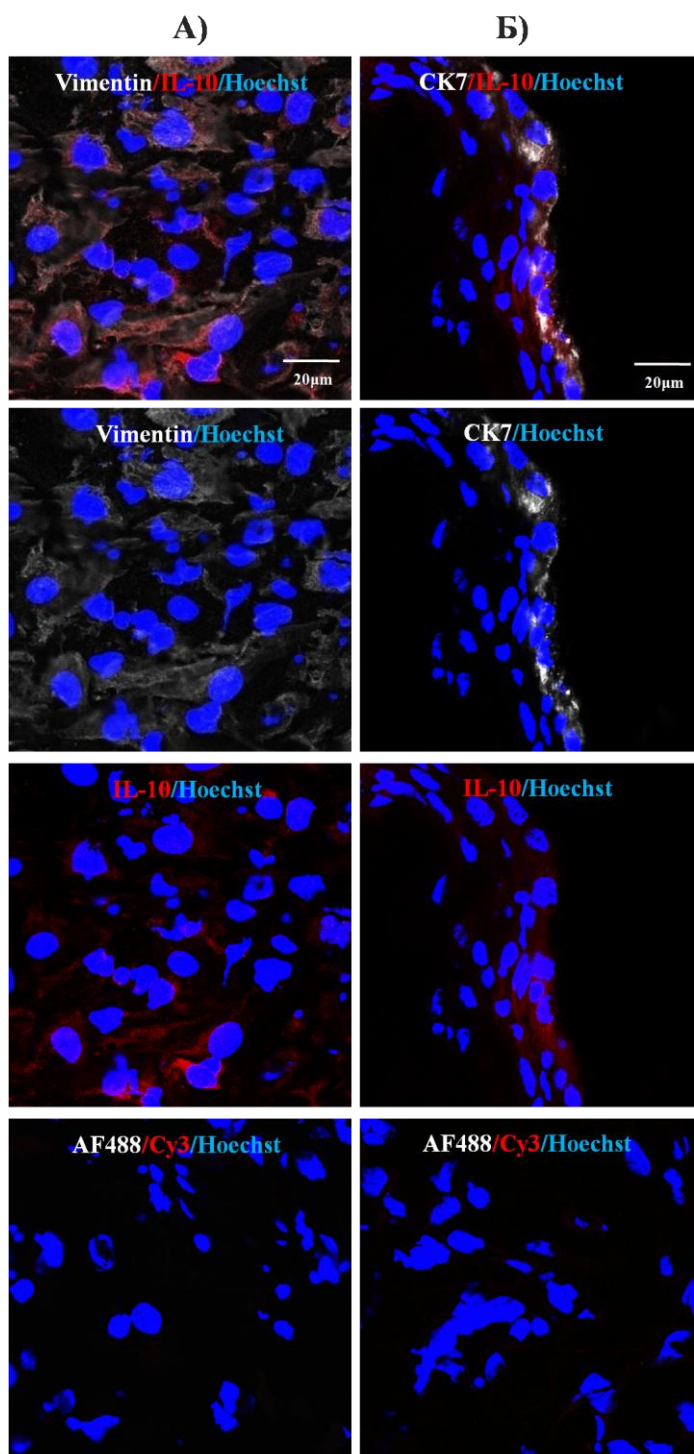
наблюдава локално повишение на нивата на IL-10, което не е задължително да има системен ефект. Настъпването на спонтанен аборт е свързано с индуциране на възпаление в децидуата [16] и вероятно повишаването на нивата на IL-10 е един от механизмите за овладяване на предизвиканото от спонтанния аборт възпаление [4].

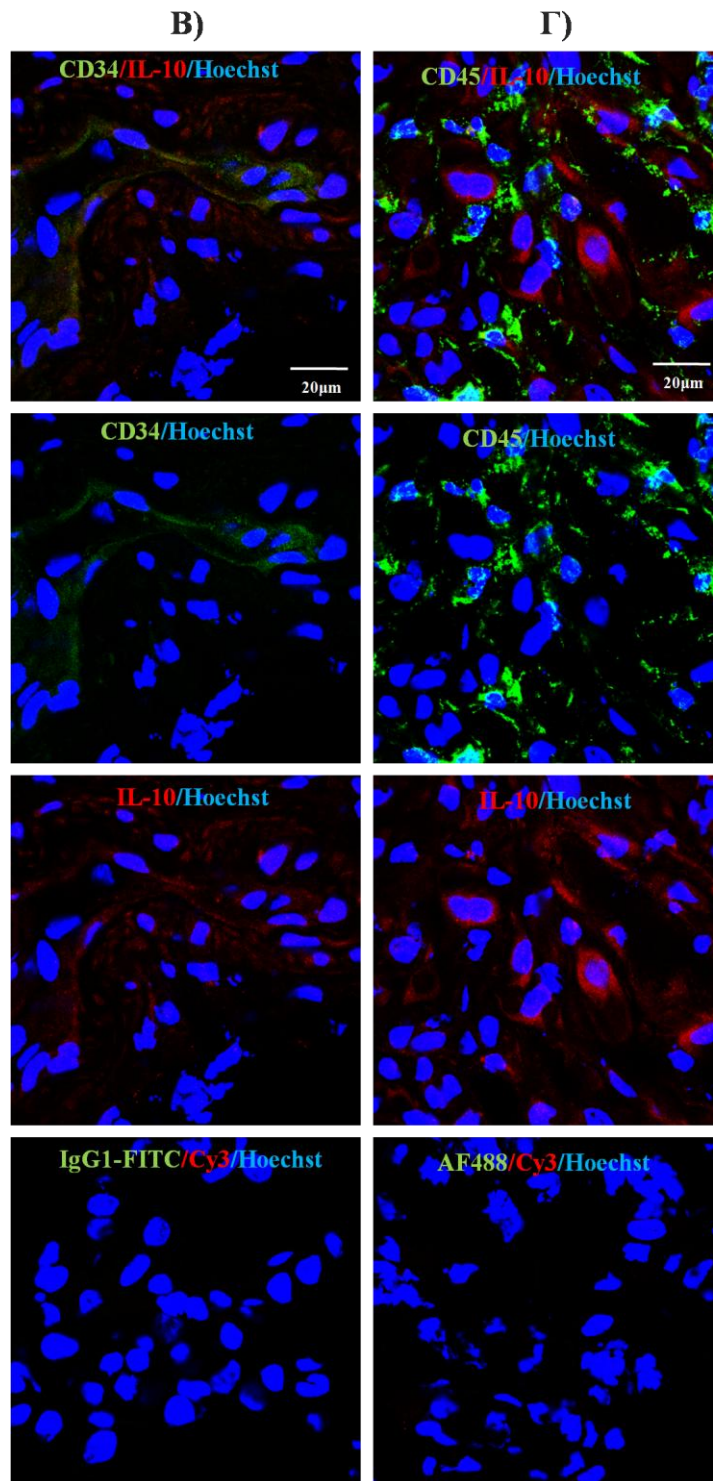
4.2.3. Имунофлуоресцентен анализ на експресията на IL-10 в децидуална тъкан от първи триместър на бременността

В децидуата се осъществява контактът между майчини и фетални тъкани, и е основно поле на действие на имунната модулацията по време на бременността. Тъй като анализът на генната експресия на IL-10 не дава информация за конкретния му източник, е проследена белтъчната експресия на тази имуномодулаторна молекула в децидуална тъкан. Децидуалната тъкан е изградена от специализирани децидуални стромални клетки, от клетки на инвазията в нея трофобласт, кръвоносни съдове и различни левкоцитни субпопулации, затова анализът на експресията на IL-10 чрез флуоресцентна микроскопия е съсредоточен върху тези клетъчни популации.

Изследваните клетъчни популации са идентифицирани със съответни клетъчни маркери: децидуални стромални клетки - Vimentin, трофобласт - Cytokeratin 7 (CK7), васкуларен ендотел - CD34 и левкоцити - CD45. Подборът на тези молекулни маркери е осъществен на база на наличните в литературата данни. Виментинът (Vimentin) е интермедиерен филамент тип III, който се експресира от стромалните клетки и се прилага широко за тяхното определяне [17]. Цитокератин 7 (CK7) също принадлежи към интермедиерните филаменти. Освен от трофобласта, той се експресира и от жлезистия епител. Въпреки, че наличието на CK7 не се ограничава само до трофобластните клетки, високият интензитет на неговата експресия при тях, съчетан с липсата на експресия на виментин, го правят подходящ маркер за трофобластни клетки [18]. CD34 е трансмембранен гликопротеин, имащ функция на адхезионна молекула и се експресира от хемопоеичните стволови клетки. Ендотелните и хемопоеичните клетки произлизат от общ прекурсор - хемангиобласта по време на онтогенезата [19]. Този факт обяснява експресията на CD34 и от двата вида клетки. CD34 не е ексклузивен маркер за васкуларен ендотел, но в комбинация с други маркери, неговото приложение като такъв е допустимо и широко използвано [20]. В нашите изследвания, при имунофлуоресцентния анализ на децидуална тъкан, морфологията на структурите, които показват експресия на CD34 (Фиг. 6B), ни дава основание да приемем, че това са

кръвоносни съдове, а белязаните клетки – ендотелни. CD45, наречен още общ левкоцитен антиген (leukocyte common antigen, LCA), е мембранен протеин с тирозин-фосфатазна активност, който се експресира от всички зрели имунни клетки [21].





Фигура 6. Имунофлуоресцентен анализ на клетъчни популации в човешка децидуа, които експресират IL-10. Криосрези на проби човешка децидуа са имунологично белязани с антители срещу IL-10 (червен) и А) Vimentin (бял) Б) CK7 (бял) В) CD34 (зелен) Г) CD45 (зелен). Представителни образи от анализа на децидуа от елективен ($n=3$) и спонтанен ($n=3$) аборт до 12-та гестационна седмица, направени чрез конфокална микроскопия. Ядрата на клетките са белязани с Hoechst 33258. Маркер 20 μm

Резултатите от имунофлуоресцентния анализ показват, че няма разлики между изследваните за експресия на IL-10 клетъчни популации, а именно децидуални стромални клетки (Vimentin-позитивни), трофобласт (Cytokeratin 7-позитивен), васкуларен ендотел (CD34-позитивен) и имунни клетки (CD45-позитивни) при елективните и спонтанните аборти. Това наблюдение е в противовес с изследвания на други групи, които показват намален брой експресиращи IL-10 клетки в децидуална тъкан от спонтанни аборти [22].

Установена е експресия на IL-10 във всички изброени клетъчни популации (Фиг. 6А, Б, В, Г). IL-10 позитивните левкоцити се срещат сравнително рядко в изследваните проби (Фиг. 6Г) в сравнение с неимунните клетъчни типове, които експресират този имуномодуляторен цитокин.

Получените резултати, които показват експресия на IL-10 в децидуални стромални клетки, трофобласт, ендотел и имунни клетки (Фиг. 6А, Б, В, Г) ни дават основание да предположим, че както при нормална бременност, така и при спонтанен аборт, тези децидуални клетъчни популации са източник на IL-10. Предвид важната роля на IL-10 на майчино-феталната граница, експресия от различни клетъчни популации обезпечава поддържането на оптималната му концентрация. Количествен анализ на белтъчната експресия на IL-10 би позволил установяване на конкретни разлики в неговата експресия от клетъчните източници при нормална бременност и спонтанен аборт.

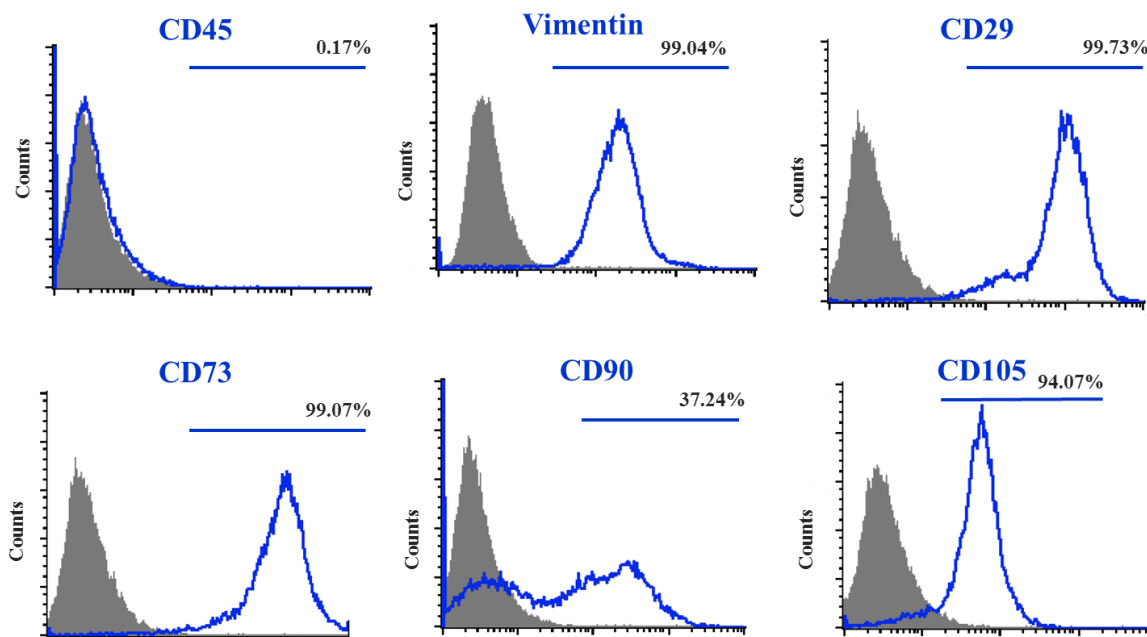
Важно е да се отбележи, че направеният имунофлуоресцентен анализ цели визуализиране на белтъчната експресия в децидуалните клетъчни субтипове, а именно кои децидуални клетки са източници на IL-10. Поради неколичествения характер на имунофлуоресцентния анализ, не бихме могли да направим директна съпоставка с резултатите от изследването на генната експресия на IL-10 в децидуа. Предимството на изследването на генната експресия в тъканта е възможността за количествена оценка на нивата на IL-10, докато имунофлуоресцентният анализ представя разпределението му в отделните клетъчни популации.

След определяне на експресията на IL-10 в периферната циркулация и локално в децидуата по време на бременност и при спонтанен аборт, изследванията се насочват към промените в нивата на IL-10 при подготовката на ендометриума за имплантация на ембриона. Експерименталният модел, който е използван в тези изследвания, са подложени на *in vitro* децидуализация стромални клетки от човешка децидуа от първи триместър на бременността.

4.3. Експресия на IL-10 при децидуализация

4.3.1. Фенотипна характеристика на стромални клетки, изолирани от децидуална тъкан от спонтанен аборт

Изолираните от всяка проба децидуална тъкан клетки са подложени на култивиране в *in vitro* условия, което позволява установяване на първични, след пасажирание и на вторични клетъчни култури децидуални стромални клетки (ДСК). В изследванията са използвани вторични клетъчни култури, обозначени като клетъчни линии със съответни номера с цел нагледно представяне на резултатите. За доказване на чистотата на използваните в изследванията култури е направено фенотипно характеризиране.



Фигура 7. Фенотипна характеристика на децидуални стромални клетки от спонтанен аборт. Експресията на молекулни маркери от децидуални стромални клетки, изолирани от човешка децидуална тъкан от спонтанен аборт в първи триместър на бременността, е анализирана чрез проточна цитометрия (FACS). Хистограмите са представителни за резултатите от анализа на ДСК, изолирани от 7 проби децидуална тъкан. Експресията на анализирани маркери е представена в синьо, докато контролните оцветявания са представени в сиво.

Фенотипна характеристика на децидуалните стромални клетки е направена на всички 7 линии спонтанен аборт, които в последствие са използвани за *in vitro* децидуализация. Направена е характеристика само на стромалните клетки, изолирани от

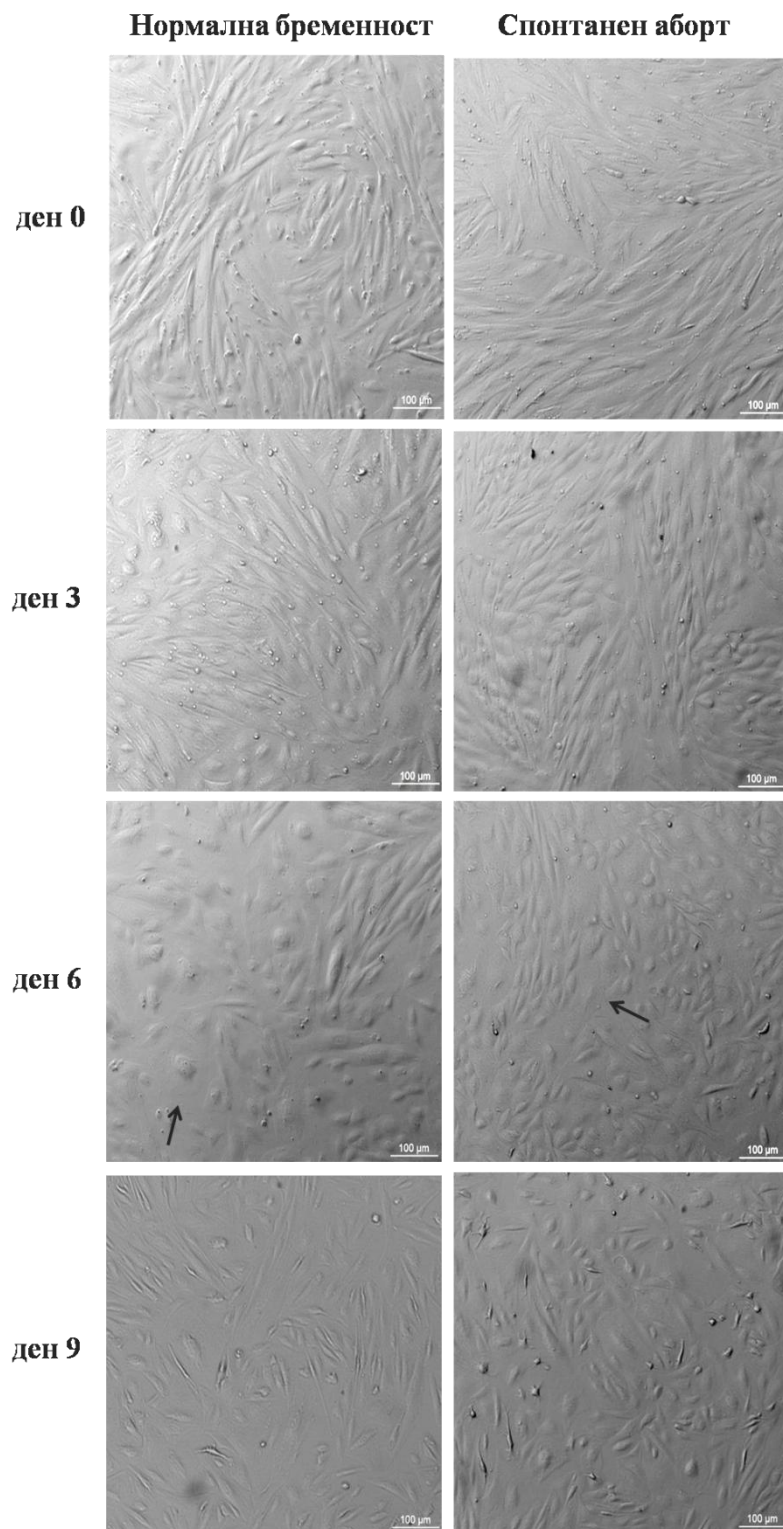
проби децидуа от спонтанен аборт, тъй като фенотипна характеристика на ДСК от елективен аборт е предварително осъществена от други членове на екипа.

Децидуалните стромални клетки имат мезенхимен произход [23] и експресират молекулните маркери, характерни за този вид клетки. Панелът от маркери, който е приложен при фенотипна характеристика на ДСК, включва Vimentin, CD29 (β -интегрин), CD73 (екто-5'-нуклеотидаза), CD90 (силно гликозилиран мембранен протеин, с вероятна функция при взаимодействието на клетките с екстрацелуларния матрикс), CD105 (или ендоглин, той е част от структурата на рецептора за TGF- β), както и липса на експресия на маркера за имунни клетки CD45 [24]. Анализираните клетъчни линии не експресират CD45 и показват хомогенен профил на експресия на четири от останалите пет маркера Vimentin, CD29, CD73 и CD105 (Фиг. 7). Изключение прави CD90, при който е установена хетерогенност на експресията, което се наблюдава и при някои линии ДСК, изолирани от тъкан от нормална бременност. Вероятна причина за намалената експресия на CD90 при някои от клетките в изследваните линии е различният стадий на диференциация, в който те се намират [25].

Резултатите от анализа на експресията на CD45, Vimentin, CD29, CD73, CD90 и CD105 в стромални клетки от децидуална тъкан от спонтанен аборт съвпадат с тези, установени при стромални клетки от нормална бременност. На база на тези данни можем да си позволим да заключим, че линиите, които са използвани в последвалите експерименти, са съставени от децидуални стромални клетки.

4.3.2. Децидуализация *in vitro* на стромални клетки от човешка децидуа от нормална бременност и спонтанен аборт

Децидуализацията на ендометриума започва след овулацията с покачващите се нива на прогестерон и след средата на лутеалната фаза в клетките вече са настъпили значими морфологични и функционални изменения [26]. В *in vitro* условия, за осъществяване на децидуализация на стромални клетки, са установени няколко различни протокола, с основни компоненти β -естрадиол, цАМФ и прогестерон в различни комбинации, както и с различна продължителност на третирането. Активирането на цАМФ-включващи сигнални пътища, съвместно с прогестероновата сигнализация, допринася за ефективното и по-бързо протичане на процеса [27].



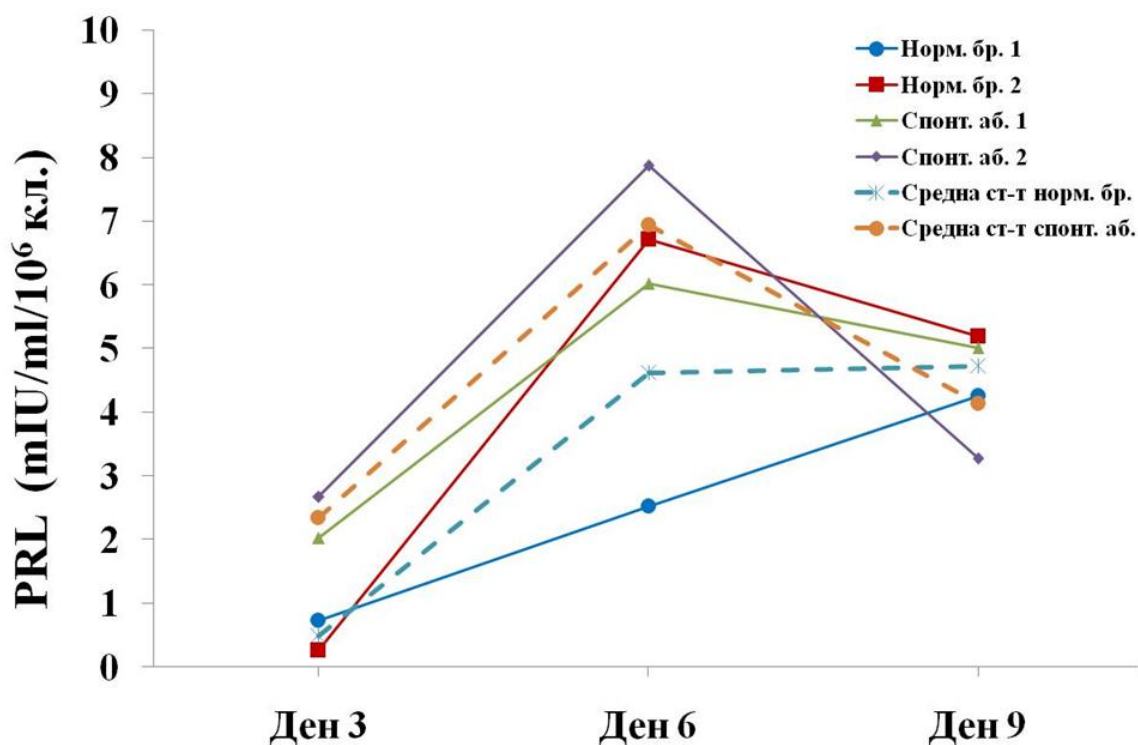
Фигура 8. Децидуализация на стромални клетки от първи триместър човешка децидуа от елективен (нормална бременност) и спонтанен аборт. Клетките от двата вида линии са подложени на *in vitro* децидуализация в продължение на 9 дни. Образите са заснети на всеки трети ден от децидуализацията. Представителни образи от децидуализацията на стромални клетки от децидуа от елективен ($n=8$) и спонтанен ($n=7$) аборт. Сивите стрелки индикират характерната за децидуализираните стромални клетки морфологична трансформация. Маркер 100 μm

За индуциране на децидуализация на стромалните клетки, изолирани от децидуални проби от нормална бременност (елективен аборт) и спонтанен аборт, те са третирани с 1 μ M медорксопрогестерон 17-ацетат (МПА), 0.5mM 8-бромоаденозин 3'5'-цикличен монофосфат (8-br-cAMP, цАМФ) и 10nM 17 β -естрадиол (E2) в продължение на девет дни. Средата на клетките се подменя и съответно факторите се добавят на всеки 72 часа (Схема 1, Материали и методи).

Още на третия ден от третирането, в клетките започват да настъпват характерните за децидуализацията морфологични промени (Фиг. 8, ден 3), а на шести ден е установена цялостна структурна диференциация на клетките (Фиг. 8, ден 6, сиви стрелки), контрастираща с удължената фибробластоподобна морфология на клетките преди началото на третирането (Фиг. 8, ден 0). На девети ден от децидуализацията в културите започват да се наблюдават отпадащи клетки, но преобладаващата част от клетките запазва добри морфологични характеристики (Фиг. 8, ден 9).

Резултатите от наблюдението на подложените на децидуализация 8 линии ДСК, получени от нормална бременност и 7 линии от спонтанен аборт показва, че проследявайки морфологичните промени като един от признаците за децидуализация, бихме могли да заключим, че в *in vitro* условия и двата вида култури отговарят по сходен, дори еднакъв начин на третирането.

Активацията на гена за пролактин е един от най-широко прилаганите маркери за настъпила диференциация на ендометриалните стромални клетки в специализирани децидуални стромални клетки [28]. За да бъде установено дали сходно протичащите морфологични промени (Фиг. 8) при децидуализация на стромални клетки от нормална бременност и спонтанен аборт отговарят на функционалните изменения в тези клетки, е направен анализ на концентрацията на PRL в културалната среда на клетките посредством електрохемилюминесценция (Фиг. 9). Културална среда от две линии нормална бременност и шест линии спонтанен аборт е анализирана на ден трети, шести и девети от началото на децидуализацията. Двете линии от нормална бременност са анализирани поотделно, докато тези от спонтанен аборт са разделени на две групи от по три проби, съдържащи равни обеми културалната среда на всяка от линиите в групата. Това разпределение на клетъчните култури от спонтанен аборт в две групи е провокирано от резултатите, получени от анализа на секретията на IL-10 в хода на децидуализация, които ще бъдат описани по-късно в изложението.



Фигура 9. Анализ на концентрацията на пролактин в културална среда от стромални клетки при децидуализация. Концентрацията на пролактин (PRL) (mIU/ml/10⁶ клетки) в културалната среда от две линии нормална бременност и две групи по три линии спонтанни аборти е анализирана чрез електрохемилюминесценция на трети, шести и девети ден от началото на децидуализацията. Всички анализирани линии имат детектируеми нива на пролактин в културалната среда. Графиката представя концентрацията на PRL в културалната среда на всяка от анализираните проби, както и средната стойност на концентрацията на пролактин във всяка група клетъчни линии (нормална бременност или спонтанен аборт) през всеки от анализираните дни. Всяка линия, група от линии или средна стойност е представена в различен цвят.

Резултатите от измерването на концентрацията на пролактин в културалната среда в хода на децидуализация показват, че стромалните клетки от децидуа от спонтанен аборт отговарят на третирането подобно на тези от нормална бременност. Нивата на секреция на пролактин при ДСК от спонтанен аборт са съизмерими тези при ДСК от нормална бременност. Най-високи нива на пролактин се наблюдават при едната група клетки от спонтанен аборт (Фиг. 9, спонт. аб. 2), а най-ниски, при едната от двете линии нормална бременност (Фиг. 9, норм. бр. 1). Средната стойност на концентрацията на пролактин в културалната среда (Фиг. 9, пунктирания линии) е по-висока при ДСК от спонтанен аборт, в сравнение с ДСК от нормална бременност, но

малкият брой проби, както и групирането на лините спонтанен аборт, не позволяват извършването на статистически анализ на данните.

Получените резултати от изследването на концентрацията на пролактин при децидуализация имат важна информативна стойност, тъй като показват способността на клетките, произхождащи от децидуа от спонтанен аборт, да се децидуализират. Това би могло да отговаря на тяхната запазена функционалност. Направеният преглед на литературата не показва наличие на докладвани данни за ефекта на *in vitro* децидуализация върху секрецията на пролактин от стромални клетки, изолирани от децидуа от спонтанен аборт. При децидуализация на стромални клетки изолирани от ендометриум (в небременно състояние) на жени с повтарящи се спонтанни аборти и жени без репродуктивни усложнения, Salker и екип установяват по-ниски нива на пролактин, секретирани от стромалните клетки от жени с повтарящи се спонтанни аборти [29]. Авторите обвързват това с неправилно протичаща децидуализация в тези клетки. Паралелно с тези резултати, Salker и екип установяват, изследвайки PROK-1 (prokineticin-1) като маркер за рецептивност на ендометриума, че при тези пациенти продължителността на имплантационния прозорец е по-голяма, което води до нарушена селективност на ендометриума, съответно позволява имплантацията на абнормално развити ембриони, което в последствие води до спонтанен аборт. Въпреки по-ниската секреция на пролактин при децидуализация, ендометриалните клетки от пациенти с повтарящи се спонтанни аборти имат многократно завишени нива на генна експресия на пролактин при третиране с ЧХГ, в сравнение с клетките от фертилни жени, което потвърждава хипотезата, че при пациенти с повтарящи се спонтанни аборти, една от вероятните причини за това е неправилно протичаща децидуализация на ендометриума, което води до абнормално взаимодействие с имплантацията се ембрион.

Имайки предвид горепосоченото изследване, нашите резултати, показващи съизмерими нива на секреция на пролактин между клетките от спонтанен аборт и нормална бременност (Фиг. 9), ни позволяват да предположим, че клетките от спонтанен аборт запазват своята функционалност, ако като критерий се използва тяхната способност да се децидуализират.

Важно е да се отбележи, че не разполагаме с данни за причините за спонтанния аборт, нито за кариотипа на отпадналите ембриони на пациентите, които са анализирани. Статистиката сочи, че при 45-70% от спонтанните аборти причината е

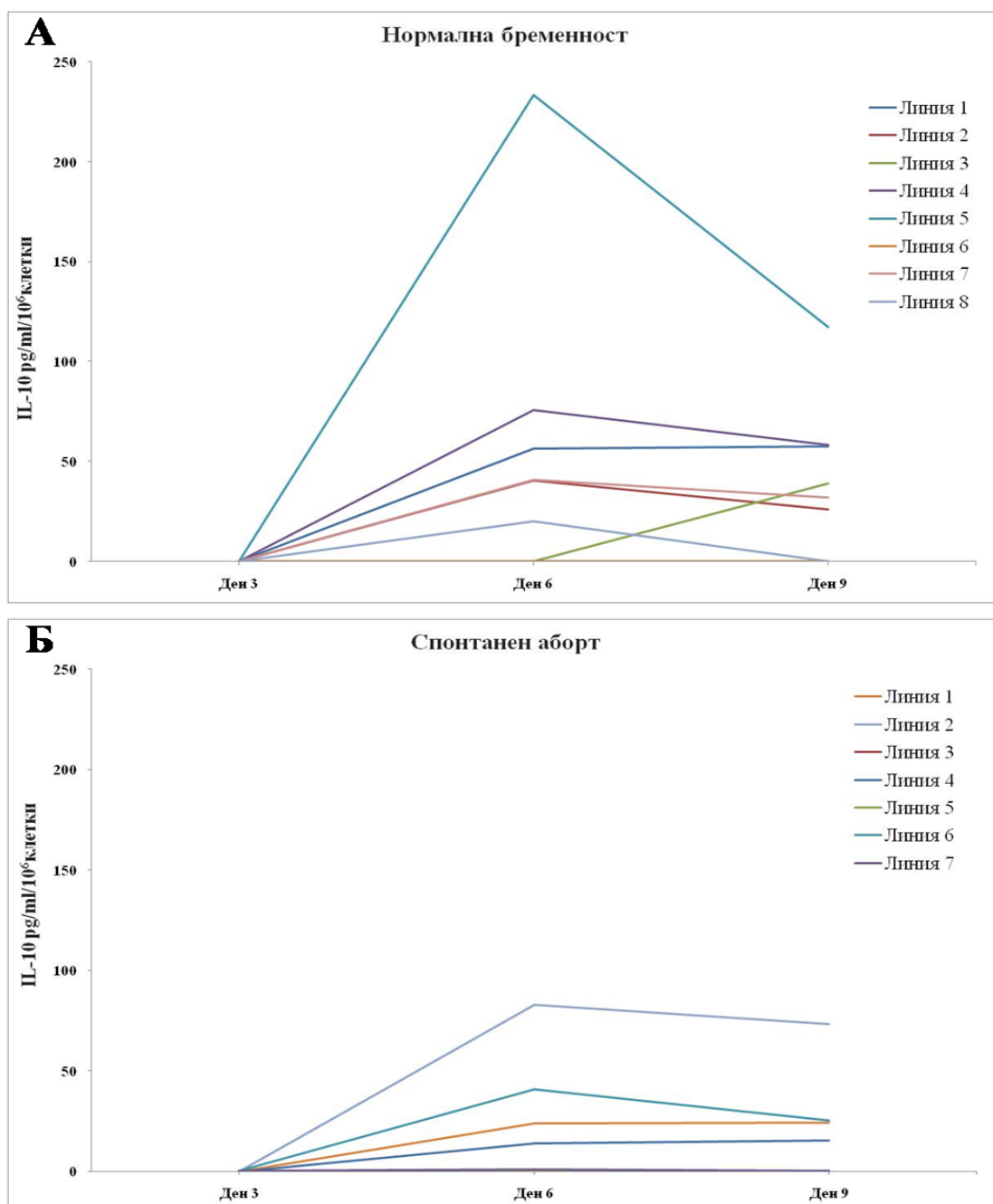
анеуплоиден ембрион [30–32], докато за останалите случаи причините са различни, като сред тях е и абнормално развит ендометриум [33].

Въз основа на установените съизмерими нива на пролактин при децидуализация на ДСК от спонтанен аборт, сравнени със ДСК от нормална бременност, бихме могли да направим заключение, че те показват правилно протекла *in vitro* децидуализация при двата вида децидуални стромални клетки.

4.3.3. Секреция на IL-10 при *in vitro* децидуализация на стромални клетки от човешка децидуа от нормална бременност и спонтанен аборт

Децидуализацията на ендометриума е от важно значение за имплантацията на ембриона и образуването на плацентата, които от своя страна са задължителни за настъпването и нормалното протичане на бременността. Анализът на нивата на секреция на пролактин (Фиг. 9) при *in vitro* децидуализация на стромални клетки от нормална бременност и спонтанен аборт показват, че и двата вида клетки отговарят на стимулите за децидуализация. Фактът, че ДСК от спонтанен аборт секретират съизмерими количества пролактин с тези при ДСК от нормална бременност, би могъл да означава, че те имат запазена функционалност.

След показаните резултати на успешна децидуализация при стромалните клетки, с цел обвързване на децидуализацията с промени в секрецията на IL-10 и установяване на разлики в зависимост от произхода на ДСК (нормална бременност или спонтанен аборт), нивата на IL-10 в културалната среда от децидуализираните клетки е анализирана чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA).



Фигура 10. Анализ на секрецията на IL-10 при децидуализация на стромални клетки от първи триместър човешка децидуа от елективен (нормална бременност) и спонтанен аборт. А) Концентрация на IL-10 при децидуализация на ДСК от нормална бременност. Б) Концентрация на IL-10 при децидуализация на ДСК от спонтанен аборт. Всяка линия е представена в различен цвят. Точките на измерване (ден 3, 6, 9) са свързани с линии, но междинни измервания на концентрацията не са правени. Графиките представят концентрацията на IL-10 (pg/ml/10⁶ клетки) на всяка отделна линия.

Клетките от 8 линии нормална бременност и 7 линии спонтанен аборт са подложени на *in vitro* децидуализация в продължение на 9 дни. Анализът на

концентрацията на IL-10 (Фиг. 10) е направен посредством ELISA на всеки трети ден от третирането с факторите на децидуализация (МПА, цАМФ и E2).

Резултатите от анализа показват, че този имуномодулаторен цитокин е един от факторите, който отделят стромалните клетки единствено при децидуализация, тъй като при нетретирани клетки той не е детектиран в културалната среда. Също така, за индукция на неговата секреция са необходими повече от три дни третиране (Фиг. 10). Както при ДСК от нормална бременност, така и при тези от спонтанен аборт, пикът на секреция на IL-10 е установен на шести ден от началото на третирането (Фиг. 10). В човешкия организъм децидуализацията протича независимо от присъствието на ембрион и започва след овулацията, индуцирана от активация на цАМФ-сигнални пътища и поддържана от прогестерона [26]. Ако допуснем, че приложеният от нас модел на *in vitro* децидуализация наподобява хода на децидуализация в организма, то пикът на секреция на IL-10 на шести ден и намаляващата му концентрация на девети ден (Фиг. 10) биха могли да отговарят на началото и края на периода на рецептивност на ендометриума, а именно имплантационния прозорец [34]. Една от анализирани осем линии нормална бременност показва забавена индукция на секрецията на пролактин (Фиг. 10А, Линия 3), като при тези клетки IL-10 е детектиран само на девети ден. Това би могло да отговаря на изместване на имплантационния прозорец при тази проба. Тези наблюдения ни дават основание да предположим, че IL-10 би могъл да бъде разглеждан като потенциален маркер за рецептивност на ендометриума и да бъде приложен в бъдещи изследвания за определяне на тази характеристика на маточната лигавица.

Необходимо е да се подчертае, че е възможно експресията на IL-10 от децидуални стромални клетки *in vivo* да не съвпада с тази в *in vitro* условия. Затова трябва да бъдат проведени допълнителни изследвания на децидуалните нива на IL-10 и в други експериментални постановки. Също така е необходимо да бъде изяснено значението на IL-10 за изграждането на рецептивен ендометриум. Имплантацията на ембриона е свързана с възпалителна реакция [35] и механично предизвикване на инфламаторен процес в ендометриума може да има положителен ефект при жени с неизяснен инфертилитет [36]. Въпреки това, прекомерната активация на Th1-имунния отговор в ендометриума е противоположна за имплантацията на ембриона [37]. Една от вероятните роли на IL-10 в периода на рецептивност на ендометриума е участие в регулацията на Th1-имунния отговор. Децидуалните стромални клетки имат показана имуномодулаторна функция [24,38] и секрецията на IL-10 може да бъде един от

механизмите, чрез които те осъществяват тази имунорегулация. Васкуларизацията на ендометриума през лутеалната фаза на менструалния цикъл корелира с неговата рецептивност [33]. Предвид показаната вазопротективна функция на IL-10 [13], това е друга възможна роля на този имуномодулаторен цитокин по време на изграждането на рецептивен ендометриум.

Анализът на секрецията на IL-10 при децидуализация показва липса на секреция при три от анализирани седем линии спонтанен аборт (Фиг. 10Б), докато това се наблюдава само при една от линиите нормална бременност (Фиг. 10А). Въпреки липсата на статистически значими разлики, нивата на секретирани от ДСК от нормална бременност IL-10 са по-високи от тези при ДСК от спонтанен аборт, както на шести, така и на девети ден. На шести ден медианата на концентрация на IL-10 при клетките от нормална бременност е 40.67 pg/ml/10⁶клетки, докато при спонтанен аборт е 13.93 pg/ml/10⁶клетки. На девети ден медианите на концентрация са съответно 35.62 pg/ml/10⁶клетки и 15.43 pg/ml/10⁶клетки.

Установените съизмерими нива на секреция на пролактин при децидуализация (Фиг. 9) и разлики в нивата на IL-10 при клетките от нормална бременност и спонтанен аборт (Фиг. 10) ни позволяват да предположим, че IL-10 специфично определя функционалността на ендометриума. Липса на секреция на IL-10 е установена при повече линии спонтанен аборт (три линии), отколкото нормална бременност (една линия), като във втория случай е важно да се отбележи, че тъй като бременността е прекъсната елективно, не бихме могли да знаем дали тя би протекла нормално, ако беше продължила.

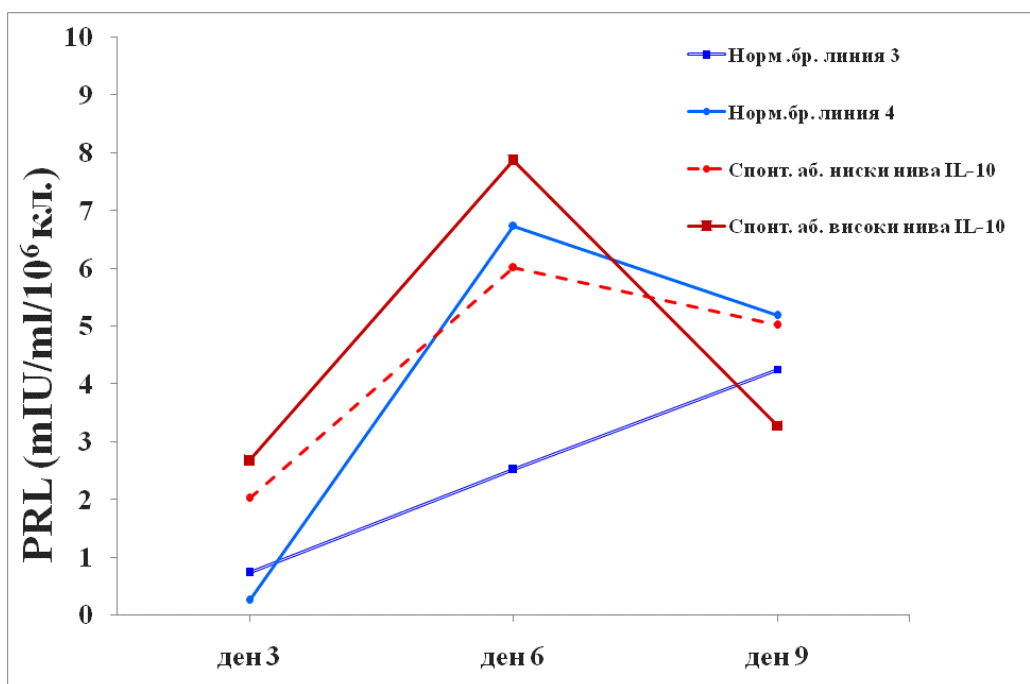
Освен рецептивност, ендометриумът трябва да притежава и друга важна характеристика – селективност. Установено е, че един от факторите, чиято секреция от децидуализирани ендометриални стромални клетки се понижава при контакт с ембриони с недобри морфологични характеристики е IL-10 [39], което предполага значение на IL-10 за селективността на ендометриума. При три от случаите на спонтанен аборт, което представлява 43% от изследваните проби, липсва секреция на IL-10 (Фиг. 10Б). Имайки предвид факта, че 45-70% от случаите на спонтанен аборт се дължат на ембриони с абнормален кариотип, то липсата на секреция на IL-10 при някои линии ДСК от спонтанен аборт може да се дължи на контакт с анеуплоиден ембрион, който е променил трайно експресията на този цитокин и съответно ДСК не го синтезират при последващ стимул, какъвто са факторите на децидуализация.

От друга страна, липсата на секреция на IL-10 при някои от случаите на спонтанен аборт може да означава, че още преди контакта с ембрион тези клетки не са имали способност да го произвеждат, което може да бъде свързано с причините, довели до аборт. Дали абортът в тези случаи се дължи на абнормален ембрион или на недостиг на IL-10, което в последствие води до прекъсване на бременността, не бихме могли да установим само въз основа на получените резултати.

Тъй като спонтанният аборт предизвиква възпалителна реакция, която може да увреди ендометриума, липсата на секреция на IL-10 при някои от изследваните линии може да се дължи на спонтанния аборт, а не да бъде причина за него. Но, имайки предвид факта, че ДСК от спонтанен аборт запазват способността си да секретират пролактин, вероятно индикиращ тяхната запазена функционалност, въпреки настъпилото спонтанно прекъсване на бременността, то бихме могли да предложим няколко възможности: 1. изначално нивата на IL-10 са били променени и са свързани по определен начин с причините за спонтанния аборт при пациентите, чиито ДСК не синтезират IL-10; 2. ембрионът при тези пациенти е притежавал абнормален кариотип, но въпреки проявата на признаци на селективност (понижаване на секрецията на IL-10), ендометриумът не е предотвратил неговата имплантация; 3. ако абнормален кариотип на ембриона е причина за спонтанния аборт при случаите, при които ДСК синтезират IL-10 при децидуализация, то тогава е възможно да е била нарушена селективността на ендометриума при тези пациенти и той да е позволил имплантацията на ембрион без потенциал за развитие.

4.3.4. Сравнителен анализ на нивата на пролактин и IL-10 при децидуализация на стромални клетки от човешка децидуа

За да се потърси връзка между нивата на секреция на IL-10 и пролактин при *in vitro* децидуализация на стромални клетки от нормална бременност и спонтанен аборт, концентрацията на пролактин в културалната среда е измерена посредством електрохемилюминесценция.



Фигура 11. Анализ на концентрацията на пролактин в културална среда от стромални клетки при децидуализация. Концентрацията на пролактин ($mIU/ml/10^6$ клетки) в културалната среда от две линии нормална бременност (линии 3 и 4 от фиг. 10А) и две групи от по три линии спонтанен аборт, разделени според нивата на секреция на IL-10 (първа група - високи нива на IL-10: линии 1, 2 и 6 от фиг. 10Б; втора група - ниски нива на IL-10: линии 3, 5 и 7 от фиг. 10Б), е анализирана чрез електрохемилюминесценция на трети, шести и девети ден от началото на децидуализацията. Графиката представя концентрацията на пролактин при всяка клетъчна линия или група от клетъчни линии през всеки от анализирания дни.

Резултатите от анализа на секреция на IL-10 при децидуализация на ДСК от елективен и спонтанен аборт (Фиг. 10) ни насочват към анализ на нивата на пролактин в същата културална среда на определени клетъчни линии. За анализ са избрани две линии ДСК от нормална бременност и две групи от по три линии спонтанен аборт. Линиите нормална бременност са линия 3 и линия 4 (Фиг. 10А). Линия 3 е селектирана, защото при нея е установена забавена индукция на секрецията на IL-10 при децидуализация (Фиг. 10А), докато линия 4 показва малко над средните нива на секреция на IL-10 (Фиг. 10А). Спонтанните аборти са групирани на базата на нивата на секреция на IL-10 при децидуализация, като равни части от културалната среда на всяка линия в съответната група са смесени и хомогенизирани, след което общата концентрация на пролактин е анализирана. Първата група спонтанни аборти е съставена от линии 3, 5 и 7 (Фиг. 10Б), при които не е установена секреция на IL-10, докато другата група е съставена от линии 1, 2 и 6 (Фиг. 10Б), при които нивата на IL-10 са високи.

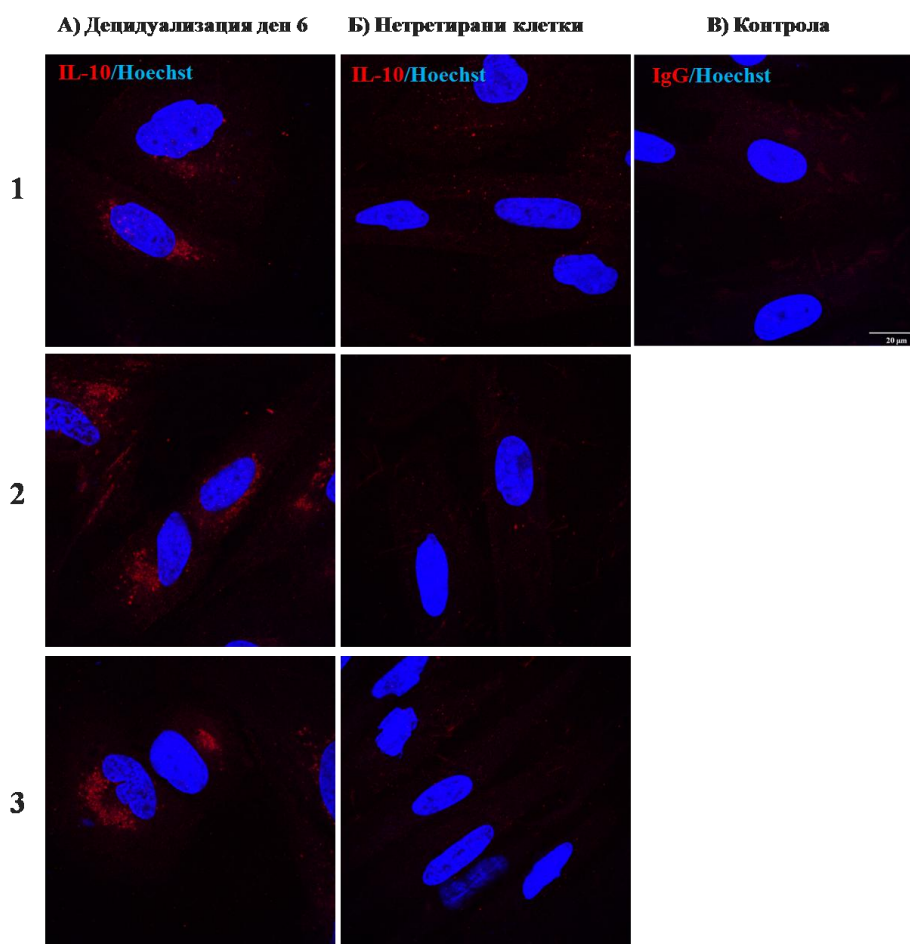
Резултатите от този анализ показват, че нивата на секреция на пролактин кореспондират напълно с тези на IL-10 само при стромалните клетки от нормална бременност (Фиг. 11). Линия 3, при която концентрацията на IL-10 е най-висока на девети ден от децидуализацията има и най-високи нива на пролактин на девети ден, което дава още едно основание да предположим, че най-вероятно се касае за ендометриум с изместен имплантационен прозорец. Линия 4, при която са измерени сравнително високи нива на секреция на IL-10, а именно 78.86 pg/ml/10⁶клетки на шести и 58.22 pg/ml/10⁶клетки на девети ден от децидуализацията, има също високи нива на пролактин, в сравнение с линия 3. Обобщено, забавена и ниска секреция на IL-10 кореспондира със същия профил на експресия на пролактин при децидуализация на ДСК от нормална бременност. При ДСК от спонтанен аборт това важи само частично. Липсата на секреция на IL-10 не отговаря на липса на секреция на пролактин при децидуализация (Фиг. 11), въпреки че нивата са малко по-ниски от тези при групата линии с високи нива на секреция на IL-10.

Резултатите от съвместния анализ на концентрациите на пролактин и IL-10 при децидуализация потвърждават специфичността на секреция на IL-10. Фактът, че въпреки отговора на стимули на децидуализация чрез секреция на пролактин, някои линии спонтанни аборти не секретират IL-10 дава основания да предположим, че компрометираната му експресия по време на децидуализация вероятно е свързана с причините, довели до спонтанния аборт и този процес е повлиял специфично само определени функции на ДСК, сред които имуномодулаторната им функция. Имайки предвид проинфламаторния ефект, който може да има пролактинът [40], паралелната секреция на IL-10 при децидуализация може да представлява регулаторен отговор на секрецията на пролактин с цел модулация на проинфламаторната среда в оптимални за имплантацията и първите етапи на бременността граници, а ДСК при някои жени, при които настъпва спонтанен аборт, да нямат способност да осъществят тази регулация.

Абнормално развитият ендометриум е една от основните причини за повтарящи се спонтанни аборти [41]. Възможно е линиите ДСК от спонтанен аборт, които не показват експресия на IL-10, да принадлежат именно от пациенти с повтарящи се спонтанни аборти. Съответно, нивата на секреция на IL-10 по време на *in vitro* децидуализация да е характеристика, която отличава техните проби от тези на пациентите, при които спонтанният аборт е еднократно явление.

4.3.5. Имунофлуоресцентен анализ на експресията на IL-10 при *in vitro* децидуализация на стромални клетки от човешка децидуа от нормална бременност

Анализът на културалната среда при *in vitro* децидуализация на стромални клетки от човешка децидуа от първи триместър на бременността показва способност на клетките да секретират IL-10 в хода на децидуализация. За да бъдат потвърдени тези резултати е проведен имунофлуоресцентен анализ на експресията на IL-10 от ДСК от нормална бременност.



Фигура 12. Имунофлуоресцентен анализ на експресията на IL-10 при децидуализация на стромални клетки от човешка децидуа. Стромални клетки от първи триместър човешка децидуа от нормална бременност (елективен аборт) са подложени на *in vitro* децидуализация в продължение на шест дни, след което експресията на IL-10 (червен цвят) е анализирана чрез конфокална микроскопия. А) ДСК на шести ден от *in vitro* децидуализацията. Б) Нетретирани с факторите на децидуализация ДСК. В) Контролно оцветяване без първо антитяло. С 1, 2 и 3 са отбелязани различни изображения от едно и също третиране. Ядрата на клетките са белязани с Hoechst 33258. Маркер 20 µm

За този експеримент са използвани стромални клетки от децидуални проби от първи триместър децидуа от нормална бременност. Клетките са подложени на децидуализация с МПА, цАМФ и β -естрадиол, след което експресията на IL-10 е анализирана на шести ден. В изследването са използвани ДСК на шести ден от началото на третирането с факторите на децидуализация, тъй като в този момент от третирането концентрация на IL-10 в културалната при преобладаващата част от анализирани линии е най-висока (Фиг. 10А). Преди приключване на третирането на клетките с факторите на децидуализация, културата е подложена на третиране с брефелдин А (BFA), който блокира вътреклетъчния транспорт, съответно инхибира секреторните функции на клетките. Резултатите от този експеримент потвърждават, че децидуализацията води до увеличаване на нивата на експресия на IL-10 от децидуалните стромални клетки. Локализирането на IL-10 в перинуклеарната област на цитоплазмата (Фиг. 12А 1, 2, 3) отговаря на установеното при третиране с BFA акумулиране на секреторни протеини в ендоплазмената мрежа [42]. Нетретираните ДСК показват много ниска или липсваща експресия на IL-10 (Фиг. 12Б 1, 2, 3).

Имунофлуоресцентният анализ на експресията на IL-10 от ДСК при децидуализация (Фиг. 12) потвърждава получените от изследването на неговата концентрация (Фиг. 10А) резултати, а именно, че при децидуализация, стромалните клетки прозвеждат IL-10.

Анализът на генната експресия на IL-10 в децидуа от нормална бременност и спонтанен аборт (Фиг. 4) показва, че нивата на този цитокин са завишени в случаите на спонтанен аборт. От друга страна, чрез функционалното изследване на способността за секреция на IL-10 само на един от клетъчните компоненти на децидуата – стромалните клетки се установява, че някои ДСК от спонтанен аборт имат занижена или липсваща способност за секреция на IL-10 (Фиг. 10Б). На базата на тези наблюдения бихме могли да предположим, че при настъпване на спонтанен аборт секретиралите във висока степен IL-10 клетъчни популации не включват ДСК, а секрецията на този имуномодулаторен цитокин от тях има значение за подготвителните и началните етапи на бременността.

5. Заключение

За настъпване и нормално протичане на бременността е необходимо както наличието на развиващ се ембрион, така и подходяща среда за неговата имплантация и последващо развитие. Нито един от тези два фактора не може да бъде пренебрегнат и нито един от тях не е самостоятелно достатъчен за бременността. Подготовката и нормалното протичане на гестационния период изискват адаптация на майчиния организъм към развиващия се плод. Един от аспектите на тази адаптация е свързан с имунната система на майката, която трябва да приеме, толерира, благоприяства и защитава експресиращия чужди гени организъм. Това е възможно само при оптимална регулация на механизмите на вродения и придобития имунитет.

Освен в модуляцията на имунната система по време на бременност, имунни фактори вземат участие и в други свързани с бременността процеси. Един от основните фактори с важно значение за нормалното протичане на бременността и многостранно действие е IL-10, участващ както в осигуряването на имунна толерантност към плода, така и в процесите на имплантация, плацентация и поддържане на бременността. Именно IL-10 е обект на изследване в този дисертационен труд.

Статистическите данни сочат, че около 15% от бременностите завършват със спонтанен аборт в първи триместър, 5% от пациентите имат повтаряща се загуба на бременността, а в много от случаите причината за това е имунологична [43,44]. Това подчерава необходимостта от определяне на нови биомаркери за патологични състояния, водещи до спонтанен аборт, което би спомогнало за разкриване на нови методи за превенция.

Част от проведените от нас изследвания са насочени към определяне на IL-10 като биомаркер за патологични усложнения в хода на бременността, които водят до спонтанен аборт. Периферната кръв и нейните компоненти са леснодостъпен, утвърден, достоверен, информативен източник за протичащи в организма процеси. Посочените предимства на периферната кръв в сравнение с по-труднодостъпни източници на аналитичен материал и рискът, свързан с неговото добиване (пр. локална биопсия на тъкан или орган), ни дават основание да проведем изследвания на нивата на IL-10 в кръвна плазма и да проверим дали те могат да бъдат обективен индикатор за рискови състояния по време на бременността. Резултатите от изследването на плазмената концентрация на IL-10 показват до шесткратно, в сравнение медианата на концентрацията при нормална бременност, завишени нива на този имуномодулаторен

цитокин при някои от случаите на спонтанен аборт (Фиг. 1). Тези резултати ни позволяват да приемем плазмените нива на IL-10 като потенциален прогностичен и диагностичен маркер за спонтанен аборт.

Друга част от нашите изследвания са насочени към установяване на нови аспекти на участието на IL-10 в механизми за обща и локална имунна толерантност. За целта са анализирани нивата на генна експресия на IL-10 в периферни мононуклеарни клетки от бременни жени, жени след претърпян спонтанен аборт и небременни жени (Фиг. 3), както и в децидуална тъкан от нормална бременност и спонтанен аборт (Фиг. 4). Завишена генна експресия на IL-10 в ПМК е установена в отделни проби във всички изследвани групи, докато в децидуа, спонтанните аборти категорично превъзхождат нормалната бременност в неговата експресия. Сравнителният анализ показва, че при нормално протичаща бременност в първи триместър, експресията на IL-10 в ПМК и децидуа е съизмерима, докато при спонтанен аборт основният източник на IL-10 е децидуата, тъй като неговата експресия в тази тъкан е по-висока в сравнение с тази при ПМК (Фиг. 5). На база на тези резултати бихме могли да преположим, че при нормално протичаща бременност, нивата на IL-10 както в периферията, така и локално, се поддържат сравнително ниски, докато при спонтанен аборт в децидуата се осъществяват основните реакции, водещи до повишаване на нивата на IL-10. Съответно, при нормален ход на бременността IL-10 взема участие както в периферни, така и в локални механизми за поддържане на имунна толерантност, докато при настъпване на спонтанен аборт, неговото действие е концентрирано в децидуата. Освен имуномодулаторна, в децидуата IL-10 има и други функции. Локалното повишаване на експресията на IL-10 при спонтанен аборт може да е свързано с овладяване на активацията на Th1-имунния отговор, но вероятно е важна и вазопротективната функция на IL-10, тъй като при спонтанен аборт в някои случаи се установява ендотелна дисфункция.

Фактът, че всички децидуални проби от спонтанен аборт имат завишени нива на генна експресия на IL-10, докато увеличена концентрация е установена само при някои от плазмените проби, може да се дължи на различните причини за спонтанния аборт, на наличието на друг освен децидуата източник на IL-10 при спонтанен аборт, на различен момент на установяване на аборта и вземане на пробата при отделните пациенти.

За установяване на децидуалните клетъчните популации, които експресират IL-10 при нормална бременност и спонтанен аборт, е направен имунофлуоресцентен анализ на децидуална тъкан от тези два вида проби. Резултатите показват, че в децидуа

източници на IL-10 са стромалните клетки, трофобластът, ендотелните клетки и левкоцитите (Фиг. 6), като експресиращите IL-10 клетъчни популации при спонтанен аборт не се различават от тези при нормална бременност. Имунофлуоресцентният анализ цели визуализация на IL-10-експресиращите клетъчни популации, затова не бихме могли да съпоставим този резултат с количествената оценка на неговата експресия в децидуа, направена посредством Real Time PCR (Фиг. 4). Въпреки това, имунофлуоресцентният анализ показва, че както при нормална бременност, така и при спонтанен аборт имунни и неимунни клетъчни популации могат да бъдат негови източници, вероятно с цел да се обезпечи осигуряването на необходимите количества IL-10 на майчино-феталната граница.

Част от изследванията, свързани с изготвянето на този труд, показват вероятно значение на IL-10 за изграждането на рецептивността на ендометриума. Децидуализацията е процес, чието правилно протичане е от особено значение за подготовката на ендометриума за имплантация и началните етапи на бременността. Предвид значението ѝ за плацентацията може да се твърди, че децидуализацията дава отражение върху последващото развитие на бременността. Резултатите от анализа на експресията на IL-10 в хода на децидуализацията показват пик на неговите нива на ден шести от началото на третирането с факторите на децидуализацията и понижение на девети ден. Този резултат би могъл да бъде свързан с промяна на нивата на IL-10 в началото и края на имплантационния прозорец (Фиг. 10А), което предполага значение на IL-10 за рецептивността на ендометриума. Забавената продукция на IL-10 при една от линиите ДСК от нормална бременност (Фиг. 10А, линия 3) може да отговаря на изместен имплантационен прозорец при тази жена.

Подложените на децидуализация ДСК от спонтанен аборт показват съизмерими с тези при ДСК от нормална бременност нива на секреция на пролактин (Фиг. 9), докато нивата на секреция на IL-10 са занижени (Фиг. 10Б). При някои от анализиранияте линии спонтанен аборт липсва секреция на IL-10, но нивата на пролактин са съизмерими с тези при секретиранияте високи количества IL-10, както ДСК от спонтанен аборт, така и от нормална бременност (Фиг. 11). Имайки предвид тези резултати бихме могли да допуснем, че IL-10 специфично определя функционалността на децидуалните стромални клетки и неговата експресия в хода на децидуализацията е един от факторите, допринасящи за изграждането на рецептивността на ендометриума. Липса на секреция на IL-10 е установена и при една от линиите ДСК от нормална бременност. Бихме могли да обясним това с факта, че тъй като

бременността е прекъсната преждевременно, не бихме могли да знаем какъв би бил нейният изход, ако беше продължила. Тъй като не при всички линни ДСК от спонтанен аборт липсва секреция на IL-10 е възможно да се допусне, че тези, при които не се наблюдава IL-10, произхождат от пациенти с повтарящи се спонтанни аборти, тъй като в много от случаите причините за това се дължат на функционални нарушения в ендометриума.

Възможно е липсата на секреция на IL-10 при децидуализация на някои линии ДСК от спонтанен аборт да е свързана със селективността на ендометриума. Ако се приеме, че ендометриумът показва признаци за селективност чрез липса секрецията на IL-10 поради контакта с абнормален ембрион, е възможно други фактори със значение за селективността на ендометриума да са отговорни за допускането на имплантацията на този ембрион. От друга страна, ако при пациентите, чиито ДСК секретират IL-10 при децидуализация, причината за спонтанния аборт е ембрион с абнормален кариотип, то може да се предположи, че при тях селективността на ендометриума е била нарушена.

В обобщение бихме могли да кажем, че завишени периферни нива на IL-10 при спонтанен аборт биха могли да бъдат свързани с причините за настъпването му, което ни дава основание да предложим IL-10 за бъдещи изследвания като прогностичен и диагностичен маркер за свързани с бременността усложнения, водещи до спонтанен аборт, докато локалното повишение на неговите нива в децидуата вероятно е свързано с компенсаторни механизми, целящи да овладеят настъпилата възпалителна реакция и ендотелна дисфункция.

На базата на установените промени в нивата на IL-10 в хода на децидуализация, различния профил на експресия при една от линните ДСК от нормална бременност, както и понижената му секреция от ДСК от спонтанен аборт бихме могли да допуснем, че IL-10 участва в изграждането на рецептивността на ендометриума, допринася за неговата функционалност и/или е свързан с неговата селективност.

6. Изводи

1. При някои случаи на спонтанен аборт се установяват повишени плазмени нива на IL-10, което показва потенциала на този имуномодулаторен цитокин да бъде валидиран като прогностичен и диагностичен маркер за спонтанен аборт.
2. В първи триместър на нормално протичаща бременност нивата на генна експресия на IL-10 в периферна кръв и в децидуа са съизмерими. При спонтанен аборт генната експресия на IL-10 в децидуа е завишена, което показва съсредоточено локално негово действие при спонтанно прекъсване на бременността.
3. На база на сходните секреторни нива на пролактин и настъпващите морфологични промени при децидуализация можем да заключим, че стромалните клетки от децидуа от нормална бременност и спонтанен аборт отговарят по сходен начин на факторите на децидуализация в *in vitro* условия, докато секрецията на IL-10 отличава двата вида клетки.
4. Промяната в нивата на секреция на IL-10 от децидуални стромални клетки в хода на *in vitro* децидуализация показва вероятна роля на IL-10 при изграждането на рецептивността на ендометриума.
5. Секрецията на IL-10 от децидуални стромални клетки при *in vitro* децидуализация може да бъде разглеждана като част от механизма, чрез който те участват в поддържането на имунна толерантост в децидуата.

7. Приноси

- Настоящият труд за първи път показва потенциала на Интерлевкин 10 да бъде разглеждан като предиктивен биомаркер за спонтанен аборт, изследвайки неговата плазмена концентрация.
- Получените резултати показват специфична експресия на Интерлевкин 10 в хода на *in vitro* децидуализация на стромални клетки от първи триместър човешка децидуа, което за първи път дава основание Интерлевкин 10 да бъде разглеждан като потенциален биомаркер за рецептивност на ендометриума.

8. Публикации и участия

8.1. Публикации

1. B. Petkova, E. Alova, I. Karagyozev, P. Stoyanova, V. Jekov, M. Mourdjeva, Ts. Oreshkova

“IL-10: a potential prognostic biomarker for missed abortion”, Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, in press

2. Б. Петкова, Ц. Орешкова

„Количествени и функционални изменения на периферните левкоцити по време на бременността“, Репродуктивно здраве, бр.23, 2016г.

8.2. Устни доклади

1. B. Petkova, K. Vinketova, E. Alova, P. Mincheva, V. Jekov, I. Karagyozev, M. Mourdjeva, Ts. Oreshkova

“IL-10: a potential marker for endometrial receptivity and pregnancy complications”
17th World Congress on Human Reproduction, 15-18 March, 2017, Rome, Italy

2. Б. Петкова, К. Винкетова, Е. Алова, П. Минчева, В. Жеков, И. Карагъзов, М. Мурджева, Ц. Орешкова

„Влияние на in vitro децидуализацията върху секрецията на IL-10 от стромални клетки и промени на плазмените му нива през бременността“, „10 години Българска Асоциация по Клинична Иммунология“, 29-30 Октомври 2016г., София, България

8.3. Постерни презентации

1. B. Petkova, K. Vinketova, E. Alova, P. Mincheva, V. Jekov, M. Mourdjeva, Ts. Oreshkova
“Ex-vivo screening of peripheral blood leukocytes reactivity status in pregnancy”, 14th International Symposium for Immunology of Reproduction , 22-24 May 2015, Varna, Bulgaria

2. Б. Петкова, К. Винкетова, Е. Алова, П. Минчева, В. Жеков, М. Мурджева, Ц. Орешкова

„Реактивност и активация на периферни левкоцити от бременни жени“, IV Национален конгрес по Иммунология, 2-5 Октомври 2014г., Златни пясъци, България

8.4. Обучения

1. 6th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School, 26-29 September 2014, Timisoara, Romania
2. 1st Black Sea International Immunology School, 2 October 2014, Golden Sands, Bulgaria

8.5. Проекти

1. ДФНП 175/13.05.2016 г. *„Изследване на имуномодулиращи фактори в кръвната рециркулация при нормална и патологична бременност”*

Ръководител на проекта: Б. Петкова

Научен консултант: доц. Ц. Орешкова

Програма за подпомагане на младите учени в БАН, 13.05.2016 г.- 30.07.2017 г.

9. Литературни източници

- [1] V.A. Holmes, J.M.W. Wallace, W.S. Gilmore, P. McFaul, H.D. Alexander, Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: A longitudinal study, *Cytokine*. 21 (2003) 265–269. doi:10.1016/S1043-4666(03)00097-8.
- [2] C. Haavaldsen, P. Fedorcsak, T. Tanbo, A. Eskild, Maternal age and serum concentration of human chorionic gonadotropin in early pregnancy, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 93 (2014) 1290–1294. doi:10.1111/aogs.12471.
- [3] A. Schumacher, K. Heinze, J. Witte, E. Poloski, N. Linzke, K. Woidacki, A.C. Zenclussen, Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance., *J. Immunol.* 190 (2013) 2650–8. doi:10.4049/jimmunol.1202698.
- [4] P. Chatterjee, V.L. Chiasson, K.R. Bounds, B.M. Mitchell, Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy, *Front. Immunol.* 5 (2014) 1–1. doi:10.3389/fimmu.2014.00253.
- [5] S. Vassiliadis, A. Ranella, L. Papadimitriou, A. Makrygiannakis, I. Athanassakis, Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion, *Mediators Inflamm.* 7 (1998) 69–72. doi:10.1080/09629359891199.
- [6] J.L. Suen, Y. Chang, P.R. Chiu, T.H. Hsieh, E. Hsi, Y.C. Chen, Y.F. Chen, E.M. Tsai, Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model, *Am. J. Pathol.* 184 (2014) 464–471. doi:10.1016/j.ajpath.2013.10.023.
- [7] A. Molvarec, A. Szarka, S. Walentin, G. Beko, I. Karádi, Z. Prohászka, J. Rigó, Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia., *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9 (2011) 124. doi:10.1186/1477-7827-9-124.
- [8] M.D. Bates, S. Quenby, K. Takakuwa, P.M. Johnson, G.S. Vince, Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss?, *Hum. Reprod.* 17 (2002) 2439–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202438>.
- [9] A. Berger, Science commentary: Th1 and Th2 responses: what are they?, *BMJ.* 321 (2000) 424–424. doi:10.1136/bmj.321.7258.424.
- [10] L.L. Power, E.J. Popplewell, J.A. Holloway, N.D. Diaper, J.O. Warner, C.A. Jones, Immunoregulatory molecules during pregnancy and at birth, *J. Reprod. Immunol.* 56 (2002) 19–28. doi:10.1016/S0165-0378(01)00146-2.
- [11] C.T. Roberts, C.A. White, N.G. Wiemer, A. Ramsay, S.A. Robertson, Altered placental development in interleukin-10 null mutant mice, *Placenta.* 24 (2003). doi:10.1053/plac.2002.0949.
- [12] Z.J. Pang, J.G. Zhou, L.P. Huang, Interleukin-10 may participate in regulating trophoblast invasion in human placentae throughout gestation, *Am. J. Reprod. Immunol.* 60 (2008) 19–25. doi:10.1111/j.1600-0897.2008.00586.x.
- [13] N. Tewari, S. Kalkunte, D.W. Murray, S. Sharma, The water channel aquaporin 1 is a novel molecular target of polychlorinated biphenyls for in utero anomalies, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 15224–15232. doi:10.1074/jbc.M808892200.
- [14] G. Trinchieri, Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 239–243. doi:10.1084/jem.20070104.
- [15] J. a Hill, K. Polgar, D.J. Anderson, T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion., *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 273 (1995) 1933–1936. doi:10.1097/00006254-199511000-00016.
- [16] K.G. Kohut, M.N.A. Anthony, C.M. Salafia, Decidual and placental histologic findings in patients experiencing spontaneous abortions in relation to pregnancy order, *Am. J.*

- Reprod. Immunol. 37 (1997) 257–261. doi:10.1111/j.1600-0897.1997.tb00224.x.
- [17] K.G. Osteen, W.H. Rodgers, M. Gaire, J.T. Hargrove, F. Gorstein, L.M. Matrisian, Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 10129–10133. doi:10.1073/pnas.91.21.10129.
- [18] J. Maldonado-Estrada, E. Menu, P. Roques, F. Barré-Sinoussi, G. Chaouat, Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry, *J. Immunol. Methods.* 286 (2004) 21–34. doi:10.1016/j.jim.2003.03.001.
- [19] L. Adamo, G. García-Cardena, The vascular origin of hematopoietic cells, *Dev. Biol.* 362 (2012) 1–10. doi:10.1016/j.ydbio.2011.09.008.
- [20] M. Mints, B. Blomgren, C. Falconer, J. Palmblad, Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family in human endometrial blood vessels, *Scand J Clin Lab Invest.* 62 (2002) 167–175. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12088335.
- [21] M.L. Thomas, The leukocyte common antigen family., *Annu. Rev. Immunol.* 7 (1989) 339–369. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.002011.
- [22] M. Plevyak, N. Hanna, S. Mayer, S. Murphy, H. Pinar, L. Fast, C. Ekerfelt, J. Ernerudh, G. Berg, L. Matthiesen, S. Sharma, Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: A lack of correlation with the decidual immune cell profile, *Am. J. Reprod. Immunol.* 47 (2002) 242–250. doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01060.x.
- [23] B.H. Dorman, V.A. Varma, J.M. Siegfried, S.A. Melin, T.A. Adamec, C.R. Norton, D.G. Kaufman, Morphology and growth potential of stromal cell cultures derived from human endometrium., *In Vitro.* 18 (1982) 919–28. doi:10.1007/BF02796348.
- [24] D. Croxatto, P. Vacca, F. Canegallo, R. Conte, P.L. Venturini, L. Moretta, M.C. Mingari, Stromal cells from human decidua exert a strong inhibitory effect on NK cell function and dendritic cell differentiation, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0089006.
- [25] D.A. Moraes, T.T. Sibov, L.F. Pavon, P.Q. Alvim, R.S. Bonadio, J.R. Da Silva, A. Pic-Taylor, O.A. Toledo, L.C. Marti, R.B. Azevedo, D.M. Oliveira, A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells, *Stem Cell Res. Ther.* 7 (2016) 97. doi:10.1186/s13287-016-0359-3.
- [26] B. Gellersen, J. Brosens, Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: A decidualizing affair, *J. Endocrinol.* 178 (2003) 357–372. doi:10.1677/joe.0.1780357.
- [27] J.J. Brosens, N. Hayashi, J.O. White, Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells, *Endocrinology.* 140 (1999) 4809–4820. doi:10.1210/en.140.10.4809.
- [28] R. Telgmann, E. Maronde, K. Taskén, B. Gellersen, Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells., *Endocrinology.* 138 (1997) 929–937. doi:10.1210/endo.138.3.5004.
- [29] M. Salker, G. Teklenburg, M. Molokhia, S. Lavery, G. Trew, T. Aojanepong, H.J. Mardon, A.U. Lokugamage, R. Rai, C. Landles, B.A.J. Roelen, S. Quenby, E.W. Kuijk, A. Kavelaars, C.J. Heijnen, L. Regan, N.S. Macklon, J.J. Brosens, Natural selection of human embryos: Impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss, *PLoS One.* 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0010287.
- [30] K.J. Hyde, D.J. Schust, Genetic considerations in recurrent pregnancy loss, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (2015). doi:10.1101/cshperspect.a023119.

- [31] M.M.J. van den Berg, M.C. van Maarle, M. van Wely, M. Goddijn, Genetics of early miscarriage, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822 (2012) 1951–1959. doi:10.1016/j.bbadis.2012.07.001.
- [32] T.J. Hassold, A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions., *Am. J. Hum. Genet.* 32 (1980) 723–30. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1686106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [33] S.Y. Tan, F. Hang, G. Purvarshi, M.Q. Li, D.H. Meng, L.L. Huang, Decreased endometrial vascularity and receptivity in unexplained recurrent miscarriage patients during midluteal and early pregnancy phases, *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 54 (2015) 522–526. doi:10.1016/j.tjog.2014.10.008.
- [34] D. Blesa, M. Ruiz-Alonso, C. Simón, Clinical management of endometrial receptivity, *Semin. Reprod. Med.* 32 (2014) 410–414. doi:10.1055/s-0034-1376360.
- [35] O.W. Griffith, A.R. Chavan, S. Protopapas, J. Maziarz, R. Romero, G.P. Wagner, Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2017) 201701129. doi:10.1073/pnas.1701129114.
- [36] Y. Liang, J. Han, C. Jia, Y. Ma, Y. Lan, Y. Li, S. Wang, Effect of Endometrial Injury on Secretion of Endometrial Cytokines and IVF Outcomes in Women with Unexplained Subfertility, *Mediators Inflamm.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/757184.
- [37] N. Lédée, M. Petitbarat, L. Chevrier, D. Vitoux, K. Vezmar, M. Rahmati, S. Dubanchet, H. Gahéry, A. Bensussan, G. Chaouat, The Uterine Immune Profile May Help Women With Repeated Unexplained Embryo Implantation Failure After In Vitro Fertilization, *Am. J. Reprod. Immunol.* 75 (2016) 388–401. doi:10.1111/aji.12483.
- [38] T. Erkers, S. Nava, J. Yosef, O. Ringdén, H. Kaipe, Decidual Stromal Cells Promote Regulatory T Cells and Suppress Alloreactivity in a Cell Contact-Dependent Manner, *Stem Cells Dev.* 22 (2013) 2596–2605. doi:10.1089/scd.2013.0079.
- [39] G. Teklenburg, M. Salker, M. Molokhia, S. Lavery, G. Trew, T. Aojanepong, H.J. Mardon, A.U. Lokugamage, R. Rai, C. Landles, B.A.J. Roelen, S. Quenby, E.W. Kuijk, A. Kavelaars, C.J. Heijnen, L. Regan, J.J. Brosens, N.S. Macklon, Natural selection of human embryos: Decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation, *PLoS One.* 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0010258.
- [40] A. Tomio, D.J. Schust, K. Kawana, T. Yasugi, Y. Kawana, S. Mahalingaiah, T. Fujii, Y. Taketani, Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet, *Immunol. Cell Biol.* 86 (2008) 616–621. doi:10.1038/icb.2008.29.
- [41] T.C. Li, E.M. Tuckerman, S.M. Laird, Endometrial factors in recurrent miscarriage, *Hum. Reprod. Update.* 8 (2002) 43–52. doi:10.1093/humupd/8.1.43.
- [42] T. Fujiwara, K. Oda, S. Yokota, A. Takatsuki, Y. Ikehara, Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 18545–18552.
- [43] L. Regan, R. Rai, Epidemiology and the medical causes of miscarriage, *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 14 (2000) 839–854. doi:10.1053/beog.2000.0123.
- [44] E.C. Larsen, O.B. Christiansen, A.M. Kolte, N. Macklon, New insights into mechanisms behind miscarriage, *BMC Med.* 11 (2013) 154. doi:10.1186/1741-7015-11-154.