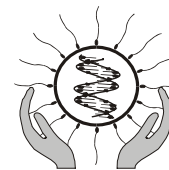




МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ



МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО БИОЛОГИЯ

Магдалена Петкова Пенчева-Демирева

Роля на НК клетки в имуноонкологията и при пациенти със спермоантитела

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен
“доктор“

по професионално направление „4.3. БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ В ОБЛАСТ НА
ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ 4. ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И
ИНФОРМАТИКА“

Докторска програма: Имунология

Научни ръководители: проф. д-р Димитрина К. Димитрова-Диканарова, дм
доц. д-р Цветанка Петрова Дончева, дм

София, 2021

Дисертационният труд съдържа 171 стандартни страници и е илюстриран с 21 фигури (2 от които с 6 подфигури, 2 – с 4 подфигури и 2 – с 3 подфигури), от които 5 микрофотографии и 12 таблици. Цитирани са 279 литературни източника, от които 271 на латиница и 8 на кирилица.

Докторантът Магдалена Петкова Пенчева-Демирева е докторант на самостоятелна подготовка, зачислена със заповед на Ректора РК36-315 от 26.02.2020 г. при Катедрата по Биология на МФ, МУ – София и отчислена със заповед на Ректора РК36-1361 от 30.06.2021 г.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на разширен Катедрен съвет на Катедрата по биология при Медицински факултет на Медицински университет – София, състояло се на 04.06.2021 г.

Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в Лаборатория по имунология на репродукцията в Катедрата по биология, Медицински факултет, Медицински университет – София, както и в Лаборатория по туморна имунология и клетъчна терапия в Япония на базата на съществуващ меморандум между Медицински колеж Хього, Нишиномия, Япония и Медицински университет – София, България.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 01.10.2021 г. от 12:00 часа в Аудитория 2 на Медико-биологичен комплекс, ул. „Здраве“ 2, МФ, МУ – София, съгласно правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София, пред **научно жури в състав:**

Председател:

Доц. д-р Румен Павлов Николов, дм

Членове:

Доц. д-р Радка Кирилова Тафраджийска-Хаджиолова, дм

Проф. д-р Виктория Степан Озаян-Сарафян, дм, дмн

Доц. д-р Велислава Илиева Терзиева, дм

Доц. Маргарита Нешова Топашка-Анчева, дб

Резервни членове:

Доц. Любомир Любомиров Трайков, дбф

Доц. Иванка Георгиева Цачева, дб

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък с използваните съкращения	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	9
IV. РЕЗУЛТАТИ	12
1. Изолиране, пречистване и култивиране на НК клетки от слезката на IL-18KO мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ НК клетки	12
2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на IL-18KO мишки НК клетки след стимулирането им чрез цитокини	13
3. Проучване на ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на НК клетките	16
4. Изследване на секреторната активност на НК клетките	19
5. Изследване на експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на НК клетките	23
6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ НК клетки	27
7. Изследване на връзката между някои фактори на клетъчния и хуморалния имунен отговор при имунологично обусловеното безплодие при човека	28
V. ОБСЪЖДАНЕ	38
1. Изолиране, пречистване и култивиране на НК клетки от слезката на IL-18KO мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ НК клетки	38
2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на IL-18KO мишки НК клетки след стимулирането им чрез цитокини	38
3. Проучване на ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на НК клетките	42
4. Изследване на секреторната активност на НК клетките	43
5. Изследване на експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на НК клетките	45
6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ НК клетки	49
7. Изследване на връзката между някои фактори на клетъчния и хуморалния имунен отговор при имунологично обусловеното безплодие при човека	50
VI. ИЗВОДИ	62
VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	63
VIII. ПРИНОСИ	64
IX. НАУЧНА АКТИВНОСТ СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	66

Списък с използваните съкращения

CA	– Спермоантитела
ACK	– Ammonium-Chloride-Potassium; лизисен буфер, съдържащ амониев хлорид и калиев хидроген карбонат
BSA	– Bovine serum albumin; говежди серумен албумин
CD	– Cluster of differentiation; клъстер на диференциация
CD69	– Cluster of differentiation 69; клъстер на диференциация 69
CTLA4 (CD152)	– Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; антиген 4, свързан с цитотоксичен Т лимфоцит
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium; модифицирана хранителна среда на Eagle
ELISA	– Enzyme-linked immunosorbent assay; ензимно-свързан имуносорбентен анализ
FBS (FCS)	– Fetal bovine serum/Fetal calf serum; фетален говежди/телешки серум
FL	– Fluorescence; флуоресценция
GM-CSF	– Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; стимулиращ фактор, който се отделя от макрофагите и действа върху производството на гранулоцити
IFN	– Interferon; интерферон
IL	– Interleukin; интерлевкин
K562	– Myelogenous leukemia cell line, erythroleukemia type; миелогенна левкемия, клетъчна линия от еритролевкемичен тип
LAG-3 (CD223)	– Lymphocyte-activation gene 3; лимфоцит-активиращ ген 3
LAMP-1 (CD107a)	– Lysosomal-associated membrane protein-1; свързан с лизозомната мембрана протеин-1
MACS	– Magnetic-activated cell sorting; магнитно активирано клетъчно разделяне
MHC	– Major histocompatibility complex; главен комплекс за тъканна съвместимост
NK	– Natural killer cells; клетки естествени убийци
NKG2	– The Natural Killer Group 2 receptor; Рецептор от групата 2, който се експресира върху клетки естествени убийци. Включва 7 члена NKG2-A, B, C, D, E, F, и H
NKT	– Natural killer T cell; Т клетки естествени убийци
NF-κB	– Nuclear factor kappa B; ядрен фактор капа бета
OPD	– Ortho-Phenylenediamine; орто-фенилендиамин
PBS	– Phosphate buffer saline; фосфатен буфер
PD-1	– Programmed cell death protein 1; протеин 1 на програмирана клетъчна смърт
SD	– Standard deviation; стандартно отклонение
SIT	– Isojima's sperm immobilization test; спермоаглутинационен тест на Изожима
SIV	– Sperm immobilization value; спермоимобилизационно ниво

STAT	– Signal transducer and activator of transcription; сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията
TAT	– Tray agglutination test; микроспермоаглутинационен тест на Фриберг
TGF	– Transforming growth factor; трансформиращ растежен фактор
TIM-3	– T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; Т-клетъчен имуноглобулин и муцин домейн-3
TMB	– Tetramethylbenzidine; тетраметилбензидин
TNF	– Tumor necrosis factor; тумор некротизиращ фактор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Имунната система подлежи на строга регулация, за да поддържа и при необходимост да възстановява имунната хомеостаза. При определени обстоятелства обаче клетките ѝ реагират недостатъчно адекватно. Реакцията може да бъде неефективна или липсваща, например при туморните заболявания, водейки до неконтролируем растеж на злокачествено трансформирани клетки, или прекомерно силна – при реакциите на свръхчувствителност и автоимунните заболявания. Последният случай включва производство на спермоантитела като причинен фактор за безплодие, които могат да бъдат автоантитела у мъжа или изоантитела при партньорката му.

В търсенето на подходи за оптимизиране на регулацията на имунната система особено интерес представляват клетките естествени убийци (Natural killer cells, NK cells). Те проявяват цитолитична активност спрямо широк набор от прицелни клетки, най-вече туморни, заразени с вирус или покрити с антитела. В организма пролиферацията, диференцирането и активността на NK клетките се контролират чрез сложни и все още недостатъчно изучени механизми с участието на паракринни белтъчни сигнали – цитокини, най-вече интерлевкини.

В днешно време химиотерапията на онкологичните заболявания отстъпва пред нови терапевтични методи, някои от които залагат на възстановяване на имунната хомеостаза. Един съвременен подход е например лечението с неорганични или органични наночастици, които могат да пренасят лекарства до таргетните клетки или да свържат и изолират дадена клетъчна субпопулация за определена терапевтична цел. Използването на имуномодулатори като цитокини самостоятелно или в комбинация с блокиращи моноклонални антитела също показва обещаващи резултати. Перспективно направление е чрез модулатори да бъде повишена пролиферативната активност на NK клетките.

Изследванията в областта на репродуктивната имунология дават възможности за създаване на ефективни имунологични средства за контрол на раждаемостта, както и за изясняване на етиопатогенезата и разработване на

терапия на безплодието. Ето защо, от изключителна важност е да се открият и характеризират имунните механизми, които биха могли да нарушат процесите на оплождане и нормална ембриогенеза.

Въпреки големия прогрес, постигнат в терапията на онкологичните заболявания и имунологичното (имунообусловеното) безплодие, все още съществуват ограничения, като неизяснени механизми, странични ефекти, слаба ефективност на лечението и други. Това налага търсенето на нови подходи, важно място сред които заема модулирането на активността на клетките на имунната система. За актуалността на това направление говори фактът, че през 2018 г. James Allison и Tasuku Honjo са удостоени с Нобелова награда по физиология и медицина за постиженията им в туморната имунотерапия „за откриване на лечение на рак чрез инхибиране на отрицателната имунна регулация“.

Настоящият дисертационен труд се основава на някои от последните постижения и съвременни направления в имунотерапията на туморните заболявания, при които акцентът е върху инхибиране на имунни контролни точки чрез моноклонални антитела и стимулиране на пролиферацията на NK клетките. Освен това в него са представени съвременни данни за ролята на NK клетките при стерилитет, обусловен от имунологични фактори и механизми.

Темата на дисертационния труд е продължение на разработваната научна тематика в Катедрата по биология за разкриване на неизяснени механизми в туморната и репродуктивната имунология.

Дисертационният труд е разработен в Катедрата по биология, Медицински факултет към Медицински университет – София, Лаборатория по имунология на репродукцията, както и в Медицински колеж Хього, Нишиномия (Япония), Лаборатория по туморна имунология и клетъчна терапия, с която Медицински университет – София има сключен меморандум за взаимно сътрудничество и научен обмен.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия научен труд е: да се изясни механизма, чрез който се създават „изтощени“ НК клетки и да се установи молекулно-имунологичния път за тяхното реактивиране; да се изследват клетъчни и хуморални имунологични фактори, свързани с безплодието като: НК клетки и производството на спермоантитела при пациенти с репродуктивни проблеми. Това би допринесло за овладяване на онкогенезата чрез високоефективен имунен надзор и за избягване на вредните странични ефекти при конвенционална терапия (онкохирургия, химиотерапия и лъчетерапия), както и за разширяване на познанията относно ролята на НК клетките и тяхната връзка с производството на спермоантитела при имунологично обусловеното безплодие на човека.

За осъществяване на целта на научния труд бяха поставени следните задачи:

1. Да се изолират, пречистят и култивират НК клетки от слезката на IL-18KO мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ НК клетки.
2. Да се проследи пролиферацията на изолираните от слезка на IL-18KO мишки НК клетки след стимулирането им чрез цитокини.
3. Да се проучи ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на НК клетките.
4. Да се изследва секреторната активност на НК клетките.
5. Да се изследва експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на НК клетките.
6. Да се проследи ефекта на IL-21 върху „изтощени“ НК клетки.
7. Да се изследва връзката между някои фактори на клетъчния и хуморалния имунен отговор при имунологично обусловеното безплодие при човека.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Използваните материали в експерименталните постановки са: IL-18 нокаут мишки (IL-18KO), на около 10 седмици, от които се изолираше слезка, а в следствие от нея се изолираха NK клетки, както и кръвни проби от пациенти, които са диагностицирани като безплодни според критериите на Световната здравна организация. Част от пациентите са с два и повече спонтанни аборта, както и без успешна бременност. За изследванията бе взета венозна кръв (5 ml) от всеки пациент, като предварително всеки един от тях бе прочел и подписал информирано съгласие.

Използваните от мен серуми и контроли са ми любезно предоставени от проф. Д. Димитрова-Диканарова, дм, с цел научноизследователска дейност.

Като негативна контрола при изследванията, в които се търсеха спермоантитела, бе използвана спермална проба от здрав донор, с нормозооспермия, при който е доказано, че липсват спермоантитела.

Изолирането, пречистването и определянето на активността на човешки NK клетки от периферна кръв бе извършено в клиничните лаборатории Cibalab, Репро Инова, Лаборатория по клинична имунология на болница „Надежда“.

Други материали, които бяха използвани в експерименталните методики са: MACS система с микромагнити, за изолиране на миши NK клетки, бои за оцветяване на NK клетките (трипаново синьо), хранителни среди за култивиране на клетките (RPMI1640), интерлевкини, с които NK клетките бяха стимулирани или чиято секреция бе установена в NK клетъчните популации и пациентски проби (IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN- γ , TNF- α , TGF- β), моноклонални антитела, буфери, китове, специална апаратура и софтуер за обработка и анализ на резултатите.

Методи

Използваните методи за постигане на целта и изпълнение на задачите са:

1. Изолиране на NK клетки от IL-18KO мишки чрез магнитно активирано клетъчно разделяне (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS)
2. Проверка на чистотата на клетъчната култура – поточна цитометрия
3. Стимулиране на миши NK клетки с IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и IFN- γ
4. Клетъчно култивиране и определяне на лимфоцитната пролиферация
5. Микроскопски техники за определяне вида на клетъчните кълстери
6. Фенотипизиране на NK клетки чрез поточна цитометрия
7. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – за определяне количеството на следните молекули: IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-10, секретирани от NK клетки, изолирани от IL-18KO мишки
8. Вътреклетъчно оцветяване чрез поточна цитометрия

Методи за откриване на спермоантитела

1. Спермоаглутинационен тест на Фриберг (TAT)
2. Спермоимобилизационен тест на Изожима (SIT)
3. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – индиректна ELISA – за откриване на спермоантитела
4. Изолиране на човешки NK клетки от периферна кръв и определяне на тяхната активност
5. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – за определяне количеството на IL-10 и IL-12 в серуми на безплодни пациенти
6. Обработка на получените резултати и статистически анализ

За анализа и онагледяването на получените резултати се използваха софтуерни програми – Microsoft Excel 2007, Microsoft Word 2007, Adobe Photoshop CS6, GraphPad Prism 5 и други.

Приложен бе еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). Проверката за равенство на груповите средни използва F- или Welch статистика, когато не е изпълнено условието за равенство на дисперсиите. Проведените множествени сравнителни процедури на получените резултати бяха направени по метода на Bonferroni, Tamhane или Dunnett. Като статически значими резултати се приеха, тези при които $P < 0.05$, отбелязани със звездичка (*).

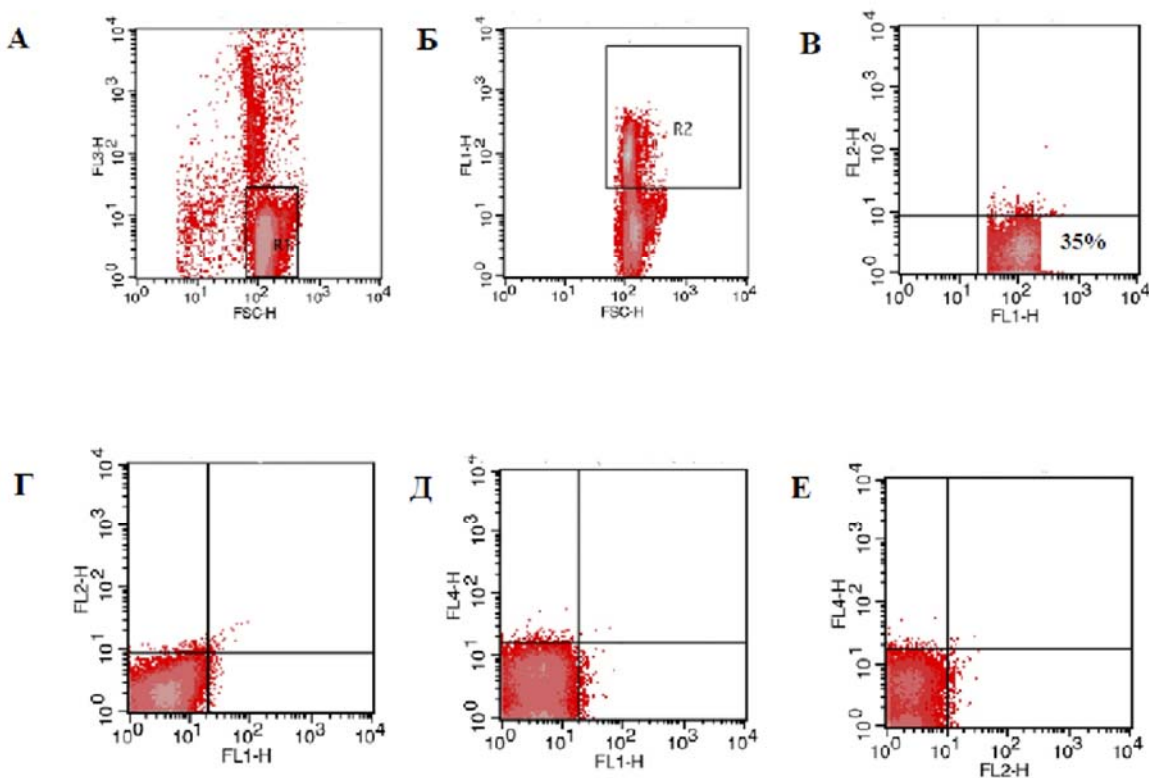
За статистическата обработка бе използван и екзактен тест на Fisher, който сравнява две независими извадки. При $P < 0.05$ стойностите се приемаха за статистически значими.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Изолиране, пречистване и култивиране на НК клетки от слезката на IL-18KO мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ НК клетки

Получихме суспензия от далак на мишки, които са с генетично изключен ген за синтеза на интерлевкин 18 (IL-18 knockout/IL-18KO мишки), от която чрез микромагнити CD4, CD8, CD19 премахнахме Т хелперите, цитотоксичните Т лимфоцити и В лимфоцити, чрез третиране с АСК лизисен буфер отстранихме еритроцитите и получихме популация на НК клетки. Чистотата на тази популация беше доказана чрез поточна цитометрия (**Фигура 1**).

Така получената чиста популация от НК клетки бе култивирана в *in vitro* условия и стимулирана с различни комбинации или самостоятелно с посочените в Материали и Методи интерлевкини.



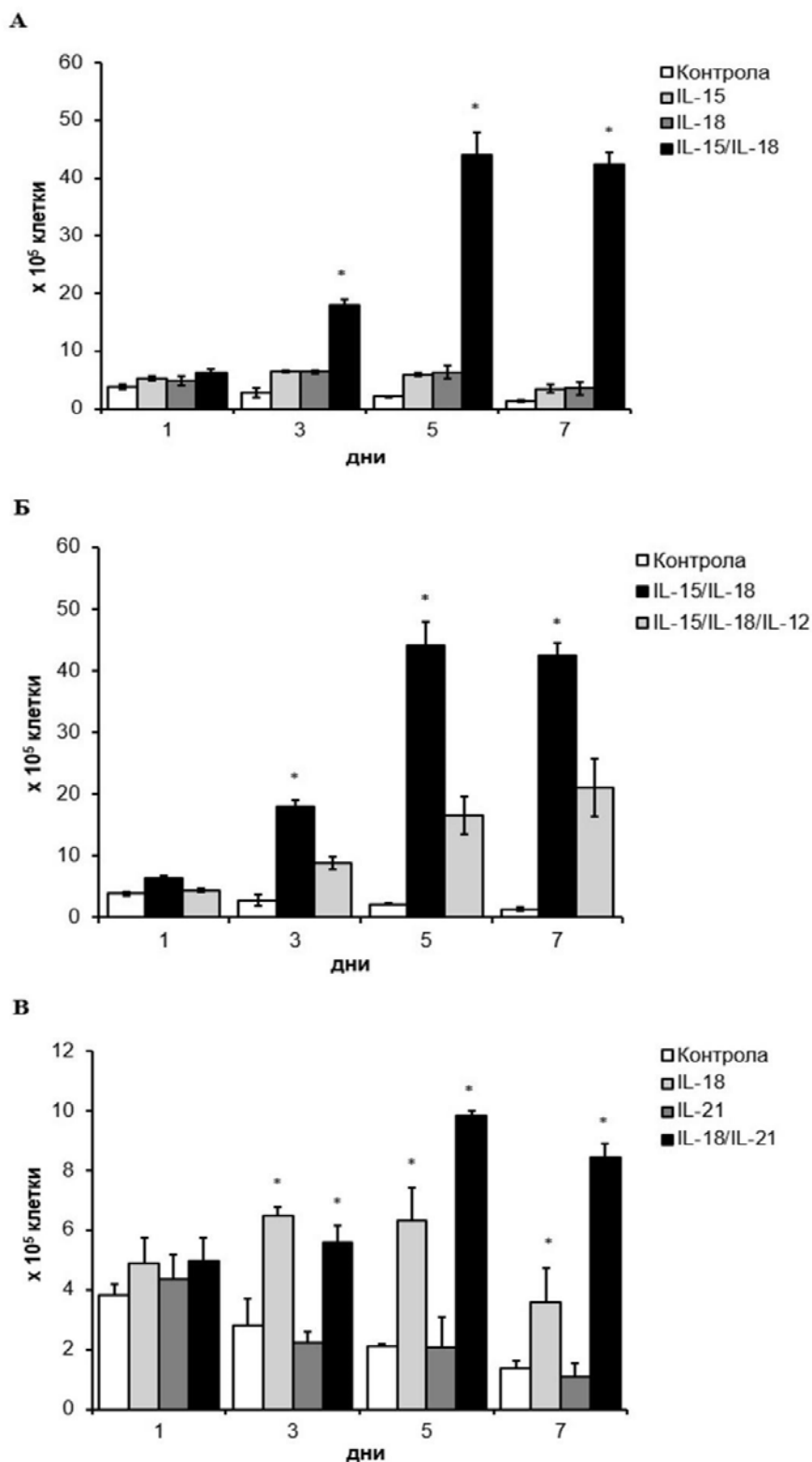
Фигура 1. Поточна цитометрия на свежо изолирани НК клетки за проверка на чистотата на спленоцитите. **А** – проба 1, FL3-H – пропидиев йодид, FSC-H – гранулираност, R1 – „врата“ за живи клетки; **Б** – проба 2, FL1-H – DX5, FSC-H – гранулираност, R2 – „врата“ за живи НК клетки; **В** – проба 2, FL1-H – DX5, FL2-H – празно, „врати“ – R1 + R2 - за живи НК клетки; **Г** – проба 1 - FL2-H – празно, FL1-H – DX5, **Д** – проба 1, FL4-H – празно, FL1-H – празно; **Е** – проба

1, FL4-H – празно , FL2-H – празно. Използван софтуер – Cell Quest™ Pro, Version 6.0, BD Biosciences.

Проследена беше пролиферативната активност на изолираната и стимулираната с цитокини чиста популация от НК клетки.

2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на IL-18KO мишки НК клетки след стимулирането им чрез цитокини

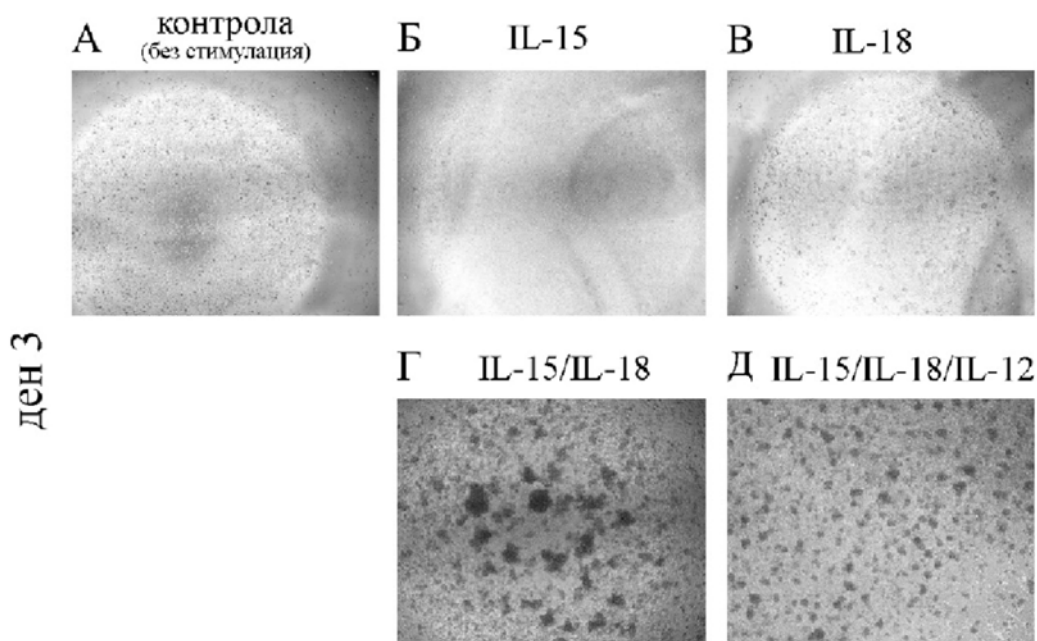
Клетките естествени убийци показаха постепенно повишаване на пролиферацията, след като бяха третирани с комбинацията от цитокини IL-15/IL-18 в сравнение с контролата и другите стимулации (**Фигура 2А, Б и В**). От друга страна, при добавяне в клетъчната среда на IL-12 в началото на култивиране или на ден 2 от култивирането, интензивно пролифериращите НК клетки силно намаляваха пролиферацията си (**Фигура 2Б**). Единичните стимулации с цитокини IL-15, IL-18, IL-21 не водеха до увеличаване броя на клетките (**Фигура 2А и 3В**). Единствено единична стимулация с IL-15 или IL-18, както и двойната стимулация IL-18/IL-21 успяха да поддържат броя на НК клетките, но не и да го увеличат (**Фигура 2А и 3В**). Интерлевкин 21 от своя страна води до постепенно намаляване на пролиферативната активност на клетките естествени убийци, като на ден 7 броят им е силно занижен (**Фигура 2В**).



Фигура 2. Проллиферативна активност на НК клетките след стимулация с цитокини на ден 1, 3, 5 и 7. **А** – НК клетки, стимулирани с IL-15, IL-18, IL-15/IL-18 и контрола – клетки, които не са третираны с цитокини. **Б** – НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18, IL-15/IL-18/IL-12 и контрола – клетки, които не са третираны с цитокини. **В** – НК клетки, стимулирани с IL-18, IL-21, IL-18/IL-21

и контрола – клетки, които не са третирани с цитокини. Статистически достоверните резултати са маркирани със звездичка (*); $P < 0,05$.

Освен значителната експанзия на клетките след третирането им с интерлевкини 15 и 18, под светлинен микроскоп беше наблюдавана и промяна в тяхното разположение и морфология. Когато клетките извършват активно делене те започват да образуват контакти помежду си и да се струпват близо една до друга. След достигане на конфлуентност НК клетките, стимулирани с IL-15/IL-18, образуваха струпвания – клъстери (**Фигура 3Г**), които се различаваха от тези образувани при клетките, стимулирани с IL-15/IL-18/IL-12 (**Фигура 3Д**), а при контролата и единичните стимулации не се наблюдаваха струпвания от клетки (**Фигура 3А, Б и В**). Максимален брой клетки след стимулация с IL-15/IL-18 се наблюдаваше между ден 3 и 4, тогава клетките се пасажираха и стимулираха на ново с цитокини, докато след стимулиране с IL-15/IL-18/IL-12 конфлуентност се достигаше между 5 и 6 ден, като същевременно в хранителната среда имаше голям брой мъртви клетки.

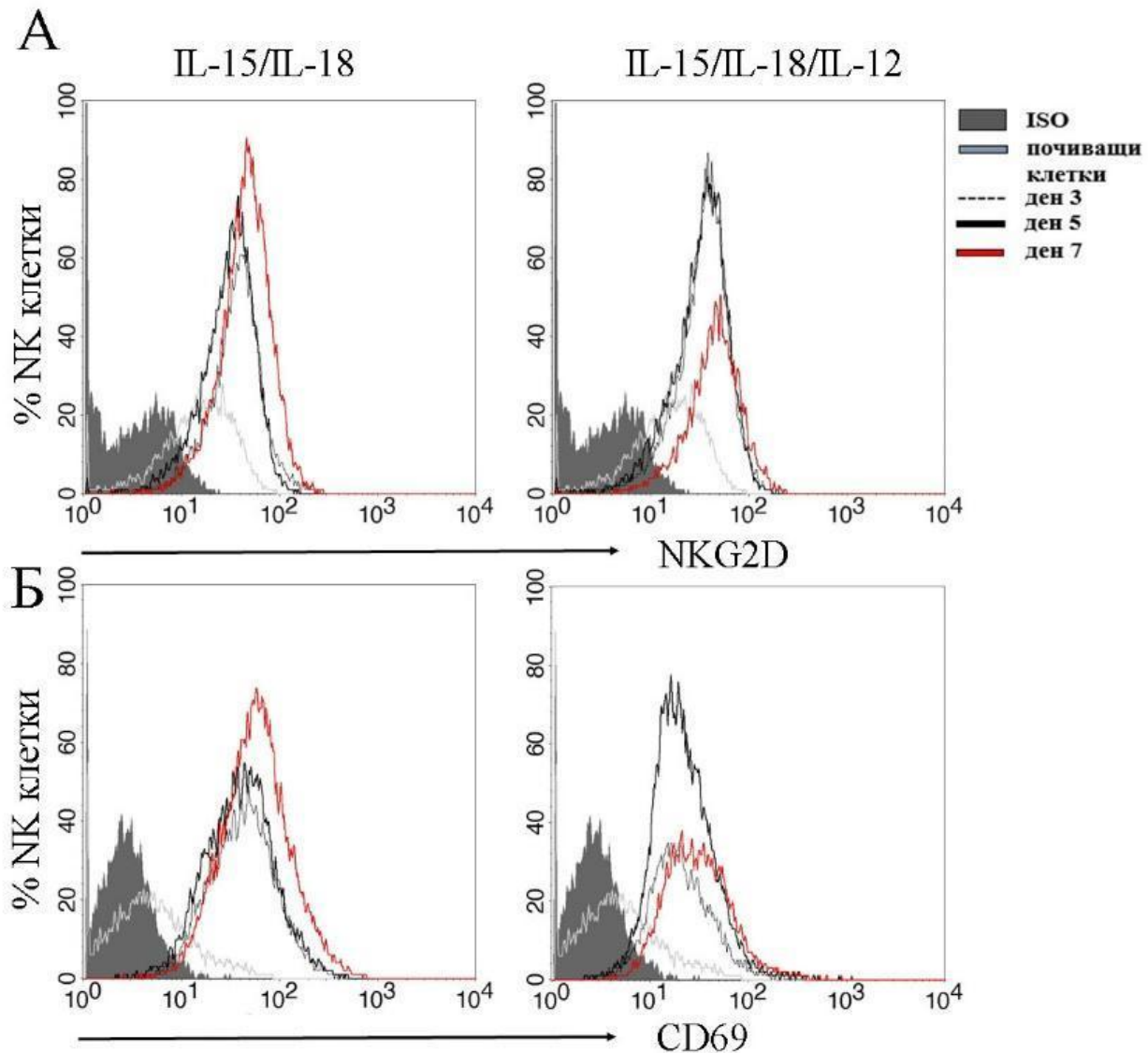


Фигура 3. Образуване на струпвания от клетки (клъстери) между НК клетките след стимулация с цитокини на ден 3. **А** – Контрола – НК клетки, които не са стимулирани. **Б** – НК клетки, стимулирани с IL-15. **В** – НК клетки, стимулирани с IL-18. **Г** – НК клетки стимулирани с IL-15/IL-18. **Д** – НК клетки, стимулирани

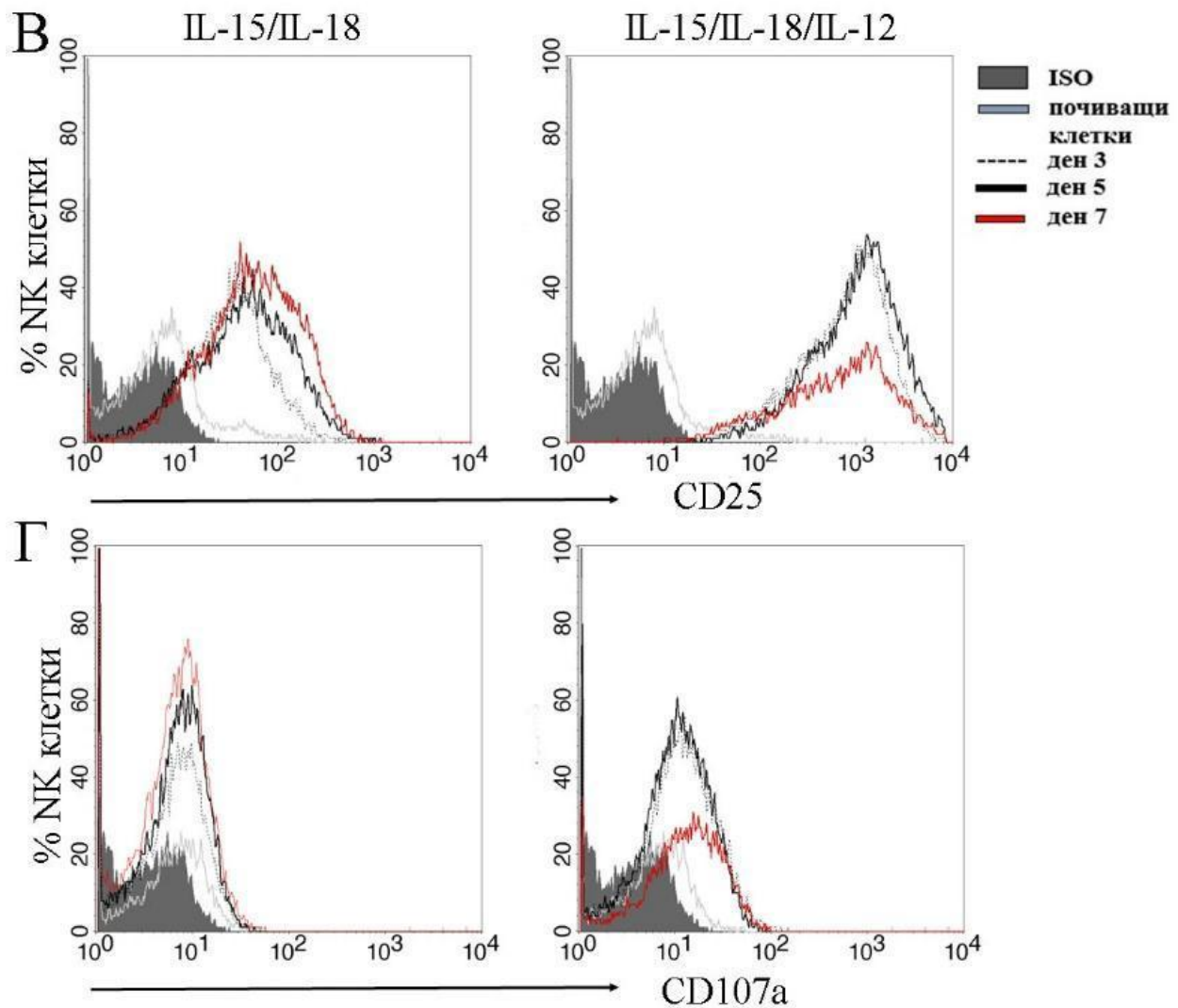
с IL-15/IL-18/IL-12. Снимките са направени под светлинен микроскоп – Olympus модел CK2 (ULWCD 0.30), с огледално-рефлексен фотоапарат Canon (EOS Rebel T5i DSLR Camera with 18-55 mm IS STM Lens Kit) при увеличение на обектива 40x.

3. Проучване на ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на НК клетките

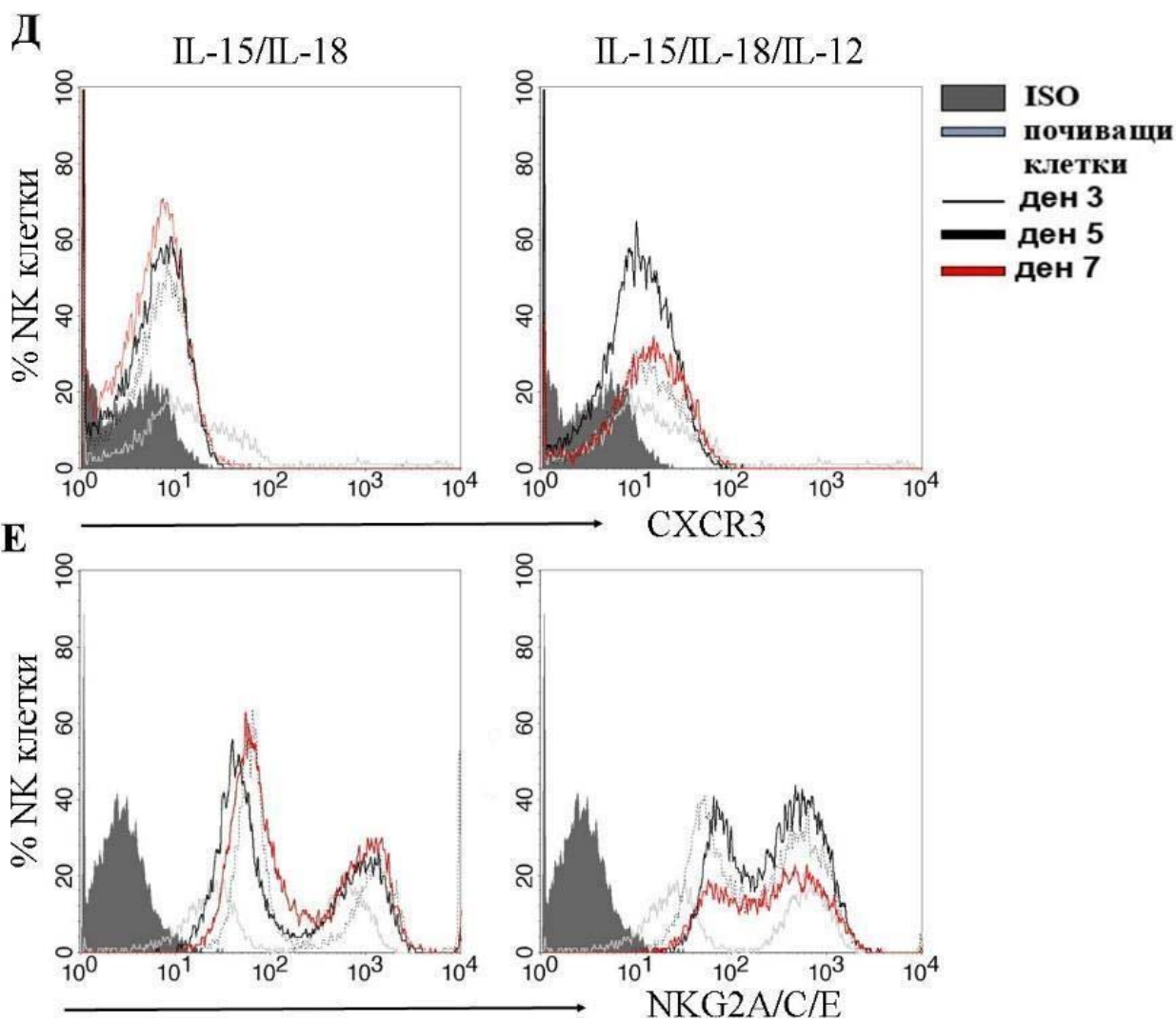
Тъй като бяха наблюдавани разлики в пролиферацията на НК клетките в зависимост от стимулацията с цитокините, изследвахме експресията на различни рецептори върху тяхната повърхност. След увеличаване на пролиферативната активност на НК клетките значително се повиши експресията на различни активиращи рецептори – CD69, NKG2D (**Фигура 4А и 5Б**), в сравнение с почиващите клетки (resting cells), както и с клетките, които са стимулирани с тройната комбинация от цитокини (**Фигура 4А и 5Б**). Във времето на култивиране НК клетките, третирани с IL-15/IL-18/IL-12, намалиха експресията на рецептори NKG2D, CD69, CD25, CD107a, CXCR3, NKG2A/C/E, които между ден 3 и 5 бяха с умерена експресия (**Фигура 4А, Б, В, Г, Д и Е**). Интересен бе фактът, че НК клетките, стимулирани с тройната комбинация, експресират силно повърхностен маркер CD25 (IL-2R α) (**Фигура 4В**), докато клетките, стимулирани с IL-15/IL-18 го експресират умерено (**Фигура 4В**). Добавянето на IL-12 към тези клетки забележително повишаваше експресията на CD25 (**Фигура 4В**) и Sca-1 (резултатите не са показани), а редуцираше NKG2D, CD69, CD107a (**Фигура 4А и Г**), B220, DX5 (резултатите не са показани).



Фигура 4А и Б. Експресия на повърхностни маркери върху НК клетките при контролата (ISO), почиващите нестимулирани НК клетки и след стимулация с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12, на ден 3 (-----), 5 (в черно на графиката), 7 (в червено на графиката). **А** – Проследява се експресията на рецептора NKG2D. **Б** – Проследява се експресия на рецептора CD69. Върху абсцисата е нанесена интензивността на експресия на съответния рецептор, а върху ординатата – концентрацията на НК клетки с експресиран рецептор. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.



Фигура 4В и Г. Експресия на повърхностни маркери върху NK клетките при контролата (ISO), почиващите нестимулирани NK клетки и след стимулация с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12, на ден 3 (-----), 5 (в черно на графиката), 7 (в червено на графиката). **В** – Проследява се експресията на рецептора CD25. **Г** – Проследява се експресия на рецептора CD107a. Върху абсцисата е нанесена интензивността на експресия на съответния рецептор, а върху ординатата – концентрацията на NK клетки с експресиран рецептор. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.



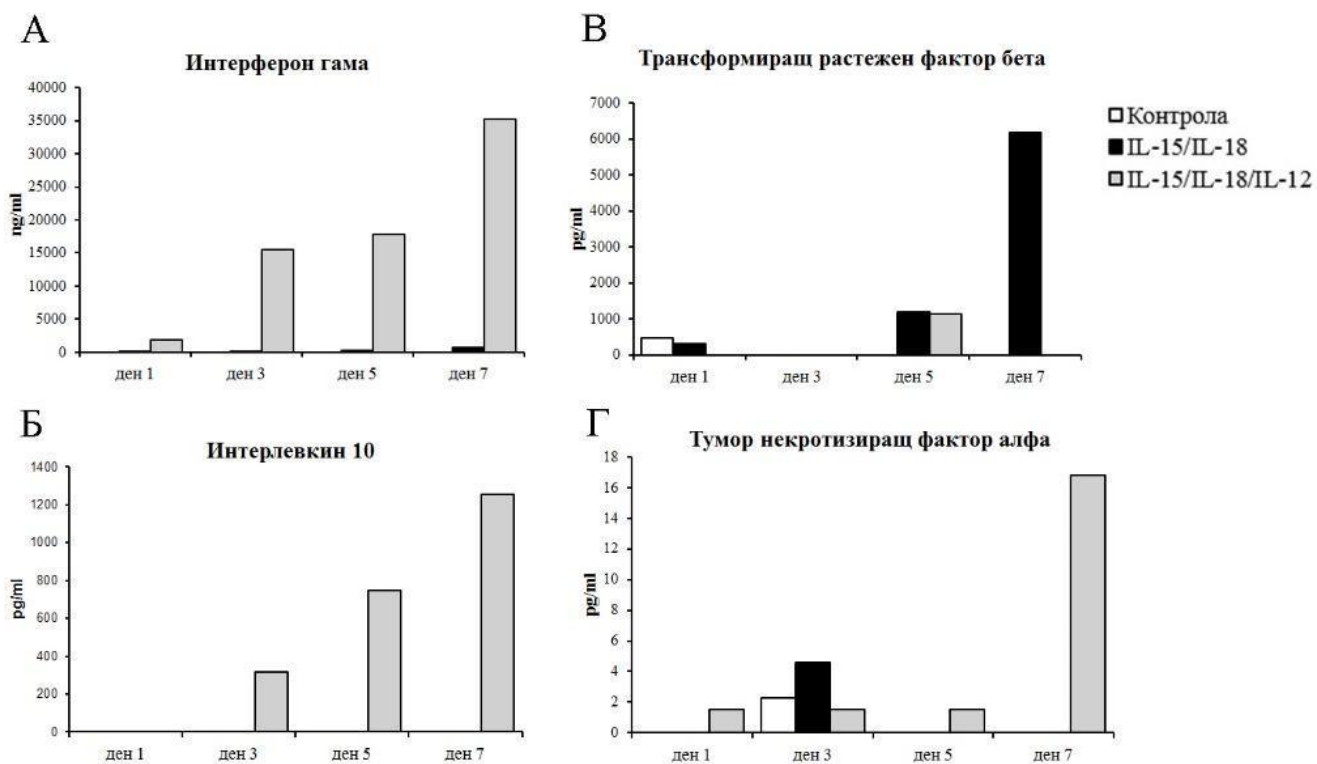
Фигура 4Д и Е. Експресия на повърхностни маркери върху НК клетките при контролата (ISO), почиващите нестимулирани НК клетки и след стимулация с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12, на ден 3 (-----), 5 (в черно на графиката), 7 (в червено на графиката). Д – Проследява се експресията на рецептора CXCR3. Е – Проследява се експресия на рецептора NKG2A/C/E. Върху абсцисата е нанесена интензивността на експресия на съответния рецептор, а върху ординатата – концентрацията на НК клетки с експресиран рецептор. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.

4. Изследване на секреторната активност на НК клетките

За да се провери секреторната активност на НК клетките беше използван ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), както и вътреклетъчно оцветяване. Благодарение на тези методи бе възможно качествено и количествено определяне на търсените молекули. На ден 1, ден 3, ден 5 и ден 7

след определяне броя на клетките, се събираше супернатантата, за да се определи каква е секрецията на интерферон гама (IFN- γ), интерлевкин 10 (IL-10), трансформиращ фактор бета (TGF- β), тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α). NK клетките бяха премествани в 96-ямкови плаки, в които бяха направени съответните разреждания и манипулации, посочени в Материали и Методи.

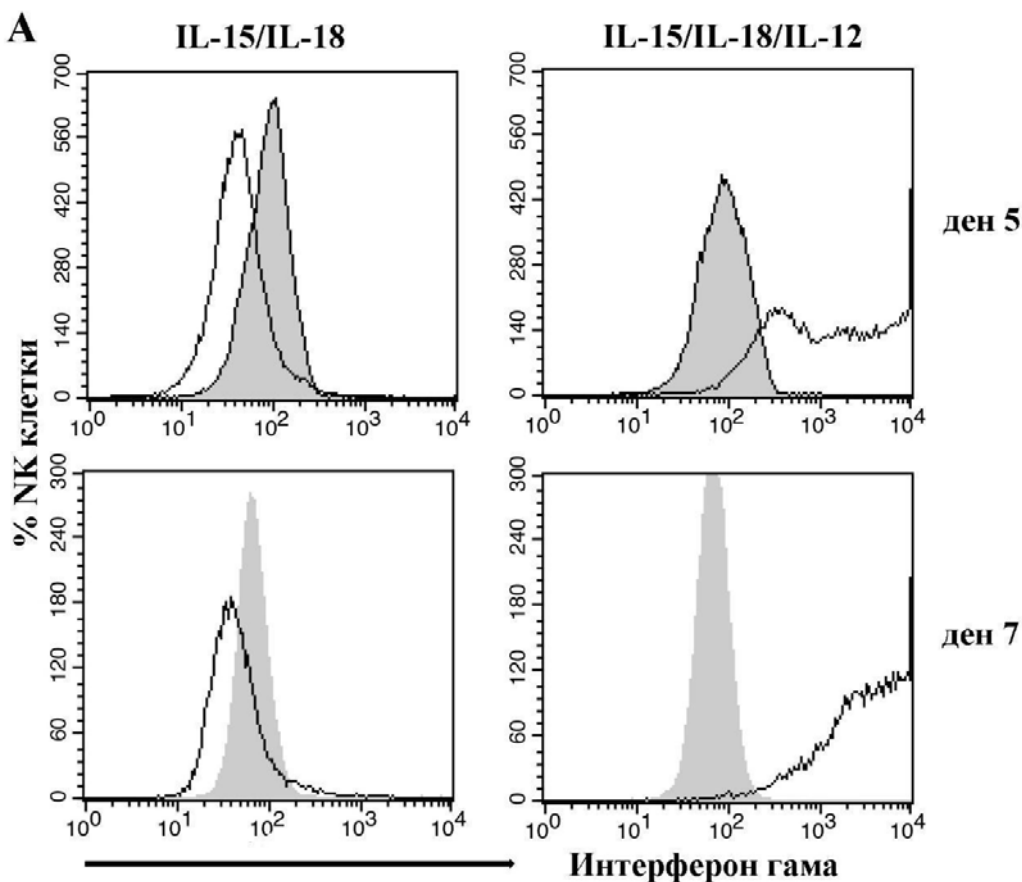
Клетките, които бяха стимулирани с IL-15/IL-18, не показаха секреция на IFN- γ и IL-10, за периода от 7 дни на култивиране. За разлика от интензивно пролифериращите клетки, NK клетки към, които бе добавен IL-12 (в началото на култивиране или на ден 2), показаха голяма продукция на интерферон гама (**Фигура 5А**), която бе последвана от високи нива на интерлевкин 10 (**Фигура 5Б**) и на тумор некротизиращ фактор алфа (**Фигура 5Г**). Тази секреция на молекули показва положителна градация от ден 1 към ден 7 от култивирането. Клетките естествени убийци, които бяха стимулирани с двойната комбинация IL-15/IL-18, секретираха трансформиращ фактор бета (**Фигура 5В**). Резултатите не показаха производство на TGF- β от клетките, към които бе прибавен IL-12. Присъствието на цитокина IL-12 доведе до производство на молекулите IFN- γ , IL-10, TNF- α , но не и на TGF- β . Обратна корелация се наблюдаваше при NK клетките, които бяха стимулирани само с IL-15/IL-18.



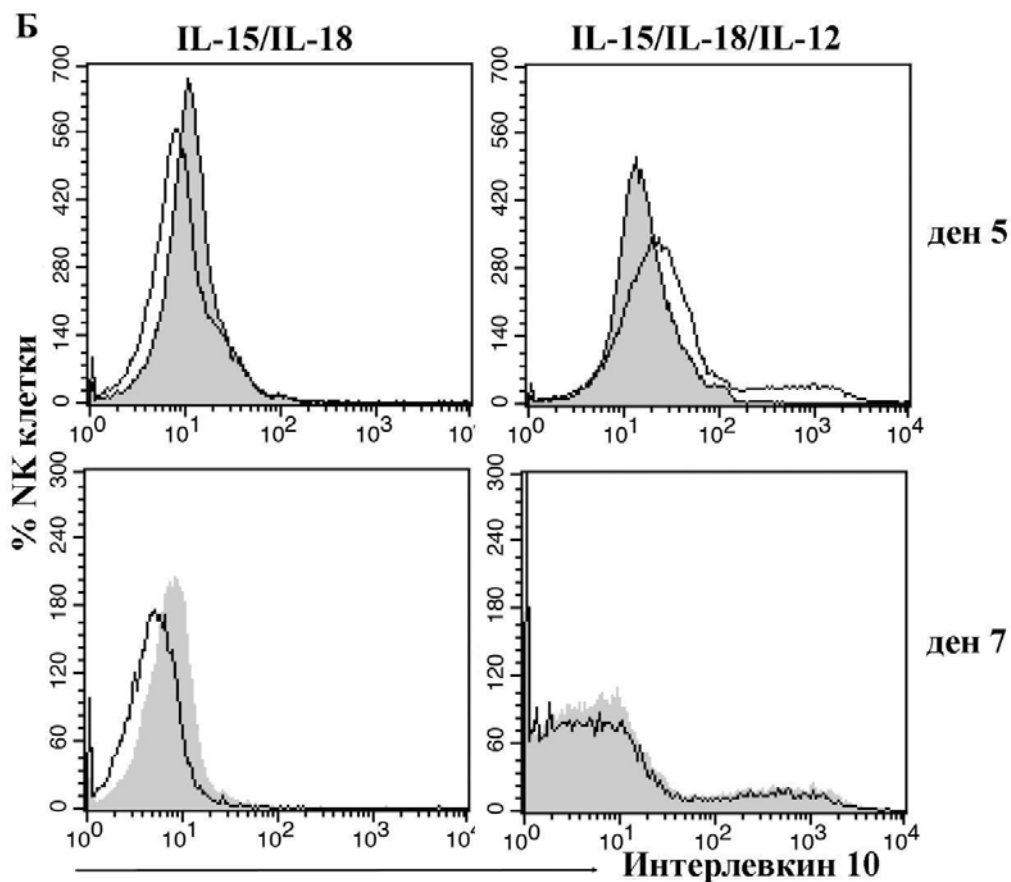
Фигура 5. Секреция на интерферон гама, интерлевкин 10, трансформиращ растежен фактор бета, тумор некротизиращ фактор алфа от НК клетки, които са стимулирани с цитокини IL-15/IL-18, IL-15/IL-18/IL-12, контрола – нестимулирани клетки. Определянето бе извършено на ден 1, ден 3, ден 5 и ден 7 от култивирането чрез метода ELISA. **А** – Секреция на интерферон гама от НК клетките. **Б** – Секреция на интерлевкин 10 от НК клетките. **В** – Секреция на трансформиращ растежен фактор бета от НК клетките. **Г** – Секреция на тумор некротизиращ фактор алфа от НК клетките.

За да потвърдим резултатите от ензимно-свързания имуносорбентен анализ, използвахме вътреклетъчно оцветяване, което е модификация на основното имунофлуоресцентно оцветяване, като открива вътреклетъчни антигени на ниво единични клетки чрез поточна цитометрия. Тъй като най-голяма пролиферация на клетките се наблюдаваше след ден 3, за определяне на секрецията на IFN- γ и IL-10 чрез метода на вътреклетъчно оцветяване, използвахме НК клетки, които са култивирани за 5 дни и 7 дни, стимулирани с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12. Резултатите от този анализ потвърдиха първоначалните резултати получени от ELISA метода. Когато IL-12 присъства в клетъчната култура на интензивно пролифериращите клетки – продукцията на IFN- γ беше изключително висока (**Фигура 6А**), последвана от

продукция на IL-10 (**Фигура 6Б**). Секреция на търсените молекули не се наблюдаваше при НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18 (**Фигура 6А и Б**).



Фигура 6А. Вътреклетъчно оцветяване на IFN- γ и IL-10. НК клетките са стимулирани с цитокини IL-15/IL-18, IL-15/IL-18/IL-12 и контрола (ISO). Определянето бе извършено на ден 5 и ден 7 от култивирането. Върху абсцисата е нанесена интензивността на секреция на съответната молекула (IFN- γ или IL-10), а върху ординатата – концентрацията на НК клетки, секретирани съответната молекула (IFN- γ или IL-10). А – Вътреклетъчно оцветяване на IFN- γ на ден 5 в НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12.

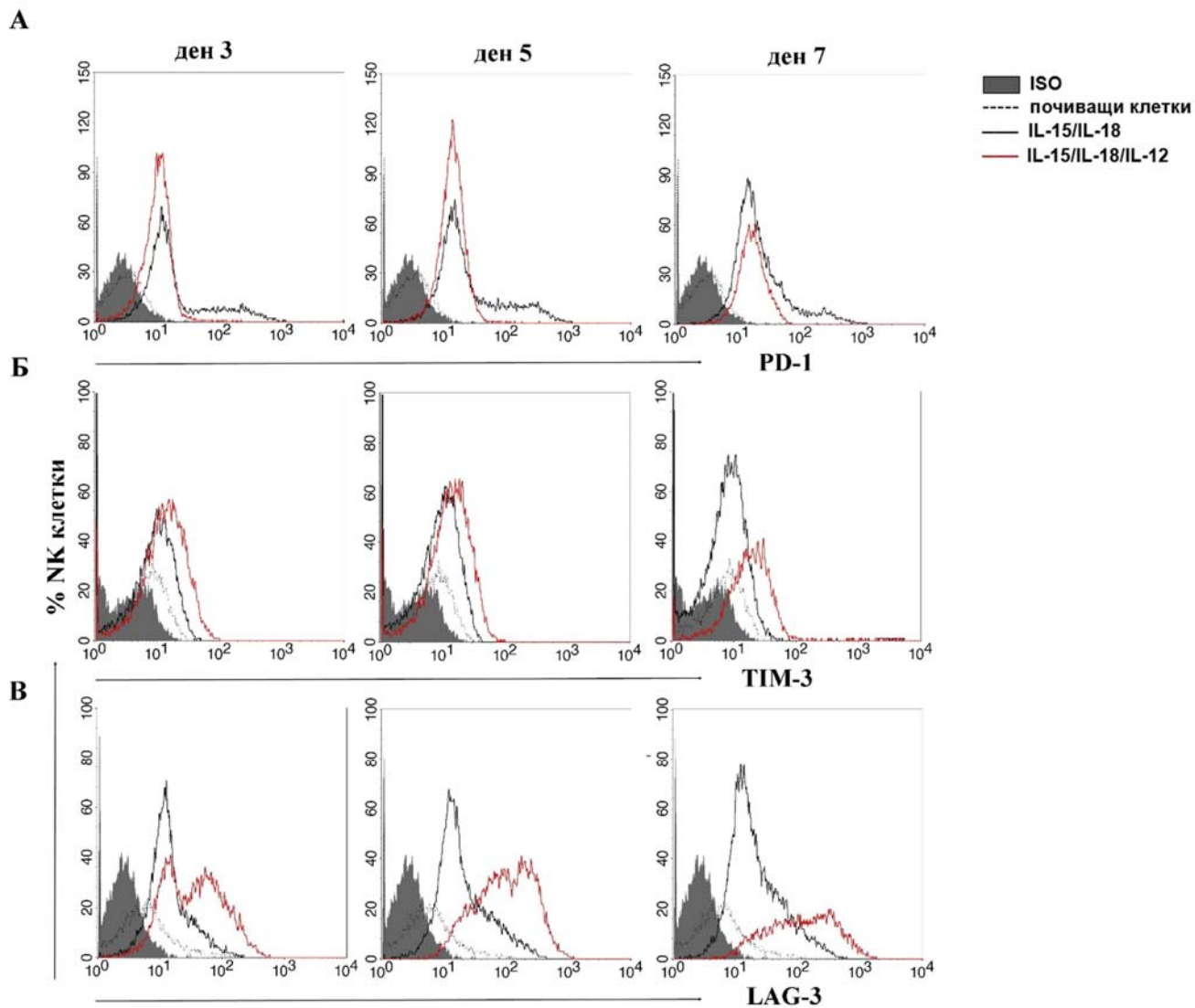


Фигура 6Б. Вътреклетъчно оцветяване на $IFN-\gamma$ и $IL-10$. NK клетките са стимулирани с цитокини $IL-15/IL-18$, $IL-15/IL-18/IL-12$ и контрола (ISO). Определянето бе извършено на ден 5 и ден 7 от култивирането. Върху абсцисата е нанесена интензивността на секреция на съответната молекула ($IFN-\gamma$ или $IL-10$), а върху ординатата – концентрацията на NK клетки, секретирани съответната молекула ($IFN-\gamma$ или $IL-10$). **Б** – Вътреклетъчно оцветяване на $IL-10$ на ден 7 в NK клетки, стимулирани с $IL-15/IL-18$ и $IL-15/IL-18/IL-12$. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.

5. Изследване на експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на NK клетките

Тъй като именно след стимулация с $IL-15/IL-18/IL-12$ беше наблюдавана по-слаба пролиферация, по-слаба експресия на активиращи маркери, както и висока секреция на $IFN-\gamma$, $IL-10$ и на базата на литературни данни предположихме, че тези NK клетки са „изтощени“ или регулаторни лимфоцити. В тази насока проверихме каква е експресията на инхибиращите рецептори PD-1, TIM-3, LAG-3, които се наричат имунни контролни точки върху NK клетките,

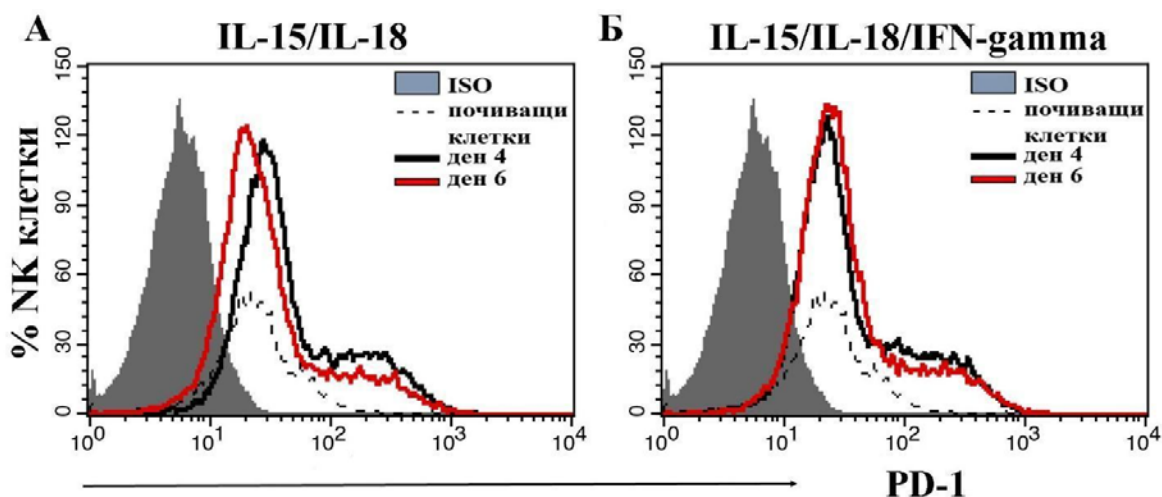
когато са стимулирани с IL-15/IL-18 и с IL-15/IL-18/IL-12. Както в предните направени експерименти тази експресия беше отчетена на ден 3, ден 5 и ден 7 от култивирането на клетките естествени убийци с цитокините. Неочаквано, интензивно пролифериращите НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18, показаха два пика на експресия на PD-1 рецептора. След добавяне на IL-12 високата експресия намаляваше до слаба или умерена такава (**Фигура 7А**). Значението на експресията и редукцията на PD-1, регулирана от IL-15, IL-18, IL-12 в НК клетките не беше изяснена, но беше явно видима. НК клетките, които бяха стимулирани с IL-15/IL-18 показаха ниска експресия на инхибиращи контролни точки TIM-3 и LAG-3 (**Фигура 7Б и 7В**), за разлика от клетките, на които бе добавен и IL-12. Присъствието на IL-12 в клетъчната среда увеличи експресията на инхибиращите рецептори TIM-3 и LAG-3 във времето на култивиране.



Фигура 7. Експресия на имунни контролни точки върху НК клетките, на ден 3, ден 5 и ден 7 след стимулация с цитокини IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12. **А** – Експресия на PD-1 върху НК клетките. **Б** – Експресия на TIM-3 върху НК клетките. **В** – Експресия на LAG-3 върху НК клетките. Върху абсцисата е нанесена интензивността на експресия на съответния рецептор, а върху ординатата – концентрацията на НК клетки с експесиран рецептор. Проследяване на резултатите на НК клетките, които не са стимулирани (----), НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18 (в черно на графиката), НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18/IL-12 (в червено на графиката), ISO – контрола (в сиво). Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.

Тъй като IL-12 е силен стимулатор за производството на IFN- γ , следваше да проверим дали високата експресия на имунните контролни точки, се дължи на IL-12 или на IFN- γ . Стимулирахме НК клетките с IL-15/IL-18 и вместо IL-12

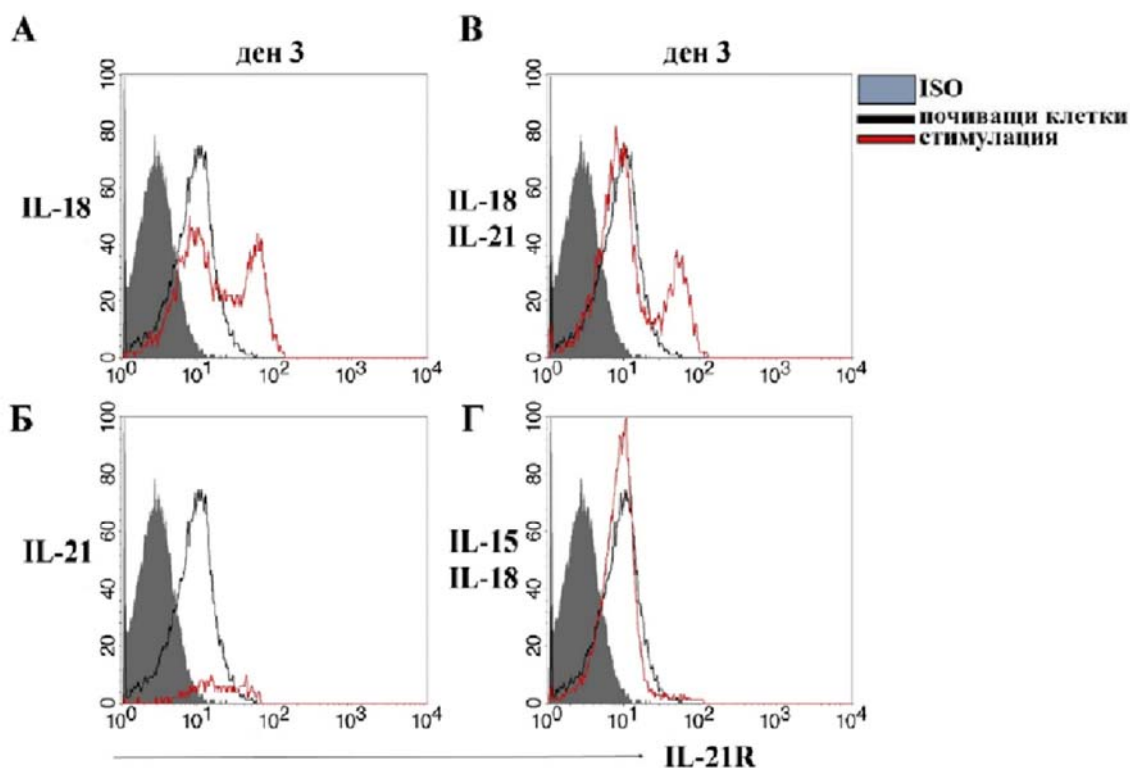
добавихме IFN- γ (IL-15/IL-18/IFN- γ). Използвахме три различни концентрации на IFN- γ – 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, а експресията проверихме на ден 4 и ден 6. Както се вижда от **Фигура 8А и Б**, потискането на експресията на PD-1 от IL-12 е интерферон гама независимо. Всички използвани концентрации на IFN- γ показаха сходни резултати и по тази причина на **Фигура 8Б** е показана стимулацията с една от използваните концентрации. Екзогенният IFN- γ също така не промени експресията на TIM-3 рецептора (резултатите не са показани) и ефектът на IL-12 е очевидно независим от интерферон гама.



Фигура 8. Експресия на PD-1 рецептора върху NK клетките, ден 4 и ден 6. Върху абсцисата е нанесена интензивността на експресия на съответния рецептор, а върху ординатата – концентрацията на NK клетки с експресиран рецептор. **А** – Експресия на PD-1 след стимулация на клетките с IL-15/IL-18. **Б** – Експресия на PD-1 след стимулация на клетките с IL-15/IL-18/IFN-gamma (1 μ g/ml). Проследяване на резултатите на NK клетките, ISO – контрола (в сиво), NK клетки, които не са стимулирани (-----), ден 4 (в черно на графиката), ден 6 (в червено на графиката). Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.

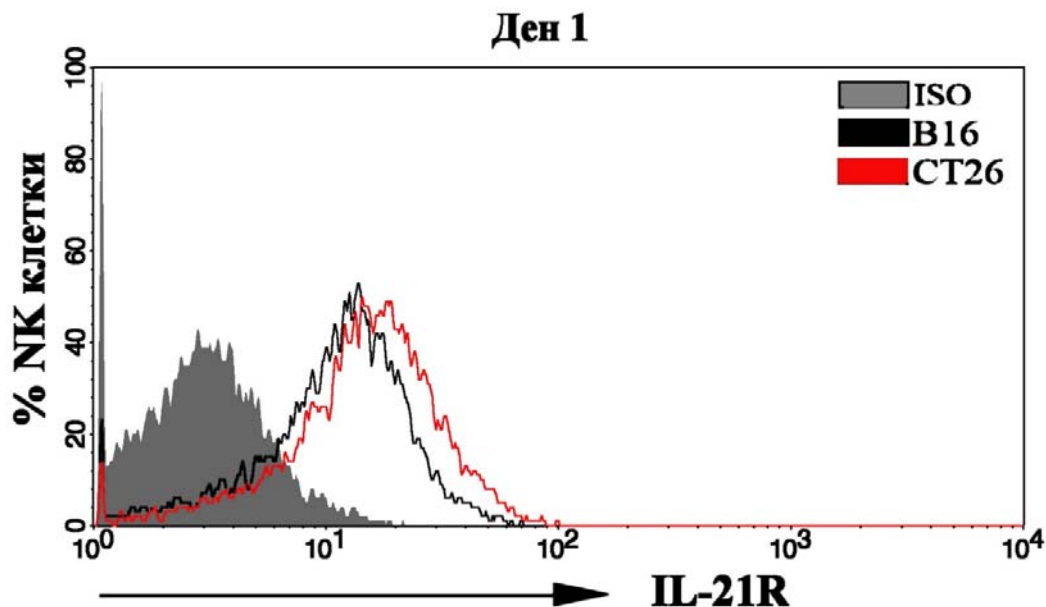
6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ НК клетки

Освен изследвания свързани с това как се създават „изтощени“ лимфоцити и какъв е техният фенотип, търсихме начин, по който тези лимфоцити могат да бъдат върнати във функционално състояние. Стимулирахме НК клетките с цитокини, а след това използвахме туморни клетъчни линии B16 (CRL-6475) (клетъчна линия на миша меланома) и CT26 (CRL-2638) (миши карцином на дебелото черво). Когато клетките естествени убийци бяха стимулирани само с IL-18 или с IL-18/IL-21 експресията на IL-21R беше увеличена (**Фигура 9А и 9В**). Единичната стимулация на НК клетките с IL-21 или с IL-15/IL-18 не доведе до повишаване на експресията на рецептора (**Фигура 9Б и 9Г**). Стимулацията на НК клетките с ракови клетъчни линии B16 (клетъчна линия на миша меланома) и CT26 (миши карцином на дебелото черво) само за една нощ на култивиране доведе до увеличаване на експресията на IL-21R (**Фигура 10**).



Фигура 9. Експресия на IL-21 рецептора върху НК клетките, след стимулация с цитокини, ден 3. Върху абсцисата е нанесена интензивността на експресия на съответния рецептор, а върху ординатата – концентрацията на НК клетки с експресиран рецептор. Проследяване на резултатите на НК клетките, ISO – контрола, НК клетки, които не са стимулирани (в черно), НК клетки,

стимулирани с цитокини (в червено). Стимулацията е показана в ляво от всяка графика. **А** – Експресия на IL-21R след стимулация с IL-18. **Б** – Експресия на IL-21R след стимулация с IL-21. **В** – Експресия на IL-21R след стимулация с IL-18/IL-21. **Г** – Експресия на IL-21R след стимулация с IL-15/IL-18. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.



Фигура 10. Експресия на IL-21 рецептора върху NK клетките, след стимулация с ракови клетъчни линии B16 (CRL-6475) (клетъчна линия на миши меланома) и CT26 (CRL-2638) (миши карцином на дебелото черво), ден 1. Върху абсцисата е нанесена интензивността на експресия на съответния рецептор, а върху ординатата – концентрацията на NK клетки с експресиран рецептор. Проследяване на резултатите на NK клетките, ISO-контрола, NK клетки, стимулирани с B16 (в черно), със CT26 (в червено) на графиката. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.

7. Изследване на връзката между някои фактори на клетъчния и хуморалния имунен отговор при имунологично обусловеното безплодие при човека.

Изследвани бяха 75 пациенти с проблеми в репродуктивния статус, от които 40 жени и 35 мъже на възраст 23-47 години (\bar{x} жени 35,175г., $\sigma=5,821$; \bar{x} мъже – 39,143, $\sigma=6,230$). Контролната група включва 26 здрави кръводарители от същата възрастова група, от които 13 жени и 13 мъже с доказана фертилност.

Пациентите са със следните диагнози: първичен стерилитет – 31 души (22 жени и 9 мъже), с вторичен стерилитет, като жените са с хабитуални аборти – 27 души (18 жени и 9 мъже), 17 мъже с възпалителни заболявания като варикоцеле,

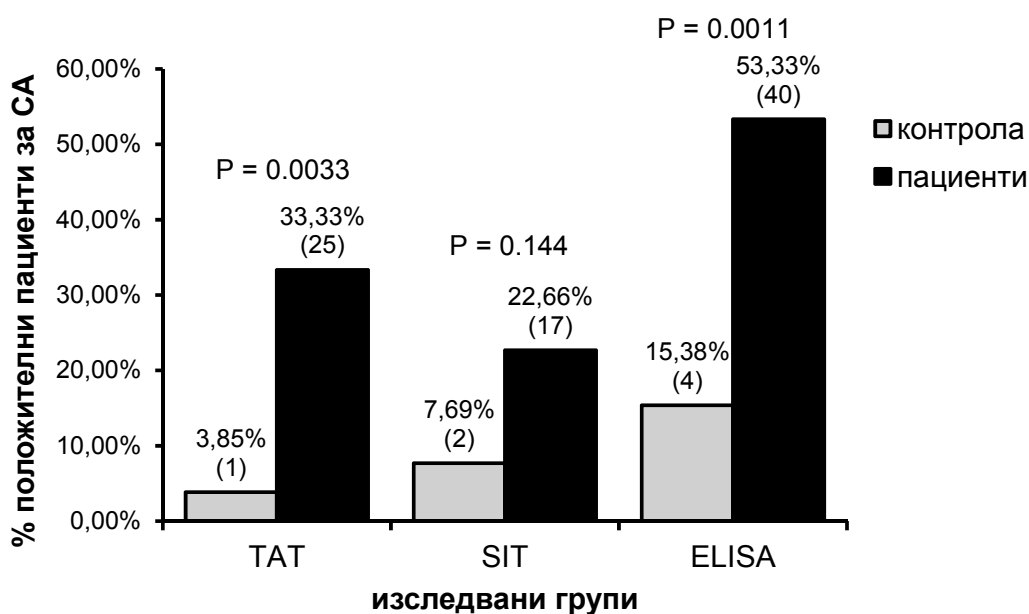
простатит, крипторхизъм (аномалия на мъжката полова система), боледували от вирусен паротит, 6 от жените с вторичен стерилитет и с хабитуални аборти са изследвани за техния НК профил, като 2 от тях са с висока НК клетъчна активност ($N \geq 10\%$), 4 с висок процент НК клетки ($N \geq 6.5-13.5\%$).

При изследване на групата пациенти с репродуктивни проблеми получихме следните данни: при TAT 25 пациенти показаха клинично значими титри на спермоаглутиниращите антитела (33,33%), в SIT – 17 пациенти (22,66%) показаха клинично значими титри на спермоимобилизиращите спермоантитела, а в ELISA при 40 (53,33%) пациенти се доказаха спермоантитела в клинично значими стойности.

При изследването на контролната група (фертилни лица) с трите метода бяха получени следните резултати: в TAT – 1 положителен (3,85%), в SIT – 2 положителни (7,69%) и в ELISA – 4 положителни (15,38%).

При методите TAT и ELISA се доказва статистически значима разлика за честотата на спермоантитела в групата на изследваните пациенти по отношение на контролната група, ($P < 0,05$).

Получените резултати са представени на **Фигура 11**.

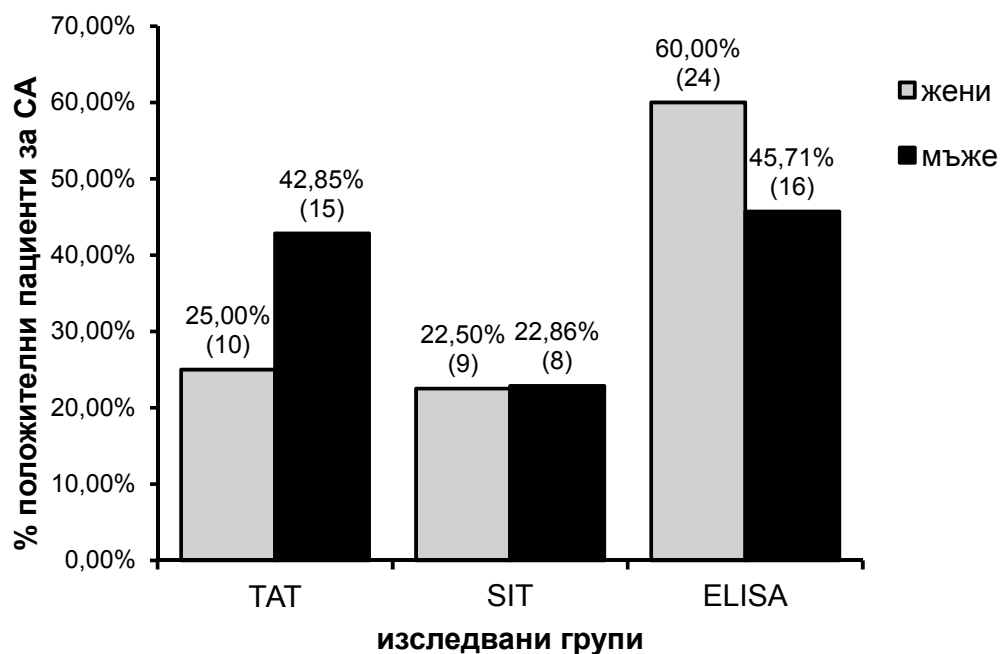


Фигура 11. Честота на положително реагиращите серуми от изследваните групи по отношение на спермоаглутиниращи (TAT), спермоимобилизиращи (SIT)

и антитела установени чрез ELISA. Графично е представен процентния дял на положителните резултати и техният брой в скоби по трите метода за изследване на СА у пациентите с безплодие, сравнени с контролната група пациенти. TAT и ELISA – $P < 0.05$ (За статистически достоверни се приемат резултати при $P < 0,05$).

Изследвана беше честотата на положително реагиращите серуми в пациентската група, като бяха сравнени данните за реагиращите в клинично значими стойности на жени и мъже, в трите приложени метода за спермоантитела. След проведените експерименти и анализирани на получените данни не беше установена статистически значима разлика в резултатите при двата пола, ($P > 0,05$).

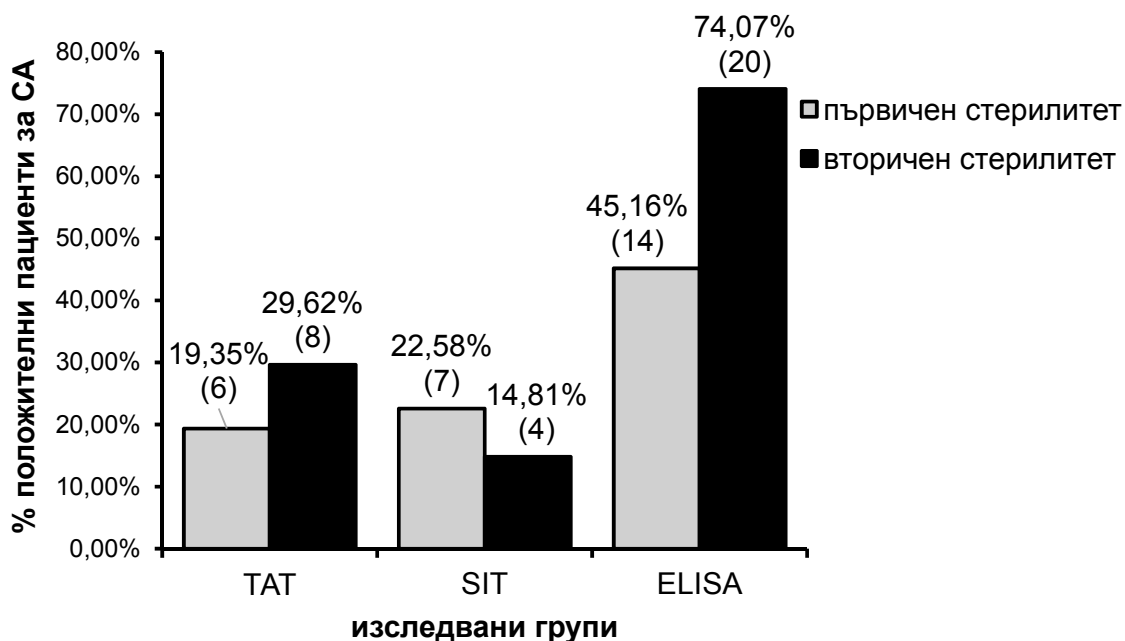
Получените резултати са представени на **Фигура 12**.



Фигура 12. Честота на положително реагиращите серуми от безплодни мъже и жени. Графично е представена процентната честота на положителните резултати и техният брой в скоби по трите метода за изследване на СА, ($P > 0,05$) (TAT – $P = 0,643$, SIT – $P = 1$, ELISA – $P = 0,252$).

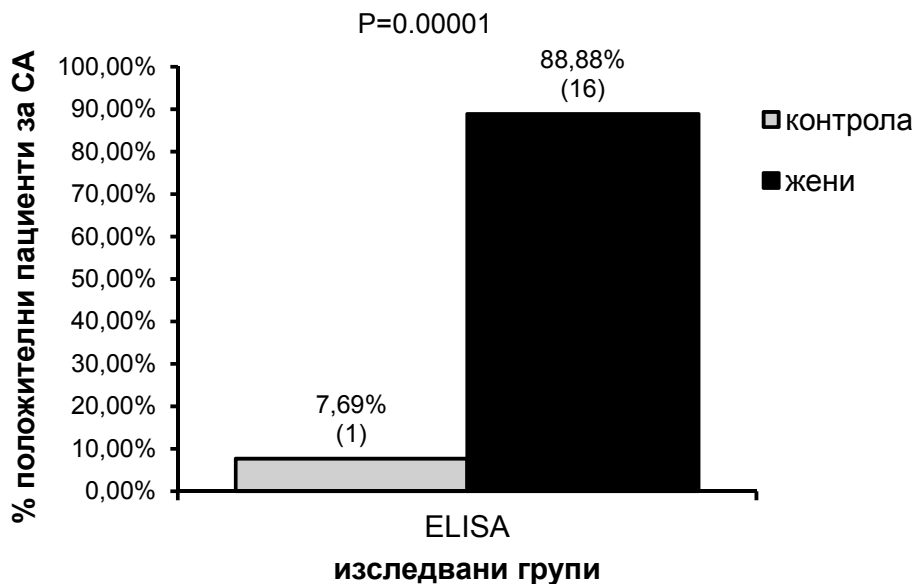
След разделяне на пациентите по диагнози: първичен стерилитет ($n = 31$) и вторичен стерилитет ($n = 27$), беше установена отново честотата на спермоантитела, чрез приложените методи. Беше анализирана корелацията между получените честоти чрез екзактен тест на Фишер. Получените резултати

показаха статистически достоверна разлика в честотата на изследваните серуми след прилагане на метода ELISA ($P=0,034$) при двете групи пациенти, но такава статистически значима разлика не бе доказана след прилагане на методите TAT и SIT $P>0.05$ (Фигура 13).



Фигура 13. Честота на положително реагиращите серуми при пациенти с първично и вторично безплодие. Графично е представена процентната честота на положителните резултати и техния брой в скоби по трите метода за изследване на СА, ($P>0,05$), $P>0.05$ (TAT – $P=0,540$, SIT – $P=0,518$, ELISA – $P=0,034$).

Тъй като вторичният стерилитет може да е следствие от родено дете или един или повече последователни аборти, направихме преброяване на жените с вторичен стерилитет и аборт. Обединихме жени с вторичен стерилитет и хабитуални аборти. Сравнихме тази група с контролната. Установено беше, че в ELISA положително реагиращите пациенти са 88,88% (16 души), спрямо 7,69% (1 човек) в контролната група. При изследване на групата пациенти с вторично безплодие и хабитуални аборти, получихме статистическа значима разлика при метода ELISA, $P<0.05$ ($P=0.00001$). Резултатите са представени на **Фигура 14**.



Фигура 14. Честота на положително реагиращите жени с вторично безплодие и хаbitуални аборти в ELISA. Сравнение на честотата на положително реагиращите жени (брой в скоби) и контролната група в ELISA, $P < 0.05$, $P = 0.00001$.

Тъй като бяха наблюдавани статистически значими стойности в групата жени с вторичен стерилитет и хаbitуални аборти, чрез прилагане на метода ELISA, бяха подбрани 6 жени, при които персистираще безплодието и които бяха проследявани във времето, с цел изследване на фенотипа и функциите на НК клетките. Тези жени бяха насочени от нас за изследване активността, фенотипа и концентрацията на НК клетките в клинична лаборатория, като в случая избраните от тях лаборатории извършили тези експерименти са Cibalab, Репро Инова, лаборатория клинична имунология на болница Надежда. В **Таблица 1** са представени резултатите на три от шестте пациентки (представителна извадка), а в **Таблица 2** са обобщени получените резултати, любезно предоставени от пациентките. Жените, позитивни за спермоантитела в метода ELISA, показаха и промяна в тяхната НК клетъчна активност (тя е по-висока от референтните стойности в норма $N < 11\%$). Този процент е изчислен спрямо броя лизирани K562 (миелогенна левкемия, клетъчна линия от еритролевкемичен тип) таргетни клетки. При някои жени с вторичен стерилитет бе повишен и процентът НК

клетки спрямо общия брой лимфоцити (референтните граници са 2-13%), при други процентът CD3⁻CD16⁺CD56⁺ от всички NK клетки (референтните граници са N<12%) или процентът CD3⁻CD16⁻CD56⁺ клетки от всички NK клетки (референтните граници са 6.5-13.5%). Пациентките позитивни за производството на спермоантитела след прилагане на метода ELISA, показаха и промяна в NK клетъчните субпопулации и активност, повишаване на % NK клетки спрямо всички лимфоцити и/или завишаване на NK клетъчната активност (**Фигура 15 и Фигура 16**).

Таблица 1. Резултати на жени с вторичен стерилитет и хабитуални аборти от изследвания на NK клетъчна активност и субпопулации, и оценка производството на СА чрез TAT, SIT и ELISA. Положителните резултати са представени в **Bold**. NK клетъчната активност показва процента лизирани K562 клетки от клетките естествени убийци, референтните граници са N<11%. Определеният процент NK клетки е спрямо общия процент лимфоцити, референтните граници са 2-13%. Процент CD16⁻CD56⁺ клетки от всички NK клетки, референтните граници са 6.5-13.5%.

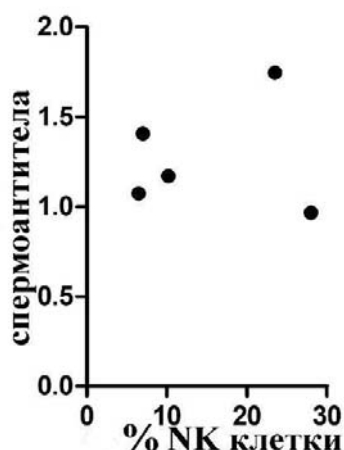
Пациент ♀	% NK клетки	CD16 ⁻ CD56 ⁺	NK клетъчна активност	TAT	SIT	ELISA (Cut off -0,928)
1	6,46%	20,79%	7%	256	1,102	1,073
2	23,5%	12,1%	11,2%	<2	0,625	1,746
3	10,2%	8,5%	11%	<2	0,410	1,917

Таблица 2. Сравнение между NK клетки и СА при жени с вторичен стерилитет и хабитуални аборти след прилагане на метода ELISA. Положителните резултати са представени в **Bold**.

Жени с вторичен стерилитет и хабитуални аборти	Промяна в NK клетъчната активност и/или субпопулации		Оценка производството на антиспермални антитела чрез ELISA
	NK клетъчна активност	NK субпопулации	
Пациент 1	В норма	В норма	Позитивни
Пациент 2	Завишена	В норма	Позитивни
Пациент 3	В норма	Завишени	Позитивни
Пациент 4	Завишена	Завишени	Позитивни

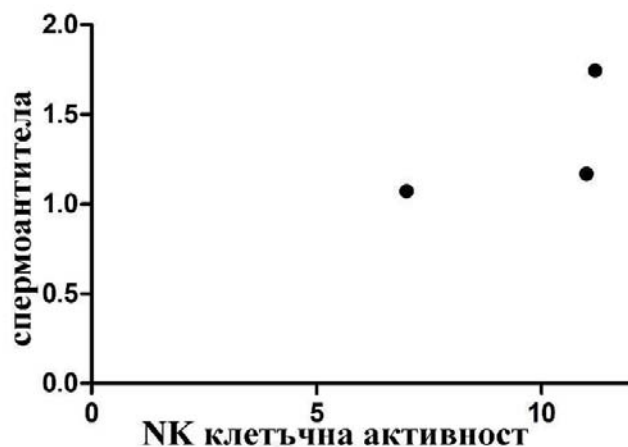
Пациент 5	В норма	Завишени	Позитивни
Пациент 6	В норма	Завишени	Позитивни

Завишено количество на спермоантитела се наблюдаваше след прилагане на метода ELISA спрямо съответния cut off, както и повишаване на процента НК клетки спрямо общия брой лимфоцити при жени с вторичен стерилитет и последователни аборти (**Фигура 15**). Референтните граници за процент НК клетки са 2-13%. По-високият процент НК клетки, надвишаваше процента в норма и предполага по-голям риск за възникване на спонтанен аборт.



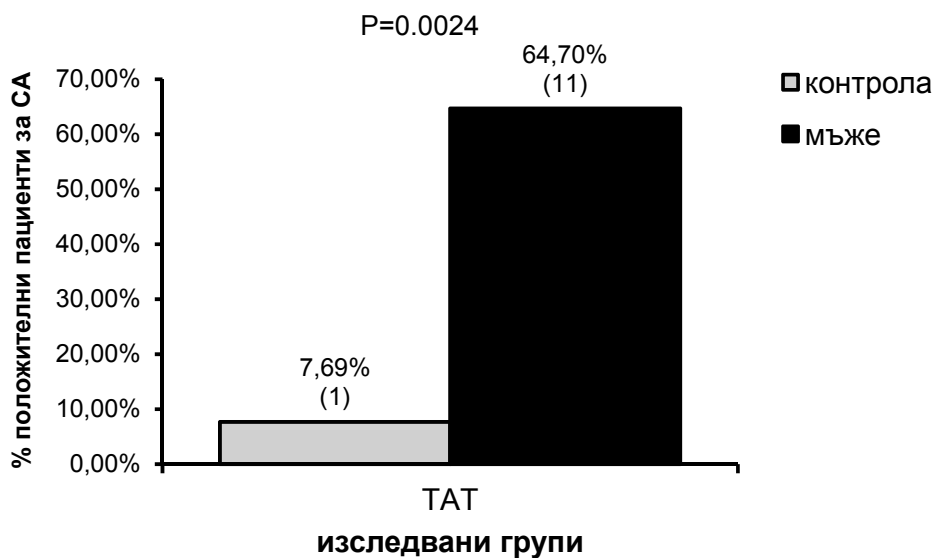
Фигура 15. Производство на спермоантитела след прилагане на метода ELISA и % НК клетки при жени с вторичен стерилитет и хаbitуални аборти. Графиката е направена с програма GraphPad Prism 5.

Освен, че процентът НК клетки бе повишен при част от пациентките с вторичен стерилитет и хаbitуални аборти, но също и НК клетъчната активност (**Фигура 16**), както и производството на спермоантитела. Тази завишена клетъчна активност на клетките естествени убийци повишава и вероятността за възникване на спонтанен аборт.



Фигура 16. Производство на спермоантитела след прилагане на метода ELISA и NK клетъчна активност при жени с вторичен стерилитет и хабитуални аборти. Графиката е направена с програма GraphPad Prism 5.

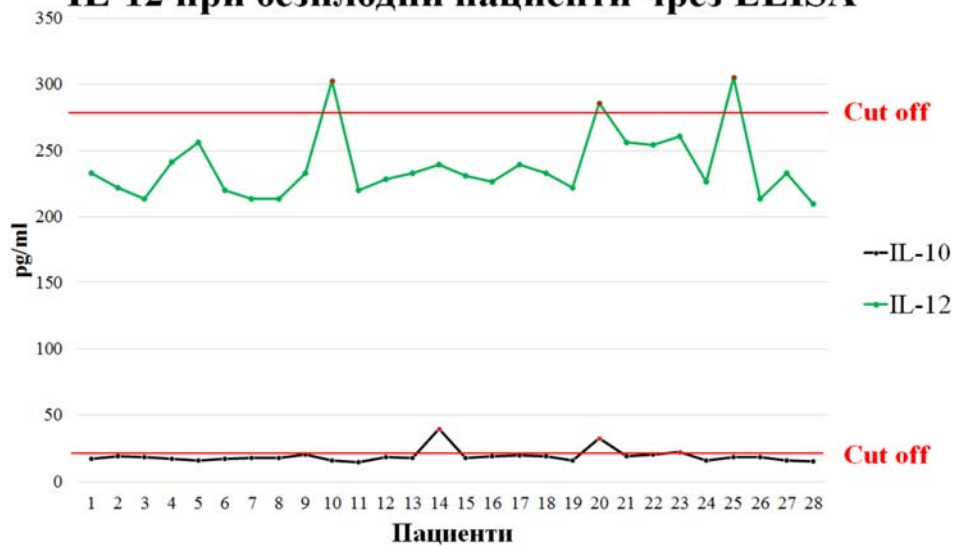
От изследваните 35 мъже, 17 са с възпаление на мъжката репродуктивна система, а останалите са пациенти с първично или вторично безплодие, с нарушения в сперматогенезата и отклонения в спермограмата. Сравнихме получените резултати между тази група и контролната, която включва 13 мъже. Статистическа значима разлика се наблюдаваше след прилагане на спермоаглутинационния тест на Фриберг (ТАТ), $P < 0.05$ ($P = 0.0024$) (Фигура 17).



Фигура 17. Честота на безплодните мъже с възпалителни заболявания и отклонения в спермограмата в ТАТ. Графично е представена процентната честота на положителните резултати и техния брой в скоби след прилагане на ТАТ метода за изследване на СА, ($P > 0,05$).

След това подбрахме 28 пациенти с първичен и вторичен стерилитет, които бяха изследвани с метода ELISA за производство на спермоантитела, за да ги изследваме и за секрецията на IL-10 и IL-12 отново чрез ELISA. Беше установено, че при пациентите 50% (14, от които 8 жени и 6 мъже) от изследваните серуми са положителни по отношение на производството на спермоантитела спрямо сперматозоидни антигени, докато при контролната група този процент беше значително по-малък (15,38%) на базата, на което се изчисли статистически значима разлика: $P < 0,004$ (резултатите не са показани). На същите групи пациенти беше приложена и индиректна ELISA за изследване на концентрацията на IL-10 и IL-12 в серума, и беше установено, че 3 пациенти (3 мъже) показват по-висока концентрация на IL-10 от изчисления Cut off (барьерна стойност, получена на базата на резултатите от отрицателната контролна група) и 3 пациенти (1 жена и 2 мъже) с по-висока концентрация на IL-12, тези пациенти са отбелязани на **Фигура 18** с червени точки. Един от тези пациенти (мъж с възпалителни заболявания) е с висока концентрация както на IL-10, така и на IL-12.

Изследване на концентрацията на IL-10 и IL-12 при безплодни пациенти чрез ELISA



Фигура 18. Серуми на безплодни пациенти, изследвани за концентрацията на интерлевкини (IL-10, IL-12) чрез ELISA. Cut off – стойност – изчислена на базата на отрицателната контролна група. Пациентите със стойност висока от Cut off са оцветени в червени точки на графиката.

V. ОБСЪЖДАНЕ

1. Изолиране, пречистване и култивиране на NK клетки от слезката на П-18КО мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ NK клетки

За целите и задачите на настоящото изследване беше необходим подходящ протокол за получаване на пречистени NK клетки от опитни животни (лабораторни мишки). За изолиране на NK клетъчната популация беше използван доказан в дългогодишната лабораторна практика метод, разработен от компанията Miltenyi Biotec през 1989 г., чиито основател е Stefan Miltenyi и усъвършенстван в Лабораторията по туморна имунология и клетъчна терапия, с ръководител проф. Х. Окамура. Чистотата на така получената NK клетъчна популация беше оценена с помощта на поточна цитометрия и при повечето експерименти беше над 90% (**Фигура 1**). Тази висока степен на чистота доказва уместността и ефективността на приложените методи и е предпоставка за получаване на надеждни експериментални резултати и достоверност на направените въз основа на тях заключения.

Според литературни данни (French et al., 2006) и данни от проведените предишни експерименти в Лабораторията по туморна имунология и клетъчна терапия (Yamanishi et al., 2018), беше подбрана комбинация от интерлевкини, които да бъдат добавени в средата за култивиране, така че ефектът им върху пролиферацията и функционалното състояние на NK клетките да се изследва поотделно и в различни комбинации.

2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на П-18КО мишки NK клетки след стимулирането им чрез цитокини

Успешната имунна защита на организма изисква при навлезли в него патогени или възникнали в тъканите му неоплазми да се увеличи оптимално броят на ефекторните лимфоцити – както цитотоксични Т лимфоцити, специфични за определени антигени, така и NK клетки, чиято активност се определя не от наличието на конкретна антигенна молекула, а от баланса между активиращи и инхибиращи сигнали. Доколкото като участници във вродения

имунитет, NK клетките са готови да реагират незабавно на активиращите сигнали, без да изискват антигенно представяне и селекция на специфични за даден антиген клонове, те играят особено важна роля в началните етапи на защитната реакция. Освен това те впоследствие могат да подсилят действието на механизмите на специфичния (адаптивен) имунитет, например като осъществяват антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност посредством своите активиращи Fc-рецептори. Ето защо е оправдан интересът към стимулацията на клетките естествени убийци, която би могла да допринесе за по-бързо и ефективно овладяване на опасността от инфекциозни агенти или трансформирани клетки и би осигурила добър старт на последвалия специфичен имунен отговор.

Нашите резултати показват, че почиващите (resting) NK клетки биха могли бързо да увеличат своя брой в отговор на стимулацията с IL-15/IL-18 (**Фигури 2А и 2Б**). Получените от нас резултати потвърждават данните от изследвания на други автори, демонстриращи, че комбинацията от IL-15/IL-18 стимулира пролиферацията на NK клетките (French et al., 2006). При това нашите резултати, показани на **Фигура 2**, са върху миши NK клетки, докато литературните данни се отнасят за човешки. Следователно получените от нас данни не са просто с потвърдителен характер, а осигуряват допълнителна информация за стимулиращото действие на IL-15/IL-18 върху NK клетките, като го установяват върху биологичен модел – мишка. Сходството в реакцията на NK клетките от два вида бозайници (човек и мишка) към комбинацията от двата интерлевкина сочи еволюционна консервативност на този сигнален механизъм, което от своя страна е показателно за неговата важност за имунната защита на организма.

Наблюдаваната висока пролиферативност на NK клетките след стимулация с двата цитокина едновременно най-вероятно се дължи на факта, че рецепторите за тези два цитокина се експресират конститутивно. Те бързо могат да предадат нужните сигнали в клетката, да активират JAK/STAT и NF- κ B сигналните пътища, което води до активиране на експресията на набор от гени, протеинов синтез и встъпване в делене. Следва да се отбележи, че IL-18 след

свързване със своя рецептор задейства NF- κ B сигналния път, но не и STAT5, а обратното е в сила за действието на IL-15 (Tato et al., 2006; Lin et al., 2017). По този начин при едновременно прилагане на тези интерлевкини активирането на двата сигнални пътя, NF- κ B и STAT5, води до ефективна пролиферация на НК клетките. Тези данни за механизма на действие на двата интерлевкина обясняват нашите експериментални резултати (**Фигура 2**) и публикуваните от други изследователи сходни резултати, получени при друг обект (French et al., 2006) за ефекта от ко-стимулирането и на двата сигнални пътя за пролиферацията на НК клетките.

Получените от нас резултати, които показват промяна в пролиферацията на НК клетките след стимулация с интерлевкини IL-12, IL-15, IL-18 (поединично или в комбинация) са потвърдени и след наблюдаването на морфологични промени (**Фигура 3**). Наличието на закръгляне на клетките и струпвания от клетки-кълстери между ден 3 и 4 от култивирането (**Фигура 3Г**), е характерно само след двойна стимулация с IL-15/IL-18. Тези клетъчни промени, изразяващи се в близък контакт между клетките по време на делене са добре известни от резултатите, описани от други автори (Kim et al., 2017). Близкият контакт позволява по-високи нива на клетъчна сигнализация. В случая, по-добрата клетъчна сигнализация е задействана посредством сигналните пътища NF- κ B и JAK/STAT. Интерлевкините 15 и 2, които принадлежат към семейство цитокини с 4 алфа спирали, споделят и общи рецептори - IL-2R β (CD122) и γ c, при свързване с които активират STAT3 и STAT5 в прицелната клетка. По този начин интерлевкините задействат производството на циклини (например на циклин B1, D2) и клетъчната пролиферация (Gupta et al., 2019). Всички цитокини, които споделят рецептора γ c са смятани за потенциални активатори на клетъчния цикъл, като една от посочените причини е повишеното производство на циклини, които са важни за нормалното протичане на клетъчния цикъл (Vigliano et al., 2012).

В литературата съществуват оскъдни данни за действието на IL-21 върху пролиферацията на НК клетките, но тъй като той е един от членовете на γ c

семејството, такъв потенциал е възможен. Описаните ефекти на този цитокин са твърде нееднозначни, като включват както активирани, така и предизвикване на апоптоза (Li et al. 2015). В организма обаче конкретните молекулни сигнали действат не изолирано, а съвместно под формата на сложен „коктейл”, поради което е нужно изследването им не само поединично, а и в комбинации. Нашите резултати показват, че пролиферацията на НК клетките се увеличава слабо след единична стимулация с IL-21 (**Фигура 2В**), повишава се статистически значимо след единична стимулация с IL-18 и двойна стимулация с IL-18/IL-21 (**Фигура 2В**). Въпреки това обаче пролиферативното действие на комбинацията IL-18/IL-21 остава по-слабо от това на IL-15/IL-18. Следователно от изследваните цитокини и техни комбинации най-силен и статистически значим ефект върху пролиферацията на НК клетките има стимулацията с IL-15/IL-18 (**Фигури 2А и 2Б**). Този стимулационен протокол, ако в бъдеще се намери начин да бъде използван за имуностимулиращо въздействие върху пациенти, би имал най-добро приложение за бързо увеличаване на ефекторната популация от НК клетки при нашествие на патоген или възникване на неоплазми.

При прилагането на комбинации от цитокини отделните им ефекти се наслаждат и могат да се подсилват взаимно (като IL-18/IL-21 и IL-15/IL-18) или, напротив, да се противопоставят. Като пример за второто явление при нашите експерименти е очевидно, че добавянето на IL-12 към стимулираните с IL-15/IL-18 НК клетки инхибира силното пролифериращо действие на IL-15 и IL-18 (**Фигура 2Б**). Това поставя въпроса за биологичното значение на IL-12. Смята се, че основната му роля е да индуцира производството на IFN- γ и диференциацията на Th₁ клетките (Okamura et al., 1995; Okamura et al., 1998); на този етап биологичната му роля за вродения имунитет и по-конкретно върху пролиферацията на НК клетките все още не е проучена. Нашите резултати показват, че IL-12 най-вероятно действа като диференциращ фактор и води до излизане на клетката от клетъчния цикъл. Когато IL-12 бъде добавен на ден 0 или ден 2 от култивирането с IL-15/IL-18, неговото присъствие в средата силно потиска пролиферацията на НК клетките. Възможна причина за това е описаното

от други автори превръщане на НК клетките в дълго живеещи клетки, наречени „изтощени” НК клетки или memory-like NK поради сходството на някои техни фенотипни характеристики с известните от специфичния имунен отговор клетки на паметта (Romee et al., 2012; Leong et al., 2014).

Процесът на получаване на дълго живеещи НК клетки разкрива присъщата на тези лимфоцити „дихотомия” между процесите на пролиферация и диференциация. При това силно пролифериращите клетки проявяват ефекторни функции, докато диференцираните клетки имат характеристики на дълготрайни, подобни на клетките на паметта, „изтощени” НК клетки, но с намалена ефекторна функция. Освен това тези дълготрайни, подобни на паметните клетки, „изтощени” НК клетки проявяват регулаторна функция като произвеждат IL-10 (**Фигура 5Б и Фигура 6Б**). По този начин представените от нас резултати потвърждават, че IL-15 и IL-18 имат описания диференциращ ефект не само върху човешки НК клетки, за които се отнасят горесцитираните литературни данни, но също и върху миши НК клетки, както и че експанзията на тези клетки е зависима от присъствието на IL-18 в средата за култивиране.

В литературата съществуват недостатъчно данни относно ефектите на IL-18 и IL-15 върху пролиферацията на НК клетки, изолирани от IL-18КО мишки. Нашите резултати доказват, че стимулацията на спленоцити от IL-18КО мишки само с IL-15 не води до експанзия на НК клетките (**Фигура 2А**), за разлика от двойната стимулация, в която присъства и IL-18 и която е високо резултатна в това отношение (**Фигури 2А и 2Б**).

3. Проучване на ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на НК клетките

След комбинирана стимулация с цитокините IL-12, IL-15 и IL-18 бе наблюдавана не само промяна в пролиферацията и диференциацията на НК клетките, но също така и драстично се промени повърхностната експресия на различни маркери на клетъчното диференциране и функционално състояние (**Фигури 4 и 7**). Новоизолираните, нестимулирани НК клетки от слезка на IL-18КО мишки имаха ниска експресия на повърхностните маркери NKG2D, CD69,

CD107a, CD25, CXCR3 (**Фигура 4А, Б, В, Г и Д**). За разлика от тях интензивно пролифериращите НК клетки, които са стимулирани с IL-15/IL-18, експресираха повишени нива на молекули, свързани с ефекторните им функции като NKG2D и CD69 (**Фигура 4А и Б**). По друг път на диференциране тръгват IL-10 продуциращите или дълго живеещи НК клетки, получени след комбинирана стимулация с IL-15/IL-18 и IL-12. Тези клетки редуцираха експресията на някои от тези молекули – NKG2D и CD69 (**Фигура 4А и Б**) и увеличаваха експресията на други – CD25, CD107a, CXCR3, NKG2A/C/E, TIM-3 и LAG-3 (**Фигури 4В, Г, Д, Е и 7Б и В**).

Получените от нас резултати съответстват на данните, че единична стимулация на НК клетките с IL-18 може да даде тласък за увеличаване на експресията на различни повърхностни и вътреклетъчни молекули. В това отношение обаче далеч по-ефективно действат комбинациите от интерлевкини. Данните от настоящото изследване показват, че активираният рецептор NKG2D е особено важен при задействане на НК отговора спрямо туморните клетки, което потвърждава активиращите свойства на комбинацията от цитокини IL-15/IL-18. Този рецептор има отношение също към цитотоксичните свойства на НК клетките, което потвърждава и обогатява съществуващите литературни и експериментални данни (Zhu et al., 2010). Смята се, че интензивно пролифериращите НК клетки (стимулирани с IL-15/IL-18) могат дори да подпомогнат изграждането на специфичен придобит имунитет, като изпълняват антиген-представяща функция. Тези предположения са представени от предишни изследвания на други изследователски колективи (Pillarisetty et al., 2005; Chaudhry et al., 2006).

4. Изследване на секреторната активност на НК клетките

Получените резултати от изследването на секреторната активност на НК клетките показват разлика в техния секреторен профил след стимулиране с комбинациите от цитокини IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12, за период от 7 дни (**Фигура 5 и Фигура 6**). Представените данни от настоящото изследване са

доказателство, че НК клетките имат различна характеристика и могат да се разделят в отделни популации в зависимост от приложената стимулация и предизвиканите от нея промени във фенотипа. НК клетките, стимулирани едновременно с трите цитокина IL-15/IL-18/IL-12, показват значително производство и секреция на свързани с възпалителните процеси цитокини като IFN- γ (**Фигура 5А и Фигура 6А**) и на потискащи цитокини като IL-10 (**Фигура 5Б и Фигура 6Б**). Това рязко ги отличава от интензивно пролифериращите НК клетки, получени чрез стимулация само с двата цитокина IL-15/IL-18 без добавен IL-12 (**Фигура 5А, Б и Фигура 6**). В настоящото изследване за първи път се установява, че високото производство на IFN- γ е зависимо от присъствието както на IL-12, така и на IL-18. Стимулация, в която присъстват и двата цитокина (IL-12 и IL-18), води до повишаване на секрецията на IFN- γ , докато наличието само на един от тези цитокини в средата не води до високо производство на IFN- γ .

Трансформираният растежен фактор бета (TGF- β) е важен регулаторен цитокин, който участва в поддържане на имунната хомеостаза. Той притежава силно изразени противовъзпалителни и имunosупресивни функции. Осъществява контрол върху активацията, пролиферацията и диференциацията на различни субпопулации от клетки на имунната система (Манолова и сътр., 2012). Изненадващо получените от нас данни показват повишено количество на TGF- β на ден 5 и от двете субпопулации от НК клетки (след стимулация с IL-15/IL-18 и след стимулация с IL-15/IL-18/IL-12), но високо производство на цитокина се наблюдава само след стимулация с IL-15/IL-18 на ден 7 (**Фигура 5В**). Според литературни и експериментални данни повишеното количество на TGF- β е свързано с потискане на функциите на НК клетките и потискане на експресията на активиращите рецептори NKG2D и CD69 (Bi and Tian, 2017). Нашите резултати показват понижаване на експресията на NKG2D и CD69 рецептора от НК клетките след стимулиране с IL-15/IL-18/IL-12 за 7 дни от култивирането (**Фигура 4А и Б**) и повишена секреция на TGF- β само на ден 5 от култивирането (**Фигура 5В**). Повишена секреция на TNF- α се наблюдава на ден 3 от култивирането след стимулиране на НК клетките с двойна комбинация от

цитокини IL-15/IL-18 (**Фигура 5Г**). Тази повишена секреция бе изместена във времето (до ден 7) след стимулиране на НК клетките с тройната комбинация IL-15/IL-18/IL-12 (**Фигура 5Г**). Описаните резултати показват, че цялостната характеристика на промените, предизвикани от даден молекулен сигнал или комбинация от сигнали в определена клетъчна популация, изисква системно отчитане на състоянието на популацията в различни моменти от немалък времеви период, както постъпихме при настоящото изследване. Еднократно моментно отчитане на състоянието на клетъчната популация извън контекста на развитието на промените във времето би могло да даде непълна и дори подвеждаща информация.

Повишената секреция на IL-10 и IFN- γ след стимулиране на НК клетките с IL-15/IL-18/IL-12 в продължение на 7 дни беше потвърдена чрез документиране и с други методи – вътреклетъчно оцветяване и поточна цитометрия (**Фигура 6**). Това доказва обективното съществуване на наблюдаваните промени в култивираната клетъчна популация.

5. Изследване на експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на НК клетките

На следващ етап от настоящото изследване беше осъществено проучване на експресията на инхибиращи рецептори (имунни контролни точки) върху получените три групи от НК клетки – почиващи, интензивно пролифериращи и IL-12 индуцирани. Нашите данни показват, че почиващите (resting cells) НК клетки не експресират или експресират в много ниска степен имунните контролни точки (инхибиращи рецептори) – PD-1, TIM-3 и LAG-3 (**Фигура 7**). Важността на тези рецептори се изразява в това, че високата им експресия по повърхността на НК клетките възпрепятства разрушаването на неоплазмени образувания, като нарушава баланса между активиращи и инхибиращи рецептори в полза на последните. Повърхностните компоненти на туморните клетки, които се свързват с инхибиращите рецептори PD-1, TIM-3, LAG-3 и NKG2A/C/E, посредством тяхното действие потискат активацията на НК

клетките, като по този начин избягват атаката на имунологичния надзор (Azoury et al., 2015; Beldi-Ferchiou and Caillat-Zucman, 2017).

От друга страна, стимулацията на НК клетките с тройна цитокинова комбинация – не само с IL-15/IL-18, а и с IL-12 драстично променя експресията на повърхностни молекули в сравнение с интензивно пролифериращите НК клетки, които са индуцирани от IL-15/IL-18 без добавен IL-12. Участието на IL-12 редуцира експресията на активиращите рецептори NKG2D и CD69 (**Фигура 4А и Б**), а повишава тази на рецептора CD25 (IL-2R α) и на инхибиращия рецептор NKG2A/C/E (**Фигура 4В и 4Е**). Тези промени в експресията на повърхностни маркери от IL-10 продуциращите НК клетки, може би са свързани с редуциране на техните ефекторни функции, като например намаляване на присъщата им цитотоксична активност (**Фигура 4А**).

Като резултат от направените експерименти открихме, че определени интерлевкини – IL-15, IL-18, IL-12 могат да предизвикат промени във фенотипа и функционалното състояние на НК клетките, превръщайки ги от почиващи клетки (новоизолирани, resting cells) в интензивно пролифериращи (чрез стимулация с IL-15/IL-18) или в IL-10 продуциращи, „memory-like” дълго живеещи клетки (чрез стимулация с IL-15/IL-18 и IL-12). Тези три групи НК клетки се различават по: пролиферативна активност, експресия на повърхностни маркерни молекули, функции (продукция на цитокини, цитотоксична активност). Информацията за трите групи НК клетки е обобщена по-долу в **Таблица 3**.

Таблица 3. Промяна на пролиферативната активност, повърхностните молекули и функцията на НК клетките чрез стимулация с цитокини.

	1.Почиващи клетки (resting cells)	2.Интензивно пролифериращи и НК клетки	3.IL-12 индуцирани, IL-10 продуциращи НК клетки
Пролиферативна активност	-	+++	+
Цитотоксичност	+++	+++	+
Секреция на цитокини	-	+ -	ко-експресия на IFN- γ ++++, IL-10 ++, TNF- α +
CD69, NKG2D, CD107a, B220 активиращи маркери	ниски нива	високи нива	средни нива
CD25, Sca-1	-	средни нива	високи нива
PD-1, NKG2A, TIM-3, LAG-3 инхибиращи маркери	+	ниски и високи нива	ниски/средни нива

Поради наличието на два пика на експресия на PD-1 рецептора след стимулация на НК клетките с IL-15/IL-18, може да се предположи, че това са две популации от клетки – с ниска и с висока експресия на посочения повърхностен рецептор (**Фигура 7А**). Освен това в съгласие с по-ранни литературни данни (Beldi-Ferchiou and Caillat-Zucman, 2017), настоящото изследване установи, че IL-12 повишава експресията на молекули, които са свързани с изтощаване на имунните клетки – например NKG2A/C/E (**Фигура 4Е**), TIM-3, LAG-3 и (**Фигура 7Б и В**), както и с повишена секреция на IL-10 и IFN- γ (**Фигури 5А, 5Б и 6**).

Тъй като добавянето на IL-12 към НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18, индуцира производство и секреция на огромно количество IFN- γ (**Фигура 5А и Фигура 6А**), а този цитокин (IFN- γ) действа върху различни типове клетки от

имунната система, изглеждаше твърде вероятно IL-12 да упражнява действието си поне отчасти чрез IFN- γ . За да се провери тази хипотеза опитно, бе изследван екзогенният ефект на IFN- γ върху IL-15/IL-18 индуцираните NK клетки. За целта включените в този конкретен експеримент NK клетки бяха стимулирани с трите цитокина IL-15/IL-18 и IFN- γ (при това бяха приложени различни концентрации на IFN- γ – 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ или 10 $\mu\text{g/ml}$), вместо IL-12. След това бе проверена експресията на имунните контролни точки (инхибиращи рецептори). Установи се, че нивото на експресия на изследваните инхибиращи рецептори (PD-1, TIM-3 и LAG-3) не се променя след стимулиране на NK клетките с комбинацията IL-15/IL-18/IFN- γ . За PD-1 рецептора това е показано на **Фигура 8Б**. Тези резултати сочат, че предизвиканата от IL-12 промяна в експресията на инхибиращите рецептори PD-1, TIM-3 и LAG-3 на NK клетките е IFN- γ независима.

Съществуващите в литературата експериментални данни показват, че действието на IL-12 може да бъде IFN- γ независимо (Price et al., 2007; Berg et al., 2013). Допълнителни експерименти с потвърдителен характер бяха направени от изследователския екип на Лабораторията по туморна имунология и клетъчна терапия с ръководител проф. Х. Окамура. Те използваха спленоцити от нормални и IFN- γ нокаут мишки, които стимулираха с IL-15/IL-18, както с комбинацията IL-15/IL-18/IL-12. Когато IL-12 бъде добавен към NK клетки от слезки на нормални мишки, тяхната пролиферация се инхибира, а количеството секретирани IFN- γ е високо в присъствието му. Във връзка с ролята на IL-12, промяната, която този цитокин предизвиква в пролиферацията, фенотипа и продукцията на IL-10 изглежда не зависи от наличието на IFN- γ , тъй като IL-12 води до същите ефекти върху пролиферацията и при IFN- γ нокаут мишки, както и при IL-18 нокаут мишки и екзогенно добавяне на IFN- γ . Изводът е, че наблюдаваното при тези експерименти въздействие върху фенотипа на NK клетките най-вероятно се дължи на самия IL-12.

6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ NK клетки

В публикуваната литература има множество данни (обобщени от Yi et al., 2010), които демонстрират, че IL-21 може да възстанови ефекторните функции на „изтощените“ цитотоксични Т лимфоцити. В същото време малко се знае за ефекта на този цитокин върху NK клетките. Тъй като действието му, разбира се, трябва да бъде упражнено чрез свързване със съответния повърхностен рецептор, изследвахме експресията на IL-21 рецептора (IL-21R) върху клетките естествени убийци. Нашите резултати показват, че експресията на IL-21R се повишава след стимулиране на NK клетките с IL-18 или с IL-18/IL-21 (**Фигура 9А и В**). Най-вероятно този ефект след двойната стимулация се дължи на IL-18 и не толкова на участието и на IL-21, тъй като самостоятелна стимулация с IL-21 за разлика от самостоятелната стимулация с IL-18 не води до промяна в експресията (**Фигура 9Б**). Пролиферацията на NK клетките и експресията на IL-21 рецептора върху тяхната повърхност се повишават след стимулиране с комбинацията от интерлевкини IL-18/IL-21 (**Фигури 2В, 9А и 9В**).

Използването на стимул на цитотоксичното действие като туморни клетъчни линии В16 (клетъчна линия на миша меланома) и СТ-26 (миши карцином на дебелото черво) за постигане на въздействие върху NK клетките доведе до повишаване на експресията на IL-21 рецептора, и то твърде бързо – само за 1 ден от съвместното култивиране (**Фигура 10**). Нашите резултати показват, че стимулация с цитокини или активиращи цитотоксичното действие клетки като ракови клетъчни линии биха повишили експресията на IL-21 рецептора върху повърхността на NK клетките (**Фигура 9 и Фигура 10**). Наличието на лиганд за този рецептор би довело до сигнална трансдукция и е възможност за реактивиране на „изтощените“ NK клетки. Разбира се, необходими са допълнителни потвърдителни експерименти, включително с проследяване на ефекта в по-дълъг времеви интервал за оценка на неговата трайност, както и проверка дали „изтощените“ NK клетки експресират IL-21 рецептора и биха отговорили на неговия лиганд, ако им бъде предоставен с цел възвръщане на функциите им.

7. Изследване на връзката между някои фактори на клетъчния и хуморалния имунен отговор при имунологично обусловеното безплодие при човека.

Редица учени са установили, че при някои мъже се развива автоимунно състояние, при което се произвеждат антитела, реагиращи със собствените за индивида сперматозоиди, а в партньорката могат да бъдат открити изоантитела. Наличието на спермоантитела в безплодни двойки са доказани от изследователи като: S. Isojima, K. Koyama, S. Kobayashi, H. Shibahara, M. Kurpisz, P. Попиванов, Св. Калайджиев и други (Димитрова и Наков, 2003). Най-вероятните причини за развитието на хуморален имунен отговор срещу сперматозоиди е нарушаване на хемато-тестикуларната бариера, в следствие на травми, малформации, възпалителен или злокачествен процес и други (Кехайов и Кюркчиев, 1999), или наличие на кръстосана реактивност между сперматозоидни и бактериални антигени (Dimitrova et al., 2004; Dimitrova et al., 2017). При жените наличието на изоантитела се дължи на тяхната сенсибилизация към семенната течност, включително към повърхностни и вътреклетъчни компоненти на съдържащите се в нея сперматозоиди (собствени и сперматозоидообличащи антигени).

От друга страна причините за възникване на стерилитет при двата пола могат да се дължат на клетъчен фактор като свръхактивирани клетъчни популации, производство на определени интерлевкини и потискане на производството и действието на други (Navrylyuk et al., 2015). Позовавайки се на литературни данни и опитни постановки на други учени, създадохме нашите работни протоколи, с които да изследваме връзката между хуморален и клетъчен имунитет, имащи потенциално отношение към инфертилитета при човека.

След проведените изследвания върху проби от пациенти с безплодие за установяване на производството на спермоантитела чрез спермоаглутинационен тест на Фриберг (ТАТ), спермоимобилизационен тест на Изожима (SIT) и ELISA (Фигури 11, 12, 13, 14, 15, 16 и 17) и за секрецията на цитокини IL-10 и IL-12 чрез ELISA (Фигура 18), както и процента и активността на НК клетките чрез флоуцитометрия (Фигури 15 и 16), бяха наблюдавани промени – повишаване на

стойностите на пациентите с репродуктивни проблеми в сравнение с контролната група. При изследване на 101 пациенти (75 с репродуктивни проблеми и 26 фертилни лица) за производството на спермоантитела чрез методите TAT, SIT и ELISA, честотата на положително реагиращите серуми от изследваните пациенти с репродуктивни проблеми е: при TAT – 33,33 % (25 души), при SIT – 22,66% (17 души) и при ELISA – 53,33% (40 души) (**Фигура 11**). Статистически значима разлика бе наблюдавана при пациенти с диагностициран стерилитет спрямо контролната група (фертилни лица) след прилагане на методите TAT и ELISA (**Фигура 11**). По-високата честота на положително реагиращите серуми по метода ELISA вероятно се дължи на типа антигени, срещу които се откриват спермоантитела (вътреклетъчни), макар че не може да се изключи и известно неспецифично свързване на сперматозоидите с циркулиращи имунни комплекси и IgG-Fc фрагменти. Получените резултати след прилагане на методите TAT и SIT, а именно по-малко положително реагиращи серуми в сравнение с ELISA, най-вероятно се дължат на различия в чувствителността на методиките, както и на това, че различните методи доказват наличие на спермоантитела с различна функция и специфичност по отношение на кореспондиращите им епитопи (Калайджиев и сътр., 2000). Получените чрез ELISA резултати вероятно илюстрират откриването на системи антиген-антитяло, които са различни от тези установени посредством аглутинационните техники и SIT (последните методи се основават на свързване на антитела с мембраната на интактна прицелна клетка, изискват използването на жизнени сперматозоиди от донорни спермални проби с високи показатели, и съответно разкриват наличието на реакция само с повърхностно разположени антигени) (Калайджиев и сътр., 2000).

Изследваните пациенти след това бяха разделени по пол, за да се проследи дали има разлика в честотата на положително реагиращите серуми на жени със стерилитет за разлика от мъжете с диагностициран стерилитет. В получените резултати се наблюдава тенденция за по-висок процент на положително реагиращите серуми, които са на жени (60%, 24 души) по отношение на метода

ELISA в сравнение с резултатите получени при мъже с репродуктивни неудачи – 45,71% (16 души) (**Фигура 12**). Наблюдаваната разлика между половете не е статистически значима, поради малкия брой изследвани лица. Не се откри статистически значима разлика по отношение на пациентите положителни в TAT и SIT, след като пациентите бяха разделени по пол: 25% (10 пациенти) от жените са положителни в TAT и 42,85% (15 пациенти) от мъжете, 22,50% (9 пациенти) от жените са положителни в SIT и 22,86% (8 пациенти) от мъжете. Статистически значима разлика бе открита обаче при изследване на честотата на положително реагиращите жени с вторично безплодие и хабитуални аборти (чрез ELISA) в сравнение с контролната група (**Фигура 14**).

По отношение на честотата на положително реагиращите серуми при пациенти с първично и вторично безплодие в приложените тестове TAT и ELISA бе наблюдаван по-висок процент при пациентите с вторичен стерилитет (жени и мъже), като тази разлика беше статистически значима само след прилагане на ELISA ($P < 0.05$) (**Фигура 13**). Честотата на положително реагиращите серуми по отношение на спермоаглутинационния тест на Фриберг и спермоимобилизационния тест на Изожима, се запази ниска и без статистически значима разлика между двете групи пациенти: с първичен и вторичен стерилитет. Това се обяснява с първоначално малкия брой положително реагиращи пациенти по тези методики, положителни пациенти в TAT – 25, в SIT – 17, за разлика от метода ELISA – 40 души (**Фигура 11**). Стерилитет, който е свързан с невъзможността за зачеване по нормален начин, е диагноза, която изисква лечение. След като то бъде проведено по съобразен с конкретните пациенти начин, шансът за зачеване по естествен начин или чрез асистирана репродукция се увеличава, а оттам и първичният стерилитет може да бъде елиминиран. Ако причината за липса на забременяване е производството на спермоантитела, то прилагането на подходяща терапия би отстранило този проблем (Димитрова и Наков, 2003; Dimitrova et al., 2017; Vicram et al., 2019).

В повечето случаи двойките, които имат нужда от консултация със специалист са с първичен стерилитет, като може да предположим, че това се

дължи на фактор, който при немалък процент от пациентите може да бъде отстранен по-лесно – например производство на спермоантитела, нарушена морфология и количество на сперматозоидите поради наличие на варикоцеле или възпалителен процес и други. За разлика от пациентите с първичен стерилитет, тези с вторичен такъв са по-малко, но в много случаи са с по-сериозни проблеми – като например повишена активност на цитотоксичните Т клетки и/или на НК клетките (**Таблицы 1 и 2 и Фигура 16**) (Moffett et al., 2004).

НК клетките за разлика от Т и В лимфоцитите не са имунокомпетентни, т.е. не притежават рецептори за антиген и по тази причина не реагират специфично срещу определени молекули. Както обаче се спомена по-горе в литературния обзор, те могат да добият такава специфичност непряко, доколкото експресират на повърхността си активиращи Fc-рецептори, което им позволява в присъствие на антитела срещу повърхностни антигени да осъществяват антияло-зависима клетъчна цитотоксичност. Въпреки многобройните литературни източници, доказващи ролята на хуморалния и клетъчния имунитет при част от случаите на диагностициран стерилитет и невъзможност за износване на плода (Димитрова и Наков, 2003; Moffett et al., 2004, Конова и сътр., 2009), досега не е направена връзка между производството на спермоантитела и високите нива на НК клетки с цитотоксични свойства. Нашето изследване показва, че може да се направи предположение за наличие на такава връзка, тъй като са наблюдавани резултати за производство на спермоантитела, повишен брой и активност на НК клетките при жени с вторичен стерилитет, както и секреция на интерлевкини при тях (**Фигура 15, Фигура 16 и Фигура 18**), производство на спермоантитела и секреция на интерлевкини при мъже с възпалителни заболявания (**Фигура 18**). Откритите от нас фактори, водещи до безплодие, потвърждават нуждата от комплексно анализиране на получените данни и необходимостта от изясняване на връзката между тези фактори, което би довело и до оптимизиране на лечението на засегнатите категории пациенти чрез прецизирана диагностика и персонализиран подход (Brazdova et al., 2016; Archana et al., 2019).

При анализа на литературните данни, включително и на тези, отнасящи се до българската популация се установява, че голяма част от пациентите, страдащи от имунологично обусловено безплодие са положителни за производството на спермоантитела, след провеждане на метода ELISA. Този метод продължава да намира широко приложение поради високата си чувствителност, възможност за едновременното изследване на голям брой серуми и използването на търговски китове, които намаляват възможността за грешка и дават възможност за по-бързо, лесно и възпроизводимо изпълнение на експеримента (Dimitrova et al., 2017; Hosseini et al., 2017).

Секрецията на интерлевкини от клетките на имунната система е друг потенциално важен фактор, който изследвахме с цел потвърждаване на връзката между хуморални и клетъчни имунни механизми при пациенти със стерилитет. Подбраните от нас пациенти бяха 28 на брой и от двата пола, за да се проследи дали има разлика в техните резултати. Подборът на тези пациенти беше направен според типа стерилитет – повечето жени са с вторичен стерилитет и хаbitуални аборти, а мъжете с възпалителни заболявания или двойки с първичен стерилитет, които в течение на продължителен период са правили опити за постигане на бременност, но без успех. Както бе посочено в литературния обзор и представено в резултатите (**Фигури 15 и 16, Таблици 1 и 2**), причината за спонтанни аборти би могла да е активацията на НК клетките, която би могла да навреди на гаметите, ембриона или плода пряко чрез цитотоксично действие или непряко чрез сложен механизъм, включващ секреция на цитокини и въздействието им върху други клетки. Изброените причини, могат също да доведат и до първичен стерилитет като възпрепятстват оплождането на по-ранните етапи, нарушавайки нормалната морфология и функционално състояние на гаметите (например жизнеността и/или подвижността на сперматозоидите) или взаимодействието им при тяхната среща във Фалопиевите тръби. Образуването на зигота и първите няколко деления също могат да бъдат прекъснати поради подобни фактори и в тези случаи стерилитетът ще бъде неправилно категоризиран като първичен,

доколкото диагностиката на бременност се определя след положителен тест за бременност или преглед при акушер гинеколог.

От множеството известни интерлевкини тези, които подбрахме, за да проверим дали се секретират (да определим тяхната концентрация) или не в серумите на пациентите, са IL-10 и IL-12. Изборът ни падна върху тях, защото това са интерлевкини с модулиращ ефект, открили сме, че при „изтощени“ НК клетки секрецията на IL-10 е висока (**Фигури 5Б и 6Б**), както и че между тях има функционална връзка – наличието на IL-12 има отношение към производството на IL-10 (**Фигури 5Б и 6Б**). Тези два цитокина също така имат противоположно действие, тъй като IL-10 е антивъзпалителен медиатор, а IL-12 принадлежи към провъзпалителните цитокини (Ma et al., 2015). Литературни данни посочват важността на изследване на секрецията на цитокини при диагностика на безплодие. Открита е повишена секреция на цитокини като IL-10, TNF, IL-18 и други при пациенти с варикоцеле, идиопатично безплодие и няколко спонтанни аборта в сравнение с контролната група (фертилни лица) (Thaxton, J. E and Sharma, 2010; Navrylyuk et al., 2015). Повишена концентрация на IL-10, IL-18 и IFN- γ е доказана при мъже, диагностицирани с безплодие (Navrylyuk et al., 2015), което бе още една причина, поради която да изберем IL-10 за нашето изследване. Относно интерлевкин 12 има данни, че води до намалено количество сперматозоиди, както и до по-малък дял на морфологично нормални сперматозоиди, което го прави възможна причина или най-малкото предразполагащ фактор за инфертилитет при мъжете (Naz and Evans, 1998; Navrylyuk et al., 2015).

От изследваната група се откри само един пациент от мъжки пол, който е положителен по отношение на трите изследвани показателя (производство на спермоантитела, които са диагностицирани чрез спермоаглутинационния тест на Фриберг, секреция на IL-10 и IL-12), което напомня, че факторите, водещи до безплодие са много и различни и че тълкуването на получените резултати изисква комплексен анализ (**Фигури 17 и 18**). По отношение на установяването на спермоантитела чрез спермоаглутинационен тест на Фриберг (ГАТ),

спермоимобилизационния тест на Изожима (SIT), ELISA и секретията на цитокини IL-10 и IL-12, в изследваните 28 пациенти, не се откри такъв, който да е положителен по всички направени изследвания. Обособиха се групи от пациенти, които са положителни по един или повече теста, като максималният брой методики, по които те са положителни са 3 от общо 5 (секреция на IL-10, секреция на IL-12, производство на спермоантитела детектирани чрез TAT, SIT или ELISA).

От изследваните индивиди един мъж с простатит е положителен за секретията на IL-10, IL-12 и производството на спермоантитела, които са диагностицирани чрез TAT, но от друга страна е негативен по отношение на спермоантителата, чието наличие се доказва чрез методите SIT и ELISA; един е със завишена концентрация на IL-10 и производство на спермоантитела, доказани чрез SIT, но негативен по отношение на IL-12, метода TAT и ELISA за детекция на спермоантитела; и един пациент е със завишена концентрация на IL-10 и производство на спермоантитела, доказани чрез ELISA, но не и чрез TAT и SIT. Резултатите при жените показват: една жена с вторичен стерилитет е със завишена концентрация на IL-12 и производство на спермоантитела доказани чрез ELISA; 5 жени с вторичен стерилитет, които са положителни за производството на спермоантитела доказани чрез ELISA и TAT, но негативни за секреция на IL-10 и IL-12; една жена която е положителна за производството на спермоантитела доказани чрез ELISA и SIT, но негативна за секреция на IL-10 и IL-12. Промяна в активността и/или процентното съдържание на NK клетките бе установена при 5 жени с вторичен стерилитет и хабиутални аборти, като всички 5 жени са позитивни за производството на спермоантитела диагностицирани чрез ELISA, 3 от тях са позитивни за производството на СА и по метода TAT, но всички са негативни за производство на СА по метода SIT, както са негативни и за секретията на IL-10 и IL-12 (**Фигури 15 и 16, Таблици 1 и 2**). Нашите резултати не откриха жена, която да е позитивна по всички изследвани критерии – производство на спермоантитела чрез 3 методики (TAT, SIT и ELISA), секреция на интерлевкини 10 и 12 (чрез ELISA) и промяна в активността и процентното

съдържание на НК клетките (чрез поточна цитометрия) (**Фигури 13, 14, 16, 17 и 19, Таблици 1 и 2**). Много вероятна причина за наличие на активирани децидуални НК клетки е тяхната активация от цитокини или формираната от нас хипотеза за активация на НК клетките чрез произведени спермоантитела (**Фигура 19**). Процесите са комплексни, така че и двете направени от нас предположения могат да действат съвместно, за да доведат до повишен процент и активация на НК клетките и да отхвърлят плода. Разбира се, в този процес на активация имат роля и други клетки като Th₁ клетките, макрофаги и други, но НК клетките са тези, които лизират трофобласта и водят до спонтанен аборт (Calleja-Agius and Brincat, 2008). Тъй като изследваните от нас пациентки са негативни за производството на Th₁ цитокина IL-12, най-вероятно причината за активираните НК субпопулации и повишеният брой клетки, се дължи на друг интерлевкин и/или и на произведените и установени от нас спермоантитела (**Фигури 14, 15, 16, 17 и 18**).

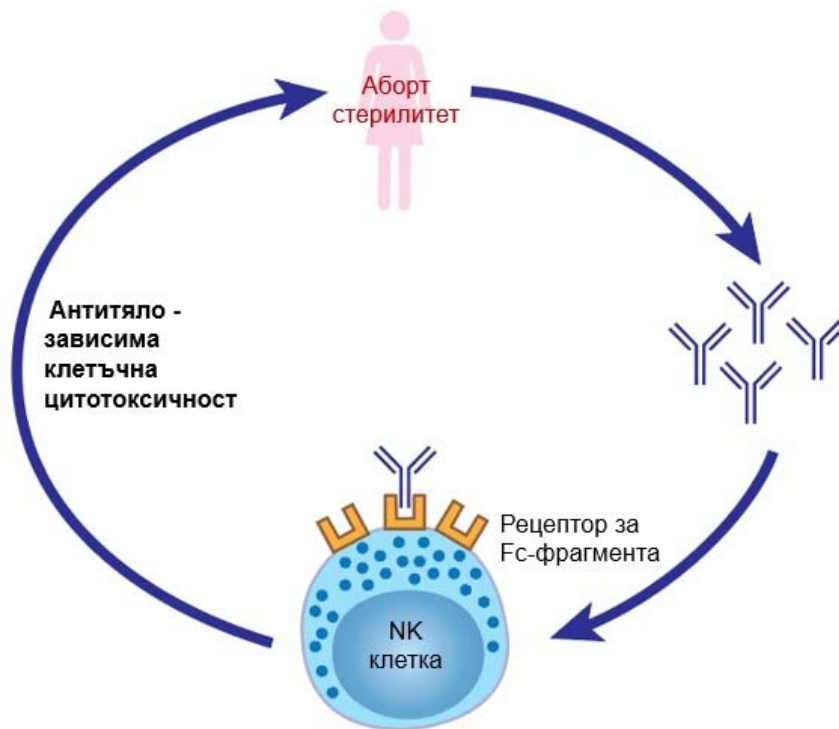
Получените от нас резултати, сравнени с литературни източници, показват, че повишената секреция на цитокини от мъжете с инфертилитет биха могли да бъдат една от причините за техните неуспехи, докато при женския пол повишено съдържание на изследваните цитокини се открива рядко, но наличието на спермоантитела би могло да доведе до негативни ефекти по други механизми, например чрез активиране на НК клетките за антияло-зависима клетъчна цитотоксичност, което изглежда вероятно предвид наблюдавания повишен брой и свръх активация на НК клетките. Тъй като повечето от изследваните пациенти са семейни двойки, техните резултати дават възможност за по-прецизен анализ и формулиране на заключение, което разбира се може да е свързано с други потенциални фактори и причини за не постигане на зачеване или износване на плода. Въпреки това, всеки един от изследваните от нас фактори е вече идентифициран като възможна причина за поставената диагноза – стерилитет.

Завишеното производство на цитокини от клетките на имунната система по време на опитите за забременяване и на самата бременност оказва като цяло негативно влияние върху успешното протичане на тези две събития, въпреки че

е добре известен дуалистичният характер на цитокините (Giannubilo et al., 2012; Navrylyuk et al., 2015). Броят пациенти положителни за секрецията на IL-10 и IL-12 не може да бъде пренебрегнат, както и това че имаме пациент положителен и за двата цитокина, тъй като тези резултати са получени върху малката популация от 28 пациенти (**Фигура 18**). Изследването на по-голяма група пациенти и от двата пола би дала по-мощна и реална представа относно този предполагаем рисков фактор, за чието наличие вече е проведено „пилотно“ изследване при 28 пациенти.

По литературна данни двата избрани цитокина повлияват процеса на диференциация на сперматозоидите в семенника, а оттам и оплодителната им способност и съответно шанса за постигане на бременност (Ianchi et al., 2007; Loveland et al., 2017). Примери за цитокини, които се произвеждат физиологично от мъжките гонади и са включени в тяхната нормална функция са: IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-18, TGF и други (Maegawa et al., 2002). Въпреки литературните данни, които доказват тяхната значимост за диференциацията и успешното оплождане, техният произход и регулация в мъжките полови органи е недостатъчно проучен, както и ефектът им, особено когато съдържанието им е повишено.

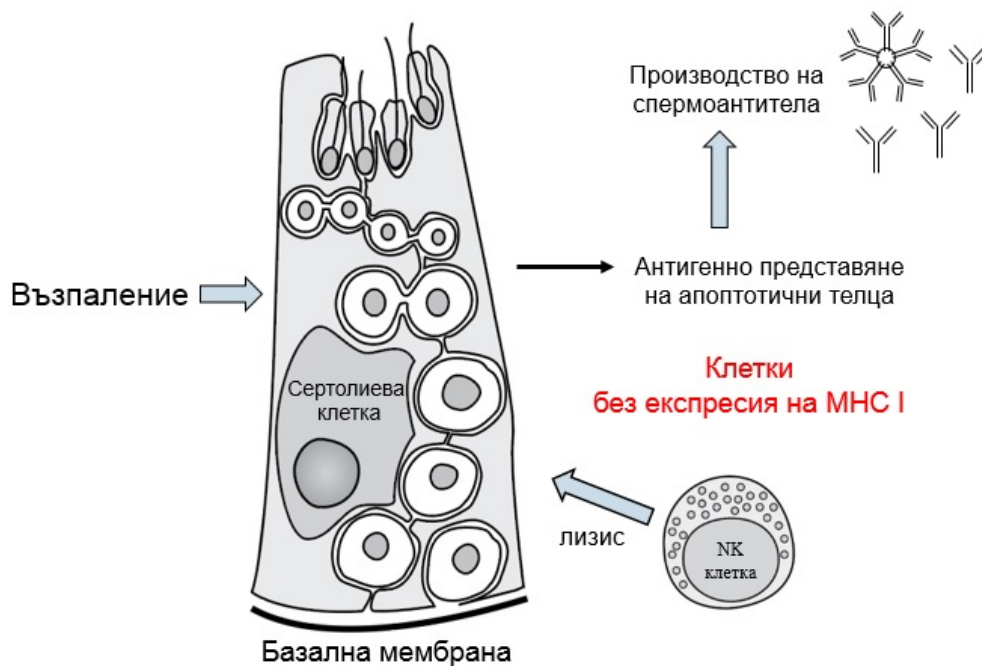
Въз основа на проведеното изследване нашата хипотеза е, че високата концентрация на спермоантитела при жени с вторичен стерилитет и/или хабитуални аборти може да е свързана и с повишен брой и активност на НК клетките. Смятаме, че е възможно тези спермоантитела да активират клетките естествени убийци, като ги насочват към антигени с бащин произход чрез Fc-рецепторите и причиняват увреждане на сперматозоидите или/и зародишните клетки чрез антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност. Такава реакция би понижила шанса за оплождане, а ако то се осъществи, би могла да попречи на имплантацията на получения ембрион, нормалното протичане на бременност и развитие на плода (**Фигура 19**).



Фигура 19. Връзка между производството на спермоантитела при жени с диагностициран стерилитет и активиране на НК клетките чрез антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност, което би могло да доведе до невъзможност за зачеване, патологии на бременността или спонтанен аборт.

Освен женският фактор на инфертилитета не трябва да се забравя и мъжкият. Въз основа на резултатите от тестовете предположихме, че при мъже с възпалителни заболявания, засягащи семенника, и отклонения в спермограмата, детектираните спермоантитела може да се дължат на повишена НК клетъчна активност и атака на мъжките герминативни клетки, които не експресират или експресират в много ниска степен МНС клас I молекули (**Фигура 20**) (Roberts et al., 1992; Del Zotto et al., 2017). В резултат на цитотоксичното действие, упражнено от НК клетките, клетките от половия път в семенника търпят апоптоза, която от своя страна води до „изчистване” на получените апоптотични телца чрез фагоцитоза с последващо антигенно представяне. Описаният процес е напълно възможно да доведе до хуморален имуен отговор срещу представените фагоцитирани автоантигени на мъжките герминативни клетки. Формулираните от нас две хипотези (**Фигури 19 и 20**), изискват допълнително потвърждение, чрез анализ на НК клетъчната активност при мъже с

възпалителни заболявания, засягащи семенника, както и чрез използване на модели, върху които тези хипотези да бъдат проверени. Анализи от този тип са прекалено мащабни, за да се включат в рамките на настоящия труд, и следва да бъдат предмет на бъдещи изследвания.



Фигура 20. Връзка между активираните NK клетки (вследствие на възпалително заболяване), което води до производството на спермоантитела и стерилитет при мъжете.

След преглед и анализ на съществуващи литературни данни, съпоставени с получените от нас резултати, относно хуморалния и клетъчния аспект за възникване на безплодие, стигнахме до заключението, че всяка молекула (като интерлевкин, антитяло) и/или клетка (като NK клетките) може както да има определен принос за нормално протичане на даден процес – диференциация на половите клетки, оплождане, контролиран клетъчен растеж, така и да повлияе негативно – гамети с нарушена морфология и брой, невъзможност за зачеване, развитие на ракови клетки. Постигането на баланс и нормална регулация изисква секрецията на различните интерлевкини да бъде оптимална и прецизно регулирана във всеки един момент от диференциацията на половите клетки,

оплождането и пренаталното развитие. Това важи и по отношение на клетките на имунната система и тяхната активност, като тук се включват не само имунокомпетентните В и Т лимфоцити и мононуклеарните фагоцити, а и НК клетките, които са относително по-слабо изучени, но в последно време се разкриват като все по-важни участници в имунната защита и надзор в норма и патология.

VI. ИЗВОДИ

1. Новоизолираните (Resting) от нас НК клетки се променят в „изтощени“ през стадия на интензивно пролифериращи клетки (ефекторни клетки), след стимулация с цитокини.

2. Интензивно пролифериращите НК клетки се диференцират под комбинираното действие на IL-15 и IL-18 и експресират високи нива на PD-1.

3. Интерлевкин 12 е включен в създаването на „изтощени“ НК клетки, като елиминира високите нива на експресия на PD-1 и от друга страна повишава други имунни контролни молекули, TIM-3 и LAG-3.

4. Интерлевкин 21 рецепторът се експресира от НК клетките в процесите на активиране и предаване на сигнали чрез имунни контролни точки.

5. Интерлевкин 12 има важна роля в регулирането на имунните контролни точки. Тази информация може да се използва в имунотерапията на туморните заболявания, базирана върху „изтощени“ ефекторни клетки.

6. Доказани са спермоантитела в клинично значими титри и концентрации при част от изследваните мъже и жени с инфертилитет, което ги прави възможен причинен фактор за това състояние.

7. По-високата честота на положителните за спермоантитела пациенти се доказва чрез използване на метода ELISA, който демонстрира наличието на системи антиген-антитяло, които са различни от тези, установени чрез SIT и TAT.

8. Установена е промяна в активността и процентното съдържание на НК клетките и производство на спермоантитела при жени с вторичен стерилитет и хабитуални аборти.

9. Диагностицирана е секреция на модулиращите цитокини IL-10 и IL-12 и производство на спермоантитела, установени чрез различни методи – аглутинационни, имобилизационни, ELISA, при мъже със стерилитет.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новоизолирани (resting) НК клетки от слезка могат да пролиферират и да се диференцират след стимулация с цитокини IL-12, IL-15 и IL-18. Интерлевкините: IL-15 и IL-18 показват, че са свързани с пролиферацията на НК клетките, докато IL-12 с диференциацията им. Установено е, че клетките естествени убийци в условия на пролиферация имат ефекторна функция, а дълго живеещите НК клетки, индуцирани от IL-12, са вероятно „изтощени“ клетки, които могат да бъдат реактивирани. Тези НК клетки силно експресират имунни контролни точки, което в зависимост от средата им дава възможност да играят супресорна роля.

Наличието на активирани НК клетки в определени периоди от бременността е причина за спонтанни аборти. По този начин НК клетките, както и производството на спермоантитела у някои мъже и жени, секрецията на модулиращи интерлевкини (IL-10, IL-12), биха могли да са причина за възникване на инфертилитет при човека.

VIII. ПРИНОСИ

Приноси с научно-теоретичен характер:

1. Получени са оригинални данни за секрецията на IFN- γ от НК клетки, изолирани от слезка на IL-18KO мишки след стимулирането им с цитокини.

2. Получени са оригинални данни за експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) PD-1, TIM-3 и LAG-3 от НК клетки, изолирани от слезка на IL-18KO мишки след стимулирането им с цитокини.

3. Получени са оригинални данни за ефекта на IL-21 върху „изтощени“ НК клетки, които са получени след стимулирането им с цитокини.

4. Получени са потвърдителни данни за пролиферативната активност на НК клетки, изолирани от слезка на IL-18KO мишки след стимулирането им с цитокини.

5. Получени са потвърдителни данни за експресията на маркерни молекули NKG2D, CD69, CD25, NKG2A/C/E, CD107a, CXCR3 от НК клетки, изолирани от слезка на IL-18KO мишки след стимулирането им с цитокини.

6. Получени са потвърдителни данни за секрецията на IL-10, TGF- β , TNF- α от НК клетки, които са изолирани от слезка на IL-18KO мишки след стимулирането им с цитокини.

7. Получени са потвърдителни данни за повишена честота на спермоимобилизиращи, спермоаглутиниращи и антитела, доказани чрез ELISA, в серуми от пациенти с репродуктивни проблеми.

8. Получени са оригинални данни относно връзката между някои фактори на клетъчния имунитет, секрецията на имуномодулиращи интерлевкини и хуморалния имунен отговор (производство на спермоантитела), при имунологично обусловеното безплодие при човека.

Приноси с научно-приложен характер:

1. Получени са потвърдителни резултати относно факторите, които причиняват безплодие при човека – спермоантитела, НК клетъчна активност.
2. Откриване на цитокини, които повлияват процеса на развитие на половите клетки, успешното зачеване и бременност.

Приноси с методичен характер:

1. Изолирането и пречистването на НК клетки от слезката на IL-18KO мишки чрез магнитно-активирано клетъчно разделяне и поточна цитометрия, имат приносен потвърдителен характер.
2. Фенотипизирането на НК клетки, изолирани от слезката на IL-18KO мишки и стимулирани с цитокини чрез поточна цитометрия, има приносен потвърдителен характер.

IX. НАУЧНА АКТИВНОСТ СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списък на публикациите:

1. **Пенчева, М.**, Кавалджиева, К., Лазаров, В., Трифонова, Н., Съинова, И., Николова, Е., Маркова, Ц., Димитрова-Диканарова, Д. Роля на IL-18 във възпалението. *Медицински преглед*, 53, 2017, № 3, 10-15.
2. El-Darawish, Y., Li, W., Yamanishi, K., **Pencheva, M.**, Oka, N., Yamanishi, H., Matsuyama, T., Tanaka, Y., Minato, N., Okamura, H. Frontline Science: IL-18 primes murine NK cells for proliferation by promoting protein synthesis, survival, and autophagy. *J Leukoc Biol.* 2018 Mar 30. Doi: 10.1002/JLB.1HI1017-396RR. **IF** - 4.012, **Q1**.
3. **Magdalena Pencheva-Demireva**, Yosif El-Darawish, Katerina Kavaldzhieva, Nikola Mladenov, Vladislav Lazarov, Dimitrina Dimitrova-Dikanarova, Tzvetanka Markova, Rumen Nikolov, and Haruki Okamura. Upregulation of Natural Killer Cells Proliferation by Cytokine Stimulation. *MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY*, **Q3**. Volume 38, Number 2, 2019.

Участия в научни прояви:

1. **Pencheva M.**, El-Darawish Y., Dimitrova-Dikanarova D., Markova T., Okamura H. IL-18 augments IL-21R expression on NK cells. Участие в 15-ти Международен симпозиум по имунология на репродукцията - в Международния дом на учените "Фр. Жолио-Кюри", "Св. св. Константин и Елена", гр. Варна, 15 – 17.06.2018г, Abstract book: P18, стр. 50.
2. Dimitrova-Dikanarova D., Lazarov V., Kavaldzhieva K., Mladenov N., **Pencheva M.**, Gateva A., Kamenov Z. SERUME ANTIBODIES AGAINST SPERMATOOZOA IN PATIENTS WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME (PCOS) AND OTHER ENDOCRINE DISORDERS. Участие в 15-ти Международен симпозиум по имунология на репродукцията - в Международния дом на учените "Фр. Жолио-Кюри", "Св. св. Константин и Елена", гр. Варна, 15 – 17.06.2018 г, Abstract book: P19, стр. 51.
3. Mladenov N., Budinova R., Lazarov V., Kavaldjieva K., **Pencheva M.**, Vakilov G., Dimitrova-Dikanarova D. Evaluation of the changes in seminal parameters in patients with potential reproductive disorders. Участие в 15-ти Международен симпозиум по имунология на репродукцията - в Международния дом на учените "Фр. Жолио-Кюри", "Св. св. Константин и Елена", гр. Варна, 15 – 17.06.2018 г, Abstract book: P20, стр. 52.
4. Lazarov V., Kavaldzhieva K., Mladenov N., **Pencheva M.**, Dimitrova-Dikanarova D., Gateva A., Kamenov Z. Humoral immune response against anti-alpha crystallins in women with endocrine disorders. Участие в 15-ти Международен симпозиум по имунология на репродукцията - в

- Международния дом на учените "Фр. Жолио-Кюри", "Св. св. Константин и Елена", гр. Варна, 15 – 17.06.2018 г., Abstract book: P21, стр. 52.
5. **Pencheva-Demireva M. P.**, El-Darawish Y. M., Kavaldzhieva K. K., Mladenov N. Y., Lazarov V. V., Dimitrova-Dikanarova D. K., Markova T. P., Okamura H. UP-REGULATION OF NATURAL KILLER CELLS PROLIFERATION BY CYTOKINE STIMULATION. Участие в 5-ти Национален конгрес по имунология, от 25 до 28.10.2018г. в Империял хотел, гр. Пловдив, Abstract book: стр. 73. Program: P2.13, стр. 19.
 6. Kavaldzhieva K.K., Lazarov V.V, Buteva-Hristova I.N, Marinova D.M., Mladenov N.J., **Pencheva-Demireva M.P.**, Dimitrova-Dikanarova D.K Comparative study of the expression of small heat shock proteins in human embryo and fetus. Участие в 5-ти Национален конгрес по имунология, от 25 до 28.10.2018г. в Империял хотел, гр. Пловдив, Abstract book: стр. 76. Program: P3.3, стр. 20.
 7. **М. Пенчева-Демирева**, Й. Ел-Дарауиш, Цв. Маркова, Д. Димитрова-Диканарова, Уен Ли, К. Яманиши, Н. Ока, Х. Яманиши, Х. Окамура. Ефект на IL-12 върху имунни контролни точки на НК- клетките. Участие в XIII Национален конференция по медицинска биология, от 13 до 14.09.2019 г. в гр. Варна. Устна презентация.
 8. Д. Димитрова-Диканарова, К. Кавалджиева, **М. Пенчева-Демирева**, Н. Младенов, Вл. Лазаров. Тенденции в честотата на безплодието, свързано с образуването на спермоантитела, в Българската популация. Участие в XIII Национален конференция по медицинска биология, от 13 до 14.09.2019 г. в гр. Варна. Участие с постер.
 9. Катерина Кавалджиева, Илиана Бътева-Христова, Дора Маринова, **Магдалена Пенчева-Демирева**, Никола Младенов, Владислав Лазаров, Цветанка Маркова, Недка Трифонова, Димитрина Димитрова-Диканарова. Сравнително проучване върху експресията на Hsp27 - фосфорилирана и нефосфорилирана форма, в 8-седмичен човешки ембрион. Участие в XIII Национален конференция по медицинска биология, от 13 до 14.09.2019 г. в гр. Варна. Участие с постер.
 10. **Магдалена Петкова Пенчева-Демирева**, Катерина Каменова Кавалджиева, Владислав Владимиров Лазаров, Радка Кирилова Тафраджийска-Хаджиолова, Зафер Ахмед Сабит, Димитър Васков Бакалов, Цветанка Петрова Маркова, Димитрина Кирилова Димитрова-Диканарова. ПРОИЗВОДСТВО НА СПЕРМОАНТИТЕЛА И СЕКРЕЦИЯ НА ЦИТОКИНИ (IL-10, IL-12) У БЕЗПЛОДНИ ПАЦИЕНТИ (ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ). Участие в Национална юбилейна конференция по имунология „15 години Българска асоциация по клинична имунология“, 6-7.11.2020 г., хотел Хилтън, гр. София. Участие с постер, П 15.

Благодарности:

Бих искала да изкажа специални благодарности към научните си ръководители – проф. д-р Димитрина К. Димитрова-Диканарова, дм и доц. д-р Цветанка Петрова Дончева, дм, които ме подкрепяха, даваха ми напътствия и знания, с които заедно да реализираме този дисертационен труд.

Бих искала да благодаря на всички колеги от Катедрата по биология, МФ, МУ-София за подкрепата и съветите, които ми даваха по време на разработването на дисертационния труд, на доц. Р. Хаджиолова от Катедрата по патофизиология, МФ, МУ – София за предоставените китове, както и на колегите от Лабораторията по туморна имунология и клетъчна терапия, Нишиномия, Япония с ръководител проф. Окамура.

Бих искала да благодаря на семейството и съпруга си за всеотдайната подкрепа, разбиране и търпение, които проявяваха към мен. Бих искала да благодаря на Веселин и Емилия Демиреви, които винаги ми помагаша и окуражаваха в трудните моменти.