



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ



ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ
НА РАЗМНОЖАВАНЕТО „АКАД. К. БРАТАНОВ“

Камелия Винкетова Петкова

**ЕКСПРЕСИЯ И РЕГУЛАЦИЯ НА CD83 В ДЕЦИДУАЛНИ СТРОМАЛНИ
КЛЕТКИ В РАННА БРЕМЕННОСТ ПРИ ЧОВЕК**

АВТОРЕФЕРАТ

Към дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
по научна специалност "Имунология" шифър 01.06.23

Научен ръководител:
доц. Цветелина Орешкова, доктор

Рецензенти:
проф. Стефан Лолов, дмн
доц. Доброслав Кюркчиев, дмн

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 136 страници, илюстриран е с 28 фигури и с 6 таблици. В библиографския списък са цитирани 215 източника.

Изследванията, включени в дисертацията, са проведени в ИБИР-БАН, секция „Молекулярна имунология“ и Walter Brendel Center of Experimental Medicine, Мюнхен, Германия.

Дисертационният труд е преминал успешно процедура за предварително обсъждане и е насочен за защита на заседание на научния съвет на ИБИР-БАН, състояло се на 18.10.2017г., София.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 18. 12. 2017г. от 14.30 часа в заседателната зала на ИБИР, бул. „Цариградско шосе“ №73, гр. София, пред научно жури в състав:

1. акад. Богдан Петрунов, дмн
2. доц. Доброслав Кюркчиев, дмн
3. доц. Иванка Цачева
4. проф. Стефан Лолов, дмн
5. доц. Цветелина Орешкова, доктор

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН.

Забележка: Номерата на фигурите в автореферата не съответстват на номерата на фигурите в дисертационния труд.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АПК	Антиген-представящи клетки
ДСК	Децидуални стромални клетки
Е	β -Естрадиол
ЕСК	Ендометриални стромални клетки
Мо	Моноцити
Мо-КС	Кондиционирана среда от активирани периферни моноцити
П	Прогестерон
ПМНК	Периферни мононуклеарни клетки
СЛР	Смесена лимфоцитна реакция
цАМФ	Цикличен аденозин монофосфат
CD83 ^{neg}	Субпопулация от ДСК, неекспресираща мембранната форма на CD83
CD83 ^{pos}	Субпопулация от ДСК, експресираща мембранната форма на CD83
CFSE	5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (5-(и 6)-карбоксифлуоресцин сукцинимидил естер)
LPS	Lipopolysaccharide (липополизахарид)
MFI	Mean/median fluorescence intensity (среден интензитет на флуоресценция)

ВЪВЕДЕНИЕ

По данни на Световната здравна организация от 2012г., смъртността при жените, свързана с бременност и раждане, възлиза на приблизително 800 жени на ден , а броят на преждевременно родените деца (преди 37-ма гестационна седмица), което е водеща причина за смърт при новородените - около 15 милиона на година. Във връзка с изнесените данни, през 2014 година National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) и Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) към Националният здравен институт (National Institutes of Health) на САЩ организират работна среща на водещи експерти в областта на репродуктивната биология и имунология. Заключение им е, че е необходимо засилване на фундаменталните изследванията в областта на ранната бременност – етапът, свързан с най-голям брой аборти, за да се подобрят диагностиката, превенцията и терапията на фертилността и проблемите на бременността, както и на свързаните с фертилността заболявания при жените.

Обект на изследване на настоящата дисертация е експресията на имунорегулаторната молекула CD83 от първични клетки и клетъчни модели на популации, представени на майчино-феталната граница в ранна бременност при човек. Интересът към CD83 се обосновава от плейотропната природа на молекулата и способността ѝ да модулира имунните реакции. Експресиран върху мембраната на зрели дендритни клетки, CD83 участва в активирането на Т лимфоцитите и подпомага антиген-специфичния имуен отговор. В свободна/разтворима форма, молекулата предизвиква противоположен ефект, като насочва имунните реакции към супресия и толерантност чрез инхибиране диференциацията на дендритните клетки. При бременност поддържането на имунната толерантност спрямо семи-алогенния ембрион/фетус е от първостепенно значение, което предполага експресията и бременност-специфичната регулация на CD83 в имплантационната ниша.

ЦЕЛ

Изследване на експресията на имунорегулаторната молекула CD83 в децидуални стромални клетки от майчино-феталната граница. Установяване ролята на специфичната за бременността хормонална среда и междуклетъчните комуникации със стабилизирани трофобластни клетъчни линии, за регулацията на CD83.

ЗАДАЧИ

1. Изолране, фенотипно и функционално характеризирне на децидуални стромални клетки (ДСК) от ранна човешка децидуа (I^{ви} тримесър на бременността).
2. Сравнение на ДСК с професионални антиген-представящи клетки и изследване на имуногенните им свойства при контакт с алогенни Т лимфоцити от периферна кръв в условия на смесена лимфоцитна реакция.
3. Характеризиране на мембранната и вътреклетъчна експресията на имунорегулаторната молекула CD83 в зависимост от диференциацията на ДСК.
4. Изследване на регулацията на CD83 в ДСК в условия на децидуализация.
5. Изследване на регулацията на CD83 от ДСК и вилозни и екстравилозни човешки трофобластни клетки при взаимодействие между тях.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Първични култури от децидуални стромални клетки и хориокарциномни линии **JAR** (ATCC) и **JEG-3** (ATCC).

Използвани са консумативи за клетъчно изолиране и култивиране, FACS, RT-PCR, клетъчно сортиране и микроскопия.

Методи

Изолиране и култивиране на човешки клетъчни типове – децидуални стромални клетки, Т лимфоцити, моноцити.

Съзряване на дендритни клетки.

Смесена лимфоцитна реакция.

Ко-култивиране на децидуални стромални клетки с JAR-, JEG-3-клетки и алогенни лимфоцити.

In vitro децидуализация.

Проточна цитометрия.

Реакция на обратна транскрипция - RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction).

Количествена полимеразна верижна реакция в реално време - qPCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction).

ELISA

Флуоресцентна микроскопия.

Статистически анализ.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Стромални клетки от човешка децидуа от ранна бременност бяха изолирани и характеризирани. Фенотипният анализ показва, че в първичните култури отсъстваха хематопоеични и трофобластни клетки. В *in vitro* условия клетките покриваха морфологичните и фенотипни критерии за мезенхимни стволови/стромални клетки на международната общност по клетъчна терапия.

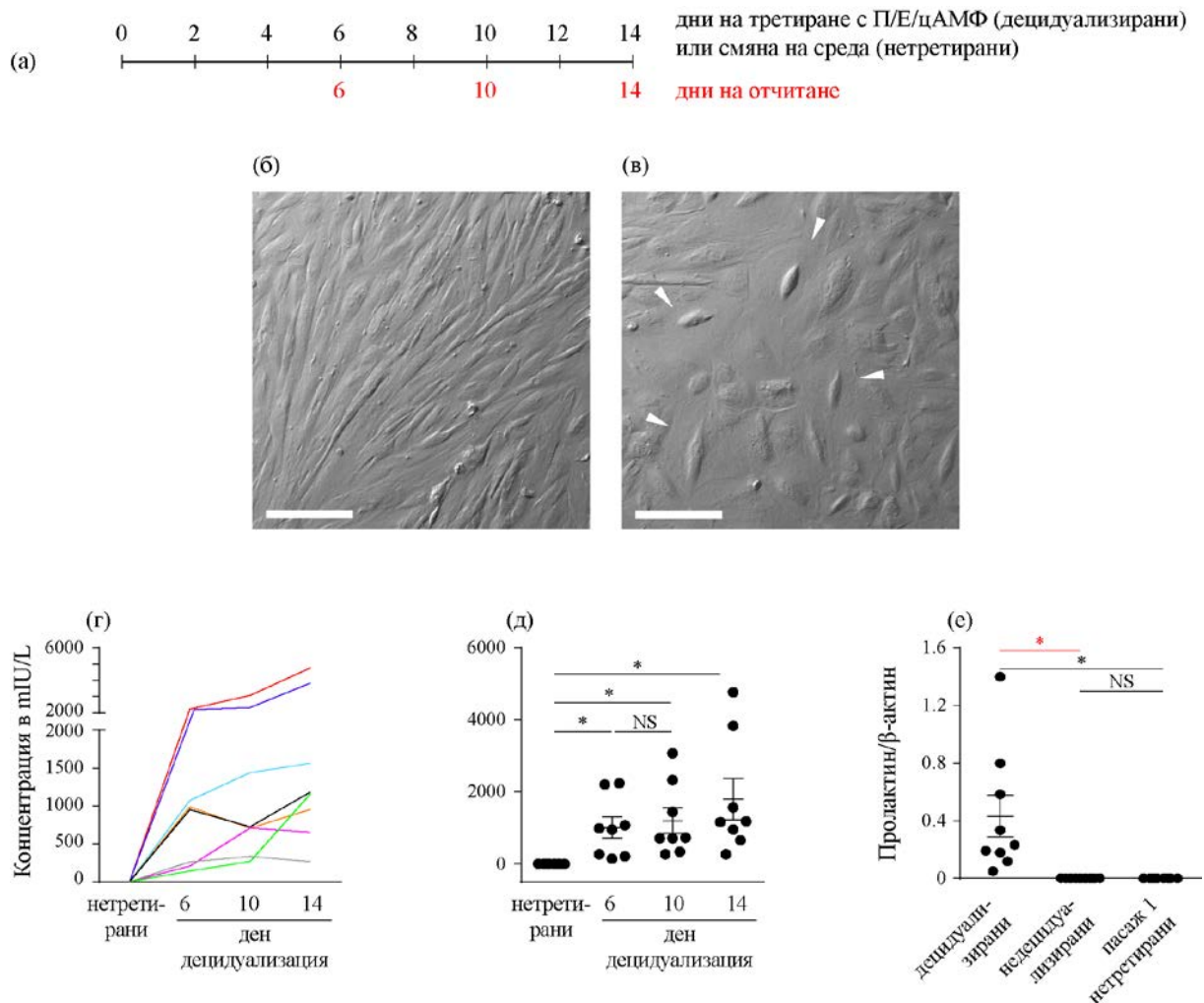
1 Функционална характеристика на ДСК чрез децидуализация *in vitro*.

По време на всеки менструален цикъл, стромалните клетки в маточната лигавица (ендометриум) претърпяват диференциация, означена като реакция на децидуализация. Децидуализацията е физиологичен процес на трансформация на лигавицата, контролиран от овариалните хормони, който подготвя ендометриума за имплантацията на семи-алогенния ембрион. В резултат от хормоналното въздействие, стромалните клетки придобиват специфични функции, поддържащи бременността. Изолирането на ендометриални/децидуални стромални клетки на базата на адхезионните им свойства (неспецифична селекция), води до получаването на култури, обогатени с клетки с висока клоногенна активност и диференциационен потенциал. Това предполага, че културите се обогатяват с прекурсорни, недецидуализирани стромални клетки при изолирането им от децидуа. Доказателство за това, че диференцираните децидуални клетки се губят в процеса на изолиране и/или поддържане на културите, е липсата на експресия на гена на хормона пролактин, който е молекулен маркер за децидуализация на стромалните клетки.

Функционалната активност на изолираните от нас клетки беше проверена чрез способността им да се децидуализират в *in vitro* условия. Осем ДСК-линии между 3^{ти} и 5^{ти} пасаж бяха третирани с прогестерон (П), естрадиол (Е) и цикличен аденозин монофосфат (цАМФ) (децидуализирани) или култивирани без фактори (нетретирани) в продължение на 6, 10 и 14 дни (фиг.1а). Децидуализацията на стромалните клетки и *in vitro*, и *in vivo* води до промяна на

клетъчната морфология и до активиране на експресията на редица фактори, от които хормонът пролактин и insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) са широко използвани като молекулни маркери за доказване на децидуализация в *in vitro* условия. Въз основа на литературните данни и наложените лабораторни практики, морфологията на ДСК и експресията на хормона пролактин на генно и белтъчно ниво бяха използвани за изследване на способността на изолираните ДСК култури да децидуализират. Резултатите показаха, че вследствие от въздействието на П, Е и цАМФ клетките претърпяха морфологични и физиологични изменения. Част от фибробласто-подобните ДСК в културите (фиг. 1б) се трансформираха в големи, полигонални клетки (фиг. 1в), като всяка една от третираните ДСК-линии показва и секреция на хормона пролактин в отговор на децидуализацията (фиг. 1г), което потвърди функционалната им активност. Статистически значимо увеличение на секрецията на пролактин се наблюдаваше за всеки от избраните дни на отчитане, при сравнение с групата на нетретираните клетки (фиг. 1д), в която не бе установена секреция на хормона при обхват на детекция на кита от 0 до 4200 mIU/l. Статистически обобщените резултати, обхващащи отговора на всички третирани култури, показаха плавно и постоянно повишаване на секрецията на пролактин с удължаване на въздействието на факторите на децидуализация. Бяха определени средни стойности на секретирания пролактин - 1009mIU/L на ден 6, 1200mIU/L на ден 10 и 1799mIU/L на ден 14 (фиг. 1д). Липсата на секреция на хормона в нетретираните клетки показва отсъствие на децидуализирани ДСК в културите, в които присъстваха основно недиференцирани клетки, поддържащи културите. Това постави въпроса, дали диференцираните клетки се губят при культивиране на линиите до достигане на 3-ти пасаж или отпадат още в етапа на изолиране на ДСК при селекцията чрез адхезия, в етапа на получаване на първичните култури. За да отговорим на този въпрос, експресията на гена за пролактин беше изследвана чрез количествен RT-PCR и сравняване на броя копия матрична РНК за пролактин с тези за β -актин (house keeping gene). Активността на гена бе изследвана в ДСК-линии на 1^{ви} пасаж (n=8) и сравнена с активността му в децидуализирани за 10 дни ДСК, както и с тази в съответстващите им

нетретирани контроли. Експресията на гена за пролактин отразява децидуализацията/диференциацията на ДСК клетките, тъй като активността му



Фигура 1. *In vitro* децидуализация на изолираните ДСК. (а) Схема на експеримента. Съкращения: П - прогестерон, Е - β -естрадиол и цАМФ – цикличен аденозин монофосфат. **(б) и (в)** Светлинно-микроскопските снимки показват реакцията на децидуализация на ДСК, която се вижда чрез морфологичната промяна в някои клетки. **(б)** Фибробласто-подобна морфология на нетретирани клетки. **(в)** Децидуализирани клетки (ден 7 децидуализация) с полигонална морфология и увеличен размер (стрелки). **(г) и (д)** Секреция на пролактин в културалната среда. ELISA тест. **(г)** Диаграмата представя нивото на секретирани пролактин от всяка една от изследваните първични култури. Отделните клетъчни линии са представена с различен цвят. **(д)** Диаграмата представя обобщени резултати за секрецията на пролактин от всички изследвани култури по дни. Средните стойности на секретирания пролактин на 6, 10 и 14 ден са показани със стандартна грешка (\pm SEM). (Paired t test; * $P < 0.05$). **(е)** Графиката показва активността на гена за пролактин в изолираните ДСК-линии на първи пасаж, в децидуализирани и нетретирани за 10 дни ДСК линии. Отклоненията представят средна стойност на експресия \pm стандартна грешка. PCR; Paired (червено) (децидуализирани/недецидуализирани) и Unpaired (черно) (пасаж 1 нетретирани/децидуализирани и пасаж 1 нетретирани/недецидуализирани) t test; * $P < 0.5$.

на ден 10-ти на децидуализация (фиг. 1е) корелира със секрецията на хормона в културалната среда при третирани клетки (фиг. 1д). В групата на нетретирани ДСК бяха отчетени липса на секреция на пролактин, съответстваща на неактивност на неговия ген (фиг. 1д, 1е). Резултатите показаха липса на активност на гена за пролактин в ДСК-линиите още на 1^{ви} пасаж (фиг. 1е), видно от липсата на статистическа разлика в броя копия на съответстващата мРНК в клетките на първи пасаж и нетретирани клетки на 3^{ти}/5^{ти} пасаж. И двете групи показаха статистически по-ниски нива на експресия на гена спрямо групата на децидуализираните клетки с разлика в броя копия мРНК за пролактин съответно 460 пъти за нетретирани клетки и 433 пъти в клетките на първи пасаж.

2 Имунни свойства на ДСК. Изследване на свойствата на ДСК в антигенното представяне.

2.1 Роля на ДСК като антиген-представящи клетки. Сравнителен анализ между ДСК и професионални антиген-представящи клетки

Децидуата (хормонално-трансформиранят ендометриум) е физиологичната ниша в майчиния организъм, в която се осъществява директен алогенен контакт с плацентарните структури. Тя е населена от тъканно-специфични имунни популации, между които и антиген-представящи клетки (АПК). Основният тип АПК в децидуата са макрофагите (Мф), но се срещат и зрели дендритни клетки. Освен АПК с класически фенотип, в децидуата се срещат и клетки, които едновременно експресират маркери, характерни и за Мф, и за дендритни клетки. Смесеният Мф/дендритни клетки фенотип на тази популация предполага, че това са клетки в междинен етап на диференциране, или отделна субпопулация клетки.

Според някои изследвания изолираните от човешка децидуа от първи триместър ДСК проявяват сходство с професионални АПК. Допускането се основава на факта, че подобно на незрели дендритни клетки, ДСК фагоцитират и подобно на зрели дендритни клетки, ДСК експресират необходимите за Т-

клетъчно активиране HLA-DR и ко-стимулаторните молекули CD80 и CD86. Освен това е установено, че ДСК са способни да предизвикат пролиферация на алогенни Т лимфоцити. За да изследваме способността на изолираните тук ДСК да функционират като професионални АПК, те бяха сравнени със зрели дендритни клетки.

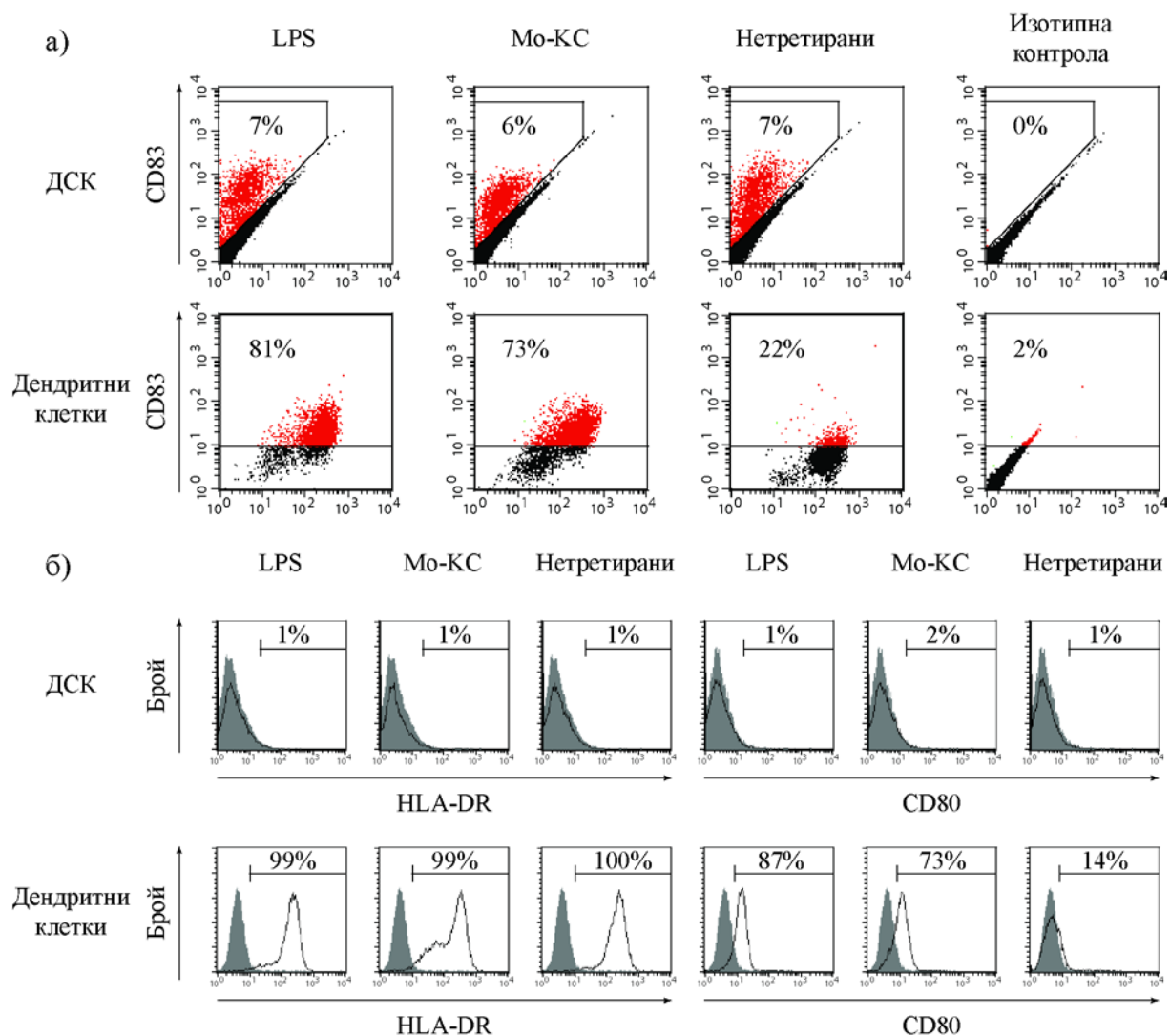
В *in vitro* условия дендритните клетки, наподобяващи тези, описани в тъканите, могат да се получат от периферни моноцити. Третирането им с цитокините IL-4 и GM-CSF превръща моноцитите в адхерентни, незрели дендритни клетки, неекспресиращи CD83, а последващо третиране с възпалителни фактори като IL-1- β , IL-6, TNF- α , PGE₂, кондиционирана среда от активирани периферни моноцити или бактериални компоненти като LPS, води до пълното диференциране на дендритните клетки. В крайно диференцирано състояние те експресират гликопротеина CD83, ко-стимулаторната молекула CD80 и молекулата от комплекса за тъканна съвместимост II клас HLA-DR и са способни да активират алогенни Т лимфоцити в смесена лимфоцитна реакция (СЛР).

В настоящата работа беше проверено дали ДСК могат да функционират като професионални АПК. Клетки от децидуални култури (n=6) бяха третирани с 50 ng/ml LPS или 30% v/v кондиционирана среда от моноцити (Мо-КС) за 60 часа. LPS е компонент от клетъчната стена на грам негативни бактерии, който чрез сигнализация през рецепторите CD14 и TLR4 активира АПК. Мо-КС е културална среда от активирани моноцити, богата на про-възпалителни цитокини (IL-1- β , IL-6, TNF- α , IFN- α). За получаването ѝ периферни моноцити бяха третирани с поликлонален имуноглобулинов прерат (Имуновенин) на антитела от клас IgG.

Третирането с 50 ng/ml LPS и 30% v/v Мо-КС беше приложено и на *in vitro* получени от периферни моноцити незрели дендритни клетки, спрямо които бе оценена експресията на CD83, CD80 и HLA-DR от ДСК, както и способността им да активират алогенни Т-лимфоцити.

Резултатите показаха повишаване на експресията на CD80 и CD83 молекулите в популацията на незрелите дендритни клетки след третирането им с

LPS или Мо-КС и превръщането им в зрели дендритни клетки. При тях процентът на експресиращи ко-стимулаторната молекула CD80 клетки се



Фигура 2. Експресия на CD83, HLA-DR и CD80 от ДСК след стимулиране с LPS и Мо-КС. (а) Представителни двупараметрови хистограми; отразяват процента на CD83-експресиращи клетки децидуални култури (ДСК) и дендритни клетки, след третиране с LPS или Мо-КС. **(б)** Хистограми, отразяващи експресията на CD80 и HLA-DR от ДСК и дендритни клетки (изотипна контрола – плътно сиво; специфично оцветяване – черна линия). FACS-анализ. Процентите на хистограмите отразяват процент положителни клетки. Съкращения: LPS – липополизахарид, Мо-КС: - кондиционирана среда от Имуновенин-активирани периферни моноцити (метод 3.2.10.).

повиши с 6.2 пъти под въздействие на LPS и с 5.2 пъти при третиране с Мо-КС (фиг. 2б). Процентът на експресиращи CD83 клетки нарастна с 3.7 пъти под

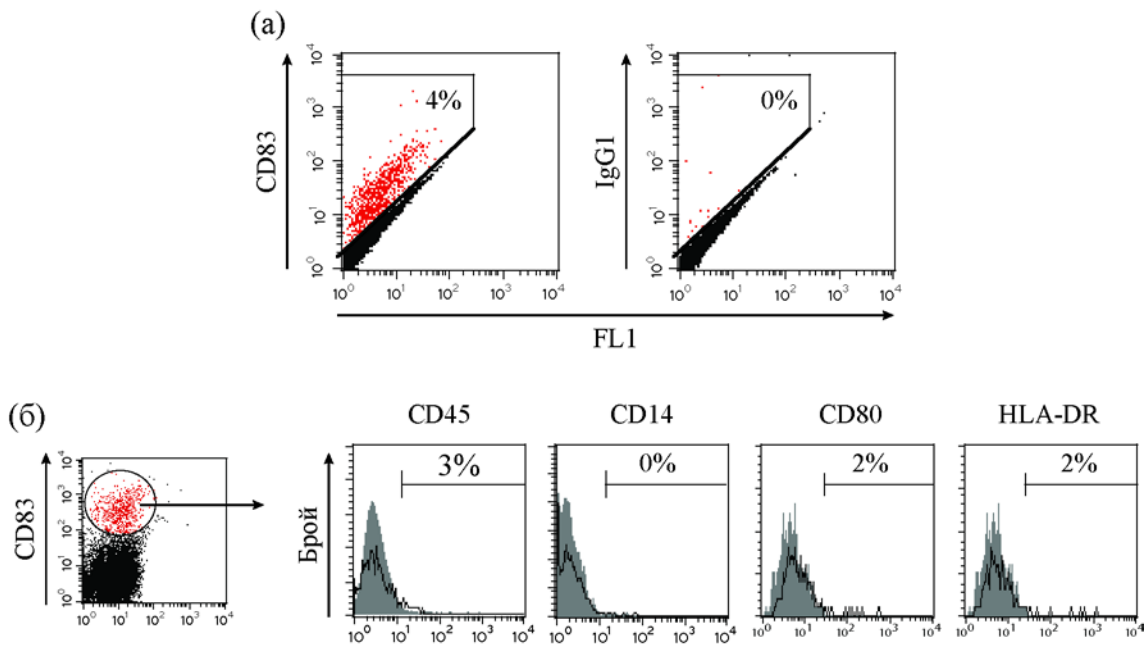
въздействие на LPS и с 3.3 пъти при третиране с Мо-КС (фиг. 2а). В допълнение, HLA-DR молекулата бе експресирана върху >99% от клетките, както в нетретираните, така и в третираните клетки (фиг. 2б). Описаният профил на повърхностни маркери доказва съзряването на дендритните клетки под въздействие на LPS или Мо-КС. За разлика от професионалните антиген-представящи клетки, клетките в децидуалните култури не показаха експресия на CD80 и HLA-DR (<2%) при третиране с LPS, както и при третиране с Мо-КС (фиг. 2б). В ДСК културите обаче бе установена експресия на CD83, дори и в нетретираните клетки, която оставаше стабилна и не се повлия от третирането на клетките с LPS или Мо-КС (фиг. 2а). Средният процент CD83^{pos} ДСК в културите ± стандартна грешка беше 5.9±0.9 в нетретираните култури, 6.5±1.1 при третиране с LPS и 5.4±1.1 при третиране с Мо-КС.

2.2 Имунотипна характеристика на CD83^{pos} ДСК

Мембранната форма на гликопротеина CD83 се експресираща от активирани имунни клетки (В лимфоцити, Т лимфоцити, активирани макрофаги), зрели дендритни клетки, туморни клетки и фибробласти и не се експресираща от мезенхимни стромални/стволови клетки. Тези данни поставят въпроса, дали експресията на CD83 в ДСК-линиите е свързана с фило- и онтогенетичната връзка на ДСК с фибробластни клетки или експресията ѝ е свързана с активирани клетки с хематопоеичен характер. За да отговорим на въпросите, CD83 експресията беше изследвана в ДСК-линии, подържани при стандартни условия на култивиране, като характеристиката бе допълнена с изследване на експресията на хематопоеични маркери от CD83-експресиращите ДСК в културите.

Изследването на експресията на имунорегулаторната молекула CD83 от ДСК в условия на *in vitro* култивиране показва наличие на клетки, експресиращи мембранна форма на гликопротеина (CD83^{pos} ДСК) (фиг. 3а) във всички изследвани ДСК-линии (n=14). Броят на CD83-позитивните клетки в различните линии варираше между 3% и 20% от общата популация клетки. Допълнителната характеристика на CD83^{pos} клетките показва, че те не експресират рецепторите

CD45 (n=10), CD14 (n=10), CD80 (n=10) и HLA-DR (n=10) и не представляват преживели макрофаги или АПК (фиг. 3б). В заключение беше прието, че част от ДСК в първичните култури експресират гликопротеина CD83.

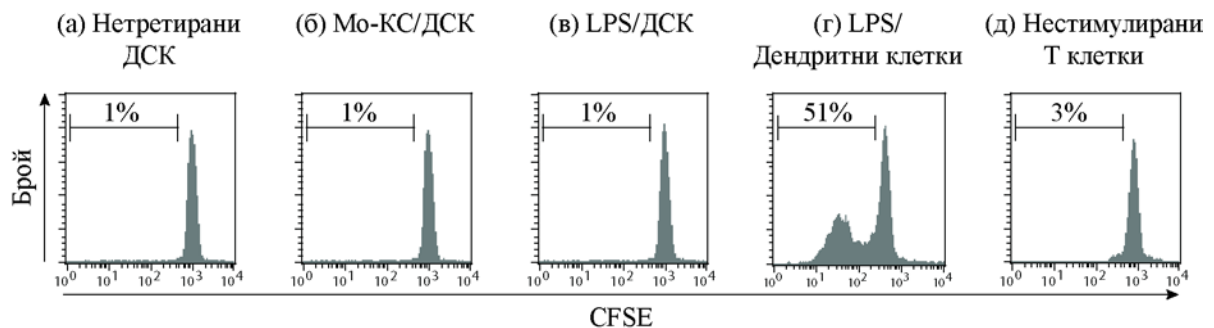


Фигура 3. Мембранна експресия на CD83 от клетки в първични култури ДСК. (а) На двупараметровата хистограма е показана мембранната експресия на CD83 молекулата от фракция ДСК и липса на неспецифично оцветяване, показана чрез оцветяване с изотипна контрола. Представителен FACS-анализ. Процентите отразяват процента позитивни клетки. (позитивните клетки – червено, негативните клетки – черно). **(б)** Представителни хистограми, отразяващи липсата на експресия на общия левкоцитен антиген CD45 и характерните за АПК молекули CD80, CD14 и HLA-DR от CD83^{pos} ДСК в културите. Процентите на хистограмите отразяват процента позитивни по съответния маркер клетки. FACS анализ.

Експресията на мембранната форма на CD83 от АПК играе ключова роля в активирането на алогенни Т лимфоцити. Блокирането на експресията на CD83 от дендритни клетки, при запазена експресия на HLA-DR и ко-стимулаторните молекули CD80 и CD86, води до понижаване на способността им да стимулират Т лимфоцити в СЛР, оценено чрез понижена степен на пролиферация на Т клетките, съпроводена с нарушение в цитокиновата им секреция .

2.3 Имуногенност на ДСК

Ролята на експресията на CD83 от ДСК по отношение на имуногенността на културите, беше оценена чрез ко-култивиране на нетретирани и претретирани с LPS или Мо-КС първични децидуални култури (n=8) с алогенни, CFSE-белязани, периферни Т лимфоцити за 5 дни. Пролиферативният отговор на алогенните Т клетки бе оценен чрез степента им на CFSE-разреждане, отчетена чрез FACS и сравнен с отговора на Т клетки, предизвикан от диференцирани с LPS, зрели дендритни клетки.



Фигура 4. Пролиферативен отговор на алогенни Т лимфоцити в контакт с LPS- и Мо-КС-претретирани ДСК. Двупараметровите хистограми отразяват пролиферацията на CFSE-оцветени, негативно сортирани, алогенни Т лимфоцити, след контакт с (а) нетретирани, (б) пре-третирани с LPS или (в) пре-третирани с Мо-КС ДСК. Т-клетъчният пролиферативен отговор е сравнен с този, предизвикан от (г) диференцирани с LPS дендритни клетки и (д) нестимулирани Т клетки, култивирани самостоятелно. FACS-анализ. Процентите в хистограмите отразяват процента Т клетки, разреждали CFSE-багрилото, като процент от общата популация Т лимфоцити в съответната ко-култура.

Резултатите показаха, че контактът на Т лимфоцити с ДСК не води до пролиферация на Т клетките (фиг. 4а). В допълнение, стимулирането на ДСК с LPS (фиг. 4в) или Мо-КС (фиг. 4б) не повлия на тяхната способност да активират Т клетките, като във всички експериментални условия Т лимфоцитите показаха нива на пролиферация сравними с тези, отчетени при нестимулираните Т клетки (фиг. 4д). За разлика от ДСК, крайно диференцираните с LPS дендритни клетки доведоха до пролиферация на ~50% от алогенните Т лимфоцити в СЛР (фиг. 4г).

Обобщение:

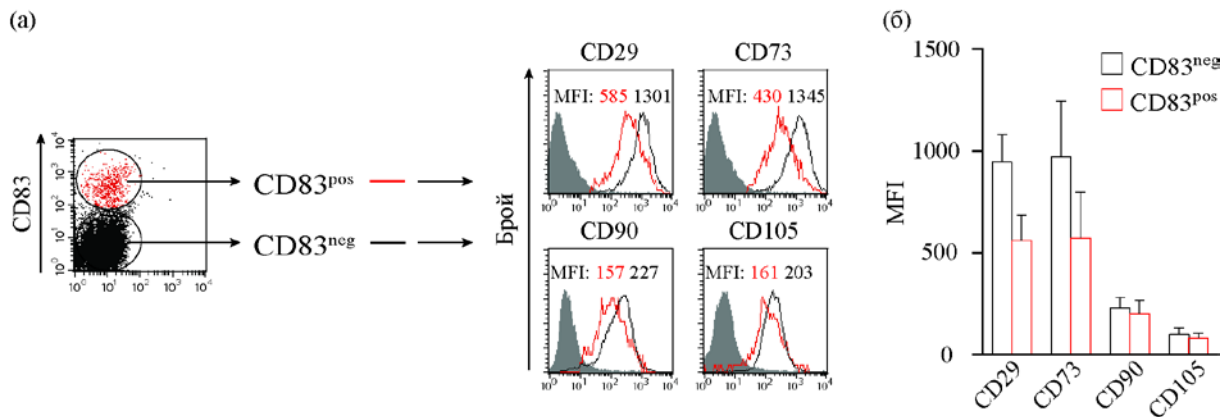
Проведените експерименти показаха, че субпопулация от ДСК експресира мембранната форма на CD83 рецептора. За разлика от експресията на молекулата от професионални АПК, при които тя е свързана с диференцирането им и има значение за активирането на алогенен имунен отговор, експресията на CD83 от ДСК не се влияе от провъзпалителни и бактериални фактори, остава стабилна и не променя имуногенността на клетките. В заключение, клетките в първичните децидуални култури, експресиращи мембранната форма на CD83, не функционират като професионални антиген-представящи клетки.

3 Експресия и регулация на CD83 от ДСК

3.1 Анализ на ДСК, експресиращи мембранна форма на рецептора CD83 (CD83^{pos} ДСК)

В културите от ДСК беше установена фракция от клетки, които експресират рецептора CD83. Мембранната форма на CD83 в АПК се експресира при диференциране на клетките заради което беше допуснато, че експресията на молекулата от ДСК отразява етап от диференциацията им. Тази хипотеза беше проверена чрез сравняване на CD83^{pos} и CD83^{neg} ДСК по някои характеристики, променящи се при диференциране на клетките, като например експресия на повърхностни маркери и клетъчна пролиферация. Диференциацията на ДСК настъпва в процеса на децидуализация в отговор на променящите се нива на овариалните хормони. Затова беше изследвано влиянието и на децидуализацията върху експресията на CD83 от ДСК.

Установено е, че по-ниска експресия на мезенхимно-стромалните маркери CD29, CD73, CD90 и CD105, експресирани от ДСК, се наблюдава при промяна в някои биологични свойства на клетките, като миграция и адхезия (CD29, CD73), пролиферация (CD105) и диференциационна пластичност (CD90). Затова беше изследван профилът им на експресия от CD83^{pos} и CD83^{neg} ДСК, като индикатор за диференциацията на ДСК.



Фигура 5. Експресия на повърхностни, мезенхимно-стромални маркери от CD83^{pos} и CD83^{neg} ДСК. (а) Представителни хистограми, показващи експресията на маркерите CD29, CD73, CD90 и CD105 от CD83^{pos} ДСК (червена линия) и CD83^{neg}. (черна линия) ДСК, насложени върху сигнала от изотипната контрола (плътно сиво). Цифрите, в съответствие с популацията цвят, отразяват средния интензитет на флуоресценцията (mean fluorescence intensity - MFI). FACS-анализ. (б) Графиката представя сравнителен анализ на експресията на мезенхимни стромални маркери от CD83^{pos} и CD83^{neg} клетки в първични култури. Степента на експресия на маркерите е представена чрез средната стойност на флуоресценцията (MFI) за дадения маркер (FACS-анализ) за CD83^{pos} (червени стълбчета) и CD83^{neg} (черни стълбчета) субпопулации клетки ± стандартната грешка. (Unpaired t test).

За целта, CD83^{neg} и CD83^{pos} ДСК бяха разграничени с анти-CD83 антитяло, а експресията на мезенхимните маркери от двете субпопулации клетки беше изследвана чрез оцветяване с антитела срещу CD29, CD73, CD90 и CD105 (фиг. 5а). Резултатите показаха, че CD83^{pos} ДСК експресираха мезенхимно-стромалните маркери CD29 (n=4), CD73 (n=4), CD90 (n=6) и CD105 (n=6) (фиг. 5а), но в по-ниска степен от CD83^{neg} ДСК (фиг. 5а, 5б).

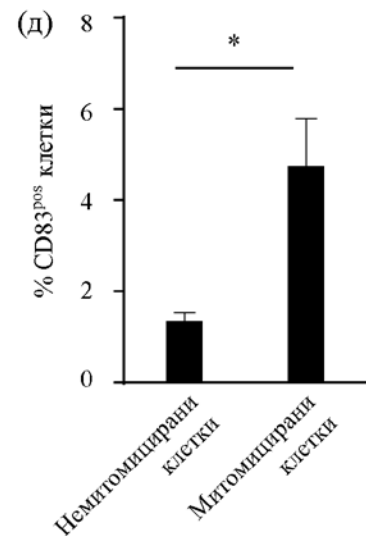
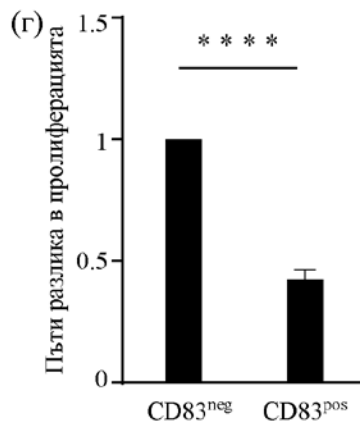
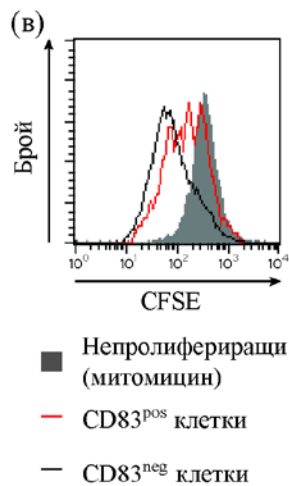
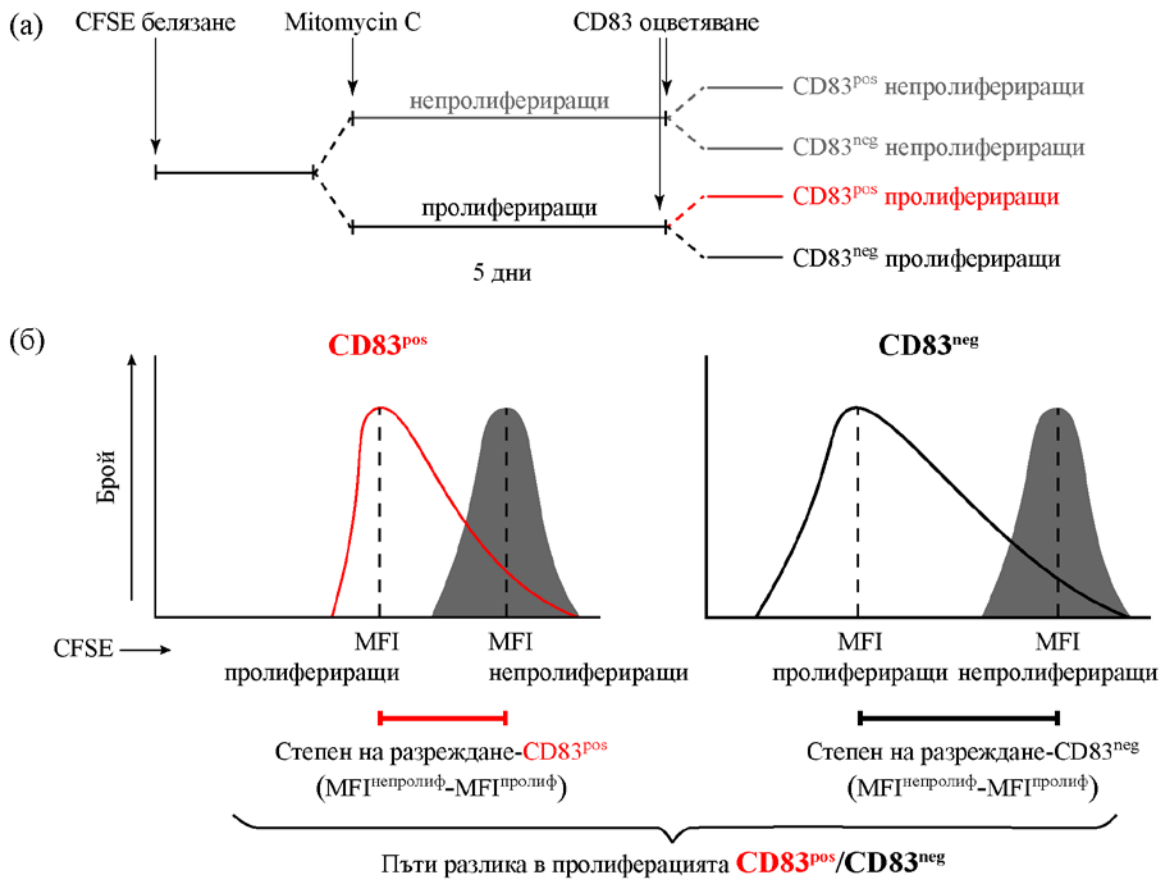
3.2 Механизъм на поддържане на първичните ДСК култури.

Известно е, че поддържането на клетъчната маса в *in vitro* култури от ЕСК/ДСК, подобно на останалите МСК, зависи от клетки, които притежават висок пролиферативен потенциал и способност за самообновяване. Макар и малък брой, тези клетки-родоначалници успяват да изпълнят определен брой деления и да съхранят културата в рамките на ограничен брой

посявания/пасажирания. Доказателство за наличието на клетки в различен етап от жизнения си цикъл и съответно потенциал на делене е факта, че част от клетките отмират при пасажиране, а друга част от клетките продължават да се делят. Наличието на гликопротеина CD83 върху повърхността на някои от клетките предположи, че хетерогенността в експресията на този маркер може да отразява различен етап от жизнения цикъл или степен на диференциация на ДСК в културата. За да се провери тази хипотеза пролиферационната активност на CD83^{pos} и CD83^{neg} беше проследена.

3.2.1 Пролиферация на CD83^{pos} ДСК в първичните култури.

Поддържането на субпопулациите CD83^{pos} и CD83^{neg} ДСК в културите беше изследвана, чрез отчитане разреждането на виталното багрило CFSE с FACS-анализ. CFSE се свързва с цитоплазмените и мембранните белтъци и намалява интензитета си на флуоресценция с всяко клетъчно делене. ДСК от първични култури (n=7) бяха оцветени със CFSE (фиг. 6а). След оцветяването, част от клетките бяха доведени до митотичен арест чрез третиране с MitomycinC, а останалите клетки бяха оставени да пролиферират в продължение на 5 дни (фиг. 6а). Накрая ДСК бяха оцветени с антитяло срещу CD83 (фиг. 6а), което позволи да се оцени пролиферацията на CD83^{pos} и CD83^{neg} клетки. Разреждането на CFSE от всяка фракция беше сравнено със съответните непролифериращи клетки (фиг. 6а). За всяка субпопулация клетки беше отчетен средния интензитет на флуоресценция (MFI) на CFSE-багрилото (фиг. 6б). Клетъчната пролиферация беше отчетена чрез степента на разреждане на CFSE, изчислена по формулата $MFI^{\text{непролифериращи}} - MFI^{\text{пролифериращи}}$ (фиг. 6б). Резултатите показаха, че клетки от двете ДСК субпопулации - CD83^{neg} и CD83^{pos} пролиферират, но с различен интензитет. Отчетливо се разграничи голямо разреждане на CFSE в CD83^{neg} субпопулация, което показва че почти всички CD83^{neg} клетки участваха в поддържането на



Фигура 6. Пролiferативна активност на CD83^{pos} ДСК. (а) Схема на експеримента. (б) Формула за изчисление на клетъчна пролиферация, чрез схематично представяне на FACS-хистограми, представящи CFSE-разреждането от пролифериращи и непролифериращи CD83^{pos} и CD83^{neg} ДСК. На схемите са означени отчитаните параметри и прилагането им в изчисленията на пролиферацията. MFI – median fluorescence intensity (средна стойност на флуоресценция). (в) Представителната хистограма отразява разреждането на CFSE от

CD83^{pos} (червена линия) и CD83^{neg} (черна линия) ДСК субпопулации, насложени върху CFSE-сигнала от MitomycinC-третиранни, непролифериращи клетки (плътно сиво). FACS-анализ. (г) Графиката отразява пролиферацията на CD83^{pos} клетки след нормализиране на стойностите към пролиферация на CD83^{neg} клетки, приета за единица; Стълбчето на CD83^{pos} отразява средна стойност на пъти разлика±стандартната грешка (Unpaired t test; ****P < 0.0001). (д) Графиката отразява сравнение на процента CD83-експресиращи клетки (CD83^{pos}) в пролифериращите (немитомизиранни) и непролифериращи фракции (митомизиранни) на първичните ДСК култури; Стълбчетата отразяват средна стойност±стандартната грешка (Paired t test; *P < 0.05).

ДСК културите. За разлика от тях, CD83^{pos} демонстрираха по-ниска степен на пролиферация. Освен това беше установено, че част от CD83^{pos} клетките в културите не пролиферираха, тъй като техният CFSE интензитет съвпадна с този на митомизираните клетки (фиг. бв). Изчисляването на степента на разреждане на CFSE показва, че CD83^{neg} клетки разреждаха багрилото в по-голяма степен в сравнение с CD83^{pos} клетките, като пролиферацията на CD83^{pos} клетките представяваше средно 0.4 от тази на CD83^{neg} клетки приети за единица мярка (фиг. бг). Статистически значимото забавяне в пролиферацията на CD83^{pos} клетки, както и присъствието на непролифериращи CD83^{pos} клетки в културите, предположиха корелация между появата на мембранната CD83 форма и понижен потенциал за клетъчно обновяване. В допълнение към анализите беше проследено и разпределението на CD83 мембранно-експресиращите ДСК в пролифериращите (немитомизиранни) и непролифериращите (митомизиранни) ДСК. Резултатите показаха 3.6 пъти по-висок процент на CD83^{pos} клетки в митомизираните ДСК със среден процент позитивни клетки±стандартна грешка 4.7±1, сравнено с 1.3±0.2% CD83^{pos} клетки в пролифериращите, немитомизиранни ДСК (фиг. бд), което отново потвърди наличието на връзка между положителния CD83 фенотип и понижената пролиферативна активност на ДСК. Не се изключва възможността свързването на CFSE багрилото да променя експресията на CD83 от ДСК, но тази вероятност не беше обект на настоящото изследване.

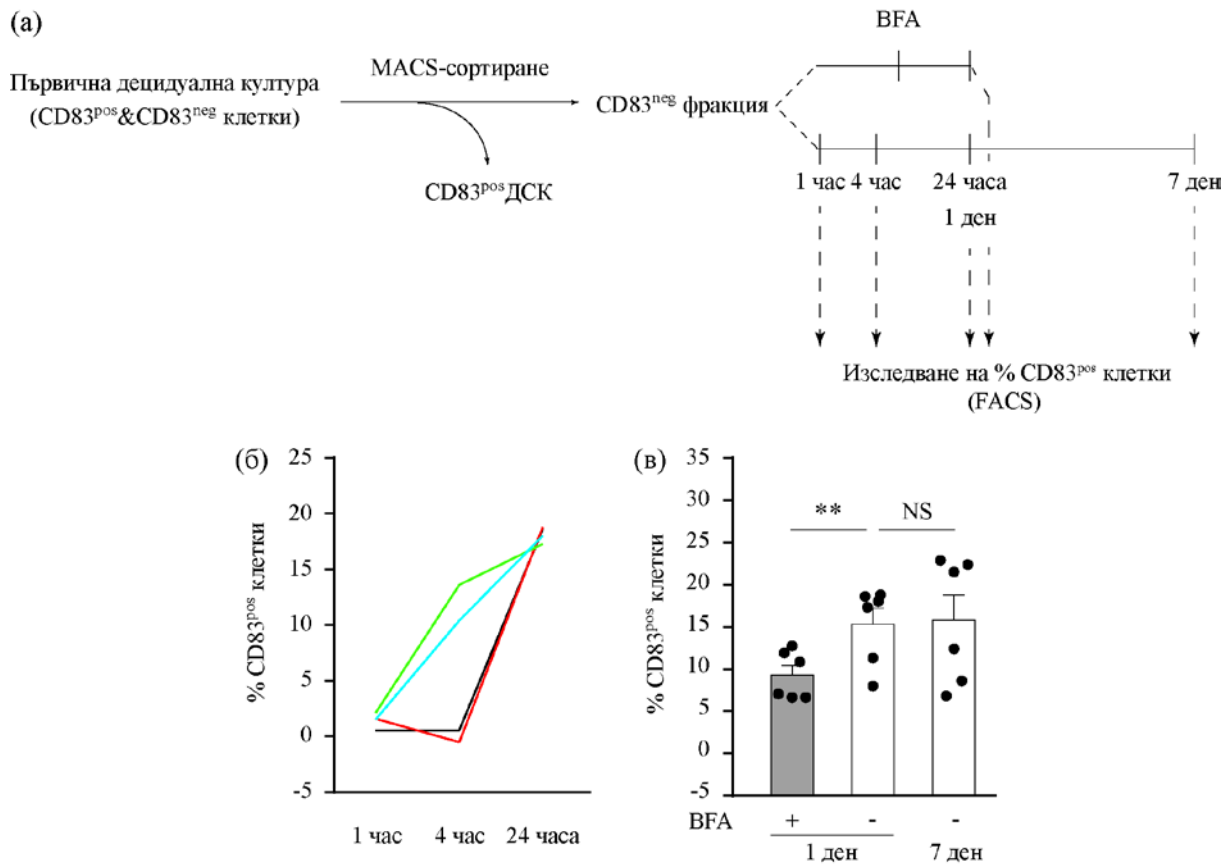
Обобщено, забавянето в пролиферацията на CD83^{pos} клетките, присъствието на непролифериращи CD83^{pos} клетки в културите и по-високият процент на CD83^{pos} в непролифериращите фракции, показаха връзка между

експресията на гликопротеина с етапа в жизнения цикъл на ДСК. Освен това забавянето в пролиферацията на клетките, както и крайният митотичен арест, са свързани с крайната диференциация на соматичните клетки, което предполага, че мембранната експресия на CD83 се засилва с напредване на диференциацията на тези клетки.

3.2.2 Регулация на CD83 в ДСК.

Забавената пролиферация и понижената степен на експресия на мезенхимните маркери показаха, че CD83^{pos} са ДСК, претърпяващи определена диференциация. Това предполага, че CD83^{pos} ДСК се диференцират от недиференцирани, прекурсорни клетки - CD83^{neg} ДСК. За проверка на тази хипотеза беше проучена способността на CD83^{neg} да се превръщат в CD83^{pos} ДСК. За целта CD83^{pos} ДСК бяха отстранени от първичните децидуални култури (n=6) чрез MACS-сортиране по CD83 рецептора и появата на нови CD83^{pos} клетки във фракцията на CD83^{neg} ДСК бе проследена на 1-ви, 4-ти час, както и на 1-ви и 7-ми ден след сорта (фиг. 7а) чрез FACS-анализ. Част от CD83^{neg} ДСК бяха третирани с Brefeldin A (BFA) за 24 часа (фиг. 7а). Брефалдинът блокира клетъчния транспорт между ендоплазмения ретикулум и апарата на Голджи и пречи на транспорта на CD83 рецептора към клетъчната повърхност. Клетките, експонирани нови CD83 рецептори на повърхността си, са анализирани чрез проточна цитометрия. Отчитането на случайно преминали през колоната и попаднали в негативната фракция CD83^{pos} ДСК беше предотвратено чрез използването на клоната анти тяло, приложен за клетъчното сортиране, но конюгиран с различен флуорохром. Резултатите показаха, че още на първия час след сортирането в негативните клетъчни фракции се появяваха ДСК, експресиращи CD83 рецептора (фиг. 7б). Средният процент на позитивни клетки ± стандартна грешка беше 1.5 ± 0.3%. На 4-тия час след сортиране процентът на позитивни клетки варираше между 0 и 13.6 със средна стойност 6 ± 3.5% (фиг. 7б). Количеството на CD83^{pos} ДСК в негативните фракции постепенно нарастваше и на първия ден след сортирането културите достигаха стабилни нива на експресия, показано от липсата на статистически значима

разлика в процента позитивни клетки на 1-ви (15.3%±1.9) и 7-ми (15.8%±3) ден след сортирането (фиг. 7в). Експонирането на CD83 рецептори от CD83^{neg} клетки бе изследвано и чрез сравняване на процента позитивни клетки на 1-ви ден след сортирането от нетретирани клетки и такива, обработени с BFA.



Фигура 7. Поддържане на CD83^{pos}-субпопулацията в първични култури ДСК. (а) Схема на експеримента. **(б)** Процент CD83^{pos} ДСК в BFA-нетретирани CD83 негативни фракции, получени от различни линии ДСК, на 1-ви, 4-ти и 24-ти час след сортирането. Всяка линия ДСК е представена с различен цвят. **(в)** Графиката представя обобщените резултати от анализа на процента CD83^{pos} ДСК, появяващи се в BFA-нетретирани CD83 негативни фракции на 1-ви, 7-ми ден (бели стълбчета) и на 1-ви ден в третирани с BFA негативни фракции (сиво стълбче). Стълбчетата отразяват средна стойност±стандартната грешка. (Paired t test; ** P<0.01). Съкращения: BFA - Brefeldin A, MACS – magnetic activated cell sorting.

Резултатите показаха, че в клетките, в които клетъчният транспорт бе блокиран, средният процент на позитивни клетки беше 9.3±1.2%, което е с 1.6 пъти по-малко от процента позитивни клетки в същите фракции, но без

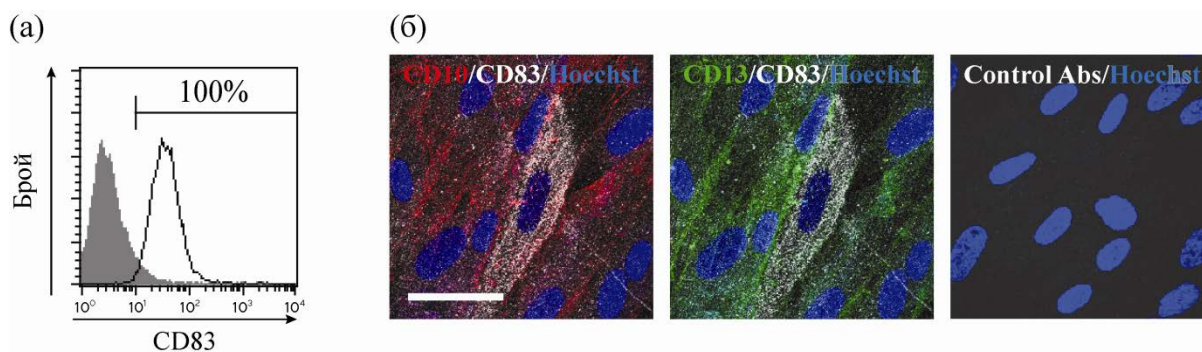
блокиране на транспорта (фиг. 7в). Наблюдаваното спонтанно възстановяване на CD83^{pos} фенотип в част от ДСК показва съществуването на присъща хетерогенност, която е необходима за стабилността на всяка клетъчна култура.

В заключение, CD83^{neg} ДСК могат да се превръщат в CD83^{pos} ДСК, чрез експониране на CD83 рецептора на клетъчната си повърхност. Обобщено, пултът от CD83^{pos} ДСК в културите се поддържа чрез слаба пролиферация на позитивните клетки, както и чрез превръщане на CD83^{neg} в CD83^{pos} ДСК.

Достигането на стабилни нива на броя на позитивни клетки в културите още на първия ден след сортирането показва, че експонирането на рецептори върху повърхността на CD83^{neg} клетки се дължи на транспорта на предварително синтезиран, интрацелуларен пул от CD83. Експонирането на мембранната форма на CD83 от вътреклетъчен пул от предварително синтезиран протеин е наблюдавано при моноцити, макрофаги и дендритни клетки. При тях процесът на активиране води до експониране на протеина върху клетъчната повърхност от предварително синтезиран вътреклетъчен пул, а не от стимулиране на *de novo* синтеза на протеина, тъй като третирането им с BFA води до по-слаба мембранна експресия на протеина, оставаща непроменена при блокиране на белтъчния синтез в клетките. Мембранната експресия на CD83 при моноцити, макрофаги и дендритни клетки, засяга всички клетки в изследваните популации и съответно, вътреклетъчна експресия на протеина е наблюдавана при всички клетки в популациите. Това постави въпросът, какъв процент от клетките в ДСК-културите синтезират и експресират вътреклетъчен CD83 протеин.

3.3 Вътреклетъчна експресия на CD83 в ДСК

Интрацелуларната експресия на CD83 от ДСК беше изследвана чрез FACS и имунофлуоресцентна микроскопия. Комбинирането на двата метода даде възможност да се определят вътреклетъчното разпределение, интензитета на експресия на CD83, както и процента на CD83 експресиращите клетки. Интрацелуларната експресия на CD83 от ДСК беше изследвана чрез FACS след пермеабелизиране на клетките и оцветяване с анти-CD83 антитяло.

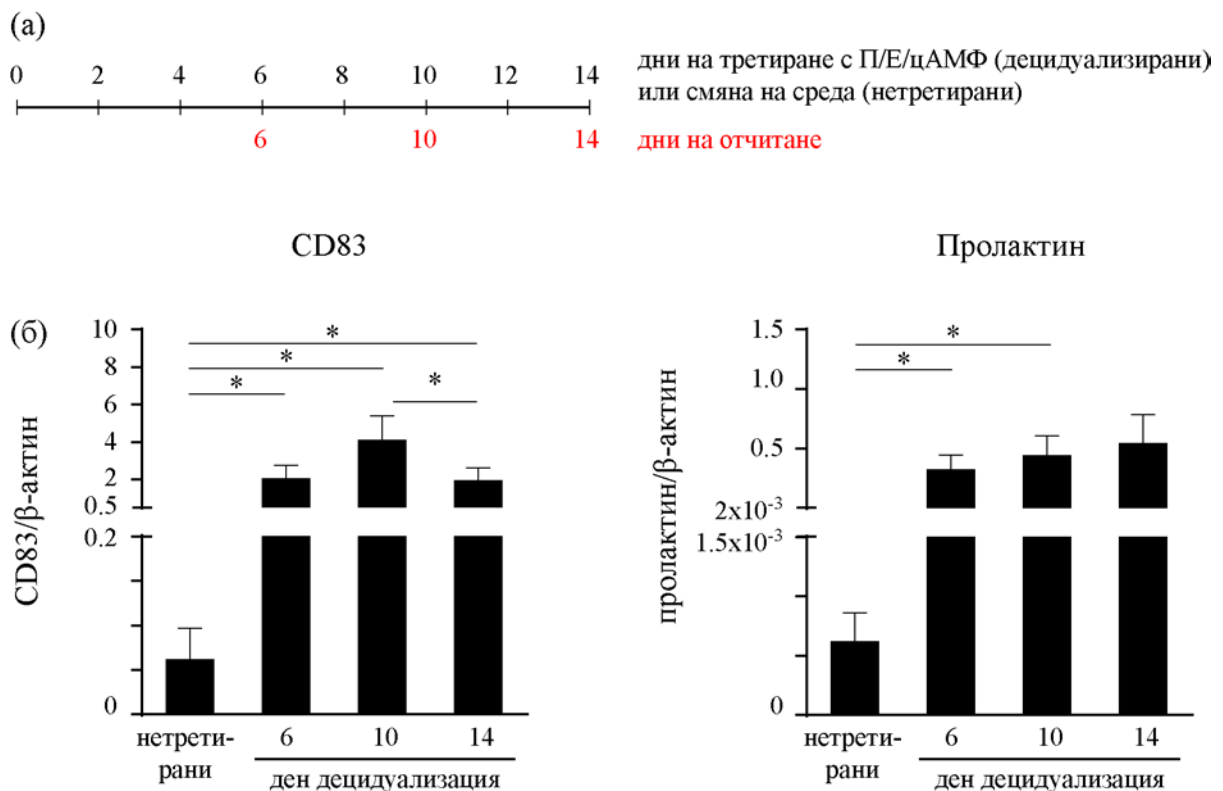


Фигура 8. Вътреклетъчна експресия на CD83 в ДСК. (а) Представителна хистограма, показваща вътреклетъчна експресия на CD83 молекулата в първична култура на ДСК. FACS-анализ (изотипна контрола – плътно сиво, специфично оцветяване – черна линия). (б) Имуноресцентно оцветяване на CD83 (сиво), CD10 (червено) и CD13 (зелено) в ДСК. Ядрата на клетките са оцветени с Hoechst 33258 (синьо). Маркерът е с размер 50µm.

Резултатите показаха, че за разлика от ограничената мембранна експресия на CD83 от ДСК, всички клетки в изследваните ДСК-линии (n=10) експресират интрацелуларната форма на протеина (фиг. 8а). Гаусовото разпределение на клетките в популацията (фиг. 8а) показва наличие на клетки с различен интензитет на експресия на интрацелуларен CD83 във всяка ДСК-линия. Вътреклетъчната локализация на CD83 бе изследвана чрез имуноресцентна микроскопия. Клетките бяха едновременно оцветени с антитела срещу CD83, CD10 и CD13. Микроскопското наблюдение показва фибробласто-подобни ДСК, като всички клетки в културите експресираха мезенхимно-стромалните маркери CD10 и CD13 (металопротеинази). За разлика от тях, експресията на CD83 в ДСК беше с различен интензитет, съответстващо на гаусовото разпределение на клетките в културите, наблюдавано при изследването им чрез FACS-анализ. Фиг. 8б показва единична клетка със силна експресия на CD83, заобиколена от клетки с по-слаба експресия на протеина. Резултатите показаха варираща по интензитет интрацелуларна експресия на CD83 във всички ДСК в първичните култури.

3.4 Регулация на CD83 експресията от процеса на децидуализация на ДСК.

Децидуализацията на стромалните клетки е закономерен процес, който обхваща периода на подготовка на маточния ендометриум за бременността и продължава след имплантацията на ембриона. През този период се установява положителна регулация на редица имуно-регулаторни молекули в диференциращите се ДСК. Именно това постави въпроса, дали експресията на CD83 в ДСК също зависи от процеса на децидуализация.



Фигура 9. Зависимост на *cd83* експресията в ДСК от факторите на децидуализация. (а) Схема на третиране на първични линии ДСК с П -прогестерон, Е - естрадиол и цАМФ – цикличен аденозин монофосфат за 6, 10 и 14 дни. (б) Графиките представят експресията на *cd83* и *пролактин* в нетретирани и децидуализирани ДСК, нормализирана към експресията на β -актин. Стълбчетата отразяват средната стойност на експресия на *cd83* и *пролактин* \pm стандартната грешка. qPCR анализ. (Paired t test; *P<0.05).

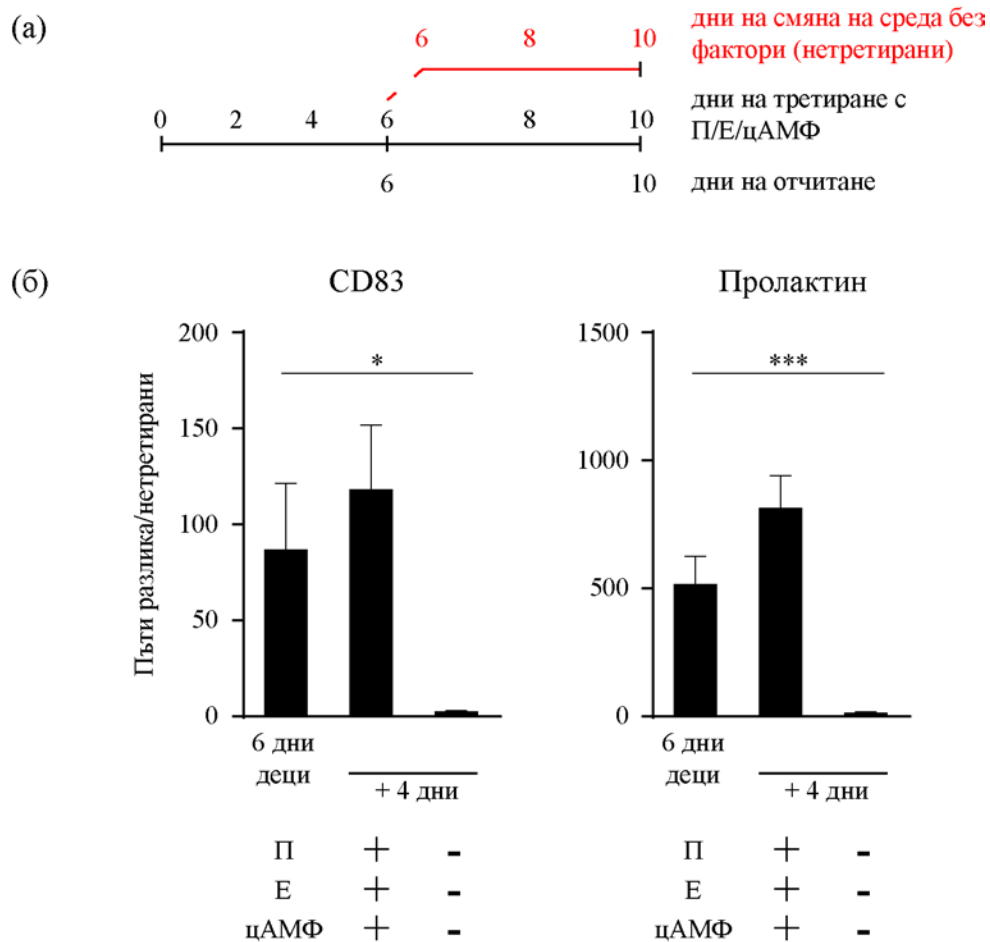
Активността на *cd83* гена бе изследвана в първични линии ДСК, децидуализирани *in vitro* с комбинация от хормоните прогестерон (П) и

естрадиол (Е) и цАМФ за 6, 10 и 14 дни (фиг. 9а). Децидуализацията на ДСК беше оценена чрез експресията на гена за пролактин.

Резултатите показаха активация на гена за *пролактин* (n=8), доказателство за успешната децидуализация на клетките. Като следствие от третирането, експресията на *пролактин*-гена (фиг. 9б) се повиши с 525 пъти на 6-ти ден, 714 пъти на 10-ти ден и 880 пъти на 14-ти ден при сравняване на експресията на гена с активността му в нетретирани клетки (фиг. 9б). Факторите, предизвикващи децидуализация, доведоха до активация и на *cd83* гена в първичните децидуални култури (n=10). При сравняване на активността на гена в децидуализираните клетки спрямо активността му в нетретирани клетки беше установено повишаване на експресията му с 34 пъти на 6-ти ден, 66 пъти на 10-ти ден и 32 пъти на 14-ти ден (фиг. 9б). Резултатите показаха значимо повишаване на експресия на *cd83* гена още на 6-ти ден от третирането, като тенденцията се запази до 10-тия ден на децидуализация (фиг. 9б). Впечатление прави, че активността на *cd83* гена на 14-ти ден беше статистически значимо понижена в сравнение с ден 10-ти от третирането със средно 2 пъти (фиг. 9б). Подобна флукутация при децидуализация е показана и за други цитокини и имунорегулаторни молекули, показващи двуфазов отговор към децидуализацията с повишаване на експресията им и последващо понижаване, за разлика от класическите маркери за децидуализация пролактин и IGFBP1, чиято експресия се повишава експоненциално. Наблюдението показва вероятност, CD83 молекулата да упражнява автоинхибиращ ефект по принципа на обратната връзка върху активността на гена си.

Настоящият експеримент показва, че експресията на *cd83* е в пряка зависимост от процеса на децидуализация. Комплексно приложени, факторите на децидуализация (прогестерон, естрадиол и цАМФ) са необходими за индуцирането на *cd83* гена, но дали те имат роля и за неговото поддържане беше проверено в следващия експеримент. За целта, ДСК бяха децидуализирани в продължение на 6 дни до достигане на значимо ниво на диференциация, след което клетките бяха разделени на две групи и съответно третирани с или без

фактори на децидуализация през следващите 4 дни (фиг. 10а). Активността на *cd83* и *пролактин* беше



Фигура 10. Поддържане на активността на *cd83* гена в ДСК от факторите на децидуализация. (а) Схема на третиране на първични линии ДСК с П - прогестерон, Е - естрадиол и цАМФ – цикличен аденозин монофосфат. (б) Графиките отразяват експерсията на *cd83* и *пролактин* в изследваните култури при 6 дни децидуализация (6 дни деци) и допълнителни 4 дни (+4 дни) със или без фактори на децидуализация. Стойностите на експерсията са нормализирани към съответните нетретирани ДСК. Стълбчетата отразяват средната стойност на разликата \pm стандартната грешка. qPCR анализ; (Paired t test, *P<0.05, *** P<0.001).

отчетена на 10-ти ден и в двете групи (фиг. 10а). Резултатите потвърдиха, че факторите на децидуализация поддържат диференцираното състояние на ДСК и високата активност на *cd83*, тъй като статистическа разлика в нивата на

експресия на *cd83* (n=10) и *пролактин* (n=8) между 6-ти и 10-ти ден в присъствие на хормони и цАМФ не бе наблюдавана (фиг. 10б). Изключването на факторите обаче доведе до статистически значимо понижаване на експресията и на *cd83*, и на *пролактин* със средно 34 пъти и за двата гена при сравнение с експресията на гените на 6-ти ден децидуализация в същите клетки (фиг. 10б).

В заключение, експресията на *cd83* гена зависи от факторите на децидуализация, които са необходими за индуциране на експресията му и за поддържане на високата му активност.

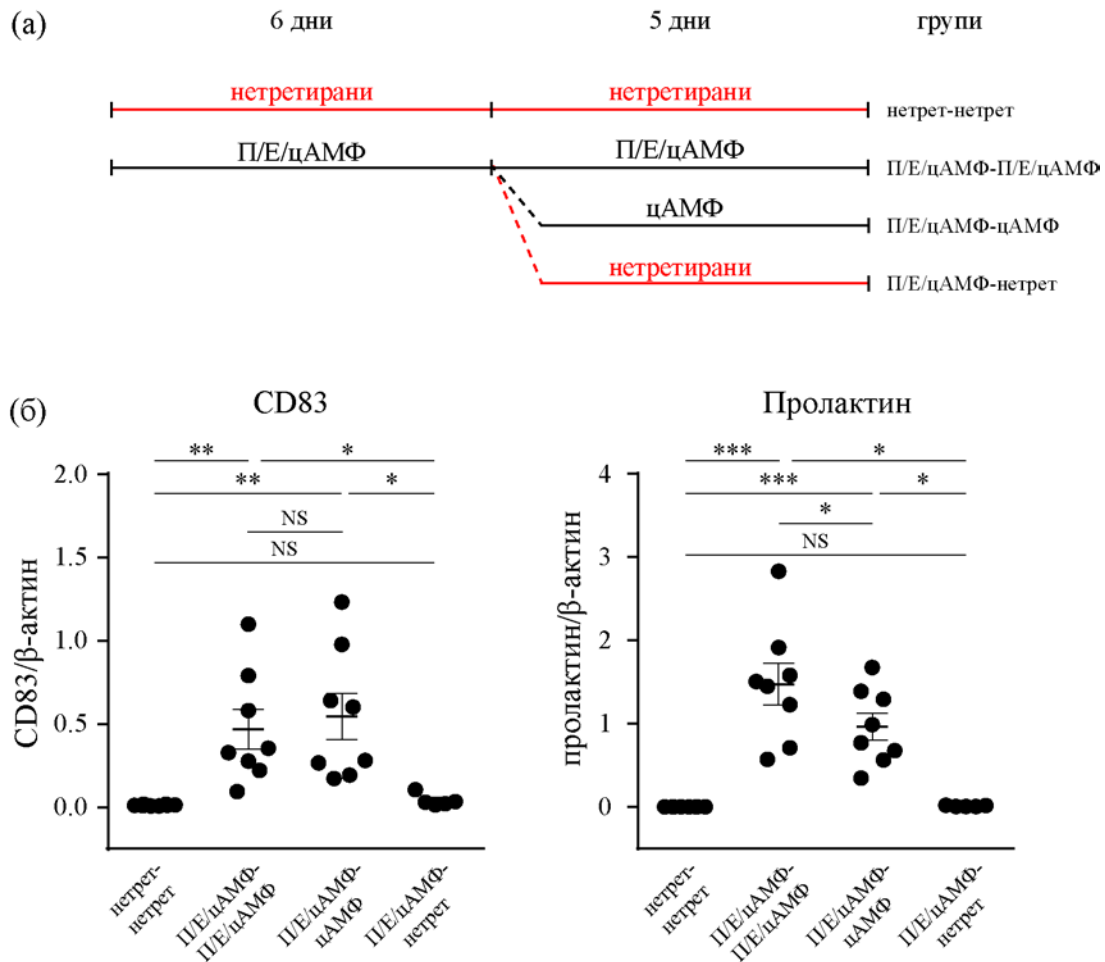
4 Определяне приноса на факторите на децидуализация, които повлияват CD83-експресията

След като бе установена зависимостта на експресията на CD83 от факторите на децидуализация, беше изследвано дали хормоните или цАМФ са водещ фактор за регулацията на CD83 експресията от ДСК. Ефектът им върху експресията на CD83 от клетките в първичните децидуални култури бе изследван на генно и протеиново ниво.

4.1 Генно ниво

Ролята на всеки от факторите за активацията на *cd83*-гена при децидуализация беше изследвана чрез третиране на ДСК с изключване на фактори от културите след предварително децидуализиране на клетките. За целта децидуални култури (n=8) бяха третирани за 6 дни с П, Е и цАМФ (фиг. 11а) до достигане на близка до максималната *in vitro* децидуализация. На ден 6, от културите бяха изключени или всички фактори (П/Е/цАМФ-нетрет), или само хормоните (П/Е/цАМФ-цАМФ) за 5 допълнителни дни. Експресията на *cd83* беше сравнена с експресията на гена в клетки, при които децидуализацията беше поддържана с пълната комбинация от фактори (П/Е/цАМФ-П/Е/цАМФ), както и с експресията му в нетретирани клетки (нетрет-нетрет) (фиг. 11а). Статистически достоверно средно увеличение на активността на *cd83*-гена при сравнение с активността му в нетретирани клетки беше установено при запазване на всички фактори в системата (38 ± 8 пъти, П/Е/цАМФ-П/Е/цАМФ) и при запазване

на цАМФ и изключване на хормоните (45±10 пъти, П/Е/цАМФ-цАМФ). Статистически значима разлика в експресията на гена между двете групи не беше установена, което показва, че водещ за активацията и експресията на *cd83* е цАМФ (фиг. 11б).



Фигура 11. Определяне на ролята на хормоните и цАМФ в експресията на *cd83* гена в ДСК. (а) Схема на третирането на първични децидуални култури с П, Е и цАМФ и означаване на третиранията и означаване на съответните групи. **(б)** Графиките отразяват експресията на *cd83* и *пролактин*, нормализирани към експресията на β -актин. За всяка група е представена средната стойност на експресия±стандартната грешка. qPCR анализ. (Paired t test; *P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001, NS-no significance).

Изключването на всички фактори от културите доведе до значимо понижаване на експресията на гена спрямо групите „П/Е/цАМФ-П/Е/цАМФ“ и „П/Е/цАМФ-цАМФ“. Освен това активността му в отсъствие на факторите в

групата „П/Е/цАМФ-нетрет“ беше само с 3 ± 1 пъти по-висока от активността на гена в нетретирани клетки (фиг. 11б), но без статистическа разлика в експресията между двете групи. Тези резултатите показват, че факторите на децидуализация са необходими за поддържане на активността на CD83-гена, тъй като в тяхно отсъствие нивата на съответните мРНК-и се доближават до базалните стойности на експресия в нетретирани ДСК. Слабо по-високите нивата на CD83-мРНК в групата „П/Е/цАМФ-нетрет“ може да се дължи на остатъчна експресия на мРНК или на висока стабилност на мРНК-ки за CD83, които не са деградирани в рамките на 5 дни след третирането. Полу-животът на мРНК за CD83 не е точно установен, но се знае, че в еукариотните клетки полу-животът на мРНК-и варира от 10 минути до няколко часа, а в някои случаи, като например еритроцитите, мРНК са стабилни до 120 дни.

Ефективността на въздействието на факторите на децидуализация върху третираните клетки беше потвърдена чрез изследване на генната активност на децидуализационния маркер пролактин. Сравняването на експресията на *пролактин*-гена в нетретирани и третираните с фактори децидуални клетки показва статистически значимо повишаване на експресията на гена в третираните клетки със средно 2830 ± 703 пъти в „П/Е/цАМФ-П/Е/цАМФ“ групата и 1886 ± 442 пъти в „П/Е/цАМФ-цАМФ“-групата. 1.5 пъти по-слабата експресия на гена при изключване на П и Е от системата, отчетено при сравняване на П/Е/цАМФ-П/Е/цАМФ“ и „П/Е/цАМФ-цАМФ“-групите, потвърждава синергичния ефект на хормоните и цАМФ за експресията на пролактин (фиг. 11б). Подобно на експресията на CD83-гена, експресията на гена за пролактин изисква клетъчна сигнализация чрез хормони и/или цАМФ за поддържане на активността си, тъй като нивата на мРНКи в нетретирани клетки и в тези, в които всички фактори са изключени (П/Е/цАМФ-нетрет) за 5 дни след достигане на децидуализация са съизмеримо ниски. За разлика от *cd83* гена, за чиято експресия водещ беше цАМФ, експресията на гена за пролактин изискваше хормони. Тези резултати предполагат, че макар и двата гена да се активират в процеса на децидуализация, изискват активацията на различни сигнални пътища на клетъчна трансдукция за експресията си.

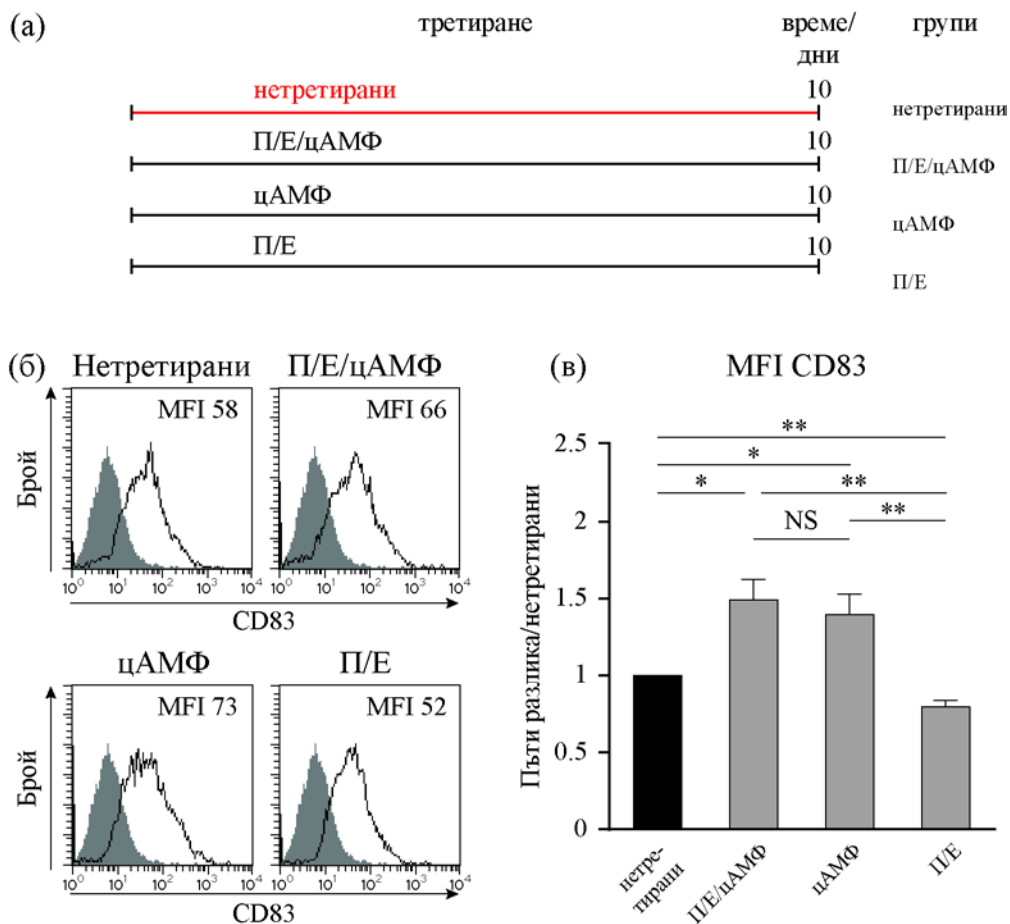
Проведените експерименти показаха, че *cd83*-генът може да се причисли към групата на гените, регулирани от факторите на децидуализация. Резултатите показаха едновременната експресия на *cd83* гена с тази на гена за пролактин, но регулацията на експресията на двата гена в различна степен зависи от децидуализационните стимули, като водещ фактор за експресията на *cd83* в условия на *in vitro* децидуализация е сигнализацията през цАМФ.

4.2 Протеиново ниво

Активацията на експресията на *cd83*-гена при децидуализация предполагаше модуляция на експресията на CD83 и на протеиново ниво. Активацията и експресията на даден ген не винаги кореспондират с експресия на съответстващия му протеин. Следващите експерименти бяха проведени, за да се провери дали децидуализацията влияе върху експресията на гликопротеина CD83 в ДСК, както и за разграничаване на значението на хормоните и цАМФ за белтъчната експресия на CD83. За целта култури на децидуални линии (n=6) бяха третирани с хормоните П и Е и цАМФ, само с хормони или само с цАМФ за 10 дни (фиг. 12а). Въздействието на факторите върху мембранната и вътреклетъчна експресия на CD83 беше определено чрез сравняване на нивата на експресия на гликопротеина от клетките в третираните и нетретираните култури. Промяната в експресията на протеина беше определена първо чрез броя на експресиращите го клетки, изразени като процент от всички анализирани клетки и второ, чрез количеството експресиран CD83 върху всяка анализирана клетка, съответстващо на интензитета на флуоресценция (MFI).

Интрацелуларна експресия на CD83

В условия на *in vitro* култивиране, ДСК показаха спонтанна вътреклетъчна експресия на CD83-гликопротеина, която възлиза на около 95% при нетретираните клетки. Третирането им с фактори на децидуализация в комбинациите: П/Е/цАМФ, цАМФ или П/Е не доведе до значима промяна на процента ДСК, експресиращи интрацелуларната форма на CD83 (фиг. 12б).



Фигура 12. Вътреклетъчна експресия на CD83 в ДСК под въздействие на факторите на децидуализация. (а) Схема на експеримента и групи клетки, в зависимост от третирането.. **(б)** Хистограмите показват вътреклетъчната експресията на CD83 (черна линия) при различните третирания, насложена върху изотипната контрола (плътно сиво). Цифрите във всяка хистограма представят средната стойност на флуоресценция (MFI) на пика на специфичното оцветяване. FACS-анализ. **(в)** Графиката отразява обобщените резултати за MFI, нормализирани към стойностите при нетретираните клетки. За всяка група е представена средната стойност на експресия±стандартната грешка. (Paired t test;*P<0.05; ** P<0.01, NS-no significance).

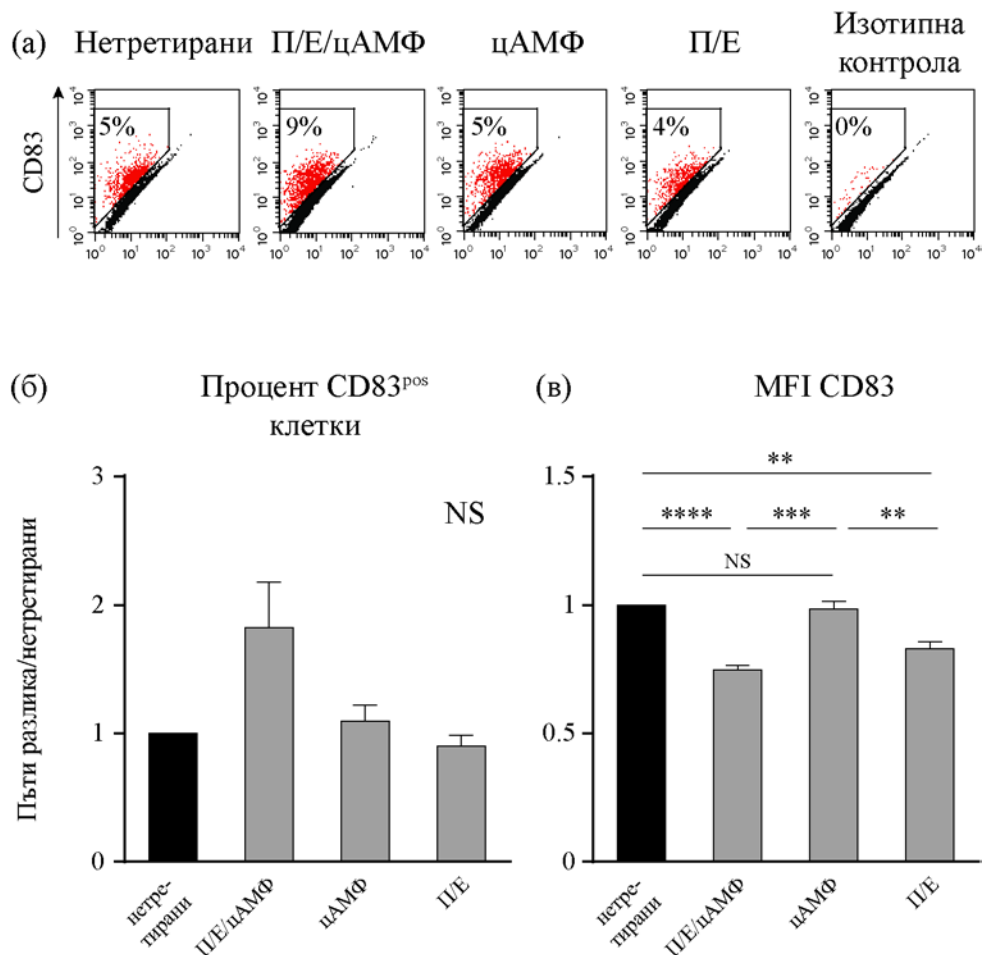
Оценката на интензитета на експресия на вътреклетъчен CD83 протеин (количество интрацелуларен протеин) показва повишаване на експресията му спрямо нетретираните клетки с 1.5 ± 0.1 пъти при третиране с П/Е/цАМФ и с 1.4 ± 0.1 пъти при третиране само с цАМФ (фиг. 12б, 12в). Статистическа значимост в интензитета на експресия на CD83 между двете групи не бе установена. Резултатите показват, че вътреклетъчната експресия на CD83 зависи

от сигнализиациите, протичащи през цАМФ, който присъстваше и в двете описани третириания. На фиг 12в е показано, че под въздействие на цАМФ в третирианията П/Е/цАМФ и цАМФ количеството вътреклетъчен протеин статистически значимо се повишава спрямо нетретираните, както и спрямо третираните само с хормони ДСК. От своя страна хормоните, приложени самостоятелно, водят до понижаване на вътреклетъчната експресия на CD83 (фиг 12в) до 0.8 ± 0.004 от експресията на протеина в нетретираните клетки. В заключение, хормоните понижават количеството вътреклетъчен CD83 протеин в ДСК, като не е ясно дали инхибират експресията му или водят до секреция на протеина. От своя страна, цАМФ стимулира вътреклетъчното натрупване на CD83, което вероятно отразява активиране на експресия на протеина, тъй като цАМФ активира експресията на гена му. Приложени в комбинация, цАМФ и хормоните показват синергичен ефект, виден от тенденцията за по-силна експресия на протеина.

Мембранна експресия на CD83

Динамиката в количеството на вътреклетъчен CD83 може да се влияе както заради различна активност на гена и предполагаема секреция на протеина, така и от експонирането на рецептори на повърхността на клетката. За това беше решено да се проследи и мембранната експресия на CD83 под въздействие на факторите на децидуализация в съответстващите на експериментите за интрацелуларен протеин групи на третиране (фиг. 12а). Средният процент на броя клетки, експресиращи мембранната форма на CD83 (CD83^{pos} ДСК) \pm стандартната грешка беше 15 ± 4 в „П/Е/цАМФ“, 9 ± 2 в „цАМФ“ и 6 ± 1 в „П/Е“. При сравняване на стойностите с процента CD83^{pos} клетки в нетретираните култури ($11 \pm 3\%$) бе установено повишаване с 1.8 пъти в условия на децидуализация с комбинацията от всички фактори – П/Е/цАМФ (фиг. 13а, 13б), но разликата нямаше статистическа значимост. Значима разлика в процента на позитивни клетки не бе установена и под въздействие на самостоятелните третириания на клетките само с цАМФ или само с хормони (П/Е) (фиг. 13а, 13б). Хормоните обаче оказаха силно влияние върху количеството на CD83 рецептора,

експониран на повърхността на CD83^{pos} ДСК. В присъствието на прогестерон и естрадиол при третиранията, независимо от присъствието на цАМФ, се установи понижаване в броя експресирани мембранни CD83 рецептори, което възлизаше



Фигура 13. Мембранна експресия на CD83 в ДСК под въздействие на факторите на децидуализация. (а) Представителни двупараметрови хистограми, представящи броя клетки, експресирани мембранна форма на CD83 (събития, ограничени в гейта) при всяко от третиранията. Цифрите представят процента позитивни клетки. (б) Графиката показва обобщените резултати за процента позитивни клетки в културите, нормализирани към нетретираните клетки. (в) Графиката показва обобщените резултати за MFI на позитивните клетки в културите, нормализирани към нетретираните клетки. Стълбчетата на графиките (б и в) показват средната стойност±стандартната грешка. (Paired t test,*P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001, **** P<0.0001, NS-no significance).

на ~ 0.8 от експресията на CD83 в нетретираните клетки (фиг. 13в). Значимо по-ниската експресия на протеина с 1.3 пъти при пълна децидуализация

(П/Е/цАМФ) в сравнение с клетките, третирани само с цАМФ, показва че прогестеронът и естрадиолът имат инхибиращ ефект върху експонирането на CD83-рецептори върху клетъчната мембрана. Под въздействието на цАМФ, приложен самостоятелно, върху ДСК бяха наблюдавани същите нива на експресия на мембранен CD83, както в нетретираниите клетки (фиг. 13в).

Резултатите показаха, че факторите на децидуализация не оказват влияние върху броя на CD83^{pos} клетки в културите, но променят количеството на рецепторите, експонирани върху клетъчната повърхност. цАМФ, приложен самостоятелно, беше достатъчен за запазване на количеството на рецепторите върху позитивните клетки в нива, близки до тези в нетретираниите култури. Хормоните от своя страна, независимо от присъствието на цАМФ, доведоха до понижаване на експонираните рецептори върху клетъчната повърхност, като информацията от проведените експерименти не е достатъчна, за да се направи заключение, дали феноменът се дължи на блокиране на експонирането на рецепторите върху клетъчната мембрана или е резултат от ензимното изрязване (shedding) на екстрацелуларната част на CD83 рецептора.

Обобщение:

Резултатите от проведените експерименти предполагат, че CD83 молекулата попада в групата на регулираните от процеса на децидуализация фактори. Този извод е базиран на факта, че генът за CD83 се активира и активността му се поддържа от П, Е и цАМФ – фактори, които *in vitro* и *in vivo* водят до активиране на молекулярния маркер за диференциране на стромалните клетки – хормона пролактин. Активността на гена за CD83 при децидуализация кореспондира със синтезирането и вътреклетъчното натрупване на протеина и същевременно понижаване на експонираните върху клетъчната мембрана рецептори, което вероятно се дължи на: 1) блокиране на транспортирането на новосинтезирани рецептори към клетъчната повърхност и натрупването им интрацелуларно както и 2) мобилизиране на клетката за освобождаване на имуноинхибиращата разтворима форма на CD83 както чрез секреция, така и чрез ензимно изрязване (shedding) на мембранни рецептори. За изясняването на тези

предположения е необходимо извършването на допълнителни експерименти, а резултатите да се потвърдят *in vivo* чрез изследване на хистологични препарати. Анализите показаха, че водещ от трите фактора за експресия на гена в *in vitro* система е цАМФ, който приложен самостоятелно води до повишаване на вътреклетъчните нива CD83. Ефектът се дължи на мобилизиране на експресията на протеина основно в ДСК, неекспресиращи мембранната му форма, тъй като цАМФ не променя нито броя на мембранно-експресиращите го клетки, които представляват до 1/5 от културата, нито количеството на рецепторите върху тях, което допуска подготовка на CD83^{neg} клетки в културите за секреция на протеина. От своя страна, овариалните хормони П и Е понижават количеството CD83 както интрацелуларно в цялата популация, така и количеството на експонирани рецептори върху CD83^{pos} клетки в културите, като на този етап не е възможно да определим, дали наблюдаваният ефект се дължи на инхибиране на експресията на протеина или хормоните са сигнал за освобождаване на разтворимата форма на CD83.

Тук получените резултати предполагат, че експресията на молекулата се активира в ДСК при подготовката на маточната лигавица за предстояща бременност. Настоящата дисертация подкрепя хипотезата, че промяната в експресията на CD83 в ДСК е отговор на клетките към променящата се хормонална среда в децидуата.

ИЗВОДИ

- Установи се обща вътреклетъчна и мембранна експресия на имунорегулаторната молекула CD83 от стромални клетки на човешка децидуа от първи триместър на бременността.
- Мембранната експресия на CD83 в част от ДСК отразява присъща хетерогенност на културите, която спонтанно се възстановява в случаите на отстраняване на CD83^{pos} клетките.
 - Поддържането на CD83^{pos} ДСК става чрез превръщането на CD83^{neg} в CD83^{pos} клетки или чрез затихваща пролиферативна активност на CD83^{pos} клетки, които предполагат по-високата им клетъчна диференциация.
- Макар експресиращи CD83, ДСК не проявяват фенотип на АПК и не активират алогенни Т клетки дори и след третиране с про-възпалителни фактори – LPS и кондиционирана среда от активирани моноцити.
- Наблюдава се пряка и положителна зависимост на вътреклетъчните количества CD83 от процеса на децидуализация на ДСК, откроявайки разлика в регулацията на клетъчните нива на CD83 от отделните фактори - цАМФ от една страна и прогестерона и естрадиола от друга.
 - Активирането на цАМФ сигналния път, самостоятелно или като част от протокола за пълна децидуализация, индуцира генна и белтъчна експресия на CD83 молекулата и показва, че както плацентарните хормони – прогестерон и естрадиол, така и други растежни фактори, цитокини и морфогени, чиито сигнализиции преминават през активирането на цАМФ, могат да повлияват общите клетъчни нива на CD83 в ДСК.
 - Непълната децидуализация на ДСК, чрез прилагане на прогестерон и естрадиол без цАМФ, откроява техния самостоятелен ефект, и показва спад на вътреклетъчните и мембранни нива на CD83 белтъка в ДСК, предполагайки секреция или потискане на експресията на молекулата.

- Трофобластните клетъчни линии JAR и JEG-3 експресират мембранна и вътреклетъчна форма на имунорегулаторната молекула CD83.
- Контактното култивиране между ДСК и вилозни/JAR и екстравилозни/JEG-3 трофобластни клетки води до понижаване на експресията на CD83 в ДСК и повишаване на CD83 в трофобластните клетки, което предполага съвместно участие на двата клетъчни типа в поддържане на CD83-нивота на майчино-феталната граница.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Vinketova K, Mourdjeva M, Oreshkova Ts. „Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity”, *Journal of Pregnancy*, Volume 2016, Article ID 8689436, 17 pages, 12 цитирания (Google Scholar).

Vinketova K, Karagouzov I, Mourdjeva M, Sperandio M, Oreshkova Ts. “Trophoblast cell lines JAR and JEG-3 modulate CD90 (Thy-1) expression on decidual stromal cells”, *Comptes rendus de l'Academie de bulgare des Sciences*, in press.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Доклад:

Vinketova K, Karagouzov I, Petkova B, Mourdjeva M, Oreshkova Ts. "Human decidual stromal cells: the low immunogenicity counterpart from foeto-maternal interface", 14th International Symposium for immunology of Reproduction, 22-24 May 2015, Varna, Bulgaria.

Представени постери:

Vinketova K, Karagyozov I, Mourdjeva M, Sperandio M, Oreshkova T. Trophoblast cell lines JAR and JEG-3 modulate CD90 (Thy-1) expression on decidual stromal cells, Technology Platforms for 3D Cell Culture, 12-13 Sept 2017, Albena, Bulgaria.

Vinketova K, Karagyozov I, Mourdjeva M, Sperandio M, Oreshkova T. Trophoblast cells modulate the CD90 expression on decidual stromal cells. Jubilee scientific conference “10 years Bulgarian Association of Clinical Immunology, 28-29 Oct 2016, Sofia, Bulgaria.

Vinketova K, Dimitrov R, Karagouzov I, Mourdjeva M, Oreshkova Ts, “Contact Interactions between Decidual Stromal Cells and Allogeneic T Cells – T Cell Activation or Tolerance?”, 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22-24 June 2012, Varna, Bulgari.

Vinketova K, Dimitrov R, Karagouzov I, Mourdjeva M, Oreshkova Ts, “Investigation of Instructive Potential of Decidual Stromal Cells on Differentiation of T Cells into Tregs”, Joint International Congress of the American Society for Reproductive Immunology (ASRI) and the European Society for Reproductive Immunology (ESRI), 31 May-2 June 2012.

Vinketova K, Karaguozov M, Mourdjeva M, Oreshkova Ts. Decidual niche contributes to suppression of allogeneic T cell reactivity. 4th National Congress of Immunology, 2-5 Oct 2014, Varna, Bulgaria.

Vinketova K, Karaguozov M, Alova E, Mourdjeva M, Oreshkova Ts. Potentials of human decidual cells crosstalk with T cells. 22-24 May 2015, 14th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, Bulgaria.