

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО БИОЛОГИЯ**

Магдалена Петкова Пенчева-Демирева

**Роля на НК клетки в  
имуноонкологията и при пациенти  
със спермоантитела**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

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

### **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.

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.

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

Списък с използваните съкращения	7
ВЪВЕДЕНИЕ	11
I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	13
1. Имунна система	13
1.1 Клетки естествени убийци (Natural killer cells, НК клетки)	14
1.1.1 Цитотоксичност и пролиферативна активност на НК клетките	15
1.1.2 Имунофенотипна характеристика на НК клетките	17
2. Цитокини и интерлевкини	19
2.1 Интерлевкин 12 (IL-12)	21
2.2 Интерлевкин 15 (IL-15)	24
2.3 Интерлевкин 18 (IL-18)	28
2.4 Интерлевкин 21 (IL-21)	33
3. Имунни контролни точки (Immune checkpoints)	37
3.1 Активиращи имунни контролни точки	38
3.2 Инхибиращи имунни контролни точки	40
4. „Изтощени“ лимфоцити (exhausted lymphocytes)	44
5. НК клетки, злокачествени заболявания и тяхната имунотерапия	46
6. Клетъчни и хуморални фактори и тяхната роля в репродуктивната имунология	50
6.1 Роля на НК клетки при бременност	51
6.2. Субпопулации на НК клетки при бременност	52
6.3. НК клетки и спермоантитела при жени със стерилитет	54
6.4. НК клетки и спермоантитела при мъже със стерилитет	55
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	58
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	59
МАТЕРИАЛИ	59
1. Опитни животни	59
2. Материали, необходими за изолиране на миши лимфоцити (НК клетки)	59
2.1 Буфери	59
2.2 MACS система	59
2.3 Бои за оцветяване на НК клетките (трипаново синьо)	60
2.4 Други материали	60

3. Материали за клетъчно култивиране	60
3.1 Хранителни среди	60
3.2 Използвани интерлевкини	60
3.3 Използвани плаки	60
3.4 Други материали	61
4. Материали за поточна цитометрия (за проверка чистотата на изолираните клетки, за детекция на повърхностни и вътреклетъчни антигени, антитела)	61
4.1 Буфери	61
4.2 Антитела	61
5. Материали за Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA)	63
6. Материали за вътреклетъчно оцветяване	64
6.1 Китове	64
6.2 Антитела	64
7. Апаратура и софтуер	64
7.1 Апаратура	64
7.2 Софтуер	65
8. Серуми от безплодни пациенти	65
9. Спермални проби	66
10. Реактиви за обработка на пациентските серуми	66
11. Апаратура за обработка на серумите	67
МЕТОДИ	68
1. Изолиране на NK клетки от IL-18KO мишки чрез магнитно активирано клетъчно разделяне (Magnetic Activated Cell Sorting - MACS)	68
2. Проверка на чистотата на клетъчната култура чрез поточна цитометрия	70
3. Стимулиране на миши NK клетки с IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и IFN- $\gamma$	72
4. Клетъчно култивиране и определяне на лимфоцитната пролиферация	73
5. Микроскопски техники за определяне вида на клетъчните кълстери	73
6. Фенотипизиране на NK клетки чрез поточна цитометрия	73
7. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – за определяне количеството на следните молекули: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, секретирани от NK клетки, изолирани от IL-18KO мишки	74
8. Вътреклетъчно оцветяване чрез поточна цитометрия	77
9. Методи за откриване на спермоантитела	78
9.1 Спермоаглутинационни тестове	78

9.1.1 Спермоаглутинационен тест на Фриберг (TAT)	80
9.2 Спермоимобилизационен тест на Изожима (SIT)	81
9.3 Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – индиректна ELISA – за откриване на спермоантитела	82
10. Изолиране на човешки NK клетки от периферна кръв и определяне на тяхната активност	83
11. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – за определяне количеството на IL-10 и IL-12 в серуми на безплодни пациенти	84
12. Обработка на получени резултати	85
13. Статистически анализ	85
IV. РЕЗУЛТАТИ	86
1. Изолиране, пречистване и култивиране на NK клетки от слезката на IL-18KO мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ NK клетки	86
2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на IL-18KO мишки NK клетки след стимулирането им чрез цитокини	87
3. Проучване на ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на NK клетките	90
4. Изследване на секреторната активност на NK клетките	94
5. Изследване на експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на NK клетките	97
6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ NK клетки	101
7. Изследване на връзката между някои фактори на клетъчния и хуморалния имунен отговор при имунологично обусловеното безплодие при човека.	102
V. ОБСЪЖДАНЕ	113
1. Изолиране, пречистване и култивиране на NK клетки от слезката на IL-18KO мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ NK клетки	113
2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на IL-18KO мишки NK клетки след стимулирането им чрез цитокини	113
3. Проучване на ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на NK клетките	117
4. Изследване на секреторната активност на NK клетките	118
5. Изследване на експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на NK клетките	120
6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ NK клетки	122

7. Изследване на връзката между някои фактори на клетъчния и хуморалния имунен отговор при имунологично обусловеното безплодие при човека.	123
VI. ИЗВОДИ	135
VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
VIII. ПРИНОСИ	137
IX. ЛИТЕРАТУРА	139
X. НАУЧНА АКТИВНОСТ СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	170

### Списък с използваните съкращения

<b>CA</b>	– Спермоантитела
<b>СЗО</b>	– Световна здравна организация
<b>HIV/ХИВ</b>	– Human immunodeficiency virus; човешки имунодефицитен вирус
<b>ACK</b>	– Ammonium-Chloride-Potassium; лизисен буфер, съдържащ амониев хлорид и калиев хидроген карбонат
<b>ADCC</b>	– Antibody-dependent cellular cytotoxicity; антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност
<b>APC</b>	– Allophycocyanin; алофикоцианин
<b>ASC</b>	– Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (caspase recruitment domain), апоптозо-свързан зрънце-подобен протеин съдържащ CARD (каспазо възстановяващ домен) домен
<b>BSA</b>	– Bovine serum albumin; говежди серумен албумин
<b>Bcl-2</b>	– B-cell lymphoma 2 protein; протеин 2 на В-клетъчна лимфома
<b>Bcl-xL</b>	– B-cell lymphoma-extra large; В-клетъчен свръх голям лимфома протеин
<b>Bim</b>	– наричан още Bcl-2-like protein 11; Bcl-2 подобен протеин 11
<b>CD</b>	– Cluster of differentiation; клъстер на диференциация
<b>CD69</b>	– Cluster of differentiation 69; клъстер на диференциация 69
<b>C-fos</b>	– Proto-oncogene that is the human homolog of the retroviral oncogene v-fos; човешки протоонкоген, хомолог на ретровирусния онкоген v-fos
<b>C-myc (Myc)</b>	– Myelocytomatosis proto-oncogene; миелоцитоматозен протоонкоген
<b>CTL</b>	– Cytotoxic T lymphocyte; цитотоксичен Т лимфоцит
<b>CTLA4 (CD152)</b>	– Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; антиген 4, свързан с цитотоксичен Т лимфоцит
<b>C-jun</b>	– Proto-oncogene that in humans is encoded by the JUN gene; протеин, който при хората е кодиран от JUN ген
<b>DCs</b>	– Dendritic cells; дендритни клетки
<b>DMEM</b>	– Dulbecco's Modified Eagle Medium; модифицирана хранителна среда на Eagle
<b>ELISA</b>	– Enzyme-linked immunosorbent assay; ензимно-свързан имуносорбентен анализ
<b>Eomes</b>	– Eomesodermin, еомезодермин
<b>FACS</b>	– Fluorescence Activated Cell Sorter; клетъчно сортиране чрез флуоресцентно активиране
<b>Fas</b>	– First apoptosis signal receptor; първи сигнален рецептор за апоптоза
<b>FasL</b>	– First apoptosis signal ligand; първи сигнален лиганд за апоптоза
<b>FBS (FCS)</b>	– Fetal bovine serum/Fetal calf serum; фетален говежди/телешки серум
<b>FITC</b>	– Fluorescein isothiocyanate; флуоресцеин изотиоцианат
<b>FL</b>	– Fluorescence; флуоресценция

<b>FOXP3</b>	– Forkhead box protein 3; протеин, включен в имунния отговор
<b>GAT</b>	– Gelatin agglutination test; желатинов спермоаглутинационен тест на Кибрик
<b>GITR</b>	– Glucocorticoid-induced TNF receptor; глюкокортикоид, който индуцира производството на рецептор за тумор некротизиращ фактор (TNF)
<b>GM-CSF</b>	– Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; стимулиращ фактор, който се отделя от макрофагите и действа върху производството на гранулоцити
<b>Grb2</b>	– Growth factor receptor-bound protein 2; протеин 2, свързан с рецептора за растежен фактор
<b>HBV</b>	– Hepatitis B virus; хепатитен вирус тип В
<b>HLA</b>	– Human leukocyte antigen; човешки левкоцитен антиген
<b>ICE</b>	– Interleukin-1 beta converting enzyme; интерлевкин-1 бета конвертиращ ензим
<b>ICOS (CD278)</b>	– Inducible T-cell costimulatory; индуцируем Т-клетъчен ко-стимулатор
<b>IFN</b>	– Interferon; интерферон
<b>IL</b>	– Interleukin; интерлевкин
<b>ILT-2</b>	– Immunoglobulin-like transcript 2 receptor; рецептор за имуноглобулин-подобен транскрипт 2
<b>IRAK</b>	– Interleukin-1 receptor - associated kinase; киназа, която се свързва с интерлевкин-1 рецептора
<b>IVIg</b>	– Intravenous Immunoglobulin; интравенозен имуноглобулин
<b>K562</b>	– Myelogenous leukemia cell line, erythroleukemia type; миелогенна левкемия, клетъчна линия от еритролевкемичен тип
<b>KIR</b>	– Killer-cell immunoglobulin-like receptor; имуноглобулин-подобен рецептор, който убива клетки
<b>KLRG1</b>	– Killer cell lectin-like receptor G1; убиващ клетки лектин-подобен рецептор G1
<b>LAG-3 (CD223)</b>	– Lymphocyte-activation gene 3; лимфоцит-активиращ ген 3
<b>LAMP-1 (CD107a)</b>	– Lysosomal-associated membrane protein-1; протеин-1, свързан с лизозомната мембрана
<b>LGLs</b>	– Large granular lymphocytes; големи гранулирани лимфоцити
<b>LIR-1</b>	– Leukocyte immunoglobulin-like receptor-1; левкоцитен имуноглобулин-подобен рецептор-1
<b>mAb</b>	– monoclonal antibody; моноклонално антитяло
<b>MACS</b>	– Magnetic-activated cell sorting; магнитно активирано клетъчно разделяне
<b>MAPK</b>	– Mitogen-activated protein kinase; митоген-активирана протеин киназа
<b>MHC</b>	– Major histocompatibility complex; главен комплекс за тъканна съвместимост
<b>MICA/MICB</b>	– MHC class I polypeptide-related sequence A and B; полипептидни последователности А и В, които се свързват с МНС клас-I молекули

<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	– Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ; възпалителен протеин-1 $\beta$ , който се произвежда от макрофагите
<b>MIP-3<math>\alpha</math></b>	– Macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ ; възпалителен протеин-3 $\alpha$ , който се произвежда от макрофагите
<b>MyD88</b>	– Myeloid differentiation primary response gene 88; ген 88 за първична миеолоидна диференциация
<b>NCAM</b>	– Neural cell adhesion molecule; неврална клетъчна адхезионна молекула
<b>NCRs</b>	– Natural cytotoxicity receptors; естествени цитотоксични рецептори
<b>NK</b>	– Natural killer cells; клетки естествени убийци
<b>NKG2</b>	– 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
<b>NKp30</b>	– Natural killer cell p30-related protein; p30-свързан протеин върху клетките естествени убийци
<b>NKp44 (CD336)</b>	– Natural killer cell p44-related protein; p44-свързан протеин върху клетките естествени убийци
<b>NKp80</b>	– Natural killer Cell p80-related protein; p80-свързан протеин върху клетките естествени убийци
<b>NKT</b>	– Natural killer T cell; T клетки естествени убийци
<b>NLRP3</b>	– NLR (NOD-like receptor) family pyrin domain containing 3; NOD-подобен рецептор, съдържащ поринов домен 3
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	– Nuclear factor kappa B; ядрен фактор капа бета
<b>OPD</b>	– Ortho-Phenylenediamine; орто-фенилендиамин
<b>PBS</b>	– Phosphate buffer saline; фосфатен буфер
<b>PKB</b>	– Protein kinase B, also known as Akt; протеин киназа B, която се нарича още Akt
<b>PD-1</b>	– Programmed cell death protein 1; протеин 1 на програмирана клетъчна смърт
<b>PD-L1/2</b>	– Programmed death-ligand 1/2; лиганд 1/2 за протеина за клетъчна смърт
<b>PE</b>	– Phycoerythrin; фикоеритрин
<b>PES</b>	– Polyethersulfone; полиетерсулфон
<b>PI3K</b>	– Phosphoinositide 3-kinase; фосфатидилинозитол киназа 3
<b>PVC</b>	– Polyvinyl chloride; поливинилхлорид
<b>PUMA</b>	– p53 upregulated modulator of apoptosis; про-апоптичен модулатор на туморен протеин 53
<b>Ras</b>	– Small, monomeric GTP-binding proteins encoded by ras genes; Малки, мономерни GTP-свързващи протеини, които са кодирани от ras гени
<b>Raf</b>	– An acronym Rapidly accelerated fibrosarcoma; акроним, бързо ускорен фибросарком
<b>SCFR (CD117, c-kit)</b>	– Mast/stem cell growth factor receptor; рецептор на растежния фактор на стволовите клетки
<b>SD</b>	– Standard deviation; стандартно отклонение

<b>SIGIRR</b>	– Single Ig IL-1 related receptor; единичен имуноглобулинов рецептор, който свързва интерлевкин-1
<b>SIT</b>	– Isojima's sperm immobilization test; спермоаглутинационен тест на Изожима
<b>SIV</b>	– Sperm immobilization value; спермоимобилизационно ниво
<b>STAT</b>	– Signal transducer and activator of transcription; сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията
<b>SOCS-1</b>	– Suppressor of cytokine signaling-1, супресор на сигналния път 1 на цитокините
<b>TAT</b>	– Tray agglutination test; микроспермоаглутинационен тест на Фриберг
<b>TGF</b>	– Transforming growth factor; трансформиращ растежен фактор
<b>T-bet</b>	– T-box transcription factor; T-box транскрипционен фактор
<b>Th</b>	– T helper cells; Т помощници (Т хелпери)
<b>TIM-3</b>	– T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; Т-клетъчен имуноглобулин и муцин домейн-3
<b>TMB</b>	– Tetramethylbenzidine; тетраметилбензидин
<b>TNF</b>	– Tumor necrosis factor; тумор некротизиращ фактор
<b>TRAF</b>	– Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor; фактор, който се свързва с рецептора за тумор некротизиращия фактор
<b>TSAT</b>	– Tray slide agglutination test; аглутинационен тест на Франклин-Дюкс
<b>Tyk-2</b>	– Non-receptor tyrosine-protein kinase; тирозин-протеин киназа, която не е рецептор

## **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.

## **I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**

### **1. Иmunна система**

Иmunната система се състои от молекули, клетки, тъкани и органи, участващи в механизма на защита на гостоприемника от носители на чужда генетична информация, инфекциозни агенти, туморни клетки (Nouroz et al., 2016). Навлизането на живи патогени (бактерии, паразити) в организма на човека е основна заплаха за стабилността на хомеостазата. За нейното предотвратяване действат общи защитни механизми като относително непроникливия епидермис, механично отделяне на навлезлите агенти (повръщане, диария), разреждане на дразнителите чрез увеличаване на междуклетъчната течност при възпалителни процеси, унищожаване на бактериални агенти чрез фагоцитоза, активиране на системата на комплемента, острофазовите белтъци, лизозим, клетките естествени убийци и интерферони. Тези механизми осъществяват т.нар. вродена защита (вроден, естествен имунитет) на човека (Кехайов и Кюркчиев, 1999). Естественият или вроден имунитет (имунен отговор) се характеризира с това, че едни и същи механизми действат срещу различни патогени, т.е. реакциите нямат специфичен характер и при повтарящи се срещи с един и същ патоген не се променя характера и интензивността на реакцията срещу него.

Друго ниво на защита на организма се развива при гръбначните животни чрез т.нар. придобит (адаптивен) имунитет, който се осъществява от имунната система. Разпознаването на чуждите агенти, наречени антигени, се осъществява чрез специфични молекули, интегрирани в плазмената мембрана на лимфоцитите. След разпознаването на антигена, те се секретират в кръвната плазма (антитела) или остават свързани по клетъчната повърхност (Т-клетъчен рецептор).

Тъй като човешкият организъм непрекъснато се среща с патогени и токсични молекули, той паралелно използва взаимосвързаните вроден и придобит имунитет (Spiering, 2015). Например първата реакция срещу микробна инфекция е незабавната защита от страна на механизми на вродения имунитет и последващо включване на придобит имуен отговор с генериране на антитела с висок афинитет и клетки на имунната памет.

## 1.1 Клетки естествени убийци (Natural killer cells, NK клетки)

Първите данни за група от клетки, които проявяват „спонтанна“ цитотоксичност спрямо таргетни клетки и не спадат нито към В-, нито към Т лимфоцитите, са публикувани през 1973 г. от Ivan Roitt, а по-късно през 1975 г. Rolf Keissling дава името им – клетки естествени убийци (Greenberg, 1994). Те представляват третата основна популация от лимфоцити (Hanahan and Weinberg, 2011). Редица автори ги причисляват към групата на големите гранулирани лимфоцити (Large granular lymphocytes, LGLs). Клетките естествени убийци съставляват между 5% и 20% от човешките лимфоцити в периферната кръв и се обособяват като самостоятелна група от клетки. Те произлизат от CD34<sup>+</sup> хемопоеични прогениторни клетки (Galy et al., 1995; Маркова и Маринова, 2006). NK клетките, притежават значително по-гранулирана цитоплазма от В и Т лимфоцитите, нямат фагоцитираща способност, не прилепват по гладка повърхност и се активират от интерферон гама (IFN- $\gamma$ ), интерлевкин 2 (IL-2) и интерлевкин 18 (IL-18). Както показва и името им – клетки естествени убийци, те лизират таргетните клетки без предварително сенсibiliзиране. Установено е, че съдържащите се в цитоплазмата им гранули са в състояние да убият туморни клетки, вирусно-заразени и дори алогенни клетки. Интересен феномен е наблюдението, че след отделянето на двете клетки (таргетна и NK клетка), таргетната клетка изпълнява програмата си за „самоубийство“, докато NK клетката възстановява способността си да убива и други клетки.

Клетките естествени убийци са ефекторни лимфоцити на вродения имунитет. Те са необходими за защита срещу клетки, подложени на стрес, за унищожаване на туморни клетки и на клетки, заразени с вирус. NK клетките, осигуряват защитата на плода по време на бременност, но при определени условия могат и да го атакуват. Тези клетки играят важна роля при имунния надзор за злокачествено изродени клетки, като предотвратяват неконтролирания им растеж (Kim et al., 2000; Smyth et al., 2001). NK клетките, разпознават клетките – мишени директно, чрез трансмембранни протеини (рецептор/лиганд), които се свързват с различни детерминанти по повърхността на таргетната клетка (Lodoen and Lanier, 2005). Това взаимодействие рецептор-лиганд (секреторен или мембранно-свързан) (Matsumoto et al., 2015) между NK клетката и таргетната клетка, определя

активността на NK клетката (Lodoen and Lanier, 2005). Тези лиганди/рецептори, които разпознават NK клетките липсват по мембраната на нормалните клетки. Клетките естествени убийци, секретират цитокини, чрез които модулират активността на други клетки като например дендритни клетки и Т лимфоцити.

### **1.1.1 Цитотоксичност и пролиферативна активност на NK клетките**

NK клетките, убиват прицелните клетки чрез няколко основни механизма, два от които изискват директен контакт между таргетната и NK клетката. При първия механизъм, активираната клетка естествен убиец извършва цитолитичното си действие, като секретира гранули, съдържащи перфорици и гранзими, които унищожават клетката мишена. Този механизъм е много ефективен и се реализира чрез активиране на апоптични цистеин протеази, наречени каспази, характерни за ранните етапи на апоптозата. Вторият механизъм включва участието на апоптични рецептори (например, Fas/CD95) в мембраната на прицелната клетка и на техните лиганди (например, FasL/CD95L) в мембраната на NK клетката, което води до класическа каспазо-зависима апоптоза (Mitra et al., 2003). И при двата механизма ефекторната функция на NK клетката се регулира след свързването на нейна трансмембранна молекула (рецептор или лиганд) със съответната ѝ молекула (рецептор или лиганд) на прицелната клетка (Smyth et al., 2005) и следователно може да бъде регулирана на това ниво. NK клетката експресира и рецептор/и FcγRIIIA и/или FcγRIIC, които се свързват с Fc-фрагмента на имуноглобулинова молекула. Когато за прицелната клетка е свързана имуноглобулинова молекула, NK клетката се свързва с нейния Fc-участък и лизира прицелната клетка, без предварително „заредане“ (priming). Активираната по този механизъм NK клетка отделя цитокини и IFN-γ, чрез които се подсилва имунния отговор. Задействането на анти тяло-зависима клетъчна цитотоксичност (Antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) от страна на NK клетките срещу ракови клетки се използва за лечение на невробластома, рак на гърдата, В-клетъчен лимфом и други, които експресират голямо количество раково специфични антигени.

Клетките, които са подложени на стрес, могат да бъдат разпознати от клетките естествени убийци и да активират техните цитотоксични свойства. Рецепторът D от групата 2, който се експресира върху клетките естествени убийци

(The Natural Killer Group 2D receptor, NKG2D), разпознава и се свързва с лиганди на клетъчен стрес, каквито са полипептидните последователности А и В, които са обединени с главен комплекс за тъканна съвместимост клас I молекули (Major histocompatibility complex (MHC) class I polypeptide-related sequence A and B, MICA/MICB). Тези лиганди се експресират при клетъчен стрес с различна етиология: като например вирусна инфекция, злокачествена трансформация и увреждане на ДНК (Groh et al., 1999; Groh et al., 2001; Jinushi et al., 2003).

Друг механизъм, чрез който NK клетките могат да разпознаят заражена или трансформирана клетка, е чрез „липсващото аз“ (missing self) (Ljunggren and Karre, 1990; Watzl, 2003). Когато ядрена клетка не експресира MHC клас I молекули, експресира ги в много ниска степен или има промяна в структурата на тези молекули, това дава сигнал на естествените убийци да лизират тази клетка (Morvan and Lanier, 2016). NK клетките, експресират и рецептори, наречени имуноглобулин-подобни, чрез които убиват клетки (Killer-cell immunoglobulin-like receptor, KIR). KIR рецепторите на NK клетките взаимодействат с молекули MHC клас I на прицелните клетки. Това им позволява да откриват инфектирани с вирус клетки или ракови клетки. Част от KIR рецепторите, които са трансмембранни гликопротеини, имат инхибиращо действие върху NK клетките, като потискат цитолитичната им активност, а друга част от тях имат активиращо действие. Блокирането на KIR рецепторите чрез моноклонални антитела е ефективно, но трябва да се има предвид генетичния полиморфизъм на рецепторите (Wang et al., 2015).

За да изпълнят ефективно своята функция, освен да бъдат активирани, NK клетките трябва да пролиферират достатъчно бързо, за да се справят с вирусно-инфектирани или туморни клетки. Активацията и пролиферацията на NK клетките изключително зависят от взаимодействията клетка-клетка и от разтворими растежни фактори, каквито са цитокините. Установено е, че при стимулация на клетките естествени убийци с IL-2 и IL-18, ефективно се подпомага тяхната пролиферация (Dallal et al., 2000; Qi et al., 2014), поради активиране на синтеза на протеини. Синергичното действие на тези интерлевкини също така подпомага различни клетъчни процеси, осъществяващи се в NK клетките: гена

транскрипция, синтез на протеини, клетъчно оцеляване и автофагия (Tomura et al., 1998; McLeod et al., 2012).

### **1.1.2 Имунофенотипна характеристика на НК клетките**

Разгадаването на механизмите, чрез които, при липса на специфичен рецептор за антиген, се предават сигнали, контролиращи функциите на НК клетките, до скоро беше предизвикателство за науката. Съвременни изследвания разкриват някои основни принципи, чрез които се осъществява този контрол (Long et al., 2013). Клетките естествени убийци нямат рецептор за антиген, характерен за Т и В лимфоцитите. НК клетките експресират рецептори за лиганди, които ги активират, поради което са наречени активиращи рецептори и рецептори за лиганди, които инхибират тяхната активност – инхибиращи рецептори (McQueen and Parham, 2002).

Активиращи рецептори за клетките естествени убийци са NKG2D, клъстер на диференциация 69 (Cluster of differentiation 69; CD69), протеин 1, който е свързан с лизозомната мембрана (Lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1), рецептор на растежен фактор на стволовите клетки (Mast/stem cell growth factor receptor, SCFR, CD117, c-kit) и други.

Инхибиращи рецептори са например – трансмембранни рецептори А, В, С, Е от група 2 на клетката естествен убиец (NKG2A/B/C/E), протеин на програмирана клетъчна смърт 1 (Programmed cell death protein 1, PD-1), левкоцитен имуноглобулин-подобен рецептор 1 (Leukocyte immunoglobulin-like receptor 1, LIR-1), подобен на лектин рецептор G1, чрез който се индуцира клетъчна смърт (Killer cell lectin-like receptor G1, KLRG1) и други.

Активиращите рецептори разпознават лигандите, предизвикващи клетъчен стрес, МНС клас I молекули, които могат да активират НК клетките. Рецепторът NKG2D е от изключителна важност за извършване на НК-медирана клетъчна цитолиза (Zhu et al., 2010; Qi et al., 2014). Свързването на този рецептор с лиганд стимулира производството на цитокини и цитотоксични молекули от страна на НК клетките като пример за такива са: IFN- $\gamma$ , стимулиращ фактор, който се отделя от макрофаги и други клетки (НК клетки, Т лимфоцити, ендотелни клетки и фибробласти) и действа върху производството на гранулоцити (Granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) и възпалителен протеин-1 $\beta$ , отделян също от макрофагите (Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ ) (Sutherland et al., 2002). Този рецептор играе роля на индуктор за T<sub>c</sub> лимфоцити, Th<sub>1</sub> и Th<sub>2</sub> (Diefenbach et al., 2001; Westwood et al., 2004). Той участва в разпознаването на променени собствени антигени (induced-self antigens), в резултат на трансформация на клетките. Следователно NKG2D рецепторът е молекула, която осигурява защита и липсата на експресия на този рецептор води до потискане на имунния отговор (Wensveen et al., 2018).

Активиращи НК рецептори са и естествените рецептори за цитотоксичност на НК клетките (Natural cytotoxicity receptors, NCRs). Такива са: протеина p44 на НК клетките (Natural killer cell p44-related protein, NKp44), протеина p80 на НК клетките (Natural killer Cell P80-related Protein, NKp80) и протеина p30 на НК клетките (Natural killer cell p30-related protein, NKp30) (Enk and Mandelboim, 2014). Те се експресират от активирани или намиращи се в покой (почиващи клетки, resting) НК клетки. Свързват се с лиганди експресирани от патогени, туморни клетки и собствени клетки, които са инфектирани или са трансформирани. В резултат на това свързване, естествените рецептори за цитотоксичност предизвикват клетъчна смърт на таргетната клетка и секреция на цитокини от НК клетките (Pazina et al., 2017).

Освен активирането на клетките естествени убийци, от изключителна важност е и те да останат толерантни към здравите тъкани. Това може да се постигне чрез активиране на инхибиращи рецептори, като например KLRG1. НК клетките не атакуват ядрени клетки, които експресират МНС клас I молекули, тъй като имат рецептори за тях (Lanier et al., 1997; Diefenbach et al., 2001; Serwenka et al., 2001). По този начин тези рецептори предотвратяват активирането на клетките естествени убийци (Hollie et al., 2011). НК клетките експресират постоянно активиращи и инхибиращи рецептори, което осигурява тяхната фина регулация. Клетките естествени убийци непрекъснато „патрулират“ в организма и осигуряват неговата естествена първа линия на защита.

Експресията на различни рецептори по повърхността на имунните клетки определя и тяхната фенотипна характеристика. Изключително важно за разделянето на клетките в субпопулации е времето, по което се експресират

рецепторите и тяхното количество. Поради непрестанното откриване на нови рецептори и техните лиганди, класифицирането на клетъчните субпопулации става по-трудно.

## **2. Цитокини и интерлевкини**

Взаимодействието на клетките на имунната система се осъществява чрез непосредствен контакт между тях или чрез хуморални сигнали, предавани от хормоноподобни нискомолекулни съединения, синтезирани от лимфоцитните клетки, известни с общото название цитокини. Терминът „цитокин“ има гръцки произход, „цито“ – клетка и „кинос“ – движение. Цитокините са молекули за клетъчна сигнализация, които подпомагат комуникацията клетка-клетка при имунен отговор и стимулират движението на клетките към местата на възпаление, инфекция, травма или туморен растеж. Според биохимичната си природа цитокините са олигопептиди, протеини или гликопротеини с размер  $\sim 5\text{-}20$  kDa.

Сигналните молекули се продуцират от широк спектър от клетки, включително клетки на имунната система като макрофаги, В лимфоцити, Т лимфоцити, мастоцити, НК клетки, както и от ендотелни клетки, фибробласти и различни стромални клетки. Даден цитокин може да бъде произведен от повече от един тип клетки (Wolters et al., 2006; Horst et al., 2013). Друга важна характеристика на цитокините е, че в повечето случаи те имат различен ефект върху различни клетъчни типове. Тези сигнални молекули се свързват със специфични мембранны рецептори, за да осъществят своята функция. Цитокините могат да действат от разстояние, както хормоните, но техният главен ефект се проявява при контакта клетка-клетка. Този начин на действие е известен като паракринен. Някои цитокини имат и автокринен ефект. Те активират пролиферацията и диференциацията на различни типове лимфоидни клетки, регулират узряването и способността за отговор на отделните клетъчни популации. Някои сигнални молекули усилват, а други инхибират действието на други цитокини по комплексен механизъм (Horst et al., 2013). Цитокините включват – хемокини, интерферони, интерлевкини, лимфокини, монокини, тумор некротизиращи фактори (Tumor necrosis factor, TNF) и растежни фактори. Интерфероните притежават антивирусна

активност, докато интерлевкините са тези, които действат върху лимфоцитните популации.

Функцията на имунната система зависи в голяма степен от интерлевкините, като тяхната роля е свързана с редица автоимунни заболявания и имунна недостатъчност. Това прави тези имунни медиатори привлекателна цел сред различните възможни начини за диагностика и лечение на рак, имунологично обусловеното безплодие и други нарушения свързани с тях (Razavi and Allen, 2015).

Откриването на интерлевкините започва още през 50-те години на миналия век, но са били нужни около две десетилетия, за да се определи тяхната структура и функция, за да бъдат идентифицирани. Първите описани членове на това семейство са IL-1, IFN и нервни растежни фактори. В днешно време са идентифицирани повече от 35 вида интерлевкини (Razavi and Allen, 2015). Названията на първите открити цитокини са в хронологична последователност, съответстваща на времето на откриването им.

Информация за по-важните интерлевкини от гледна точка на целите на дисертационния труд е представена в **Таблица 1**.

*Таблица 1. Сравнителна характеристика на цитокини и тяхната функция върху НК клетките.*

<b>IL</b>	<b>Рецептори на IL</b>	<b>Клетки, които произвеждат IL</b>	<b>Клетки, върху които действат IL</b>	<b>Сигнален път</b>	<b>Ефект на IL върху НК клетките</b>
<b>IL-12</b>	IL-12R $\beta$ 1 IL-12R $\beta$ 2	активирани макрофаги, моноцити, дендритни клетки, неутрофили, В клетки	Т клетки, НК клетки	STAT4	пролиферация, продукция на IFN- $\gamma$
<b>IL-15</b>	IL-15R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , $\gamma$ c (common gamma chain)	дендритни клетки, макрофаги, гранулоцити, нехематопоеични клетки, епителни клетки	дендритни клетки, CD8 <sup>+</sup> T, НК клетки	STAT3, STAT5	пролиферация, диференциация, оцеляване, придобиване на цитотоксичен потенциал

<b>IL-18</b>	IL-18R $\alpha$ IL-18R $\beta$	дендритни клетки, макрофаги	Th <sub>1</sub> - клетки, неутрофили, базофили, макрофаги, дендритни клетки, НКТ, НК клетки	MyD88, NF-kB	пролиферация, продукция на IFN- $\gamma$
<b>IL-21</b>	IL-21R и $\gamma$ c (CD132)	активирани CD4 <sup>+</sup> T, НКТ, CD8 <sup>+</sup> T	Лимфоидни и миелоидни популации, НК, Т и В клетки , дендритни клетки, макрофаги	STAT1, STAT3	инхибиране на пролиферацията, повишаване на цитотоксичността, продукция на IFN- $\gamma$

### 2.1 Интерлевкин 12 (IL-12)

Интерлевкин 12 (наричан още IL-12p70, означаван като IL-12) е ключов имунорегулаторен цитокин, който по биохимична природа е гликопротеин и координира имунните реакции на вродения и придобития имунитет. Молекулното му тегло е 70 kDa и е съставен от две ковалентно свързани субединици – IL-12p35 (35 kDa) и IL-12p40 (40 kDa), всяка от които се кодира от гени, които се намират в различни хромозоми (Hamza et al., 2010). Въпреки че p35 транскриптът се открива в много клетъчни типове, свободен p35 не се секретира без p40 субединицата. Експресията на IL-12p35 субединицата е критично повлияна от IL-12 и тип 1 интерферони (Sinigaglia et al., 1999). IL-12p40 се произвежда предимно от активирани моноцити, макрофаги, неутрофили и дендритни клетки. Предполага се, че при мишки, но не и при хора, IL-12p40 хомодимерите антагонизират активността на IL-12p70 чрез свързване с  $\beta$ 1 субединицата на IL-12 рецептора (D'Andrea et al., 1992; Gately et al., 1996; Ling et al., 1995). IL-12p40 може да действа като хемоатрактант за макрофаги и подпомага миграцията на стимулирани дендритни клетки (Khader et al., 2006). Ролята на p40 субединицата се свързва с патологични реакции, при силикоза, отхвърляне на присадката и астма, но също така се установява, че може да действа като защита срещу микобактериални инфекции (Cooper and Khader, 2007). Предполага се, че двете субединици имат различна роля, но въпреки това, свързани заедно те спомагат за изпълнение функциите на цитокина.

Интерлевкин 12 се продуцира главно от дендритни клетки, макрофаги, неутрофили, микроглиални клетки и в по-малка степен от В лимфоцити (Airoidi et al., 2002). Неимунни клетки като инфектирани кератиноцити и остеобласти, епителни и ендотелни клетки също могат да продуцират малки количества от тази сигнална молекула (Aragane et al., 1994; Bost et al., 1999). Продукцията на IL-12 се регулира от механизми на положителна и отрицателна обратна връзка, включващи Th<sub>1</sub> цитокини (например IFN- $\gamma$ ), Th<sub>2</sub> цитокини (например IL-10) и интерферони тип 1 (Aste-Amezaga et al., 1998; Segal et al., 1998).

Биологичните свойства на IL-12 се осъществяват чрез свързване към неговия рецептор, който също като самия цитокин, е съставен от две субединици – IL-12R  $\beta$ 1 и IL-12R  $\beta$ 2. И двете субединици са членове на семейството от рецепторни цитокини клас I, което включва IL-6, IL-11 и левкоцит инхибиращ фактор, свързан с гликопротеин gp130 (Presky et al., 1996; Collison and Vignali, 2008). Рецепторът за IL-12 е с висока степен на консервативност, ~ 68% хомоложност на аминокиселинната последователност между миши и човешки IL-12R  $\beta$ 2 и 54% хомоложност между миши и човешки IL-12R  $\beta$ 1 (Presky et al., 1996). Двете вериги на рецептора са необходими за осъществяване на клетъчна сигнализация, но въпреки това имат и независими роли. IL-12R  $\beta$ 1 е необходима за силно афинитетно свързване към IL-12p40 субединицата и се свързва с Janus киназа (Jak), която е член на семейството тирозин-протеин кинази, които не са рецептори (Non-receptor tyrosine-protein kinase, Тук-2). IL-12R  $\beta$ 2 разпознава или хетеродимера IL-12, или IL-12p35 субединицата, която се експресира при ниски нива след стимулация на Т-клетъчния рецептор, но не и от наивни Т клетки. IL-12R  $\beta$ 2 веригата се свързва с Jak-2 и осъществява сигналната трансдукция чрез три тирозинови остатъка, които действат като място за скачване на сигнален трансдюсер и активатор 4 на транскрипцията (Signal transducer and activator of transcription 4, STAT4).

Основната цел на IL-12 сигналния път е активиране на STAT, главно на STAT4, за да се стимулира диференциацията на наивни CD4<sup>+</sup>T клетки до Th<sub>1</sub> клетки, увеличаване пролиферацията и цитотоксичните свойства на NK и Т клетките (Watford et al., 2004). Като резултат от активирането на IL-12 се индуцира продукцията на IFN- $\gamma$ . При свързване на IL-12 към IL-12R се активират Jak

киназите Tyk-2 и Jak-2. IL-12R  $\beta$ 1 веригата от една страна се свързва с IL-12p40 субединицата, а от друга с Tyk2, докато IL-12R  $\beta$ 2 веригата се свързва с IL-12p35 субединицата и с Jak2. Това води до фосфорилиране на рецептора, който става свързващо място за STAT4 протеини. Последва фосфорилиране на тирозиновите остатъци на STAT4 от Jak киназите. Фосфорилирането от своя страна индуцира хомодимеризация на STAT4 протеините и транслокация в ядрото, където те се свързват със специфични последователности и регулират тяхната транскрипция (Jacobson et al., 1995; Thierfelder et al., 1996; Kusaba et al., 2005). В Th<sub>1</sub> и NK клетките, IL-12 основно индуцира активиране на STAT4. В някои случаи STAT1, STAT3 и STAT5 също могат да бъдат активирани посредством цитокина (Collison and Vignali, 2008; Bacon et al., 1995).

Под действието на IL-12, STAT4 също така индуцира транскрипцията на IL-12R  $\beta$ 2 и интерлевкин 18 рецептора (алфа веригата, IL-18R $\alpha$ ). Това води до амплификация на IL-12 сигнализацията и диференциране на Th<sub>1</sub> клетките (Yoshimoto et al., 1998; Nakahira et al., 2001; Letimier et al., 2007; Yu et al., 2007; Becskei and Grusby, 2007). В NK клетки, IL-12 посредством STAT4 активира гена за перфорин и задейства цитотоксичните им свойства (Yamamoto et al., 2002). Интерлевкин 12 има синергичен ефект с IL-18 в развитието на NK и Th<sub>1</sub> клетките. Интерлевкините 12 и 18 заедно повишават експресията на различни рецептори като CD25, CD107a и други (Sinigaglia et al., 1999; Mirjačić Martinović et al., 2015). Най-значимият ефект от съвместното действие на тези два цитокина обаче е индукцията на IFN- $\gamma$ . Мишки, при които липсва генът за IL-12 или IL-18 не произвеждат IFN- $\gamma$ . Следователно, само наличието на тези два цитокина може да доведе до производството на IFN- $\gamma$  (Okamura et al., 1998; Nomura et al., 2002).

В допълнение, IL-12 спомага транспорта и миграцията на T клетките чрез индуцирана експресия на лиганди от страна на Th<sub>1</sub> клетките, които се свързват с адхезионни молекули като P- и E-селектин. Тези клетки избирателно мигрират и се натрупват, в мястото където е необходимо осъществяване на Th<sub>1</sub> имунен отговор (Austrup et al., 1997). Стимулирането на макрофаги чрез ендогенен IL-12 (произведен от самите макрофаги) има основна роля за индуциране на резистентност при паразитни инфекции (Gazzinelli et al., 1994).

*In vitro* проучвания показват, че при човека IL-12 може да е полезен при лечението на някои atopични състояния, ХИВ-инфекция (човешки имунодефицитен вирус) и рак. При тези условия цитокинът стимулира антитуморната активност на лимфоцити от пациенти с рак и *in vivo* антитуморната активност в много миши модели с тумори. Някои проучвания показват, че CD4<sup>+</sup>T клетките, CD8<sup>+</sup>T клетките, NK клетките и IFN- $\gamma$ , допринасят за антитуморния ефект при терапия с IL-12 (Robertson and Ritz, 1996).

Други цитокини, които спадат към IL-12 семейството са още IL-23, IL-27 и IL-35. Всички те имат хомоложни субединици, рецептори, нива на сигнализация и играят важна роля за пролиферацията на клетки от Th<sub>1</sub> субпопулацията (Brombacher et al., 2003; Beadling and Slifka, 2006; Gee et al., 2009).

## **2.2 Интерлевкин 15 (IL-15)**

Интерлевкин 15 е 14-15 kDa, гликопротеин кодиран от регион от 34 килобази (kb) на хромозома 4q31. Матричната му РНК се синтезира във фибробласти, кератиноцити, епителни клетки на различни тъкани, нервни клетки, моноцити, макрофаги, дендритни клетки и в ниска степен от Т клетки (Waldmann and Tagaya, 1999; Anderson et al., 1995). Въпреки че голям брой клетки синтезират IL-15-мРНК, IL-15 протеинът се секретира главно от моноцити, макрофаги и дендритни клетки.

Интерлевкин 15 едновременно е открит от две различни лаборатории през 1994 г. и е бил характеризирен като растежен фактор на Т лимфоцитите (Burton et al., 1994). Той принадлежи към семейството цитокини с четири  $\alpha$ -спирали, семейство споделящо общ гама рецептор (Common gamma chain family,  $\gamma$ c). Биологичните свойства на IL-15 се осъществяват чрез свързване с неговия рецептор, който е съставен от три субединици –  $\beta$  субединица (IL-2/15R $\beta$ , CD122 на IL-2 рецептора), обща  $\gamma$  субединица ( $\gamma$ c, CD132 на IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-21) и уникалната  $\alpha$  субединица (IL-15R $\alpha$ ), която придава специфичността на IL-15 (Giri et al., 1995). Структурата на интерлевкин 15 е много подобна на тази на интерлевкин 2 (IL-2). Това и фактът, че двата цитокина споделят общи субединици на рецептора, с който се свързват (IL-2/15R $\beta$ , CD122 и  $\gamma$ c, CD132) обяснява подобните им биологични свойства.

Интерлевкин 15 използва JAK/STAT сигналния път при клетъчно активиране (Johnston et al., 1995). При лимфоцитите, свързването на IL-15 към хетеродимера IL-2/IL15R $\beta\gamma$  предизвиква активиране на JAK1/STAT3 и JAK3/STAT5. IL-2/15R $\beta$  субединицата се свързва с JAK1, който в последствие фосфорилира STAT3, докато  $\gamma$  субединица се свързва с JAK3 и фосфорилира STAT5 (Miyazaki et al., 1994; Lin et al., 1995). Фосфорилираните STAT3 и STAT5 протеини образуват хетеродимери, които след това постъпват в ядрото, където активират транскрипцията на анти-апоптичния протеин 2 на В-клетъчна лимфома (B-cell lymphoma 2 protein, bcl2) и протоонкогените: миелоцитоматозен протоонкоген (myelocytomatosis proto-oncogene, c-myc), човешки протоонкоген хомолог на ретровирусния онкоген v-fos (proto-oncogene that is the human homolog of the retroviral oncogene v-fos, c-fos) и протоонкоген, който при хората е кодиран от JUN ген (proto-oncogene that in humans is encoded by the JUN gene, c-jun) (Waldmann and Tagaya, 1999; Shibuya et al., 1992; Miyazaki et al., 1995; Lord et al., 2000).

Мишки, които имат генетично детерминирано увреждане в гена за IL-15, STAT3 или STAT5, нямат лимфоидни клетки (Kennedy et al., 2000; Nosaka et al., 1995; Imada et al., 1998; Teglund et al., 1998). Когато STAT3 е фосфорилиран може да задейства фосфатидинозитол киназа 3/протеинкиназа В (Phosphoinositide 3-kinase, Protein kinase B PI3K/Akt (PKB)) сигналния път. В лимфоцитите това се осъществява въпреки липсата на свързващи места за PI3K върху IL-2/IL15R $\beta\gamma$  (Gu et al., 2000; Ellery and Nicholls, 2002). Този сигнален механизъм използва адапторен протеин наречен Shc, който се свързва с фосфотирозинов остатък върху IL-2/IL15R $\beta\gamma$ , в резултат на което се активира протеин 2, свързан с рецептор за растежен фактор (Growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) и се задейства каскадата: Shc  $\rightarrow$  Grb2  $\rightarrow$  Gab  $\rightarrow$  PI3K  $\rightarrow$  Akt. По този начин се засилва клетъчната пролиферация и/или оцеляване (Gu et al., 2000). Трети сигнален път, който се задейства чрез свързването на IL-15 към неговия рецептор и активиране на Grb2 (посредством Shc) включва свързване с гуанин нуклеотид обменящ фактор SOS. Формираният Grb2-SOS комплекс активира Ras-Raf протеините и в последствие се активира митоген - активирана протеин киназа (Mitogen-activated protein kinase, MAPK), свързана с клетъчната пролиферация

(Adunyah et al., 1997; Steelman et al., 2004). Така фосфорилирането на Grb2, което е медирано от IL-15, регулира както PI3K, така и MAPK пътя. Заедно тези сигнални механизми индуцират експресията и активирането на ефекторни молекули надолу по веригата, като: c-myc, c-fos, c-jun, Bcl-2 и ядрен фактор капа бета ( Nuclear factor kappa B, NF-kB) (Miyazaki et al., 1995).

Функционално IL-15 подпомага експанзията и поддържа жизнените процеси в клетката чрез индуциране на силни сигнали за пролиферация чрез JAK/STAT и Ras/MAPK сигналните пътища, предотвратява клетъчната смърт чрез увеличаване на анти-апоптичните протеини Bcl-2 и Bcl-xL, както и намалява про-апоптичните протеини като: Bcl-2 подобен протеин 11 (наричан още Bcl-2-like protein 11, Bim) и про-апоптичен модулатор на туморен протеин 53 (p53 upregulated modulator of apoptosis, Puma) чрез активиране на PI3K пътя (Huntington et al., 2007; Johnston et al., 1995; Miyazaki et al., 1994; Adunyah et al., 1997; Miyazaki et al., 1995; Steelman et al., 2004). В допълнение, IL-15 усилва цитотоксичните ефекторни функции на лимфоцитите чрез увеличаване на производството на перфорин и гранзими A/B (Imada et al., 1998; Teglund et al., 1998; Farag and Caligiuri, 2006). Цитокинът може да задейства, както Th<sub>1</sub> имунния отговор, като индуцира освобождаването на IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , така и Th<sub>2</sub> имунен отговор чрез секреция на IL-4 и IL-5 в активирани човешки Т клетки (Borger et al., 1999; Mori et al., 1996).

Като провъзпалителен цитокин, IL-15 намира роля в автоимунните заболявания, както и при възпаление. Напоследък все по-често се установява тясна връзка между възпалението и развитието на злокачествени тумори (Malamut et al., 2010). Тъй като IL-15 стимулира пролиферацията и поддържа популациите от НК, В и Т клетки, вероятно е цитокинът да играе важна роля при някои хематологични злокачествени заболявания. В подкрепа на тези твърдения е фактът – в присъствие на IL-15 се засилва пролиферацията на миша Т-лимфомна клетъчна линия LBC (Gravisaco et al., 2003) и спонтанното развитие на CD8<sup>+</sup> Т-клетъчна линия при трансгенни мишки (Fehniger et al., 2001; Sato et al., 2011). Лабораторни миши модели демонстрират бърза пролиферация на НК и Т клетки, последвана от спонтанна трансформация до летална левкемия с възможност за по-тежки варианти на човешка НК- и Т-клетъчна голяма гранулирана лимфоцитна левкемия.

*In vitro*, IL-15 инхибира апоптозата на първични човешки НК левкемични клетки и НК туморни клетъчни линии, както и стимулира растежа на В-клетъчна хронична лимфоцитна левкемия (Trentin et al., 1996). Матрична РНК за IL-15 е открита в периферни кръвни мононуклеарни клетки на пациенти със синдром на Sezary, Т-клетъчна лимфома, в епидермални кератиноцити в кожни лезии на пациенти с микозис фунгоидес (Leroy et al., 2001). Големият брой доказателства в литературата показват, че IL-15/IL-15R $\alpha$  автокринна стимулация е една от причините за растежа, трансформацията и прогресията на Т-клетъчна левкемия при възрастни, лимфома дължаща се на човешки Т-клетъчен лимфотропен вирус (HTLV-1) (Azimi et al., 1998; Kukita et al., 2002).

Цитокинът може да играе роля в имунологичния контрол и като защита срещу появата на тумори. За сега проучванията не установяват значима разлика между серумните нива на IL-15 при пациенти с различни солидни тумори, включително такива с метастазирал рак в сравнение със серумните нива на цитокина при здрави индивиди (Lissoni et al., 1998). В действителност, IL-15 може да има защитен ефект срещу развитието на рак. Рискът от злокачествен тумор се повишава с възрастта. Проучвания при мишки показват свързано с възрастта намаляване на серумните нива на IL-15 (Quinn et al., 2010). Цитокинът може да осъществява защитна функция срещу тумори, като подобри имунния надзор, който може да бъде загубен при стареенето.

Директното приложение на IL-15 показва антитуморни ефекти в няколко предклинични туморни миши модели (Munger et al., 1995; Oh et al., 2003; Zhang et al., 2009; Yu et al., 2010). В проучване на Yu et al. е показано, че IL-15 удължава продължителността на живот на мишки с метастатичен CT25 рак на дебелото черво. Използването единствено на IL-15 обаче не е оптимално, тъй като могат да се активират отрицателни регулаторни контролни точки на имунната система, които също потискат имунния отговор. Цитокинът може да индуцира експресия на имуносупресивния рецептор PD-1 и повишава секрецията на IL-10 (имунен супресор) от CD8<sup>+</sup>T клетките. Едновременното прилагане на цитокина и моноклонални антитела срещу рецепторите PD-L1 и Цитотоксичен Т-лимфоцит-свързан антиген 4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) намалява експресията на PD-1, секрецията на IL-10 и има по-добър антитуморен ефект,

отколкото самостоятелното третиране с цитокина (Zhang et al., 2009; Dubois et al., 2008). С цел увеличаване ефикасността на имунотерапията с IL-15, освен него се прилага и анти-CD40, което индуцира и увеличава експресията на IL-15R $\alpha$ , като така подпомага ковалентното свързване на IL-15 към разтворим IL-15R $\alpha$ . Имитира се транс-представяне и повишаване на биостабилността на IL-15 (Zhang et al., 2009; Dubois et al., 2008). И двата подхода показват по-добри антитуморни резултати, отколкото самостоятелното използване на цитокина. По подобен начин, едновременното прилагане на други цитокини като IL-21 увеличава ефективността на IL-15 при животински туморни модели (Zeng et al., 2005).

Установено е, че IL-15 е ефективен, когато се използва като адювант в *in vitro* модели на рак и инфекциозни заболявания. Това се подчертава в проучване на Steel и сътрудници, на NEU-антиген позитивен модел на рак на гърдата при мишки (Steel et al., 2010). Животните ваксинирани с дендритни клетки, експресиращи IL-15 и скъсен неу (неу) ген, остават без поява на тумори значително по-дълго, в сравнение с животни ваксинирани само с неу. Този ефект допълнително се повишава, когато ваксината с дендритни клетки се модифицира – освен IL-15, се експресира и IL-15R $\alpha$ . Това проучване също така показва, че IL-15 може да преодолее дефекти в CD4<sup>+</sup> клетките и да подобри терапията, базирана само на моноклонални антитела. Преодоляването на дефекти в CD4<sup>+</sup> имунния отговор се осъществява, като IL-15 позволява на CD8<sup>+</sup>-клетъчния отговор да инхибира TRAIL-медирана апоптоза (Oh et al., 2008).

IL-15 се смята за спомагателно средство при стимулиране на клетки. *In vitro* проучванията показват, че NK клетки, CD8<sup>+</sup>T клетки, CD8<sup>+</sup>T клетки на паметта и дендритни клетки, култивирани в присъствието на IL-15, проявяват функциите си по-оптимално, след като са трансферирани обратно в животни (Salagianni et al. 2011; Klebanoff et al., 2004; Anguille et al., 2009).

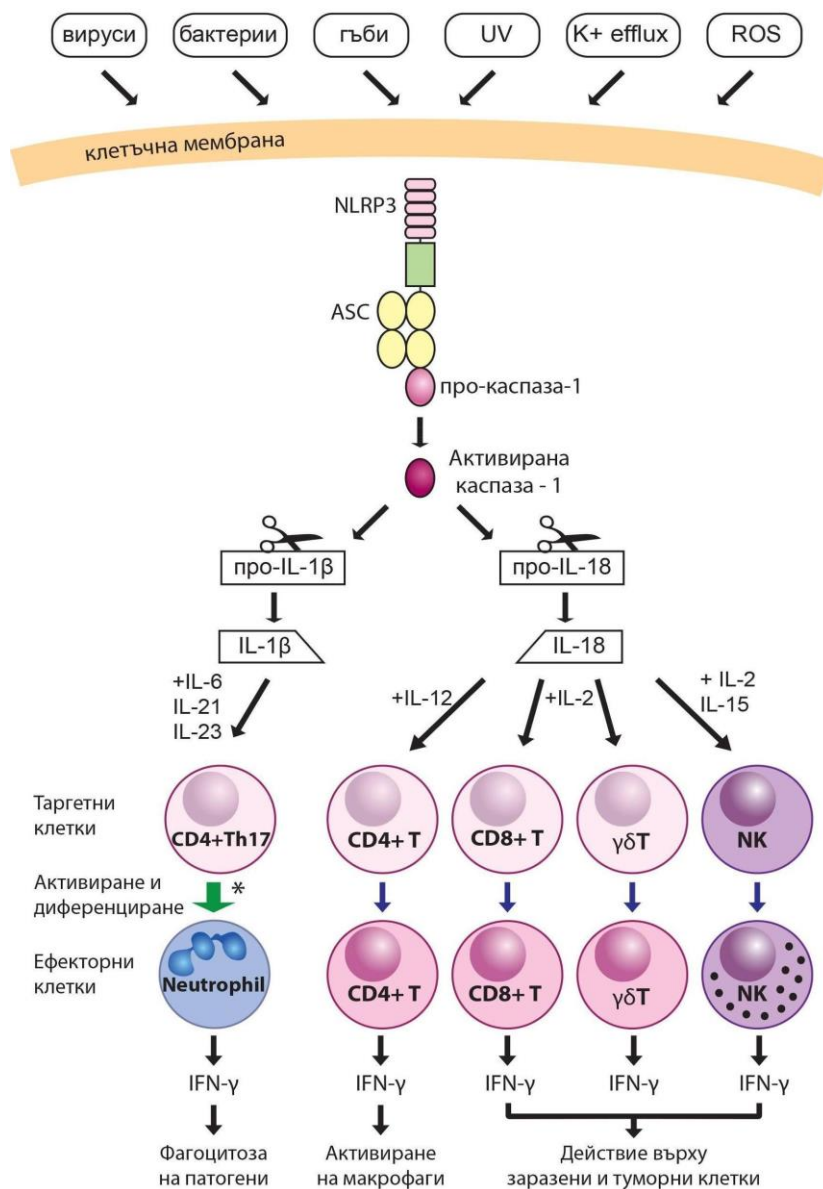
### **2.3 Интерлевкин 18 (IL-18)**

Интерлевкин 18 (IL-18) е провъзпалителен цитокин, член на IL-1 семейството и по-конкретно на IL-1R/Toll-like receptor (TLR) суперсемејството. Този цитокин е открит от видния японски имунолог Харуки Окамура и неговите сътрудници през 1995 г. (Okamura et al., 1995). Професор Окамура от лабораторията

по туморна имунология и клетъчна терапия, Медицински колеж Хього, Нишиномия, Япония, първоначално описва IL-18 като Th<sub>1</sub>-цитокин, който индуцира производството на INF- $\gamma$ . По-късно е установено, че освобождаването на INF- $\gamma$  от NK клетките изисква участието и на IL-12.

Интерлевкин 18 се синтезира като 24 kDa неактивен прекурсор (без класическа сигнална последователност), който изисква разцепване от IL-1 $\beta$  конвертиращ ензим (ICE, наречен още каспаза-1), за да се създаде биологично активен мономер от 17,2 kDa (Ghayur et al., 1997; Gu et al., 1997). В този процес участва протеинов комплекс, наречен инфлазома. Комплексът е изграден от про-каспаза-1, ASC-адапторен протеин (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, протеин свързан с апоптозата, съдържащ CARD домен), криопирин (NLRP3, NLR (NOD-like receptor) family pyrin domain containing 3) (Yoshimoto and Yoshimoto, 2013). Както при обработването на IL-1 $\beta$ , неактивната про-каспаза-1 първоначално се превръща в активна каспаза-1 от нуклеотид-свързващ домен и NLRP3. Активираната каспаза-1, която е част от активната инфлазома, разцепва проинфламаторния цитокин IL-18 и го превръща в неговата активна (инфламаторна) форма (**Фигура 1a**), но над 80% от прекурсора на IL-18 остава необработен. Аналогично се активира и IL-1 $\beta$ , тъй като той има подобна структура с IL-18. В литературата има и примери, при които не се изисква разцепване на IL-18 от каспаза-1 (Tsutsui et al., 2000). Стимулиране на Fas лиганд води до секретирание на биологично активен IL-18 от миши макрофаги с дефицит на каспаза-1 (Tsutsui et al., 2000). IL-18 се секретира от широка група от клетки, включваща макрофаги, дендритни клетки, моноклеарни, кератиноцити и остеобласти (Yoshino et al., 2001).

Биологичният ефект на IL-18 се осъществява чрез свързване към мембранен рецепторен комплекс, който е съставен от две субединици IL-18R $\alpha$  и IL-18R $\beta$ . Провъзпалителният цитокин има нисък афинитет към  $\alpha$  веригата, но след свързване с нея проявява висок афинитет към  $\beta$  веригата (Kim et al., 2001).



**Фигура 1а.** Механизъм на действие на IL-1β и IL-18. Когато клетката е подложена на различни външни стимули се самосглобява надмолекулен протеинов комплекс, наречен инфлазама (NLRP3, ASC и про-каспаза-1). От предшественици про-IL-1β и про-IL-18 се получават биологично активните им форми IL-1 и IL-18. Те активират таргетните им клетки, които водят до активиране и диференциране на други клетки (\*) или самите таргетни клетки се диференцират до ефекторни и започват да секретират IFN-γ. Ефектът от това се изразява във фагоцитоза на патогени, активиране на макрофаги, и действие върху заразени или туморни клетки. Моделът на Фигурата [Yoshimoto and Yoshimoto, 2013] е модифициран.

Комплексът, който се образува между IL-18 и неговите рецептори, е подобен на комплекса, който се формира от другите членове на IL-1 семейството. След образуване на хетеродимера, Toll-IL-1 рецептор (TIR) домените се приближават и последователно се задейства каскадата: ген 88 за първична миелоидна диференциация (Myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88), четирите кинази, асоциирана с интерлевкин-1 рецептора (Interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK) и фактор, асоцииран с рецептора за тумор некротизиращия фактор (TNF receptor-associated factor, TRAF-6), последвани от разграждане на I-капа В (I $\kappa$ B) и освобождаване на NF- $\kappa$ B (Weber et al., 2010).

Повечето клетки експресират  $\alpha$  веригата за IL-18, но не експресират  $\beta$  веригата. IL-18R $\beta$  имат Т клетки и дендритни клетки, но често липсва върху мезенхимни клетки (Dinarello et al., 2013). Човешка клетъчна линия A549 (човешки белодробен карцином) не експресира IL-18R $\beta$  (Kim et al., 2005) и сигнал от IL-18 може да бъде предаден само ако IL-12 индуцира експресията на IL-18R $\beta$  (Nakanishi et al., 2001). При липса на  $\beta$  веригата, IL-18 се свързва с IL-18R $\alpha$ , но не се предава провъзпалителен сигнал.

Биологичният ефект на IL-18 може да се регулира след свързването му с високо афинитетен за него протеин IL-18BP (Interleukin 18-binding protein) (400 pM). IL-18BP се свързва с IL-18 и не позволява свързването му с рецепторния си комплекс, в резултат на което действието на IL-18 се инхибира. Нарушаването на баланса в свързването на IL-18 и IL-18BP, е причина за наличие на високо ниво на несвързан IL-18, поради което броят на пациенти със заболяване, дължащо се на този дисбаланс се увеличава.

В подкрепа на значението на IL-18BP като инхибитор на IL-18 сигналния път е нарастващият брой проучвания с IL-18-дефицитни мишки, мишки, в които IL-18 е неутрализиран или мишки, които имат дефицит на IL-18BP. Те показват, че IL-18BP има отношение към възпалителни процеси (Mansoori et al., 2016).

IL-18BP не е класически разтворим рецептор. За разлика от съдържащите три IgG домена тип II IL-1 рецептори, IL-18BP има само един такъв домен, поради което той принадлежи към отделно семейство секреторни протеини. Единичен IgG домен притежава и рецепторът, който свързва IL-1 (Single Ig IL-1 related receptor, SIGIRR). Свързвайки се с IL-18, IL-18BP регулира функциите на Th<sub>1</sub> клетките и

намалява секрецията на IFN- $\gamma$  (Nakanishi et al., 2001). По този начин IL-18BP осигурява по-добро действие на Th<sub>1</sub> клетките спрямо патогени и намаляване на автоимунните реакции при инфекциозни болести. Същото важи и в случаите, при които участват и Th<sub>2</sub> клетките (Nakanishi et al., 2001).

Интерлевкин 18 се смята за мощен регулатор на процеси, свързани с вродения и придобития имунитет (Garcie et al., 2003; Dinarello et al., 2013). Заедно с IL-12 или IL-15, той активира NK клетките и индуцира Th<sub>1</sub>-клетъчен отговор, за който е характерна висока продукция на IFN- $\gamma$ . Без IL-12 и IL-15, IL-18 не предизвиква секреция на IFN- $\gamma$ , тъй като тези два цитокина увеличават продукцията на IL-18R $\beta$ , която е от съществено значение за IL-18 сигнална трансдукция (Dinarello et al., 2013). Секрецията на IFN- $\gamma$  се стимулира и след съвместното действие на IL-18 с Th<sub>1</sub>-свързаните IL-12 и IL-23 (Okamoto et al., 2002; Nakahira et al., 2002; Okazawa et al., 2004). IL-18 може да индуцира Th<sub>2</sub> отговор и без присъствието на IL-12. В мишки, инфектирани с *E.coli*, IL-18 задейства, както Th<sub>1</sub> имунен отговор, така и Th<sub>2</sub> (Kinoshita et al., 2006). Изследвания проведени при нокаут мишки на IL12p40 и IL-18, показват, че IL-18 участва в индуцирането на Th<sub>17</sub>-клетъчния отговор (Lim et al., 2013). Предполага се, че IL-18 заедно с IL-23 усилват продукцията на IL-17 от Th<sub>17</sub> клетките, без участието на T-клетъчен рецептор (Weaver et al., 2006). Увеличеното производство на IFN- $\gamma$  е в резултат на активиране на клетките с IL-18, което е придружено от повишена пролиферация на T клетки и производството на различни цитокини (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-14, IL-5, IL-13) от T хелперите (CD4<sup>+</sup>) и активирани цитотоксични T лимфоцити (CD8<sup>+</sup>). При имунокомпрометирани мишки, заразени с *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans*, е установено, че само многократното инжектиране на IL-18 предизвиква Th<sub>1</sub> и Th<sub>2</sub> имунен отговор и увеличаване на фагоцитната активност на неутрофилните фагоцити (Kinoshita et al., 2013). Освен положителната му роля, поради силния му IFN- $\gamma$  индуциращ ефект, той може да предизвика негативни за организма последици, като възпаление, а в някои случаи – увреждания на множество органи и смърт.

Терапевтичният ефект на IL-18 се потвърждава от нарастващ брой публикации. Например мишки с дефицит на IL-18 развиват метаболитно-подобен синдром, което е в съответствие с ролята на IL-18 в поддържането на метаболитна

хомеостаза (Dinarello et al., 2013). При моделно проучване на възрастова дегенерация на макулата у мишки, е установено, че комплексът drusen (получен от комплемента и апополипротеини и липиди) активира NLRP3 и индуцира произвеждането на IL-1 $\beta$  и IL-18 (Doyle et al., 2012). Ако мишките са с дефицит на NLRP3, но нямат дефицит на IL-1RI, макулната дегенерация е по-изразена (Doyle et al., 2012). Следователно, именно IL-18 подобрява състоянието на организма, а не IL-1 $\alpha$  или IL-1 $\beta$ .

В публикация за антитуморното действие на IL-18 се съобщава, че той усилва терапевтичния ефект на блокиращи имунни контролни точки, които не позволяват перитонеално разпространение на неоплазма и метастазирание на малигна меланома. Активиращият ефект на IL-18 се изразява в натрупване на пре-mNK клетки, CD8<sup>+</sup>T клетки на паметта и в инхибиране на CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup> T клетки (Ma et al., 2016). Авторите изтъкват, че тези резултати, разкриват възможност за нова противотуморна терапия, чрез комбиниране на IL-18 с инхибитори на имунни контролни точки (Ma et al., 2016).

При клинично приложение на рекомбинантен човешки IL-18, при пациенти с напреднал, но неметастазирал карцином (фаза I), не са установени странични вредни ефекти. Терапевтичният му ефект се изразява в активиране на моноцити, NK и T клетки, в произвеждане на IFN- $\gamma$  и други цитокини (Srivastava et al., 2010).

Безопасността на лечението с IL-18 е потвърдена при болни с метастазирал меланом (фаза II), но антитуморният му ефект е ограничен. Това означава, че прилаган самостоятелно, IL-18 не може да осигури оптимален ефект. Такъв ефект може да се постигне, когато се прилага съвместно с други имуностимулиращи цитокини, ваксини или моноклонални антитела (Srivastava et al., 2010).

#### **2.4 Интерлевкин 21 (IL-21)**

Интерлевкин 21 е плеiotропен цитокин от тип I с молекулна маса 17,923 Da. Открит е през 2000 г. (Parrish-Novak et al., 2000). Клетките, които главно произвеждат този цитокин са T клетки и T естествени убийци (NKT).

Биологичните свойства на IL-21 се осъществяват чрез свързване към мембранен рецепторен комплекс, който е съставен от две субединици – IL-21 рецептор (IL-21R) и общ гама рецептор ( $\gamma$ c), който е субединица още за

рецепторите на IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 и IL-15. Мутация в  $\gamma$ с веригата при хора води до тежка комбинирана X-свързана имунна недостатъчност (XSCID), заболяване, което се характеризира с отсъствието на Т и НК клетки и с нормален брой В клетки, които не функционират (Rochman et al., 2009). Когато IL-21 се свърже със своите рецептори, задейства JAK/STAT пътя, като използва Jak1 и Jak3 и STAT3 хомодимери, за да активира целевите гени (Habib et al., 2002).

Аналогично на другите  $\gamma$ с цитокини, IL-21 осъществява своите действия чрез JAK-STAT, PI3K и MAPK сигналните пътища (Zeng et al., 2007). IL-21 индуцира силно и продължително активиране на STAT3, което е от решаващо значение за ефектите на цитокина върху диференциацията на В и Т лимфоцитите (Spolski and Leonard, 2014). Значението на активирането на STAT3 е потвърдено при пациенти с мутации в STAT3 (Siegel et al., 2011; Deenick et al., 2013). По-нови изследвания показват, че допълнителни фактори и ко-фактори, участват в IL-21 медираната сигнализация, като някои от тях образуват комплекси със STAT3 (Li et al., 2014).

IL-21 се свързва към комплекса IL-21R $\alpha$ / $\gamma$ с, JAK1 и JAK3, претърпяват автофосфорилиране и последователно фосфорилират STAT1 и STAT3, в по-малка степен фосфорилират STAT4 и STAT5 (Zeng et al., 2007; Strengell et al., 2003). IL-21 се различава от IL-2 и IL-15, по това, че те силно активират STAT5, но не и STAT3. Тези цитокини осъществяват различни ефекти върху имунните клетки, тъй като задействат различни сигнални пътища. Втреклетъчните протеини, които принадлежат към семейството на супресорите на сигналния път 1 на цитокините (Suppressor of cytokine signaling-1, SOCS-1), регулират сигнализацията на IL-21 (Gagnon et al., 2007). Един от начините за регулация е в следствие на свързването на SOCS-1 протеини към JAK киназите или STAT. По този начин се блокира или отслабва JAK/STAT сигналния път (Alexander and Hilton, 2004; Pangumaran et al., 2004). SOCS-1 влияе върху степента на фосфорилиране на STAT3, което е от важно значение за предаване на сигнала (Gagnon et al., 2007). IL-21 води също така до активиране на PI3K и MAPK пътищата, което се оказва много важно за пролиферацията на имунните клетки (Zeng et al., 2007; Strengell et al., 2003). IL-21 редуцира експресията на еомезодермин (Eomes), фактор, който играе роля в регулиране на производството на IFN- $\gamma$  от CD4<sup>+</sup>T клетките (Suto et al., 2006). В

плазмоцитите и В клетките цитокинът (IL-21) индуцира производство на B1M, BLIMP и Vcl-6. В зависимост от приложения ко-стимулиращ сигнал, тези молекули могат да действат като ключови фактори върху оцеляването, диференциацията, апоптозата на В лимфоцитите и плазмоцитите (Ozaki et al., 2004). Въпреки че са изследвани пътищата на сигнализация индуцирани от IL-21 в различни подгрупи от лимфоцити, гените, които са засегнати, остават не напълно изяснени.

Интерлевкин 21 е ключов цитокин, който е мост между вродения и придобития имунитет, тъй като е свързан с взаимодействията между В, Т, НК клетки и дендритни клетки. Този цитокин може да се разглежда като помощен цитокин, получен от CD4<sup>+</sup>T клетките, който усилва антиген-специфичния имуен отговор чрез стимулиране на пролиферация и оцеляване на CD8<sup>+</sup>T и чрез диференциране на В лимфоцитите в плазмоцити. IL-21 има ефект и върху неимунни клетки, като играе роля във възпалението, вероятно чрез способността си да въздейства върху Th<sub>17</sub> клетките. IL-21R, който се експресира върху чревни епителни клетки е функционално активен (Caruso et al., 2007). Експресията на IL-21R върху чревните епителни клетки е по-висока при пациенти с възпаление на червата, отколкото при здрави хора. Повишена секреция на IL-21 се наблюдава още в чревни Т клетки, изолирани от пациенти с възпаление на червата. Сигнализацията чрез IL-21R върху тези клетки води до фосфорилиране на низходящи молекули-посредници и увеличаване на производството на възпалителния протеин MIP-3α. При неутрализиране на IL-21 чрез антитяло, се намалява продукцията на MIP-3α (Caruso et al., 2007), което предполага, че IL-21 може да има директен ефект при възпаление. Други изследвания, показващи ефектите на IL-21 върху експресията на металопроотеази от чревни фибробласти (Monteleone et al., 2006), подкрепят хипотезата, че IL-21 медира тези ефекти, поне отчасти, като действа върху неимунни клетки.

Активиране на цитотоксичните свойства в НК и CD8<sup>+</sup>T клетките са от ключово значение при туморната имунотерапия. Проучвания предоставят доказателства, че IL-21 е обещаващ имунотерапевтичен агент при злокачествените тумори (Croce et al., 2015). IL-21 стимулира узряването на НК клетките, повишава тяхната цитотоксичност и индуцира секрецията на IFN-γ и перфорин (Kasaian et al., 2002; Brady et al., 2004). Индуцираната цитолитична активност на НК клетките, от

страна на IL-21, значително инхибира растежа на B16 меланом (Brady et al., 2004). Нещо повече, IL-21 заедно с IL-15 води до експанзия на антиген-специфични CD8<sup>+</sup> Т клетки и тяхната ефекторна функция, което води до регресия на тумора (Zeng et al., 2005). В допълнение, ракови клетки, които преекспресират IL-21 не могат да се присадят към гостоприемника и бързо се елиминират (Di Carlo et al., 2004; Ma et al., 2003; Ugai et al., 2003; Kumano et al., 2007). Локалното добавяне на IL-21 в туморна микросреда в модел на рак на гърдата, показва превключване на тумор-свързани макрофаги от M2-фенотип към тумор-инхибиращ M1-фенотип, което бързо стимулира Т-клетъчния имунен отговор (Xu et al., 2015). Тези изследвания предполагат, че IL-21 може да възвърне функциите на ефекторните клетки в туморната микросреда. Цитокинът би могъл да се използва самостоятелно или в комбинация с други терапевтични средства. Действително, текущите клинични изпитвания са обнадеждаващи. В проучване във фаза II, при което IL-21 се използва като самостоятелно средство за лечение на пациенти с метастазирал меланом, които не са получили предишна системна терапия, постигат подобрене от 22,5% (Petrella et al., 2012). Друго проучване изследва ефектите на IL-21 в комбинация със сорафениб, инхибитор на тирозин киназата, като показва подобрене на лечението на метастазен бъбречно-клетъчен карцином с 82% (Bhatia et al., 2014).

За IL-21 е известно, че директно индуцира апоптоза при някои типове лимфоми. *In vitro* проучвания показват, че IL-21 силно индуцира апоптозата на дифузен голям В-клетъчен лимфом (Sarosiek et al., 2010), мантелноклетъчен лимфом (неходжкинов лимфом) (Bhatt et al., 2015; Gelebart et al., 2009) и клетки на хронична лимфоцитна левкемия (de Toter et al., 2006) чрез активиране на STAT3 или STAT1, което води до променена експресия на протеини от BCL2 семейството и активиране на каспази. Освен директен апоптичен ефект, IL-21 самостоятелно или в комбинация с анти-CD40 моноклонално антитяло (ритуксимаб) може индиректно да предизвика смърт в туморни клетки чрез активиране на NK-клетъчно-зависим цитотоксичен ефект (Bhatt et al., 2015; Gowda et al., 2008). Въз основа на тези резултати, изследване във фаза I комбинира IL-21 с ритуксимаб за лечение на 19 пациенти с В-клетъчни злокачествени заболявания и 42% от пациентите показват пълен или частичен отговор (Timmerman et al., 2012). За

разлика от IL-2, инжектиране на висока доза с IL-21 не предизвиква синдром на капилярната пропускливост *in vivo* (Sivakumar et al., 2013) и се понася добре.

Експанзия на антиген-специфични CD8<sup>+</sup>T клетки срещу туморни клетки в *in vitro* условия и последващия им трансфер в пациенти, е друга обещаваща стратегия срещу тумори. Когато се изолират антиген-специфични CD8<sup>+</sup>T клетки от болен от левкемия, пречистят се от HLA, култивират се с IL-21 в *in vitro* условия и след това се инфузират в пациента, CD8<sup>+</sup>T клетките показват дълготраен паметен фенотип в сравнение с клетките, които не са третирани с IL-21. Пациентите, които са подложени на клетъчен трансфер с клетки, стимулирани с IL-21, показват намаляване в броя на раковите клетки и удължена пълна ремисия (Charpuis et al., 2013). Тези резултати показват, че IL-21 може да бъде мощен адювант за клетъчно-базирана ракова имунотерапия.

### **3. Имунни контролни точки (Immune checkpoints)**

Имунните контролни точки са белтъчни молекули, които функционират като система за контрол и баланс, като модулират (стимулират или потискат) имунния отговор към инфекциозни агенти, чужди тъкани и туморни клетки (Flies et al., 2017). Те представляват молекули на имунната система, които могат да увеличат или да намалят даден сигнал в клетката, след като се свържат към рецептора/лиганда си. Модулаторите на имунната система позволяват инициране на имунен отговор в подходящ момент и предотвратяване на автоимунен отговор. Имунните контролни точки обхващат много инхибиращи пътища, свързани с имунната система, които са от решаващо значение за поддържане на толеранс в клетката. Те модулират продължителността и амплитудата на физиологичните имунни отговори в периферните тъкани, за да се сведе до минимум тяхното увреждане (Bose, 2017). Ко-инхибиращи и ко-стимулиращи имунни контролни молекули са необходими, за поддържане баланса между активно и неактивно състояние на Т лимфоцитите и NK клетките (Ceeraz et al., 2014). Клетките естествени убийци постоянно „патрулират“ из тялото, като следят за промени, които са свързани с настъпила инфекция или патология в дадена клетка. Когато се натъкнат на друга клетка, те предават сигнали, които водят до експресия на тяхната повърхност, на определен протеин, който служи като отличителен знак за

идентичността на тази клетка. Ако протеините са знак, че клетката е здрава, NK клетката не я атакува. Ако клетката естествен убиец разпознае чужд антиген, ще инициира атака срещу тази клетка. След тази атака, имунната система ще увеличи броя на допълнителни молекули, за да предотврати увреждане на здравите тъкани. Тези молекули са известни още като имунни контролни точки или пунктове. Имунните контролни пунктове (чекпойнт рецептори) модулират сигнализирането, ограничавайки (ко-инхибиращи) или увеличавайки (ко-стимулиращи) имунния отговор.

### **3.1 Активиращи имунни контролни точки**

Взаимодействието между лиганди и техните активиращи рецептори, които се експресират върху имунните клетки, е необходимо, за да се поддържа оптимално активиране на тези клетки (Т лимфоцити, В лимфоцити, NK клетки) (Schildberg et al., 2016). Блокирането на това взаимодействие води до потискане функциите на имунните клетки. Затова активиращите имунни контролни точки е необходимо да останат свободни при липса на заплахата за организма и да се свържат със своята активираща молекула при наличие на такава.

Към едно семейство протеини често спадат освен активиращи рецептори и инхибиращи такива. Тези рецептори се конкурират за едни и същи лиганди. В зависимост от това кой рецептор ще се свърже с лиганда се определят и последствията за клетката (Schildberg et al., 2016). Когато активиращите имунни контролни точки (например CD80 лиганд) се свържат с инхибиращи такива (например CTLA-4 рецептор), а не със своя активиращ рецептор (в случая CD28), функциите на имунните клетки се потискат (Schildberg et al., 2016). Повечето данни относно имунните контролни точки – активиращи и инхибиращи, в литературата са свързани с Т клетките и са оскъдни за NK клетките.

Активиращи имунни контролни молекули, които са членове на TNF суперсемејството (рецептори за TNF) са CD27, CD40, OX40, глюкокортикоид, който индуцира производството на рецептор за TNF (Glucocorticoid-induced TNF receptor, GITR) и CD137. Други молекули със същите функции, които принадлежат към суперсемејството B7-CD28, са CD28 и индуцируем Т-клетъчен ко-стимулатор (Inducible T-cell costimulator, ICOS). Всички те спомагат Т-клетъчната

пролиферация. Всички други ко-стимулиращи молекули, включително антагонистите на техните антители, са обект на интензивни изследвания от страна на много фармацевтични компании.

CD27 е молекула на имунната система, която подпомага експанзията на наивни антиген-специфични Т клетки и е жизненоважна за създаването на Т клетки на паметта (Hendriks et al., 2000). Тя е също така маркер на В клетки на паметта (Agematsu, 2000). Действието на CD27 се регулира от преходната наличност на неговия лиганд CD70, върху лимфоцити и дендритни клетки (Borst et al., 2005). Известно е, че CD27 ко-стимулацията, потиска функцията на Th<sub>17</sub> ефекторните клетки (Coquet et al., 2013). Разработено е агонистично анти-CD27 моноклонално антитяло, наречено верлилумаб, което при животински модели е доказано, че е ефективно в контекста на стимулиране на Т-клетъчния рецептор (He et al., 2013).

CD28 е молекула, която константно се експресира върху почти всички CD4<sup>+</sup>Т клетки и на около половината от всички CD8<sup>+</sup>Т клетки. При свързване с двата си лиганда – CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), експресирани върху дендритни клетки, CD28 предизвиква експанзия на Т клетките (Eastwood et al., 2010). Структурен хомолог на CD28 рецептора е инхибиращият рецептор CTLA-4, който се свързва дори по-стабилно с B7 лигандите, отколкото активиращият рецептор (Schildberg et al., 2016).

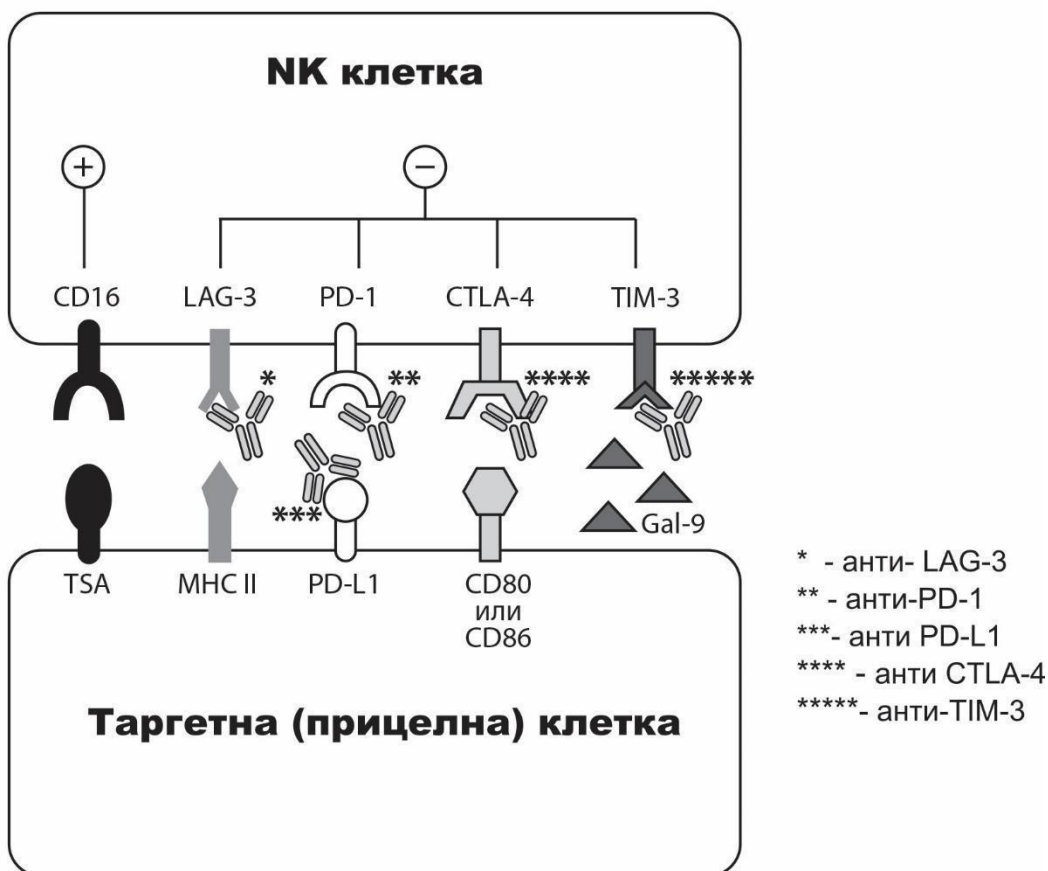
Резултат от свързването на CD137 със своя лиганд CD137L е пролиферацията на Т клетките. Сигнализацията, медирана от този комплекс има и други функции като да предпазва Т клетките и по-специално CD8<sup>+</sup>Т клетките от клетъчна смърт, индуцирана чрез активиране (Mittler et al., 2004).

При свързване на OX40 със своя лиганд OX40L (CD252), комплексът задейства каскада, която води до експанзия на ефекторни и паметни Т клетки, потиска диференциацията и активността на Т регулаторни клетки, както и регулира производството на цитокини (Croft et al., 2009). Недостатъкът на OX40 като лекарствена мишена се крие главно във факта, че преходно се свързва с Т-клетъчния рецептор. Въпреки това свързването води до повишаване на антиген-активираните Т клетки, в рамките на възпалителните лезии (Weinberg et al., 2011). Анти-OX40 моноклонални антители са показали предимствата си в клинични изследвания при напреднал рак (Curti et al., 2013).

Индуцираният Т-клетъчен стимулатор (ICOS (CD278)) се експресира върху активирани Т лимфоцити. Лиганд на ICOS-ICOSL се експресира предимно върху В лимфоцити и дендритни клетки. Образуваният се комплекс изглежда е важен за ефекторните функции на Т лимфоцитите (Burmeister et al., 2008).

### **3.2 Инхибиращи имунни контролни точки**

Експресията на повече инхибиращи молекули по повърхността на имунните клетки предоставя по-голяма възможност за атака от страна на туморните клетки. Според последни данни силната експресия на инхибиращи рецептори по повърхността на лимфоцитите ги превръща в т.нар. „изтощени“ лимфоцити (**Фигура 1б**). Инхибиращите рецептори много често се конкурират с активиращите рецептори за свързване с техните лиганди. Като при успешно свързване с лигандите на активиращите рецептори, инхибиращите контролни точки потискат функциите на имунните клетки. Броят на установените инхибиращи рецептори се увеличава непрекъснато с нарастващия интерес и изследвания в тази област. Затова ще бъдат описани основните молекули, които имат отношение към потискането на имунната система и за които има данни за тяхната роля.



**Фигура 16.** Инхибиращи контролни точки (рецептори), експресирани от НК клетката. Взаимодействието между инхибиращия рецептор (LAG-3, PD-1, CTLA-4, TIM-3), експресиран от НК клетката и неговия лиганд от таргетната клетка (MHC II, PD-L1, CD80/CD86, Galectin-9 в секретирания му форма), може да бъде блокирано чрез моноклонални антитела (monoclonal antibodies, mAbs) (примери за такива са посочени със звездичка \*). Тези блокиращи антитела могат да бъдат насочени срещу: рецептора; лиганда; както и срещу рецептора и лиганда. Използвайки посочения механизъм на предотвратяване на контакта рецептор-лиганд, НК клетката може да повиши цитолитичните си свойства и да атакува таргетната клетка. Активираният рецептор CD16, експресиран от НК клетката, се свързва с тумор-специфичен антиген (tumor-specific antigen, TSA) експресиран от таргетната клетка. При блокиране на тази връзка с mAb – НК клетката се активира и атакува таргетната клетка. Фигурата е по Carotta, 2016, модифицирана от нас.

Рецепторът CTLA-4 (CD152) е повърхностен гликопротеин, експресиран от цитотоксични Т лимфоцити (CTL). Той е негативен регулатор на Т-клетъчната активация чрез конкуриране на ко-стимулиращия рецептор CD28 с неговите В7 лиганди – CD80 и CD86 (Linsley et al., 1991). Затова блокиране на CTLA-4 чрез CTLA-4 антитяло освобождава CD28, който се свързва с В7 лигандите, за да задейства стимулиращ сигнал. При недробноклетъчен бъбречен карцином Т регулаторните клетки (Tregs), потискащи пролиферацията на цитотоксичните Т лимфоцити, експресират също и CTLA-4. Инхибирането на Tregs, респективно и на CTLA-4 води до премахване на супресията на цитотоксични Т лимфоцити (Zou and Chen, 2008).

Цитотоксичният Т лимфоцит свързан антиген 4 е първата молекула на имунната система, която показва, че може да действа като инхибитор на имунната система чрез различни механизми. Той инхибира, както пролиферацията на имунните клетки, така и продукцията на IL-2 (Azoury et al., 2015). Тази молекула е таргетен рецептор за меланома на Bristol-Mayers Squibb's, които произведоха лекарството Yervoy, което получава одобрение от администрацията по храните и лекарствата през март 2011 г.

Ролята на CTLA-4 като критичен отрицателен регулатор е широко изследвана в множество животински модели. Първоначалните проучвания показват, че блокирането на CTLA-4 сигнализацията, използвайки анти-CTLA моноклонално антитяло, може значително да усилва активирането на Т клетките и тяхната ефекторна диференциация *in vitro* (Krummel and Allison, 1995). Затова CTLA-4 се смята за „главен регулатор“ на имунната активация (Bluestone, 1997).

Друга имунна контролна точка е протеинът на програмирана клетъчна смърт 1 (PD-1). Той е ко-инхибиращ рецептор, принадлежащ към CD28/CTLA-4 семейството, и се експресира по повърхността на активирани Т, В лимфоцити, НК клетки и моноцити след продължителното им излагане на антигена. Протеинът на програмирана клетъчна смърт 1 има два лиганда – PD-L1 (CD274, B7-H1 (homologe)) и PD-L2 (CD273, B7-DC (dendritic cell)). При свързване с лигандите си (PD-L1 и PD-L2) PD-1 осуетява Т-клетъчната активация и ограничава активността на ефекторните Т клетки в периферните органи и тъкани при възпаление и автоимунен отговор. Това се постига чрез инхибиране на Т-клетъчната

пролиферация и намаляване секрецията на анти-апоптогични молекули и цитокини (Philips and Atkins, 2015). Експресията на PD-L1 се наблюдава често при различни тумори, включително и при недребноклетъчен бъбречен карцином (НДКБК). Счита се, че свързването на тумор-експресиран PD-L1 с PD-1 блокира Т клетъчната активация и води до имунно „изплъзване“ (Калев, 2017). На това се основава увеличаването на имунния отговор срещу тумори, като се блокира PD-1 сигналния път чрез използване на анти-PD-1 антитела.

Тази контролна точка (PD-1) е таргетна за лекарство срещу меланома, наречено кейтруда (keytruda), одобрено от администрацията по храните и лекарствата през септември 2014 г. Предимството в блокирането на PD-1 рецептора и/или на PD-L1, PD-L2 е, че може да възстанови ефекторните функции на имунните клетки в туморната микросреда (Philips and Atkins, 2015; Syn et al., 2017).

Трети инхибиращ рецептор причислен към групата на имунните контролни точки е Т-клетъчен имуноглобулин и муцин домейн 3 (TIM-3). Той е ко-инхибиращ рецептор, който се експресира върху активирани човешки CD4<sup>+</sup>T клетки, Т клетки, които продуцират IFN- $\gamma$ , FoxP3<sup>+</sup>Treg клетки, върху клетки на вродения имунитет (макрофаги и дендритни клетки), като е показано, че потиска имунния отговор на тези клетки при взаимодействие с лиганда си (Das et al., 2017). Този рецептор задейства клетъчната смърт при взаимодействие с лиганда си – галектин 9 (Gal-9). TIM-3 действа като отрицателен регулатор на човешки Т лимфоцити и регулира секрецията на Th<sub>1</sub> и Th<sub>17</sub> цитокините (Hastings et al., 2009; Zhu et al., 2011; Syn et al., 2017). Той участва още в поддържането на имунен толеранс (Hastings et al., 2009). Този ко-инхибиращ рецептор придобива популярност като потенциален кандидат за имунотерапия на рак, като е доказано, че *in vivo* блокирането на TIM-3 и на други инхибиращи контролни точки, усилва антитуморния имунитет и потиска туморния растеж в няколко предклинични туморни модела (Das et al., 2017).

Имунна контролна точка с инхибиращо действие, която все още е недостатъчно проучена, е лимфоцитен активиращ ген 3 (LAG-3, CD223). Негативното действие на лимфоцитен активиращ ген 3 е, че потиска имунния отговор чрез активиране на Treg (Huang et al., 2004), както и чрез директен ефект върху CD8<sup>+</sup>T клетките (Grosso et al., 2007; Syn et al., 2017). Учените са във фаза I на изследванията с анти-LAG-3 моноклонално антитяло.

#### 4. „Изтощени“ лимфоцити (exhausted lymphocytes)

През последното десетилетие характеристиките на „изтощени“ имунни клетки са станали малко по-добре дефинирани и се знае, че „изтощените“ NK клетки, T лимфоцити и други, са съвсем различни от ефекторните и паметните клетки. Изчерпването на функциите на имунните клетки, се свързва с постоянната експресия на инхибиращи рецептори, които заедно действат като негативни регулатори и по този начин намаляват пролиферацията и ефекторните функции на тези клетки (Yi et al., 2010). Това явление се характеризира с последователни фенотипни и функционални промени. „Изтощените“ имунни клетки експресират редица инхибиращи молекули, различни рецептори за цитокини, транскрипционни фактори и ефекторни молекули, които ги отличават от конвенционалните ефекторни, паметни клетки. Функционалното изтощаване на клетките естествени убийци в туморната среда и хронични инфекции понякога се съпровожда с намалена експресия на някои повърхностно активиращи рецептори върху NK клетките. Експресията на NKG2D рецепторът е намалена при пациенти с рак на панкреаса, рак на стомаха, колоректален карцином (Peng et al., 2013), рак на гърдата (Mamessier et al., 2011) и хронична лимфоцитна левкемия (Parry et al., 2016), както и при пациенти с хронична вирусна инфекция, като например хепатитен вирус тип В (HBV) (Sun et al., 2012). Освен намалена експресия на активиращия рецептор NKG2D, такава се наблюдава и при – NKp44, NKp46, CD226, 2B4 рецепторите. Дисрегулация в експресията на тези рецептори при пациенти може да бъде възстановена при ремисия (Mamessier et al., 2011). Като се има предвид, че активирането на NK клетките е резултат от баланса между активиращите и инхибиращите рецептори (Long et al., 2013), отслабените сигнали, както и експресия на активиращите рецептори логично водят до превъзходство от страна на инхибиращите такива и до „изтощаване“ на NK клетките. Повишава се експресията на инхибиращите рецептори PD-1, CTLA-4 и други. Изброените промени представляват само малка подгрупа от цялостните промени, които се проявяват, когато се развива състоянието на „изтощаване“. (Yi et al., 2010).

До момента експерименталните данни в литературата обобщават състоянието на „изтощени“ NK клетки и T лимфоцити в следните твърдения:

- „изтощените“ имунни клетки се характеризират с хипореактивно състояние в хронична среда, с повишена експресия на инхибиращи рецептори, понижена секреция на ефекторни цитокини и ниска цитотоксичност
- повечето клетки на имунната система в туморната микросреда са „изтощени“, което води до инвазия на раковите клетки
- PD-1 е основният инхибиращ рецептор, който регулира „изтощеното“ състояние на Т лимфоцитите и НК клетките. Клетките с висока експресия на PD-1 губят способността си да елиминират раковите клетки.

Сега е ясно, че НК клетките и Т клетките не са непременно лишени от функционалните си възможности, въпреки постоянното наличие на антигена. Въпреки това е възможно да станат функционално неефективни и неспособни да реализират обичайния набор от ефекторни функции, които са типични за здрави НК клетки, Т хелпери, Т ефекторни, Т паметни клетъчни популации (Yi et al., 2010). Изчерпването на функциите на НК клетките, цитотоксичните Т клетки, Т хелперите се наблюдава и след различни видове инфекции (Boni et al., 2007; Sester et al., 2008).

Въпреки че много имунолози се опитват да дадат дефиниция за „изтощени“ лимфоцити, първоначално за Т лимфоцитите, след това за НК клетки и т.н., точно определение не е формулирано. Продължават да стоят въпросите като – как се изчерпват функциите и пролиферативната активност на имунните клетки, каква е причината, за това, има ли скала за тази „изтощеност“, какво още трябва да се изследва за „изтощените“ лимфоцити, каква е разликата между „изтощени“ клетки при хронични инфекции и такива при рак, могат ли такива клетки да бъдат отново функционални, как инхибиращите рецептори могат да се използват като терапия. Разкриването на важността на инхибиращите рецептори при дисрегулация на клетъчните имунни отговори ще разкрие нови потенциални лекарства за възстановяване физиологичното състояние на имунните клетки. Резултати от предклинични и клинични изследвания доказват възможността за имунотерапия на злокачествени заболявания.

## 5. NK клетки, злокачествени заболявания и тяхната имунотерапия

Туморното имуноредактиране се описва като динамично взаимодействие между карцином и имунната система на гостоприемника, проявяващо се в три фази: елиминиране, баланс и избягване (Schreiber et al., 2011). Във фазата на елиминиране имунната система може да идентифицира и елиминира туморните клетки, които експресират туморасоциирани антигени (ТАА). NK клетките, които са „природно“ снабдени с всички необходими атрибути за разпознаване и отстраняване на туморните клетки, се активират в най-ранните етапи на туморогенезата. Фазата на баланс се характеризира с туморна латентност, т.е. туморните клетки не са унищожени, но растежът им е имунно ограничен. Избягването от надзора на имунната система се постига чрез акумулиране на мутации, експресия на рецептори близки по природа до рецепторите на здравите клетки или липса на рецептори. Туморната клетка използва подобни механизми, за да не бъде разпозната и атакувана от нашата имунна система.

Туморните клетки често носят протеини, които разкриват онкологичната им природа. Понякога обаче те извършват „кражба на самоличност“ от здрава клетка като експресират протеини, характерни за нея. Последните проучвания показват, че раковите клетки използват имунни контролни точки, за да потиснат и избягат от атаката на имунната система. Когато Т лимфоцитите не атакуват туморните клетки, те остават необезпокоявани. Много видове онкологични заболявания „избягват“ от имунната система именно по този начин, чрез инхибиране на Т клетъчния сигнал и NK клетъчния сигнал. CTLA-4 и PD-1 са две молекули върху клетъчната мембрана на Т лимфоцитите, идентифицирани като техни ключови инхибиращи рецептори. Близки до цитотоксичните Т лимфоцити, NK клетките също експресират инхибиращи рецептори, от които туморните клетки се възползват, за да се „скрият“ от атаката им. Като се смята, че откритите досега инхибиращи рецептори, които служат като контролни точки могат да се експресират и върху NK клетките.

Лечението на злокачествени заболявания чрез инжектиране на антитуморни антитела, получени от различни животински видове е била експериментално изпробвана отдавна, но винаги е било последвано от тежки токсични състояния (Кехайов и Кюркчиев, 1999). Едва след въвеждането на хибридомната технология за получаване на моноклонални антитела се осигурява необходимото количество

за целия курс на лечение. Така експерименталната пасивна имунотерапия се въвежда като надежден терапевтичен метод, който може да се прилага в клиниките.

Основен проблем при имунотерапията с моноклонални антитела е била реакцията на имунната система на болния спрямо инжектираните чужди имуноглобулини. Днес това нежелано последствие е преодоляно чрез конструиране на човешки (хуманизирани) антитела. Използват се хуманизирани антитела, които могат да се конструират чрез заместване на постоянен участък от мишето антитяло с постоянен участък от човешки имуноглобулин. Изследванията показват, че хуманизираните антитела намаляват имуногеността си за човешкия организъм.

Лечението на злокачествените тумори с моноклонални антитела се основава на следните механизми: 1 – активиране на ефекторните клетки, които произвеждат антитуморни ефекторни молекули (антитела, цитокини) от имунната система, 2 – след свързване на антитялото с туморната клетка, последва въздействие върху процесите на растеж и диференциране, 3 – индуциране на активна имунизация чрез моноклоналното антитяло по механизма на анти-идиотипната ваксина, 4 – индиректно активиране на други биологично активни агенти като IFN- $\gamma$ , IL-2 и други, 5 – моноклоналното антитяло да блокира важни механизми за клетъчната пролиферация на туморните клетки, като например блокиране на лигандите и/или рецепторите на инхибиращите контролни точки.

Съществуват различни туморни имунотерапии, базирани на антитела. Пример за такава терапия е антитяло, свързано с лекарствено средство или токсин, посредством свързващи молекули (най-често човешки албумин или различни декстриани). Предполага се, че лекарственият препарат ще бъде доведен от антитялото до прицелната клетка. Алтернативен метод за имунотерапия, който намира широко приложение, е лечението с моноклонални антитела, свързани с растителни или бактериални токсини. Голям брой от използваните токсини са в състояние да се свържат с прицелната клетка и да потиснат белтъчния ѝ синтез. Остава сериозният недостатък при използване на токсините и това е тяхната имуногенност. Моноклоналните антитела могат да бъдат свързани с радионуклиди. Така модифицираните моноклонални антитела могат да задействат каскада от реакции, които да доведат до елиминиране на клетки, които се намират на

значително разстояние от таргетната клетка, към която се е свързало белязаното с изотоп антитяло (Кехайов и Кюркчиев, 1999).

Антителата остават едно относително надеждно средство в комплексната терапия срещу злокачествените заболявания. Не трябва да се забравя обстоятелството, че многообразието във формите на злокачествените тумори налага търсенето на специфична терапия за всяка конкретна форма. Всеки тумор и всеки стадий от неговото развитие изисква специфичен терапевтичен агент или комбинация от няколко агента. Пациентите, подлагащи се на дадена имунотерапия също трябва да бъдат добре подбрани, за да има тя ефект.

Използването на моноклонални антитела, за да се блокират имунни контролни точки е най-новата и широко изследвана възможност за имунотерапия.

Инхибиторът на имунната контролна точка е моноклонално антитяло, което в качеството си на лекарство, отключва атака от страна на имунната система спрямо туморните клетки (Pardoll, 2012). Тези лекарства са постигнали впечатляващи успехи през последните години, особено при пациенти с метастазирал меланом или лимфом на Ходжкин (Syn et al., 2017) и изглеждат обещаващи за пациенти с други видове рак.

Инхибиторите на имунни контролни точки блокират нормални протеини върху раковите клетки или върху повърхността на Т клетките, които отговарят на тези точки. Целта е да се елиминират сигналите, които възпрепятстват функциите на цитотоксичните Т клетки и НК клетките, тези клетки да разпознаят раковите и да ги атакуват.

Три инхибитора на имунни контролни точки са получили бързо одобрение от Американската администрация по храните и лекарствата срещу рак, включвайки ипилимумаб (Yervoy®), пембролизумаб (Keytruda®) и ниволумаб (Opdivo®). Използването на вече одобрените и включени в клиничната практика медикаменти (ипилимумаб, пембролизумаб и ниволумаб), са едни от най-обещаващите лечения срещу злокачествените тумори.

Имунотерапии, насочени към CTLA-4 контролната точка, отварят нови възможности в областта на човешката онкология. Две антагонистични моноклонални антитела срещу CTLA-4 – ипилимумаб (IgG1 изотип) и тремелимумаб (IgG2 изотип), блокират взаимодействието между CTLA-4 и

неговите ко-рецептори – CD80 и CD86 (лигандите на активиращата контролна точка CD28). Тези медикаменти във вид на инхибитори са одобрени за лечение на рак в напреднал стадий. Точните механизми, чрез които работи анти-CTLA-4 не са напълно изяснени. Данните до момента предполагат, че анти-CTLA-4 действа главно във вторичните лимфоидни органи чрез освобождаване на вече съществуващи Т клетки от инхибиращото действие, чрез изчерпване/намаляване броя на Treg клетки в туморната микросреда (Kvistborg et al., 2014; Twyman-Saint et al., 2015).

Въпреки обещаващите ранни резултати от терапията с моноклонални антитела срещу CTLA-4, при клинични проучвания с хора, нивата на обективен отговор остават ниски в повечето случаи. Подобрения са наблюдавани, когато анти-CTLA-4 е комбиниран с химиотерапевтичното лекарство дакарбазин (Ribas et al., 2013). Най-добри резултати обаче са наблюдавани, когато е приложена комбинирана терапия от анти-CTLA-4 моноклонално антитяло и блокиращо антитяло срещу протеина на клетъчна смърт 1 (PD-1) (Wolchok et al., 2013; Postow et al., 2015).

Анти-PD-1 е друго моноклонално антитяло, което успешно блокира връзката рецептор – лиганд между ефекторната и туморната клетка. Прилага се самостоятелно за лечение на рак при хора, както и в комбинация с друго антитяло или медикамент. Комбинираните терапии с анти-CTLA-4 и анти-PD-1 са постигнали висока ефективност, при пациенти с меланома в стадий III и IV (Larkin et al., 2015; Postow et al., 2015). Имуноterapia с анти-PD-1 се фокусира до голяма степен върху стимулиране на Т-клетъчните антитуморни отговори чрез блокиране на свързването на PD-1 към неговите лиганди PD-L1 и PD-L2. Блокирането на PD-1 премахва инхибиращите ефекти, които настъпват вследствие на взаимодействието PD-1 – PD-L1 (Chatterjee et al., 2013; Chemnitz et al., 2004; Sheppard et al., 2004). PD-L1 и PD-L2 протеините до голяма степен не се експресират от здравите клетки. Експресията на PD-L1 се повишава при повече от 20 вида човешки тумори (Zou and Chen, 2008). Освен това много видове рак и здрави клетки повишават експресията на PD-L1 в отговор на възпалителни цитокини като IFN- $\gamma$  (Karachaliou et al., 2018).

Ерата на антитуморната „чекпойнт-блокада“ включва синтезирането и клиничното тестване на анти-PD-1 моноклонални антитела: ниволумаб и пембролизумаб. Друг начин за таргетиране на сигналния път PD-1 – PD-L1/PD-L2 е чрез антитела, свързващи лигандите PD-L1 и/или PD-L2. Счита се, че таргетирането на PD-L1 е по-малко токсично, тъй като действа чрез селективно повлияване на имунния отговор в туморната микросреда и не се влияе от степента на PD-L1-експресия (Zou and Chen, 2008).

## **6. Клетъчни и хуморални фактори и тяхната роля в репродуктивната имунология**

Според Световната Здравна Организация безплодието е състояние на репродуктивната система, което се определя от невъзможност за зачеване след 12 месеца неуспешни полови контакти без използване на контрацепция (11 издание на Международна класификация на болестите, СЗО, 2018). Причините за възникване на безплодие при човека могат да се дължат както на проблеми свързани с женския пол, така и с мъжкия. Известните причини за възникване на стерилитет при мъжете са: намалена оплодителна способност, дължаща се на отклонения в сперматогенезата и развитие на имунен отговор в резултат на крипторхизъм, варикоцеле, възпалителни процеси като простатит, орхит и други, социални фактори, стрес, хормонален дисбаланс, производство на автоантитела (спермоантитела, антинуклеарни). Установени причини за възникване на стерилитет при жените са: овулационни нарушения, увреждане или запушване на маточните тръби, ендометриоза, синдром на поликистозните яйчници, инфекции предавани по полов път, социални фактори, стрес, повишаване на процента маточни НК клетки и тяхната активност и други. Случаите, в които не се открива причина за невъзможно зачеване и износване на плода, са значителен брой и безплодието се нарича идиопатично. Откриването на все повече показатели, които могат да бъдат използвани за диагностика на инфертилни двойки и обяснението на идиопатичното безплодие, дават възможност след това да се назначи необходимата терапия. Въпреки възможността за проследяване на здравния статус на безплодните двойки и използването на асистирана репродукция с цел зачеване и раждане, медико-биологичните науки и медицинската практика се нуждаят от

допълнително изясняване на механизмите, чрез които възниква безплодие и връзката между отделните фактори, които водят до него.

В този контекст е важно анализирането на някои клетъчни и хуморални фактори и тяхната роля в репродуктивната имунология.

### **6.1 Роля на НК клетки при бременност**

Бременността от имунологична гледна точка е феномен, при който майката – организъм с напълно развита имунна система – изработва толерантност спрямо плода, който е отделен организъм, експресиращ различни за нея антигени.

Тази толерантност може да се постигне чрез няколко основни механизма: анатомичното разделение на майката и плода чрез плацентата, промяна в експресията на HLA молекули от плацентата и потискане на майчиния клетъчно-медиран имунитет (Tersigni et al., 2020).

Толерантност по отношение на МНС молекулите може да се постигне, когато МНС клас I молекулите не се експресират от женските полови клетки – овогонии, овоцити от I и II ред, а след това и от плода (Roberts et al., 1992). Тогава той ще остане незасегнат от цитотоксичните Т лимфоцити, които са част от придобития имунитет. Когато МНС II молекулите също не се експресират от плода, той ще остане неатакуван от Т хелперните клетки. Интересен е фактът, че децидуални CD8<sup>+</sup>T клетки експресират във висока степен ко-инхибиращите рецептори CTLA-4, PD-1, LAG-3. Микрообкръжението в матката поддържа инхибирани CD8<sup>+</sup>T клетките (Tersigni et al., 2020).

Поддържането на имунна толерантност спрямо плода по отношение на МНС гликопротеините се осъществява и чрез различната им експресия. Екстравилният трофобласт експресира специфични HLA антигени, такива като HLA-G, HLA-F, HLA-E, HLA-C, които са пряко включени в избягването на майчино отхвърляне (Kovats et al, 1990).

НК клетките като част от вродения имунитет логично биха увеличили своя брой и активност при наличие на бременност именно заради липсващата експресия на МНС клас I, както и заради наличието на чужди антигени. Въпреки това майчиният организъм при нормална бременност успява да поддържа концентрацията на децидуалните НК клетките в норма.

В матката NK клетките са 50-70% от всички лимфоцити, като броят им е максимален в лутеалната фаза от менструалния цикъл, при имплантирането на ембриона и в началните месеци на бременността. Предполага се, че маточните NK клетки са клетки, които са мигрирали от кръвообращението в маточната лигавица, където претърпяват специфични промени, включващи промяната в техния фенотип, секреция и цитотоксични свойства, отразяващи специализираната им функция. Смята се, че децидуалните NK клетки имат толерогенен фенотип поради загубата на цитотоксичност, която се обяснява с експресията на KIR рецептори, които разпознават полиморфни HLA-C, NKG2 рецептори, които разпознават HLA-E, рецептор за имуноглобулин-подобен транскрипт 2 (immunoglobulin-like transcript 2 receptor, ILT-2), който разпознава HLA-G (Olmos-Ortiz et al., 2019). Способността на NK клетките да разпознават HLA-C молекули помага за постигане на имунна толерантност срещу плода (Parúchová et al., 2019).

NK клетките в ендометриума имат значение за успешното имплантиране на ембриона, тъй като контактуват директно с клетките на трофобласта и секретират специфичен набор от молекули, регулиращи ангиогенезата и трофобластното разрастване (Moffett-King, 2002). Те и цитотоксичните T клетки са основните популации, източник на имуномодулиращи цитокини и играят важна роля в регулацията на майчиния имунен отговор към феталния алогографт, имплантацията и износването на плода. Имунологичният успех на бременността зависи от установяване на баланс между благоприятни и вредни цитокини (Reina et al., 2004). Установено е, че Th<sub>1</sub> цитокините (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF) оказват вредно въздействие върху бременността, като инхибират растежа и развитието на плода. От друга страна, Th<sub>2</sub> цитокините (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) се свързват с успешна бременност (Daher et al., 2004; Makhseed et al., 2001). Разбира се концентрацията на тези имунорегулатори, както и моментът, в който се отделят определят техния позитивен или негативен ефект върху бременността.

## **6.2. Субпопулации на NK клетки при бременност**

Въз основа на богатия рецепторен репертоар и нивата на експресия, NK клетките се считат за по-хетерогенна популация, която формира различни подгрупи, различаващи се по функция, фенотип и анатомична локализация

(Cristiani et al., 2016). Така клетките естествени убийци, които се намират в матката са фенотипно и функционално различни от тези, които са в периферната кръв. Затова НК клетките в матката трябва да се разглеждат като отделна лимфоцитна подгрупа (Moffett et al., 2004).

При хората клетките естествени убийци се идентифицират главно по степента на експресия на повърхностните маркери CD56 (изоформа на NCAM, която се експресира от всички клетки естествени убийци) и CD16 (ниско-афинитетен рецептор за IgG, отговорен за антитяло-зависима клетъчно-медирана цитотоксичност от страна на НК клетките). На тази основа НК клетките се разделят на две функционално различни субпопулации (Cristiani et al., 2016). Около 90% от периферните НК клетки са CD56<sup>dim</sup> (слаба експресия на CD56) и експресират високи нива на CD16. Останалите 10% са CD56<sup>bright</sup> (силна експресия на CD56) и експресират ниски нива на CD16. CD56<sup>dim</sup> лимфоцитите са в по-голяма степен цитотоксични, докато CD56<sup>bright</sup> са основен източник на НК клетъчни имунорегулаторни цитокини (Конова и сътр., 2009).

При наличие на бременност, специална популация на НК клетките (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) в плацентата допринася за растежа на нейните клетки, като секретира растежни молекули и отслабва локалния имунен отговор на границата майчин организъм/плацента. Обратно, друга популация от НК клетки (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), която се активира от IL-2 е цитотоксична за плацентния трофобласт, тъй като секретира TNF, който може да разруши плацентата. Жени с над 11% CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> НК клетки са с висок риск от спонтанен аборт и невъзможност за имплантация на зародиша.

Процентът НК клетки се определя чрез флоуцитометрично имунофенотипизиране. Жените с висока активност на НК (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) клетките отговарят добре на терапия с интравенозен имуноглобулин (IVIg) – над 90% ефективност (Конова и сътр., 2009).

Определянето на различни субпопулации лимфоцити в периферна кръв има важно диагностично значение за установяване на рискови фактори за прекъсване на бременността. Репродуктивният имунофенотип дава възможност за откриване на пациенти, при които съществува риск от неуспешна имплантация или загуба на нормален плод, с нормален кариотип, вследствие на повишен брой циркулиращи

NK клетки, NKT и/или неравномерно разпределение на Т клетките (Т хелпери и цитотоксични Т клетки).

### **6.3. NK клетки и спермоантитела при жени със стерилитет**

Нарушената регулация на клетките естествени убийци в периферната кръв и ендометриума се свързва с репродуктивна имунопатология, като повтарящи се спонтанни аборти, стерилитет и неуспешни *in vitro* процедури.

Един от възможните механизми за увреждане на фетуса, в отговор на произвеждането на цитокини, вероятно е стимулиране на NK активността под влияние на IL-2 и IFN- $\gamma$ . Доказателства за това твърдение са следните факти: при фетална резорбция, броят на NK клетките се увеличава, а инжектирането на опитни животни с анти-NK антитела предотвратява резорбцията на фетуса; неспецифичното активиране на NK клетки в бременни мишки причинява резорбция на фетуса (Кехайов и Кюркчиев, 1999).

След много научни разработки и клинични тестове е установено, че изследването на степента на цитотоксичната активност на NK клетките в периферното кръвообращение, дава информация за състоянието на тези в маточната лигавица.

При жените с безплодие или неуспешна бременност е регистрирано повишаване на процента на NK клетките спрямо общата концентрация на лимфоцитите (над 11%), а цитотоксичните им свойства също са завишени.

Съществуват данни, показващи пряка връзка между повишената концентрация и цитотоксична активност на NK клетки в кръвната циркулация при жени с неуспешна ембрионална имплантация и спонтанни аборти. Установено е също, че голям брой от пациентите, при които се наблюдава съпътстващо заболяване или отклонение от нормата по някои важни показатели, свързани с успешна бременност, като например жени с диагноза ендометриоза, подлагащи се на *in vitro* процедура, имат повишена NK клетъчна активност. Разликата в количеството и активността на NK клетките при жени с хабитуални аборти (три и повече от три последователни спонтанни аборта) в сравнение със здрави фертилни жени вече се използва успешно с диагностична цел при прогноза за застрашена бременност от много клинични лаборатории в България. Изследването би

допринесло за избор на адекватна терапия на пациентите, която да доведе до успешна бременност.

Както клетъчните, така и хуморалните фактори имат значение за оплождането, бременността и изхода от нея. NK клетките и производството на спермоантитела имат отношение към фертилизацията и запазването на плода. Произведените спермоантитела са причина за възникване на инфертилитет и при двата пола, а също така имат значение и по време на бременност, ако все пак такава се реализира (Vicram et al., 2019). Произведените спермоантитела възпрепятстват оплождането като не позволяват на сперматозоида да достигне и да оплоди яйцеклетката. Възможни причини за активиране на маточните NK клетки по време на първия триместър от бременността и отхвърляне на плода са: произведени спермоантитела или нарушаване между баланса в секрецията на Th<sub>1</sub> и Th<sub>2</sub> цитокини (Giannubilo et al., 2012; Adib Rad et al., 2018).

#### **6.4. NK клетки и спермоантитела при мъже със стерилитет**

Тестисите са част от органите, които се намират в имунна изолация. Като такива те биват защитени от възникване на имунен отговор (Zhao et al., 2014; Bolourian and Mojtahedi, 2017). От части тази имунна привилегираност се дължи на кръвно-тестикуларната бариера (КТБ) (Kaur et al., 2014). Тази механична бариера може да бъде нарушена в следните случаи: при инфекция (орхит, простатит), възпаление или травма (Kalaydjiev et al., 2002). Това би довело до имунен отговор срещу герминативни клетки в тестисите, производство на спермоантитела и безплодие (Fijak and Meinhardt, 2006). Запазването на имунна толерантност в тестисите се дължи също така и на други фактори: молекули секретирани от неимунни клетки, особено от Сертолиевите клетки, на уникалния „образ“ на имунните клетки в тестикуларния интерстициум и намалена до липсваща експресия на МНС клас I от мъжките герминативни клетки (Zhao et al., 2014; Fijak and Meinhardt, 2006; Kaur et al., 2014). Тъй като мъжките герминативни клетки не експресират МНС клас I, главният рецептор за свързване с ко-рецептора CD8, те не се атакуват от цитотоксичните Т лимфоцити (Fijak and Meinhardt, 2006). От друга страна герминативните клетки стават уязвими за NK клетките, които атакуват именно клетки с намалена или липсваща експресия на МНС клас I (Del

Zotto et al., 2017). При увеличена съдова пропускливост, например при усукване на тестиса/ите (тестикуларно торзио) (Feher and Vajogy, 2016) е възможно „изтичане“ на НК клетки от периферната кръв към тестисите. Това води до незабавна атака и унищожаване на сперматогонии, сперматоцити I, II ред от НК клетките. Освободените антигени, могат да бъдат представени на CD4<sup>+</sup> лимфоцитите и да доведат до производство на спермоантитела от страна на В лимфоцитите (Bolougian and Mojtabehi Z, 2018). Мъже при които има „изтичане“ на НК клетки към тестисите и последваща атака от тяхна страна са с отклонения в спермограмата, намалено до липсващо количество сперматозоиди в еякулата и със стерилитет. При мъже с олигозооспермия, тератозооспермия, астенотератозооспермия и други отклонения в спермограмата показват производство на спермоантитела, което е извън норма (Dimitrova et al., 2004; Dimitrova et al., 2005). Високият титър на спермоантитела е една от причините за възникване на безплодие при мъжете и жените. Блокирането на НК клетките в тестисите може да предпази или намали появата на имунен отговор срещу герминативните клетки и следователно от риска за произвеждане на спермоантитела.

Целта на учените от гледна точка на лечението на злокачествени заболявания е възвръщане на функциите на „изтощените“ клетки естествени убийци, т. е. повишаване на цитотоксичната и пролиферативната им активност, докато при жени с неуспешна бременност и последователни загуби на плода, се търси начин да се потисне цитотоксичността на НК клетките. Установяването на механизмите, регулиращи активността на НК клетките, би позволило да се постигне напредък и в двете области.

Анализът на литературния обзор показва, че е необходимо да се задълбочат изследванията за механизма на възстановяване на функциите на „изтощените“ НК клетки и промяната на техния брой. За създаването на „изтощени“ НК клетки следва да се проучи ролята на различни цитокини и да се опише фенотипа на клетките. Предполага се, че „изтощените“ НК клетки експресират високи нива на инхибиращи рецептори (имунни контролни точки) като PD-1, TIM-3, и LAG-3, показват слаба пролиферация и слаба секреция на ефекторни молекули. Изследванията на ролята на различни цитокини за получаване на „изтощени“ НК

клетки биха били изключително полезни при търсенето на нови подходи в имунотерапията на онкологичните заболявания, особено при неоплазми, в чието микрообкръжение се откриват „изтощени” НК клетки. Изследването на броя и активността на НК клетките при мъже и жени на различна възраст с повишена концентрация на антитела срещу сперматозоидни антигени е важно с цел изясняване ролята на НК клетките при възникване на безплодие при мъже и жени в репродуктивна възраст, а също така и връзката между клетъчните и хуморалните фактори в репродуктивната имунология.

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Целта на настоящия научен труд е: да се изясни механизма, чрез който се създават „изтощени“ NK клетки и да се установи молекулно-имунологичния път за тяхното реактивиране; да се изследват клетъчни и хуморални имунологични фактори, свързани с безплодието като: NK 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 NK 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 NK клетки от слезката на IL-18KO мишки. Чрез стимулиране на тези клетки с комбинации от цитокини да се постигне създаване на „изтощени“ NK клетки.
2. Да се проследи пролиферацията на изолираните от слезка на IL-18KO мишки NK клетки след стимулирането им чрез цитокини.
3. Да се проучи ролята на IL-12, IL-15 и IL-18 за фенотипното определяне на NK клетките.
4. Да се изследва секреторната активност на NK клетките.
5. Да се изследва експресията на имунни контролни точки (инхибиращи рецептори) на NK клетките.
6. Да се проследи ефекта на IL-21 върху „изтощени“ NK 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**

Повечето консумативи и материали, необходими за изработването на настоящия дисертационен труд са закупени от Nacalai Tesque, eBioscience™, BD Pharmingen™, BioLegend и Thermo Fisher Scientific.

#### **1. Опитни животни**

За получаването на лимфоцитна популация от НК клетки бяха използвани 40 IL-18КО мишки (Japan SLC (Hamamatsu)), на около 10 седмици.

Преди работа с опитни животни, докторантът е преминал курс на обучение свързан с използването на моделни животни (нокаут мишки) в експерименталната работа и за който е получил сертификат на 25.04.2017 г., № 17-041 (Certificate of education and training related to animal experiments). Докторантът също е преминал обучение и положил изпит за работа с рекомбинантни материали на 17.04.2017 г., №17007.

#### **2. Материали, необходими за изолиране на миши лимфоцити (НК клетки)**

##### **2.1 Буфери**

- D-PBS свободен от  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.4 (Nacalai Tesque, Inc.)
- АСК лизисен буфер - (500 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mmol/L  $\text{KHCO}_3$  и 0.1 nmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7.2 - 7.4) (Dojindo 345-01865)
- MACS буфер – D-PBS (Nacalai tesque, Inc.) с 2% FCS (BioWest), 2mM  $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$  pH 7.2 - 7.4 (Dojindo 345-01865)

##### **2.2 MACS система**

MACS Microbeads (Нетоксични биоразградими наночастици за белязане и разделяне на клетъчни популации)

- CD4, Miltenyi Biotec Inc., САЩ
- CD8, Miltenyi Biotec Inc., САЩ
- CD19, Miltenyi Biotec Inc., САЩ
- MACS Колони LD 25, Miltenyi Biotec Inc., САЩ
- MACS Разделител, MidiMACS™, Miltenyi Biotec Inc., САЩ

### **2.3 Бои за оцветяване на НК клетките (трипаново синьо)**

- Трипаново синьо 0.4%, Life technologies™ (Thermo Fisher Scientific), САЩ

### **2.4 Други материали**

- Мини шпатули за клетки (Mini cell scrapers), Qty:200 (Sterile), каталожен номер № MCS-200
- Клетъчен филтър, 70 µm найлонов, BD Falcon™
- Специални предметни стъкла с камери за броене на клетки, за еднократна употреба (Countess™ cell counting chamber slides), Invitrogen

## **3. Материали за клетъчно култивиране**

### **3.1 Хранителни среди**

- RPMI 1640 (Nacalai tesque, Inc.) с 10% FCS (BioWest), 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин (Gibco BRL).
- DMEM (High Glucose) (Nacalai tesque, Inc.) с 4.5g/L D (+) Glucose, L-glutamine, Phenol Red, Sodium Pyruvate, с 10% FBS (BioWest), 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин (Gibco BRL).

### **3.2 Използвани интерлевкини**

- Рекомбинантен миши IL-12, R&D Systems, Inc., Миннеаполис, MN 55413 САЩ
- Рекомбинантен миши IL-15, PEPROTECH, Каталожен номер № 2010-15-10UG
- Рекомбинантен миши IL-18, GlaxoSmithKline PLC (Research Triangle Park)
- Рекомбинантен миши IL-21, PEPROTECH

### **3.3 Използвани плаки**

Плаки с плоско дъно:

- 6-ямкови плаки, IWAKI, каталожен номер № 3810-006
- 12-ямкови плаки, IWAKI, каталожен номер № 3815-012
- 24-ямкови плаки, IWAKI, каталожен номер № 3820-024
- 48-ямкови плаки, IWAKI, каталожен номер № 3830-048
- 96-ямкови плаки, IWAKI, каталожен номер № 3860-096

Плаки с U-образно дъно:

- 96-ямкови плаки, IWAKI, каталожен номер № 3870- 096

### 3.4 Други материали

- Филтър с полиетерсулфон (PES) мембрана (150 ml, Thermo Scientific™ Nalgene™)
- Флакони/колби (15, 50, 250, 500 ml) (IWAKI) (Thermo Scientific™ Nunc™ 15 ml & 50 ml Conical Sterile Polypropylene Centrifuge Tubes)

## 4. Материали за поточна цитометрия (за проверка чистотата на изолираните клетки, за детекция на повърхностни и вътреклетъчни антигени, антитела)

### 4.1 Буфери

- D-PBS свободен от  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.4 (Nacalai Tesque, Inc.)
- АСК лизиращ буфер - (500 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mmol/L  $\text{KHCO}_3$  и 0.1 nmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7.2 - 7.4) (Dojindo 345-01865)
- FACS буфер – D-PBS (Nacalai tesque, Inc.) с 2% FCS (BioWest)

### 4.2 Антитела

- Плъше/IgG2a, lambda, CD16/CD32 моноклонално антитяло (93), eBioscience™
- Плъше/IgM, kappa, CD49b (Integrin alpha 2) моноклонално антитяло (DX5), FITC, eBioscience™
- Мише анти-мише NK-1.1 (NKR-P1B and NKR-P1C), PE, BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише T- and B-Cell Activation Antigen, PE, BD Pharmingen™
- Американски хамстер/IgG, CD3e моноклонално антитяло (145-2C11), FITC, eBioscience™
- Хамстер анти-мише CD3e моноклонално антитяло (145-2C11), PE, BD Pharmingen™
- Streptavidin, PE (каталожен номер 12-4317), eBioscience™
- Streptavidin, APC (каталожен номер 17-4317), eBioscience™
- Плъше анти-мише NKG2A/C/E, Biotin, BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише CD4 (L3T4), PE, BD Pharmingen™
- Хамстер анти-мише TCR  $\beta$  Chain, APC, BD Pharmingen™

- Хамстер анти-мише CD69 (VEA; Very Early Activation Antigen; AIM; Activation Induced Molecule), PE, BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише CD11b (Itgam; Integrin alpha-M; Ly-40; Mac-1a; Mac-1 alpha; CR3A; CR-3 alpha), PE, BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише CD14, PE, BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише CD19, Biotin, BD Pharmingen™
- Пропидиев йодид (PI), BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише CD25 (Interleukin-2 receptor alpha chain; IL-2RA; IL-2R $\alpha$ ; IL2ra; IL-2R p55), APC, BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише CD107a (LAMP-1), PE, BD Pharmingen™
- Плъше анти-мише CD107a (LAMP-1), APC, BD Pharmingen™
- Хамстер анти-мише CD183 (CXCR3) моноклонално антитяло (CXCR3-173), APC, eBioscience™
- Анти-мише CD8a антитяло (T8, Lyt2, Ly-2), APC, BioLegend
- Анти-мише CD366 (Tim-3) Antibody (T-cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3, hepatitis virus cellular receptor 2, CD366), APC, BioLegend
- Анти-мише CD366 (Tim-3) антитяло, PE, BioLegend
- Анти-мише CD223 (LAG-3) антитяло, PE, BioLegend
- Анти-мише CD274 (B7-H1, PD-L1) антитяло, PE, BioLegend
- Анти-мише CD279 (PD-1) антитяло, PE, BioLegend
- Анти-мише IL-21R антитяло, PE, BioLegend
- Анти-мише CD314 (NKG2D) антитяло (клон CX5), APC, eBioscience™
- Анти-мише CD314 (NKG2D) биотин антитяло (клон A10), eBioscience™

## 5. Материали за Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA)

Таблица 2. Списък на материалите, които са използвани за ELISA метода.

	ELISA кит (ELISA MAX™ Standard Sets)			
	IFN- $\gamma$ (Каталожен номер, № 430801)	TNF- $\alpha$ (Каталожен номер № 555268)	IL-10 (Каталожен номер № 555252)	TGF- $\beta$ (Каталожен номер № 88-8350)
	BioLegend	BD Pharmingen™	BD Pharmingen™	eBioscience™
Покриващ буфер	NaHCO <sub>3</sub> , pH 9.5 (№421701)	0.2M Натриев фосфат, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6.5	0.2M Натриев фосфат, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6.5	1x покриващ буфер
Измиващ буфер	0,05% Tween/PBS (Каталожен номер № 421601)	0,05% Tween/PBS (Каталожен номер № 421601)	0,05% Tween/PBS (Каталожен номер № 421601)	0,05% Tween/PBS (Каталожен номер № 421601)
Блокиращ буфер	10% FCS/PBS	10% FCS/PBS	10% FCS/PBS	10% FCS/PBS
Активиране на пробите	--	--	--	1N HCL 1N NaOH
Стандарт, изследвани проби	Миши IFN- $\gamma$ стандарт	Рекомбинантен миши TNF- $\alpha$ , лиофилизиран	Рекомбинантен миши IL-10, лиофилизиран	рекомбинантен TGF- $\beta$
Детектиращо анти тяло	Мише IFN- $\gamma$ и GM-CSF моноклонално анти тяло (200x)	Биотинилирано анти-мише TNF моноклонално анти тяло	Биотинилирано анти-мише IL-10 моноклонално анти тяло	Биотинилирано анти-мише TGF- $\beta$ моноклонално анти тяло
Стрептавидин, конюгиран с пероксидаза от хрян St Av-Hrp	St Av-Hrp	--	--	St Av-Hrp
Субстрат	тетраметилбензидин (ТМВ) и водороден пероксид Каталожен номер № 421101	тетраметилбензидин (ТМВ) и водороден пероксид Каталожен номер № 555214	тетраметилбензидин (ТМВ) и водороден пероксид Каталожен номер № 555214	тетраметилбензидин (ТМВ) и водороден пероксид Каталожен номер № 555214
Стопиращ разтвор	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Каталожен номер № 423001)	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Каталожен номер № 423001)	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Каталожен номер № 423001)	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Каталожен номер № 423001)

## **6. Материали за вътреклетъчно оцветяване**

### **6.1 Китове**

BD Cytofix/Cytoperm™ plus фиксиращ/пермеабелизиращ кит (с BD GolgiStop™, инхибитор на транспорта на протеини, който съдържа моненсин), каталожен номер №554715.

Компоненти на кита:

- Фиксиращ/Пермеабелизиращ разтвор (125 ml);
- BD Perm/Wash™ Buffer, 10x концентрат, съдържащ фетален говежди серум (FBS) и сапонин;
- BD GolgiStop, инхибитор на транспорта на протеини, който съдържа моненсин (Каталожен номер № 554724) (0.7 ml);
- Разтвор за инхибиране на протеиновия транспорт (500x), eBioscience™, Каталожен номер № 00-4980.

### **6.2 Антитела**

- Плъше/IgG2a, lambda, CD16/CD32 моноклонално антитяло (93), eBioscience™;
- Плъше анти-мише CD49b моноклонално антитяло (DX5), APC, (каталожен номер № 560628), eBioscience™;
- Стрептавидин, FITC, (каталожен номер № 554060), BD Pharmingen™;
- Анти-мише IFN-γ моноклонално антитяло (XMG1.2), FITC (каталожен номер № 11-7311-41), eBioscience™;
- Плъше-IgG моноклонално антитяло(IgG2bk), PE, (каталожен номер № 554685), eBioscience™;
- Анти-мише IL-10 моноклонално антитяло (JES5-16E3), PE, (каталожен номер № 12-7101-82), eBioscience™.

## **7. Апаратура и софтуер**

### **7.1 Апаратура**

- Ламинарен бокс, Sanyo MHE 130A №60072;
- Инкубатор, Sanyo (024056);
- Светлинен микроскоп – Olympus модел CK2 (ULWCD 0.30), Токио, Япония;

- Огледално-рефлексен фотоапарат Canon (EOS Rebel T5i DSLR Camera with 18-55 mm IS STM Lens Kit), Япония;
- Камера на Neubauer deep (1/10 mm), Ерма Токио 2815, Япония;
- Автоматичен клетъчен брояч, Invitrogen™, каталожен номер C10227, сериен номер 09023-145;
- Уред за дегазиране и пречистване на разтвори, Ultrasonic cleaner AU-12C 0586438 11BX00003;
- Центрофуги:
  - TOMY MX-307
  - TOMY RLX 135
- Флоуцитометър, FACSCalibur, Becton Dickinson;
- Microplate – четец, модел 680XR, BIO-RAD;
- Вортекс, Ecan Tube Mixer TM-2000, Iwaki.

## **7.2 Софтуер**

- Cell Quest™ Pro, Version 6.0, BD Biosciences;
- Microplate Manager.

## **8. Серуми от безплодни пациенти**

За експериментите бяха използвани 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.

Двойките с репродуктивни проблеми са преминали консултации при специалисти по стерилитет и асистирана репродукция, след което са изпратени в Лаборатория по имунология на размножаването към Катедрата по биология.

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

### **Жени**

- 22 инфертилни жени с първичен стерилитет
- 18 инфертилни жени с вторичен стерилитет, както и с хабитуални аборти
- 13 фертилни жени

### **Мъже**

- 9 инфертилни мъже с първичен стерилитет
- 9 инфертилни мъже с вторичен стерилитет
- 17 инфертилни мъже с възпалителни заболявания и отклонения в спермограмата
- 13 фертилни мъже

Общ брой изследвани пациенти:  $n=75$ , от които жени: 40, мъже: 35.  
Контроли – 26 фертилни души, от които 13 жени и 13 мъже.

### **9. Спермални проби**

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.

### **10. Реактиви за обработка на пациентските серуми**

#### **➤ Буфери**

- Цитратен буфер, рН 5.1 със съдържание: 1.03 g лимонена киселина, 3.67 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ;
- 1x PBS рН 7.2 със съдържание 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8.0 g NaCl, 1L dH<sub>2</sub>O;
- Блокиращ буфер, рН 5.8-8.2 със съдържание 0,1 Tris HCl, 0,5 mol NaCl, 10% инактивиран телешки серум;
- Промиващ буфер 0,05% Tween / PBS.

#### **➤ Антитела**

- Анти-човешки IgG пероксидазен конюгат, партиден номер №441015, “Бул био-ИЦЗПБ“ ЕООД, България;

- Анти-човешки поливалентен IgG конюгиран с пероксидаза, № 116K4788, Sigma-Aldrich, Israel.

➤ **Хранителни среди**

- TC Medium 199 10x (работно разреждане 1x), обогатена с 0,3% BSA (говежди серумен албумин, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

➤ **Плаки**

- ELISA – 96-ямкова PVC плака (U-bottom, Costar, Cambridge, USA)
- Микротитърни плаки на Terassaki.

➤ **Спринцовки/пипети**

- Хамилтонова спринцовка

➤ **Адхезивни стъкла**

➤ **Китове за изследване на секрецията на IL-10 и IL-12 чрез ELISA**

Използваните от нас китове са с каталожен номер D1000B (Human IL-10 Immunoassay, Quantikine ELISA) и D1200 (Human IL-12p70 Immunoassay, Quantikine ELISA) и са ни любезно предоставени от доц. Р. Хаджиолова.

Компоненти на кита:

- Измиващ разтвор
- Калибриращи буфери (RD6P за IL-10, RD5C за IL-12)
- Разтворител за IL-10 – RD1W, за IL-12 – RD1F
- Стандарт за IL-10 (кат.номер № 892646) и за IL-12 (кат.номер № 890214)
- Конюгат за IL-10/IL-12 с пероксидаза
- Субстрати А и Б: водороден пероксидаза и ТМВ-тетраметилбензидин
- Стопиращ разтвор – сярна киселина

**11. Апаратура за обработка на серумите**

- ELISA четец Labsystems Multiscan;
- ELISA четец, DW-SM600, ДАНС ФАРМА, България;

- Термостат/инкубатор модел TB3-25, 37° C;
- Нагревателна плоча;
- Стерилен ламинарен бокс Aquaria Mini Flow FLV-H;
- Центрофуга Hettich Rotofix 32;
- Vortex-Genie 2;
- Аналитична везна – Sartorius basic, BA110S, Germany
- Инвертен микроскоп – Carl Zeiss Jena

## МЕТОДИ

### **1. Изолиране на НК клетки от IL-18KO мишки чрез магнитно активирано клетъчно разделяне (Magnetic Activated Cell Sorting - MACS)**

НК клетките бяха изолирани от далак на IL-18KO мишки на възраст ~ 10 дни. Лабораторните животни бяха приспани в камера KN-1071 Narcobit-E (II) с изофлуран, и след цервикална дислокация, далаците бяха изолирани и преместени в петри (d=15 mm) с 5 ml PBS (Nacalai Tesque, Inc.) върху лед. Изолирането на далак от мишка се извърши в специално помещение, а изолирането на мишите лимфоцити в стерилно помещение (ламинарен бокс), като се работеше винаги върху лед. В ламинарен бокс бяха изолирани миши лимфоцити с помощта на грапавата част на две предметни стъкла, като лимфоцитите се събраха в петри (d=15 mm) с 3 ml PBS. Изолираните клетки бяха филтрирани, промити няколко пъти с PBS и центрофугирани 3 пъти на програма 1200 RPM за 8 минути на 4° C (центрофуга TOMY RLX-135). С оглед премахване на еритроцитите от изолираните клетки беше добавен АСК буфер (Ammonium-Chloride-Potassium; Dojindo 345-01865) (1,5 ml – за 1 далак) за една минута и тридесет секунди и клетките бяха промити и центрофугирани трикратно на програма 1200 RPM за 8 минути на 4° C. Успоредно с центрофугирането, беше определен и броят на клетките с помощта на 0.4% трипаново синьо, Life technologies™ (Thermo Fisher Scientific), камера на Neubauer (Erma Tokyo 2815, Japan) и светлинен микроскоп Olympus CK2.

За да получим чиста клетъчна култура от НК клетки използвахме магнитно активирано клетъчно разделяне (Magnetic Activated Cell Sorting - MACS). Това е метод за разделяне на различни клетъчни популации в зависимост от техните

повърхностни антигени (CD молекули). Разработен е от компанията Miltenyi Biotec през 1989 г., чиито основател е Stefan Miltenyi. Името MACS е регистрирана търговска марка на компанията. За експеримента бяха използвани магнитни наночастици натоварени с антитела, които специфично се свързват с повърхностните рецептори CD19, CD4, CD8. По този начин от културата се отстраняват – В клетките, Т хелперите и цитотоксичните Т лимфоцити. Всички клетки, експресиращи горепосочените рецептори се свързват с антителата по магнитните наночастици. Клетките преминават през колона с магнити и за тях се захващат всички наночастици „уловили“ клетки с някой от рецепторите – CD19, CD4 или CD8. Останалите, NK клетки преминават през магнитната колона и се събират в епруветка.

Спрямо броя на изолираните лимфоцити се изчислява по формула необходимото количество дегазиран MACS буфер (D-PBS (Nacalai tesque, Inc.) с 2% FCS (BioWest), 2mM EDTA.2Na pH 7.2-7.4 (Dojindo 345-01865)) и количество микро магнити – CD19, CD4, CD8 (Miltenyi Biotec Inc., САЩ). Пресметнатото количество от съответните реактиви се добавяше към клетките, като те престояваха за 20 минути на тъмно върху лед. След изтичане на времето, клетките се промиваха еднократно с MACS буфер на програма 1200 RPM за 8 минути на 4° C. Успоредно с това подготвихме и промивахме 25LD колоните (Miltenyi Biotec Inc., САЩ) за изолиране на NK клетки (съгласно инструкциите на Miltenyi Biotec Inc., САЩ). След центрофугиране на клетките беше добавен MACS буфер (съгласно инструкциите на Miltenyi Biotec Inc., САЩ) и на порции от по 500 µl изолираните лимфоцити се добавяха към колоните. Изолираните NK клетки бяха центрофугирани 2 пъти с PBS на програма 1200 RPM за 8 минути на 4° C и преброени, за да се установи крайният брой NK клетки. Беше добавена хранителна среда RPMI 1640 (Nacalai tesque, Inc.) с 10% FCS (BioWest), 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин (Gibco BRL) към клетъчната култура и  $2 \times 10^6$  клетки/ml бяха отделени, за да се провери чистотата на културата. За целта бяха използвани антитела и флоуцитометър. Останалите клетки бяха посяти в плаки с концентрация  $2 \times 10^6$  клетки на ямка (с обем от 1 ml).

## 2. Проверка на чистотата на клетъчната култура чрез поточна цитометрия

Изолираните НК клетки с концентрация  $2 \times 10^6$  клетки/ml бяха центрофугирани на 2000 RPM за 10 минути на  $4^\circ \text{C}$  (ТОМУ MX-307) и прехвърлени в 96-ямкова плака по 100  $\mu\text{l}$  клетки на ямка ( $2 \times 10^5$ ) и беше добавен по 100  $\mu\text{l}$  FACS буфер (D-PBS (Nacalai tesque, Inc.) с 2% FCS (BioWest) на ямка. След центрофугиране на 1200 RPM за 5 минути на  $4^\circ \text{C}$  и внимателно изхвърляне на супернатантата се добавяше по 1  $\mu\text{l}$  на ямка блокиращо антитяло CD16/32Ab и 49  $\mu\text{l}$  на ямка FACS буфер (разреждане 1:50). Клетките се инкубираха на тъмно и на лед за 30 минути. След добавяне на 150  $\mu\text{l}$  на ямка FACS буфер клетъчната суспензия отново се центрофугираше на 1200 RPM за 5 минути на  $4^\circ \text{C}$ . Съответните антитела (посочени в **Таблица 3**) бяха добавени по 1  $\mu\text{l}$  на ямка и 49  $\mu\text{l}$  на ямка FACS буфер (разреждане 1:50), като първата ямка служеше за негативна контрола и в нея се добавяше само 50  $\mu\text{l}$  FACS буфер. След 30-минутна инкубация с антителата на тъмно и върху лед, беше добавен по 1  $\mu\text{l}$  на ямка стрептавидин (само в ямките, където е използвано антитяло с биотин (посочени в **Таблица 3**) и 49  $\mu\text{l}$  FACS буфер. Във всички останали ямки се добавяше по 50  $\mu\text{l}$  FACS буфер.

Клетките се инкубираха на тъмно и върху лед за 30 минути и след двукратно промиване с FACS буфер и центрофугиране на 1200 RPM за 5 минути на  $4^\circ \text{C}$  беше добавен по 200  $\mu\text{l}$  на ямка FACS буфер и клетките се прехвърляха в епруветки за флоуцитометрия, в които предварително е добавен по 300  $\mu\text{l}$  на епруетка FACS буфер.

Следваше отчитане на чистотата на свежо изолираните миши лимфоцити с флоуцитометър, като преди всяко измерване се добавяха по 5  $\mu\text{l}$  пропидиев йодид на епруетка, като клетките през цялото време бяха на лед и покрити с фолио, така че да не бъдат осветени, с оглед запазване на флуоресценцията. Беше използвана следната флуоресценция на филтрите – FITC (fluorescein isothiocyanate) при 488 nm дължина на вълната отговаря на флуоресценция на лазер 1 (FL = fluorescence, FL-1), PE (phycoerythrin) при 561 nm дължина на вълната отговаря на лазер 2 (FL-2), APC (allophycocyanin) при 635 nm дължина на вълната отговаря на лазер 4 (FL-4), като при нужда зададените параметри можеха да бъдат променяни в зависимост от производителя на използваните антитела.

**Таблица 3.** Използвани моноклонални антители при поточна цитометрия. Легенда: FL (FL1,2,4) – флуоресценция; (-) – не е използвано антияло; маркери за НК клетки – DX5, NK1.1, B220; маркери за Т клетки ( $CD8^+T$  и  $CD4^+T$ ) – CD3, CD4, CD8, T/B; маркери за В клетки – CD19, T/B; CD14 – маркер за моноцити; MAC-1 ( $CD11b$ ), CD11c – маркери за макрофаги.

FL1	FL2	FL4	НК клетки
FITC	PE	APC	
(-)	(-)	(-)	1
DX5	(-)	(-)	2
DX5	CD3	CD19 (биотин)	3
DX5	IL-21R	B220	4
DX5	T/B	CD11c	5
DX5	NK1.1	CD11c	6
MAC-1	CD14	DX5	7
DX5	CD4	CD8	8

Подбрани бяха маркери срещу различни лимфоцитни и нелимфоцитни типове клетки. Направени бяха „врати“, които да разделят клетките на – мъртви (позитивни за пропидиев йодид) и живи (негативни за пропидиев йодид) спленоцити,  $CD8^+T$  позитивни (позитивни за CD3, CDТ/B, CD8) и негативни,  $CD4^+T$  позитивни (позитивни за CD3, CDТ/B, CD4) и негативни, В клетки позитивни (позитивни за CD19, T/B) и негативни, НК позитивни (позитивни за DX5, NK1.1, B220) и негативни, макрофаги – позитивни (позитивни за MAC-1 ( $CD11b$ ), CD11c) и негативни, моноцити – позитивни (позитивни за CD14) и негативни. За определяне на позитивните клетки по дадените маркери се построиха отделения за канали FL1-H, FL2-H, FL4-H на флоуцитометъра, като за негативна контрола бе използвана пробата с НК клетки, които не са конюгирани с антигеновото антияло. Процентът НК клетки се определяше спрямо броя живи (чрез „врата“) и позитивни за маркери DX5, NK1.1, B220 спленоцити. Най-често използваното антияло за определяне на клетки естествени убийци е DX5. Процентът живи НК клетки предимно бе 35%. Антигеновото NK1.1 и B220 се използваха за допълнителна достоверност на положителния резултат от DX5 антигеновото. Резултатите с тези две антигенова бяха положителни и с потвърдителен характер. Допуска се в културата да има малък брой други спленоцити като В и Т клетки, макрофаги, които се

премахват от нея до 24 часа от култивирането. Софтуерът беше нагласен да отчита до 50 000 живи клетки.

**Таблица 4.** Използвани моноклонални антитела при поточна цитометрия. Легенда към Таблицата. (-) – негативна контрола (клетки, които не са конюгирани с антитела), DX5 – маркер за НК клетки.

FITC (FL1-H)	PE (FL2-H)	APC (FL4-H)	НК клетки (проба)
(-)	(-)	(-)	1
DX5	(-)	(-)	2

### 3. Стимулиране на миши НК клетки с IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и IFN- $\gamma$

Свежо изолираните НК клетки бяха посяти в плаки (IWAKI, 24-, 48-и 96-ямкови) с хранителна среда RPMI 1640, съдържаща 10% FCS, 100 единици/ml пеницилин и 100  $\mu\text{g/ml}$  стрептомицин. Използваната концентрация клетки за всички експерименти беше  $2 \times 10^6$  кл/ml. Клетките бяха стимулирани с различни комбинации или самостоятелно (в зависимост от експеримента) със следните интерлевкини: IL-12 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml), IL-21 (5 ng/ml), IFN- $\gamma$  (0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Като контрола се използваха НК клетки, в чиято среда не бяха добавени екзогенно посочените интерлевкини. НК-клетъчните култури се инкубираха за период от 1 до 7 дни при 95% влажност, 5% CO<sub>2</sub> и 37°C.

**Таблица 5.** Комбинации от цитокини, с които НК клетките бяха третиранни.

Без стимулация	Единична стимулация	Двойна стимулация	Тройна стимулация
Негативна контрола	IL-12	IL-15/IL-18	IL-15/IL-18/ IL-12
	IL-15	IL-15/IL-21	IL-15/IL-18/IL-21
	IL-18	IL-18/IL-21	IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ (0.1 $\mu\text{g/ml}$ )
	IL-21		IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ (1 $\mu\text{g/ml}$ )

			IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ (10 $\mu$ g/ml)
--	--	--	--

#### **4. Клетъчно култивиране и определяне на лимфоцитната пролиферация**

Изолираните NK клетки бяха култивирани в хранителна среда RPMI 1640 (Nacalai tesque, Inc.) обогатена с 10% фетален телешки серум (FCS) (BioWest). Към средата бе добавена смес от антибиотици 100 единици/ml пеницилин и 100  $\mu$ g/ml стрептомицин (Gibco BRL). За експериментите още използвахме ракови клетъчни линии B16/F10 (CRL-6475) (клетъчна линия на миша меланома) и CT-26 (CRL-2638) (миши карцином на дебелото черво). B16/F10 клетките (ATCC) бяха култивирани в хранителна среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Nacalai tesque, Inc.) с 10% фетален говежди серум (FBS), 100 единици/ml пеницилин и 100  $\mu$ g/ml стрептомицин (Gibco BRL), а CT-26 в хранителна среда RPMI 1640 (Nacalai tesque, Inc.) с 10% FCS (BioWest), 100 единици/ml пеницилин и 100  $\mu$ g/ml стрептомицин (Gibco BRL). Клетките бяха култивирани при 37° C, 95 % влажност и 5 % CO<sub>2</sub>. Пролиферацията на NK клетките беше проследена не само качествено чрез наблюдение под светлинен микроскоп (конфлуентност на културата, наличие или липса на кълъстери), но и количествено. В зависимост от експеримента, клетките бяха преброявани между ден 1-ви и 7-ми, последователно или през ден. За целта използвахме автоматичен клетъчен брояч (Invitrogen™) и/или камера на Neubauer, в зависимост от броя на пробите.

#### **5. Микроскопски техники за определяне вида на клетъчните кълъстери**

За проследяване на пролиферацията, определяне на вида на образуваните кълъстери (групи от клетки) или липсата на такива, беше използван светлинен микроскоп Olympus CK2. Снимките бяха направени с огледално-рефлексен фотоапарат Canon (EOS Rebel T5i DSLR Camera with 18-55mm IS STM Lens Kit).

#### **6. Фенотипизиране на NK клетки чрез поточна цитометрия**

За определяне на фенотипа на получените популации от NK клетки, се използваха моноклонални антитела в различни комбинации, посочени в точка 4.2 Материали за поточна цитометрия. Наличието на експресия на определените

рецептори се проследяваше в период от 1 до 7 дни. Стъпките за отчитане на експресията на посочените маркери е аналогична на метода за определяне на чистотата на клетъчната култура описан в Материали и Методи, част методи – точка 2.

**7. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – за определяне количеството на следните молекули: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, секретирани от НК клетки, изолирани от IL-18KO мишки**

За количествено определяне на секрецията на IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 бе използвана индиректна ELISA.

Етапи на протичане:

**На ден 1**

1. Натоварване на ямките с първо анти тяло (срещу IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10);
2. Инкубиране на плаките за 1 нощ, на тъмно, 4<sup>0</sup> C;

**На ден 2**

3. Промиване с 0,05% Tween/PBS;
4. Добавяне на блокиращ буфер – 10%FCS/PBS в плаките с IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 и 1xAssay Diluent dH<sub>2</sub>O за TGF- $\beta$ ;
5. Активиране на пробите за детекция на TGF- $\beta$  с 1N HCL - 20  $\mu$ l 1N NaOH;
6. Разреждане и накапване на пробите;
7. Промиване с 0,05% Tween/PBS;
8. Прибавяне на второ анти тяло;
9. Промиване с 0,05% Tween/PBS;
10. Добавяне на стрептавидин, конюгиран с пероксидаза от хрян (St Av-Hrp);
11. Промиване с 0,05% Tween/PBS;
12. Добавяне на субстрат (TMB, тетраметилбензидин) и водороден пероксид;
13. Добавяне на стопиращ разтвор – 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
14. Отчитане на абсорбцията при дължина на вълната 450 nm.

За този експеримент се използваха 96-ямкови PVC (Polyvinyl chloride) плаки с кръгло дъно (IWAKI). За по-ясно и изчерпателно описание на проведения

експеримент, неговите стъпки ще бъдат последователно посочени във вид на таблици.

**Таблица 6.** Разреждания на стандарта с 10% FCS/PBS.

	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	TGF- $\beta$
Начална концентрация	70 ng/ml	65 ng/ml	20 ng/ml	1000 ng/ml
Разреждане на стандарта	1000 pg/ml	1000 pg/ml	500 pg/ml	1000 pg/ml
	500	500	250	500
	250	250	125	250
	125	125	62.5	125
	62.5	62.5	31.3	62.5
	31.3	31.3	15.6	31.3
	15.6	15.6	7.8	15.6

**Таблица 7.** Разреждане на изследваните проби с 10% FCS/PBS.

	Проби	Разреждания спрямо изследвания маркер			
		IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	TGF- $\beta$
	НК клетки, третирани с цитокини:				
Дни (1-7)					
	PBS (негативна контрола)	x1	x1	x1	x1
	IL-12	x1	x1	x1	x1
	IL-15	x1	x1	x1	x1
	IL-18	x1	x1	x1	x1
	IL-21	x1	x1	x1	x1
	IL-15/IL-18	x1	x1	x1	x1
	IL-15/IL-21	x1	x1	x1	x1
	IL-18/IL-21	x1	x1	x1	x1
	IL-15/IL-18/IL-12	x10, x100, x1000, x10 000	x1	x1	x1
	IL-15/IL-18/IL-21	x10, x100, x1000, x10 000	x1	x1	x1
	IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ (0.1 $\mu$ g/ml)	x10, x100, x1000, x10 000	x1	x1	x1

	IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ (1 $\mu$ g/ml)	x10, x100, x1000, x10 000	x1	x1	x1
	IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ (10 $\mu$ g/ml)	x10, x100, x1000, x10 000	x1	x1	x1

**Таблица 8.** Стъпки за провеждане на ELISA метода.

	миши ELISA кит			
	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	TGF- $\beta$
	BioLegend	BD Pharmingen™	BD Pharmingen™	eBioscience™
<b>Ден 1</b>				
Разреждане и натоварване с първо анти тяло	NaHCO <sub>3</sub> , pH 9.5 1/200, 100 $\mu$ l	0.2M Натриев фосфат, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6.5 1/250, 100 $\mu$ l	0.2M Натриев фосфат,, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6.5 1/250, 100 $\mu$ l	1x натоварващ буфер 1/200, 100 $\mu$ l
Инкубиране	1 нощ, на тъмно, 4° C	1 нощ, на тъмно, 4° C	1 нощ, на тъмно, 4° C	1 нощ, на тъмно, 4° C
<b>Ден 2</b>				
Промиване	0,05% Tween/PBS 230 $\mu$ l x 4 пъти	0,05% Tween/PBS 230 $\mu$ l x 3 пъти	0,05% Tween/PBS 230 $\mu$ l x 3 пъти	0,05% Tween/PBS 230 $\mu$ l x 5 пъти
Разреждане на блокиращия буфер	10%FCS/PBS	10%FCS/PBS	10%FCS/PBS	1xAssay Diluent dH <sub>2</sub> O (5x $\square$ 1x)
Блокиране	200 $\mu$ l, 1h	200 $\mu$ l, 1h	200 $\mu$ l, 1h	200 $\mu$ l, 1h
Активиране на пробите	--	--	--	проба - 100 $\mu$ l 1N HCL – 20 $\mu$ l 1N NaOH - 20 $\mu$ l контрола - RPMI
Стандарт, проби	100 $\mu$ l, R.T 2h	100 $\mu$ l, R.T 2h	100 $\mu$ l, R.T 2h	100 $\mu$ l, R.T 2h
Промиване	230 $\mu$ l x 5 пъти	230 $\mu$ l x 5 пъти	230 $\mu$ l x 5 пъти	230 $\mu$ l x 5 пъти
Детекция	Детектиращо анти тяло - 1/200, 100 $\mu$ l, R.T 1h	Детектиращо анти тяло - 1/500, 100 $\mu$ l St Av-HRP 1/250, 100 $\mu$ l R.T 1h	Детектиращо анти тяло - 1/500, 100 $\mu$ l St Av-HRP 1/250, 100 $\mu$ l R.T 1h	Детектиращо анти тяло - 1/250, 100 $\mu$ l, R.T 1h
Промиване	230 $\mu$ l x 4 пъти	230 $\mu$ l x 7 пъти	230 $\mu$ l x 7 пъти	230 $\mu$ l x 5 пъти
Стрептавидин, конюгиран с пероксидаза от	St Av-HRP 1/1000, 100 $\mu$ l R.T 0.5h	--	--	St Av-HRP 1/250, 100 $\mu$ l R.T 0.5h

хрян (St Av-Hrp)				
Промиване	230 $\mu$ l x 5 (всеки по 1 мин)	--	--	230 $\mu$ l x 7 пъти
Субстрат (ТМВ) и водороден пероксид	100 $\mu$ l, 20-30min на тъмно	100 $\mu$ l, 20-30 минути на тъмно	100 $\mu$ l, 20-30 минути на тъмно	100 $\mu$ l, 20-30 минути на ТЪМНО
Стопиращ разтвор	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100 $\mu$ l	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 $\mu$ l	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 $\mu$ l	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 $\mu$ l
Отчитане на абсорбцията	450 nm	450 nm	450 nm	450 nm

## 8. Вътреклетъчно оцветяване чрез поточна цитометрия

Модификация на основното имунофлуоресцентно оцветяване и поточна цитометрия могат да се използват едновременно за анализ на повърхностни молекули и вътреклетъчни антигени на ниво единични клетки чрез поточна цитометрия. Основните етапи на вътреклетъчното оцветяване са: фиксиране на клетките с формалдехид, за да се стабилизира клетъчната мембрана и след това се използва детергент или алкохол, за да направи мембраните пропускливи за антитела срещу вътреклетъчните антигени.

НК клетки бяха изолирани и стимулирани с: негативна контрола (без стимулация), с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12. На всеки 3 дни се извършваше смяна на хранителната среда и клетките се стимулираха отново със съответните концентрации (IL-12 (10 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml)). Отчитането на продукцията на IFN- $\gamma$  и IL-10 чрез вътреклетъчно оцветяване и последваща поточна цитометрия бе извършено на ден 5-ти и 7-ми.

Един ден преди вътреклетъчното оцветяване към клетките беше добавен BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Фиксиращ/Пермеабелизиращ кит (с BD GolgiStop™, инхибитор на транспорта на протеини, който съдържа моненсин, каталожен номер №554715). На следващия ден (ден 5-ти, аналогично ден 7-ми) клетките бяха събрани и преброени. Изполваната концентрация на клетките беше  $2 \times 10^6$ . Следващата стъпка беше блокиране на Fc рецептора със CD16/32 антитяло с концентрация 1  $\mu$ g за концентрация на клетъчната суспензия -  $10^6$  клетки/100  $\mu$ l. Клетките бяха инкубирани на 4° C за 15 минути, оцветени за повърхностните

клетъчни антигени с оцветяващ буфер при концентрация  $10^6$  клетки/50  $\mu$ l, 4° C и инкубирани за 15 минути. След промиване, клетките се фиксираха и пермеабелизираха, като се добавяше по 100  $\mu$ l фиксиращ/пермеабелизиращ разтвор след което се инкубираха на 4° C за 20 минути. Последваше двукратно промиване с 1x миеш буфер (BD Perm/Wash™) и оцветяване за вътреклетъчни цитокини с 5  $\mu$ l антитяло (Таблица 9). След двукратно промиване с 1x миеш буфер (BD Perm/Wash™) (45  $\mu$ l) и инкубиране на клетките на 4° C за 30 минути, получените резултати се отчитаха чрез FACS анализ по вече описания метод.

**Таблица 9.** Схема на използваните антитела при извършване на поточна цитометрия и стимулации на NK клетките.

FITC	PE	APC	IL-15/IL-18	IL-15/IL-18/IL-12
(-)	(-)	(-)	1	2
(-)	(-)	DX5	3	4
стрептавидин	Плъше IgG	DX5	5	6
IFN- $\gamma$	IL-10	DX5	7	8

## 9. Методи за откриване на спермоантитела

Съществуват различни техники, които могат да докажат присъствието на антитела срещу сперматозоидни антигени, както в кръвен серум, така и в семинална плазма, върху сперматозоидите или в цервикален мукус. Най-широко застъпени са методите, чрез които се откриват антитела от класовете – IgG, IgM и IgA. Прието е при изследването на антитела срещу сперматозоидни антигени (спермоантитела, СА) да се използват повече от два метода. Използват се различни имунологични методи при етиологичната диагноза на безплодието, като тези подходи могат да разкрият различни антиген-антитяло системи при поликлоналния авто- или изоимунен отговор.

### 9.1 Спермоаглутинационни тестове

При наличие на спермоантитела в изследвания серум, те биха могли да доведат до аглутинация на сперматозоидите (спермоаглутинация) в резултат на

реакцията сперматозоиден антиген – спермоантитяло. Аглютинатите, които се получават в резултат на слепването, могат да бъдат изследвани чрез желатинов спермоаглютинационен тест – GAT (Gelatin agglutination test), на Kibrick, чрез тест на Franklin-Dukes – TSAT (Tray slide agglutination test), както и чрез микроспермоаглютинационен тест на Friberg – TAT (Tray agglutination test). Представените резултати в дисертационния труд са получени чрез прилагането на метода на Фриберг – TAT. За изпълнение на експериментите се използва донорска спермална проба от донор с доказан фертилен статус, която отговаря на общоприетите критерии на Световната Здравна Организация (Rose et al., 1976; WHO laboratory manual, 2010).

Спермоаглютинационните тестове включват предварителна обработка на еякулата, получен от донор с нормоспермия. Изследваната спермална проба се втечнява, като за тази цел се поставя в инкубатор на 37°C за 30 минути. Последва центрофугиране на ~ 1500 RPM за 10 минути. След приключване на центрофугирането, внимателно супернатантата се отделя, а към утайката се прибавя хранителна среда TC Medium 199 1x, обогатена с 0,3% говежди серумен албумин (bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Спермалната проба се оставя да престои в инкубатор на 37° C за 30 минути, под наклон от 45°, за да изплуват най-жизнените и подвижни сперматозоиди (“swim up”). След изтичане на времето под микроскоп се прави проверка на подвижността и морфологията на сперматозоидите, а след това се извършва броенето в камера на Бюркер. За по-лесно преброяване, сперматозоидите се разреждат в съотношение 1:20 с разтвор за броене на сперматозоиди, оставят се за 5 минути във влажна камера (с цел утаяване на сперматозоидите) и след преброяването се изчислява концентрацията на сперматозоидите в пробата по формула:

Концентрация сперматозоиди = брой преброени сперматозоиди (в 100 средни квадратчета) x 50 000.

Важно е да се отбележи, че при броенето не се включват сперматозоиди с нарушена морфология (например без глава и без опашка). След изчисляването на крайната концентрация се извършва преизчисляване за работна концентрация  $1 \times 10^7 / \text{ml}$ .

### 9.1.1 Спермоаглутинационен тест на Фриберг (ТАТ)

За доказване на спермоантитела срещу антигени, разположени по сперматозоидната повърхност бе използван микроспермоаглутинационният тест на Фриберг. Методът е с висока чувствителност и чрез него се доказват спермоантитела, които предизвикват главно аглутинация от типа опашка с опашка (tail to tail, t-t), които са предимно от клас IgG и аглутинация от типа глава с глава (head to head, h-h), при която участващите спермоантитела са от клас IgM, както и смесена аглутинация (mixed, m) – при която се наблюдават ясно групи сперматозоиди, съчетаващи някои от изброените по-горе типове аглутинация (Rose et al., 1976). При качествено определяне на аглутинацията според спецификата на антителата и локализацията на аглутиногените се наблюдават и други типове аглутинация като: опашен край с опашен край (tail tip to tail tip, tt-tt), тангентна (tangle, t) – при нея сперматозоидите са с усукани опашки, като главите се допират до опашките. Изброените типове аглутинация посочват локализацията на аглутиногените, които участват в реакцията.

След обработка на спермалната проба (описана по-горе в раздел Материали и Методи) в микротитърни плаки на Terassaki се налива по 5  $\mu$ l от буфер на Бейкър. Към него се добавят 5  $\mu$ l от съответния серум и се правят падащи разреждания. Накапват се два вида контроли, отрицателни – серуми от предварително изследвани здрави мъже и жени с доказан фертилен статус (с разреждане 1:100), при които не се откриват спермоантитела и положителни контроли – заешки хиперимунен анти-човешки серум и човешки серуми от безплодни пациенти с установени предварително високи концентрации на спермоаглутиниращи антитела (с разреждане 1:100). След това плаката се покрива с течен парафин, като за целта се използва Пастъорова пипета. Във всяка ямка се добавя по 1  $\mu$ l от сперматозоидната суспензия със спринцовка на Хамилтон. Плаката се инкубира за 1 час в термостат (модел ТВ3-25) на 37° C, след което се отчита резултатът под инвертен микроскоп (модел Carl Zeiss Jena).

За положителни (клинично значими) резултати се приемат титри, равни или по-високи от 32, а като отрицателни – титри, по-ниски от 32. Освен титърът на спермоантителата се отчита и типа аглутинация на тестирания серум.

## 9.2 Спермоимобилизационен тест на Изожима (SIT)

Чрез спермоимобилизационния тест на Изожима се доказват антитела от класовете – IgG и IgM (без IgG<sub>4</sub>), които свързват и активират системата на комплемента по класическия път. В резултат на свързването на спермоантитела с антигени, разположени по сперматозоидната повърхност, подвижността на сперматозоидите намалява.

Тестът в неговия полуколичествен вариант се основава на реакцията спермоимобилизация в присъствие на комплемент и се отчита полуколичествено (титър) и ниво на спермоимобилизация (Sperm immobilization value, SIV) на изследвания серум.

Преди експеримента, серумите се инактивират на водна баня на 56<sup>0</sup>C за 30 мин. След това спермалната проба се обработва (описана по-горе в раздел Материали и Методи), след което в микротитърни плаки на Terassaki се накапват 10 µl буфер на Бейкър и 10 µl от съответния серум в ямка, ресуспендира се, след което 10 µl се прехвърлят в съседната ямка. В резултат на това пробата е с разреждане 1:2, в няколко повторения. Накапват се два вида контроли: отрицателни – серуми от предварително изследвани здрави мъже и жени с доказан фертилен статус (с разреждане 1:100), при които не се откриват спермоантитела и положителни контроли – заешки хиперимунен анти-човешки серум и човешки серуми от безплодни пациенти с установени предварително високи концентрации на спермоимобилизиращи антитела (с разреждане 1:100). Плаката внимателно се наслоява с 10 ml течен парафин с помощта на Пастърова пипета. Във всяка ямка със спринцовката на Хамилтон се накапва по 1 µl сперматозоидна суспензия с концентрация 1x10<sup>7</sup>/ml. За всеки пациентски серум се накапват по 4 ямки, като в 2 от тях се добавя по 2 µl комплемент от морско свинче (ИЗПБ лиофилизиран продукт), а в другите 2 ямки не се добавя комплемент.

Комплементът от морско свинче е лиофилизиран и се разтваря предварително с dH<sub>2</sub>O, според инструкциите на фирмата производител.

Плаките се инкубират за 1 час на 37<sup>0</sup> C. След изтичане на времето – резултатите се отчитат под инвертен микроскоп. Изброяват се 100 сперматозоида на ямка и се отчита броят подвижни между тях.

Формула за изчисляване на SIV (спермоимобилизационно ниво):  $SIV = \frac{C}{T}$

Където C е процентът на подвижни сперматозоиди в отрицателната контрола, а T е процентът на подвижни сперматозоиди в изследвания серум (тестираната проба). Като положителни се отчитат резултатите, по-големи от 2,00.

### **9.3 Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – индиректна ELISA – за откриване на спермоантитела**

Индиректният метод е разработен главно за определяне на концентрация на антитела в биологични течности. Антигенът, имобилизиран на твърда фаза (в случая сперматозоидни антигени), се инкубира с изследваната проба (пациентския серум), съдържаща антитялото, след което имобилизираният антиген се промива, за да се отстранят несвързаните антитела и по-нататък се инкубират с второ антитяло, маркирано с ензим (анти-човешки IgG конюгиран с пероксидаза), което е вече антивидово имуноглобулиново антитяло. След разделянето на разтворим ензимен конюгат от този, имобилизиран на твърдата фаза, се определя ензимната активност, свързана с фазата. Определената ензимна активност е правопропорционална на концентрацията на антитялото в изследваната проба (Цончева et al., 1988).

Предварително плаките (твърди или меки, Costar, Cambridge, USA) се обработват с поли-L-лизин – 50 µl на ямка с цел повишаване на тяхната адхезивна способност. Те се инкубират за 1 час на стайна температура с поли-L-лизин, след което се промиват с дестилирана вода (dH<sub>2</sub>O) и се оставят да изсъхнат отново на стайна температура. След това плаките се натоварват със сперматозоидна суспензия от “swim up” сперматозоиди (описано по-горе), които се свързват неспецифично към пластмасовите ямки. Плаката престоява за една нощ в термостат на 37<sup>0</sup>С. За фиксирането ѝ се използва 30% метанол – по 50 µl на ямка и инкубиране за 30 мин на стайна температура. Следва промиване с 0,05% Tween/PBS – 3 пъти по 5 мин. За блокиране на свободната повърхност в ямките се използва индиферентен белтък – инактивиран говежди серум. Последва инкубиране за 1 час на стайна температура. Трикратно промиване на ямките с 0,05% Tween/PBS. Предварително разредените серуми (в разреждане 1:20, което е определено от експерименталните ни проучвания и литературни данни) се накапват в няколко

повторения. Последва инкубиране за 2 часа на стайна температура. Трикратно промиване на ямките с 0.05% Tween/PBS. Второто анти тяло (анти-човешки IgG белязан с пероксидаза, Sigma-Aldrich) се разрежда 1:1000 (работно разреждане, което е определено след съответните експерименти) непосредствено преди накапването му, след което се добавя по 50µl на ямка. Плаката се инкубира за 1 час на 37<sup>0</sup> C. Следва трикратно промиване на ямките с 0,05% Tween/PBS. Субстратът, който се използва, за проявяване на реакцията, е орто-фенилендиамин (Ortho-Phenylenediamine, OPD, Sigma-Aldrich), който е разтворен в цитратен буфер с pH=5.1, при концентрация на хромогена 0,4 mg/ml в присъствие на 0.015% водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – 50 µl на ямка. Плаката се инкубира в тъмна камера за 4-7 мин., след което се добавя стопиращ разтвор – 10% сярна киселина (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) – 50 µl на ямка. Определянето на ензимната активност се извършва при дължина на вълната – 492 nm с помощта на ELISA четец (модел DW-SM600, ДАНС ФАРМА).

#### **10. Изолиране на човешки НК клетки от периферна кръв и определяне на тяхната активност**

Изолирането и пречистването на човешки НК клетки от периферна кръв бе извършено в клиничните лаборатории Cibalab, Репро Инова, лаборатория клинична имунология на болница „Надежда“. На всеки пациент посетил някоя от гореспоменатите клинични лаборатории за изследване на броя и активността на НК клетките е взета периферна кръв. Периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMC) са получени чрез центрофугиране през плътностен градиент с Ficoll. Мононуклеарните клетки се промиват с PBS. НК клетките се изолират от PBMC като се използват CD56 магнити в съответствие с указанията на производителя (Miltenyi Biotec, GmBH, Bergisch Gladbach, Germany) (Ahn et al., 2004). Последва проверка на чистотата на НК клетките чрез поточна цитометрия, като анализът на клетките трябва да показва над 90-95% чистота. Процедурата по изолиране на НК клетки от PBMC е аналогична на изолирането на миши НК клетки от далак, като единствено използваните маркери са различни.

Определянето на НК клетъчната активност от изолираните от периферна кръв клетки бе извършено в клиничните лаборатории Cibalab, Репро Инова, Лаборатория клинична имунология на болница Надежда. Тестът за НК клетъчна

активност определя способността на функционално активирани НК клетки да атакуват таргетни клетки. НК активността се измерва с помощта на биологичен метод, при който се определя способността на активирани НК клетки да убиват таргетни за тях клетки (K562 миелогенна левкемия, клетъчна линия от еритролевкемичен тип). Процентът лизирани K562 клетки се определя с помощта на флуориметър, като се използва имунофлуоресцентна техника (Медицински център, Клиничен институт за репродуктивна медицина „Света Елисавета“, гр. Плевен, Ahn et al., 2004).

#### **11. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) – за определяне количеството на IL-10 и IL-12 в серуми на безплодни пациенти**

Провеждането на ELISA метода за установяване концентрацията на IL-10 и IL-12 в серуми на безплодни пациенти бе аналогична на тази, извършена при определяне на концентрацията на IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  и IL-10, секретирани от миши НК клетки на IL-18KO мишки, описана в Материали и Методи (**Таблица 8**).

##### **Етапи на протичане:**

1. Подготовка на реактивите: разреждане на измиващ буфер, разреждане 1:5 на калибриращ разтвор (RD6P за IL10, RD5C за IL-12), падащи разреждания на стандарта
2. Добавяне на разтворител на пробите (50 $\mu$ l/на ямка), RD1W за IL-10, RD1F за IL-12
3. Добавяне на стандарта към изследваните проби 200  $\mu$ l/ямка
4. Покриване на плаката с адхезивен лист
5. Инкубиране за 2 часа на стайна температура
6. Промиване – 3 пъти за 5 минути (с по 400  $\mu$ l/ямка)
7. Добавяне на конюгата за IL-10 (кат. № 892899), съответно за IL-12 (кат. № 890213), които са конюгирани с пероксидаза (по 200  $\mu$ l/на ямка)
8. Покриване на плаката с адхезивен лист
9. Инкубиране за 2 часа на стайна температура.
10. Промиване – 3 пъти за 5 минути (с по 400  $\mu$ l/на ямка)
11. Подготовка на субстратите А (хидроген пероксидаза) и Б (ТМВ-тетраметилбензидин)
12. Добавяне на субстрат А + Б (по 200  $\mu$ l/ямка)
13. Инкубиране за 20 минути на тъмно, на стайна температура
14. Добавяне на стоп разтвор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (по 50  $\mu$ l/ямка)
15. Отчитане при 450 nm дължина на вълната

За този експеримент се използваха 96-ямкови PVC (Polyvinyl chloride) плаки с кръгло дъно.

## **12. Обработка на получени резултати**

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.

## **13. Статистически анализ**

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 (\*).

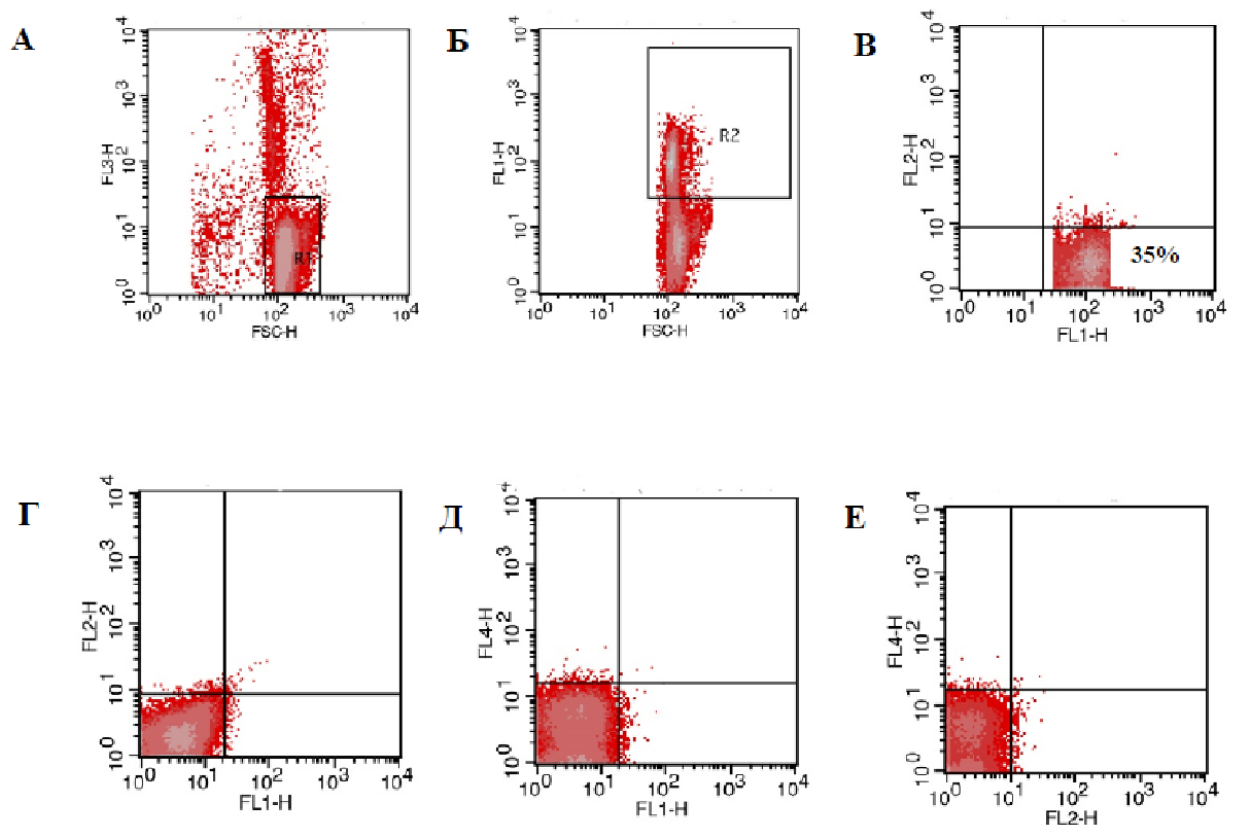
За статистическата обработка бе използван и екзактен тест на Fisher, който сравнява две независими извадки. При  $P < 0.05$  стойностите се приемаха за статистически значими.

#### 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 синтезата 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 2**).

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 (**Таблица 5**).



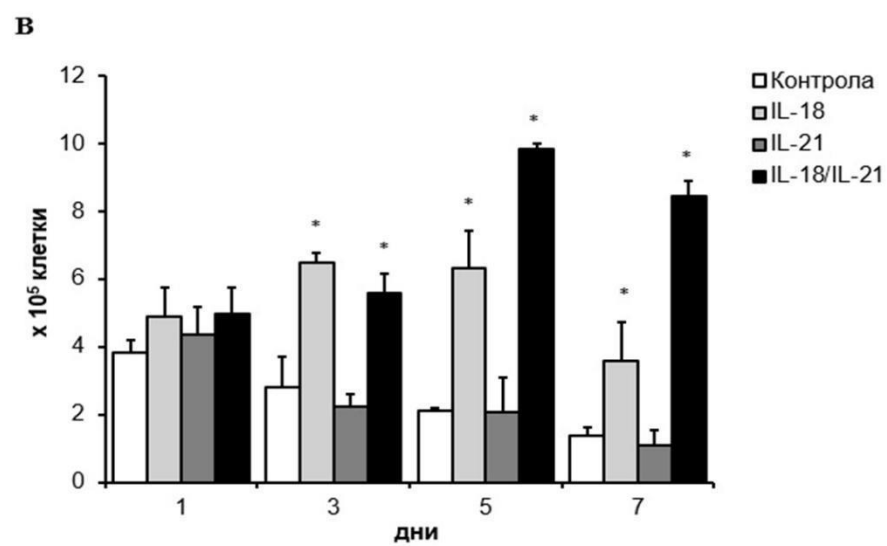
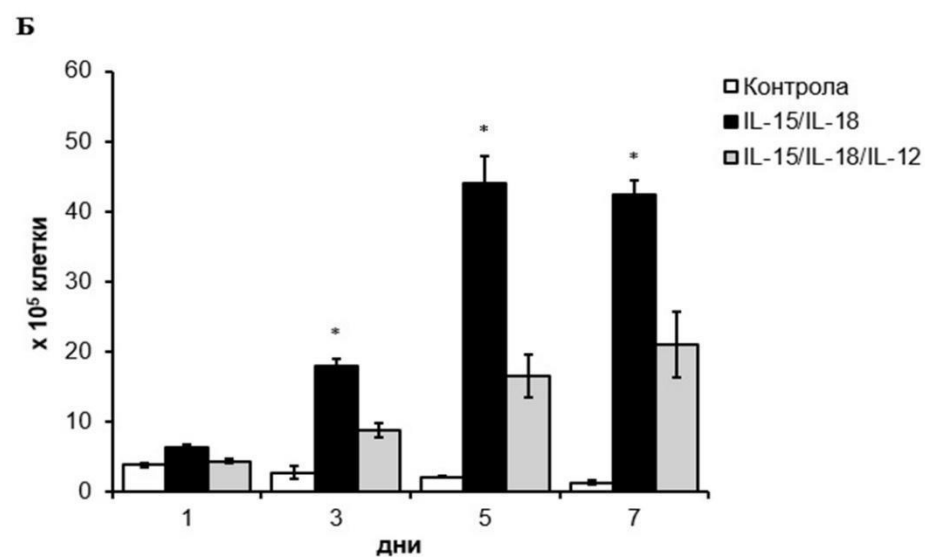
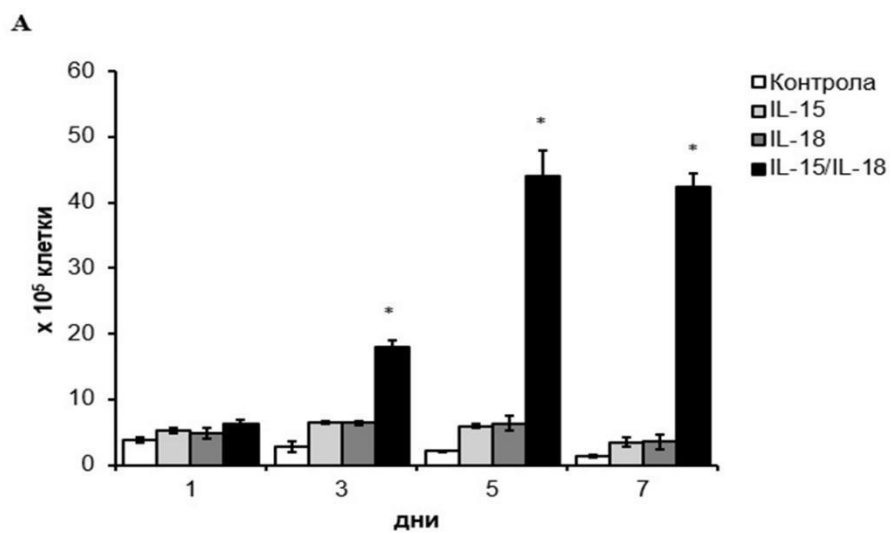
**Фигура 2.** Поточна цитометрия на свежо изолирани НК клетки за проверка на чистотата на спленоцитите. **А** – проба 1, FL3-H – пропидиев йодид, FSC-H – гранулираност, R1 – „врата“ за живи клетки; **Б** – проба 2, FL1-H – DX5, FSC-H – гранулираност, R2 – „врата“ за живи НК клетки; **В** – проба 2, FL1-H – 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<sup>TM</sup> Pro, Version 6.0, BD Biosciences.*

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

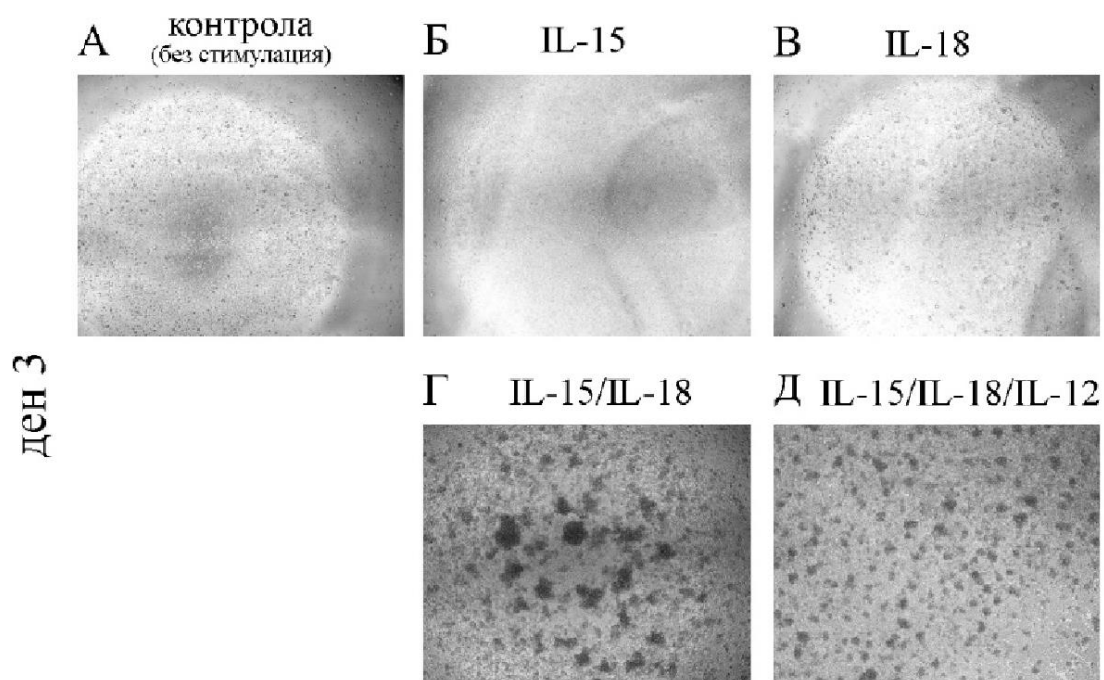
## **2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на ИЛ-18КО мишки НК клетки след стимулирането им чрез цитокини**

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



**Фигура 3.** Пролиферативна 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 третирани с цитокини. **Б** – НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18, IL-15/IL-18/IL-12 и контрола – клетки, които не са третирани 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 конfluентност НК клетките, стимулирани с IL-15/IL-18, образуваха струпвания – кълъстери (**Фигура 4Г**), които се различаваха от тези образувани при клетките, стимулирани с IL-15/IL-18/IL-12 (**Фигура 4Д**), а при контролата и единичните стимулации не се наблюдаваха струпвания от клетки (**Фигура 4А, 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 конfluентност се достигаше между 5 и 6 ден, като същевременно в хранителната среда имаше голям брой мъртви клетки.

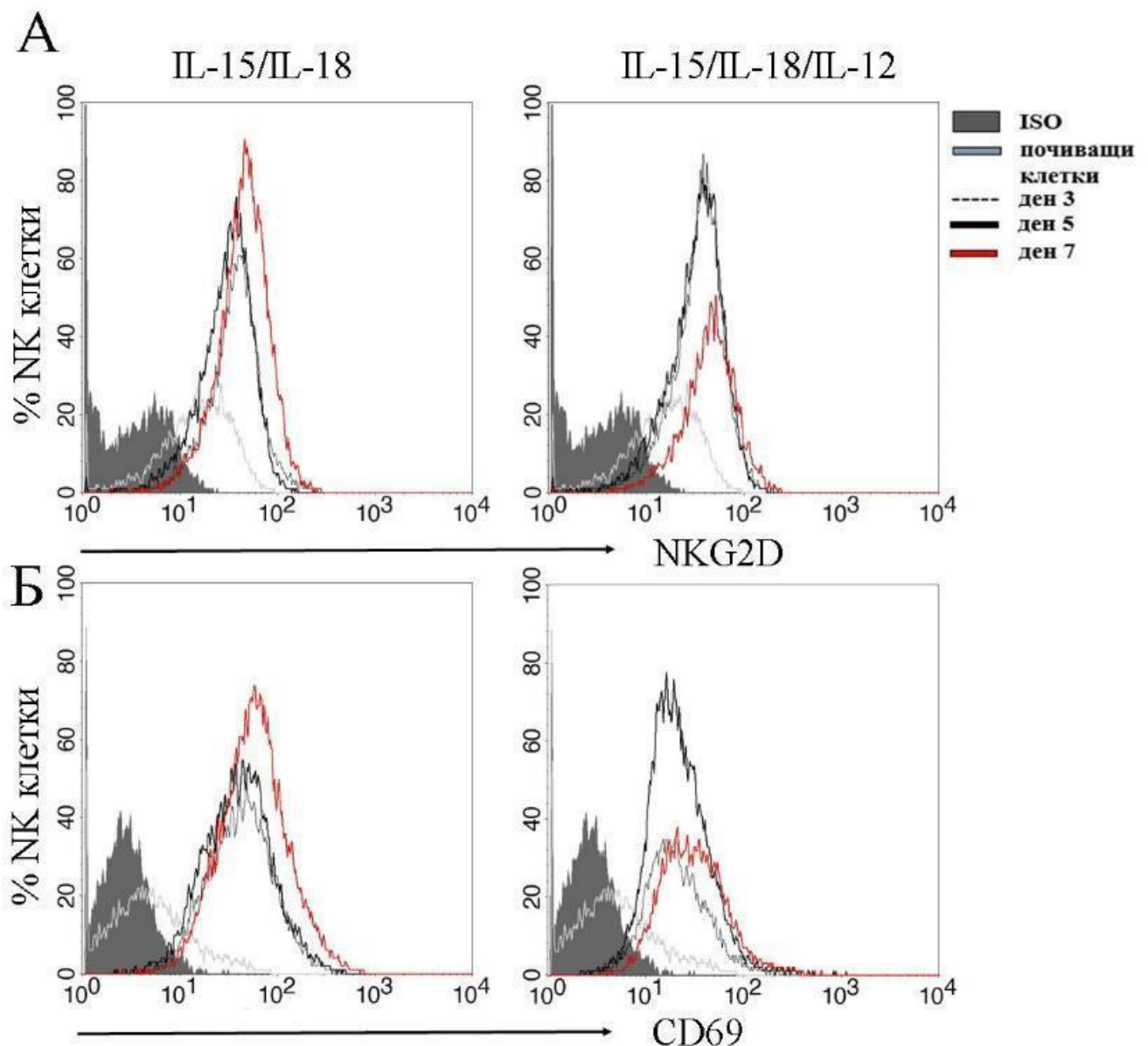


**Фигура 4.** *Образуване на струпвания от клетки (кълъстери) между НК клетките след стимулация с цитокини на ден 3. А – Контрола – НК клетки, които не са стимулирани. Б – НК клетки, стимулирани с IL-15. В – НК клетки, стимулирани с IL-18. Г – НК клетки стимулирани с IL-15/IL-18. Д – НК клетки, стимулирани 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**

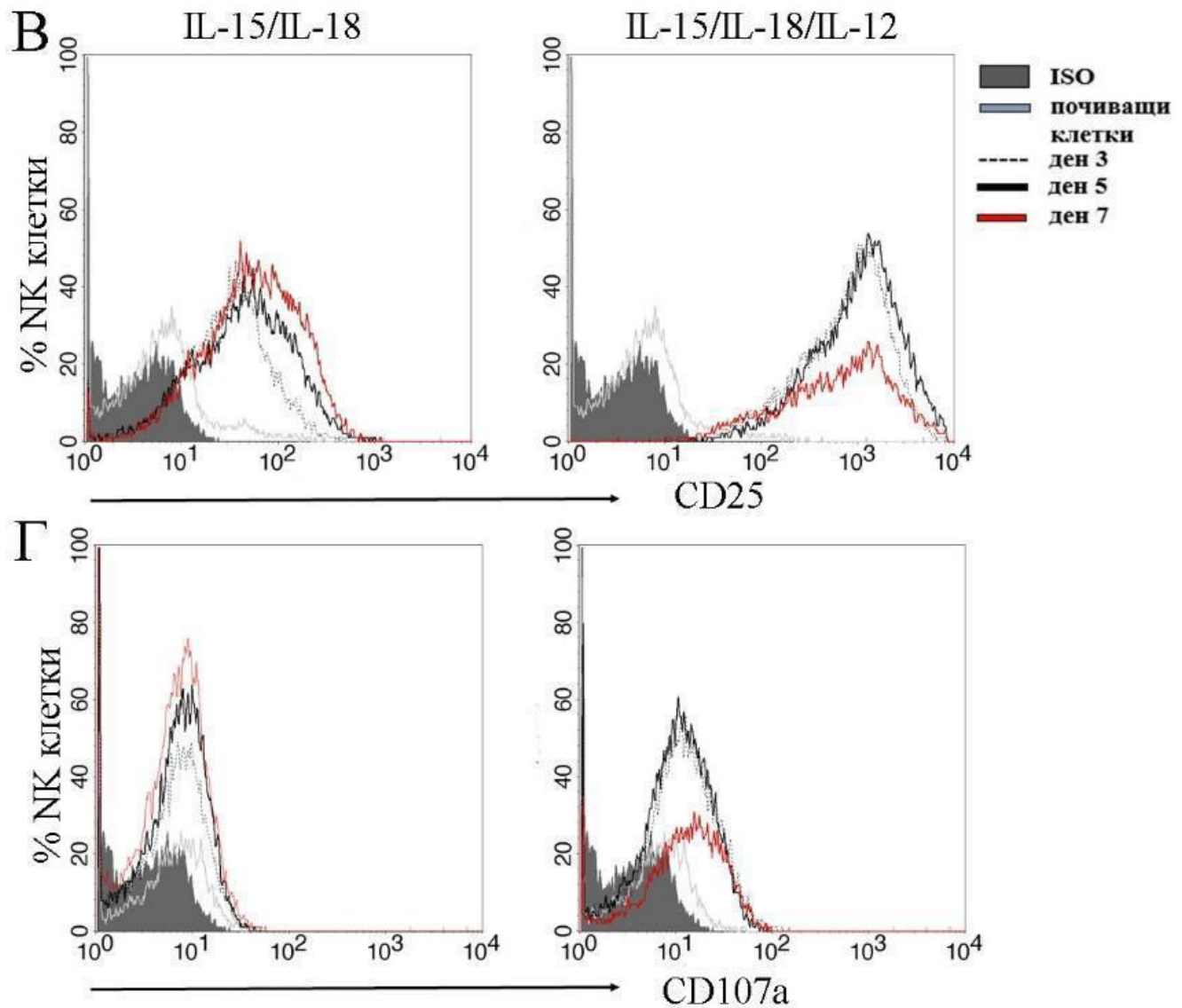
Тъй като бяха наблюдавани разлики в пролиферацията на НК клетките в зависимост от стимулацията с цитокините, изследвахме експресията на различни рецептори върху тяхната повърхност. След увеличаване на пролиферативната активност на НК клетките значително се повиши експресията на различни активиращи рецептори – CD69, NKG2D (**Фигура 5А и 5Б**), в сравнение с почиващите клетки (resting cells), както и с клетките, които са стимулирани с тройната комбинация от цитокини (**Фигура 5А 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 5А, Б, В, Г, Д и Е**). Интересен бе фактът, че НК

клетките, стимулирани с тройната комбинация, експресират силно повърхностен маркер CD25 (IL-2R $\alpha$ ) (Фигура 5В), докато клетките, стимулирани с IL-15/IL-18 го експресират умерено (Фигура 5В). Добавянето на IL-12 към тези клетки забележително повишаваше експресията на CD25 (Фигура 5В) и Sca-1 (резултатите не са показани), а редуцираше NKG2D, CD69, CD107a (Фигура 5А и Г), B220, DX5 (резултатите не са показани).



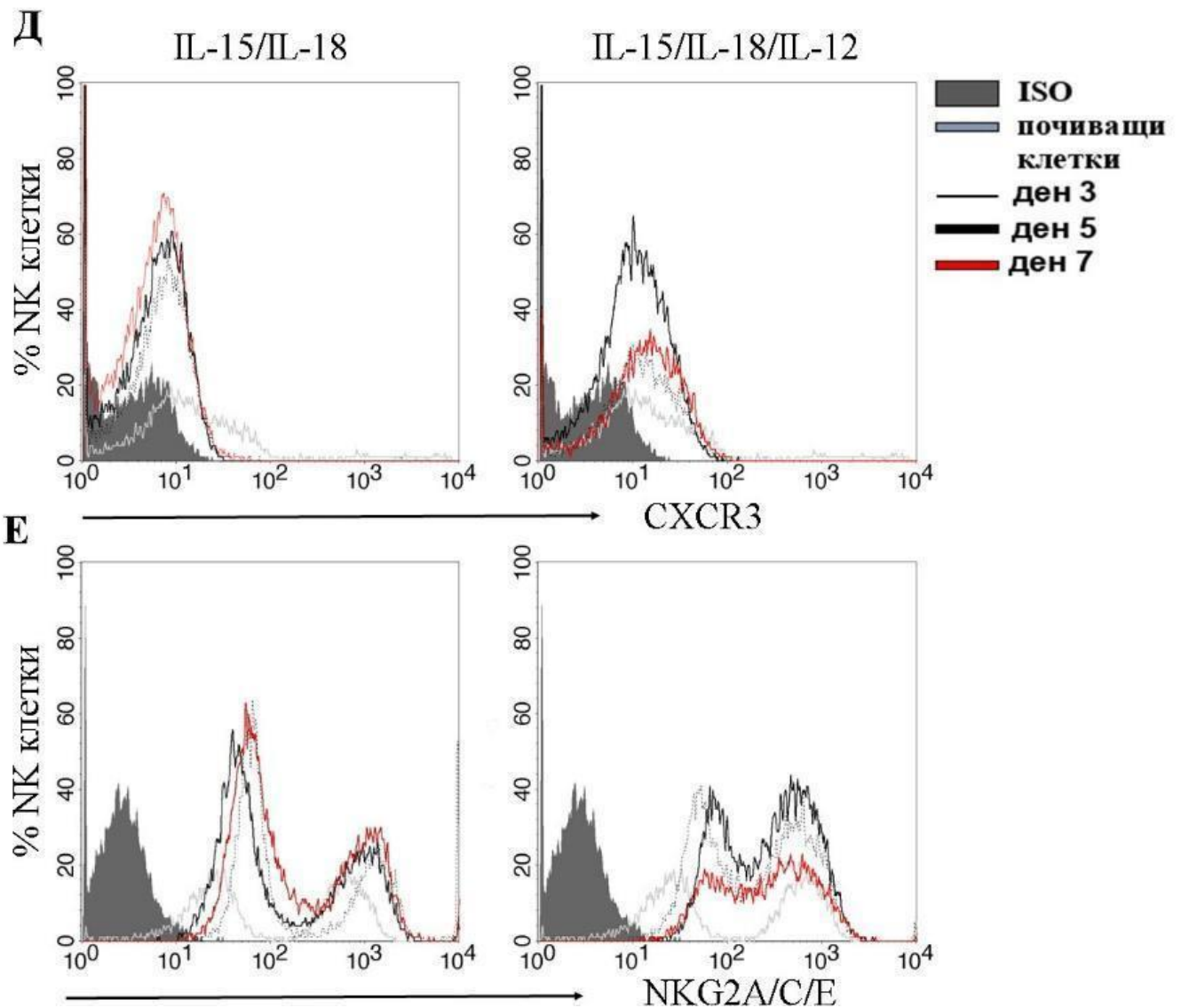
**Фигура 5А и Б.** Експресия на повърхностни маркери върху NK клетките при контролата (ISO), почиващите нестимулирани NK клетки и след стимулация с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12, на ден 3 (-----), 5 (в черно на графиката), 7(в червено

на графиката). **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 NK клетки с експресиран рецептор. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.



**Фигура 5В 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

*НК клетки с експресиран рецептор. Представените резултати са получени чрез поточна цитометрия.*

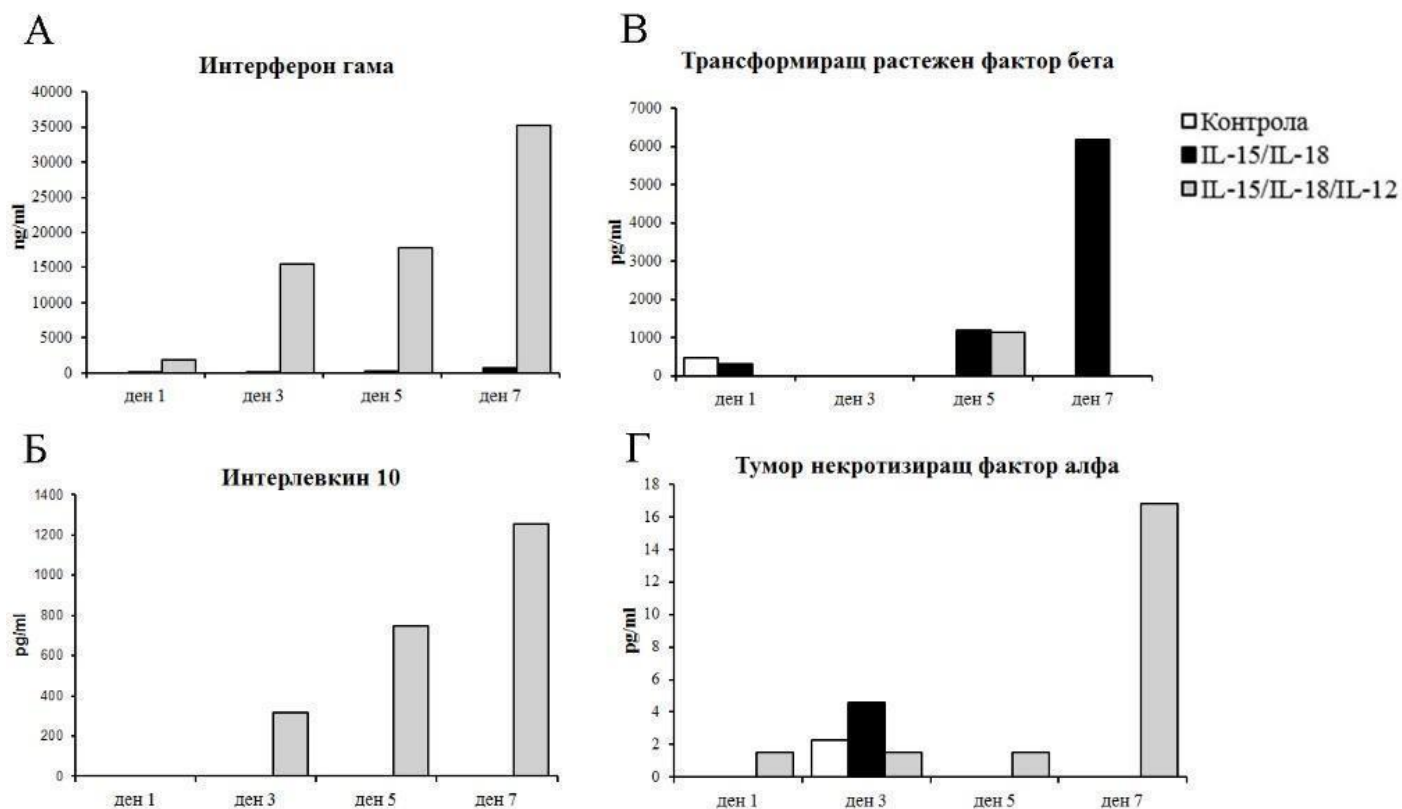


**Фигура 5Д и Е.** Експресия на повърхностни маркери върху НК клетките при контролата (ISO), почиващите нестимулирани НК клетки и след стимулация с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12, на ден 3 (-----), 5 (в черно на графиката), 7 (в червено на графиката). **Д** – Проследява се експресията на рецептора CXCR3. **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 секретията на интерферон гама (IFN- $\gamma$ ), интерлевкин 10 (IL-10), трансформиращ фактор бета (TGF- $\beta$ ), тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ). НК клетките бяха премествани в 96-ямкови плаки, в които бяха направени съответните разреждания и манипулации, посочени в Материали и Методи, точка 7, **Таблицы 6 и 7**.

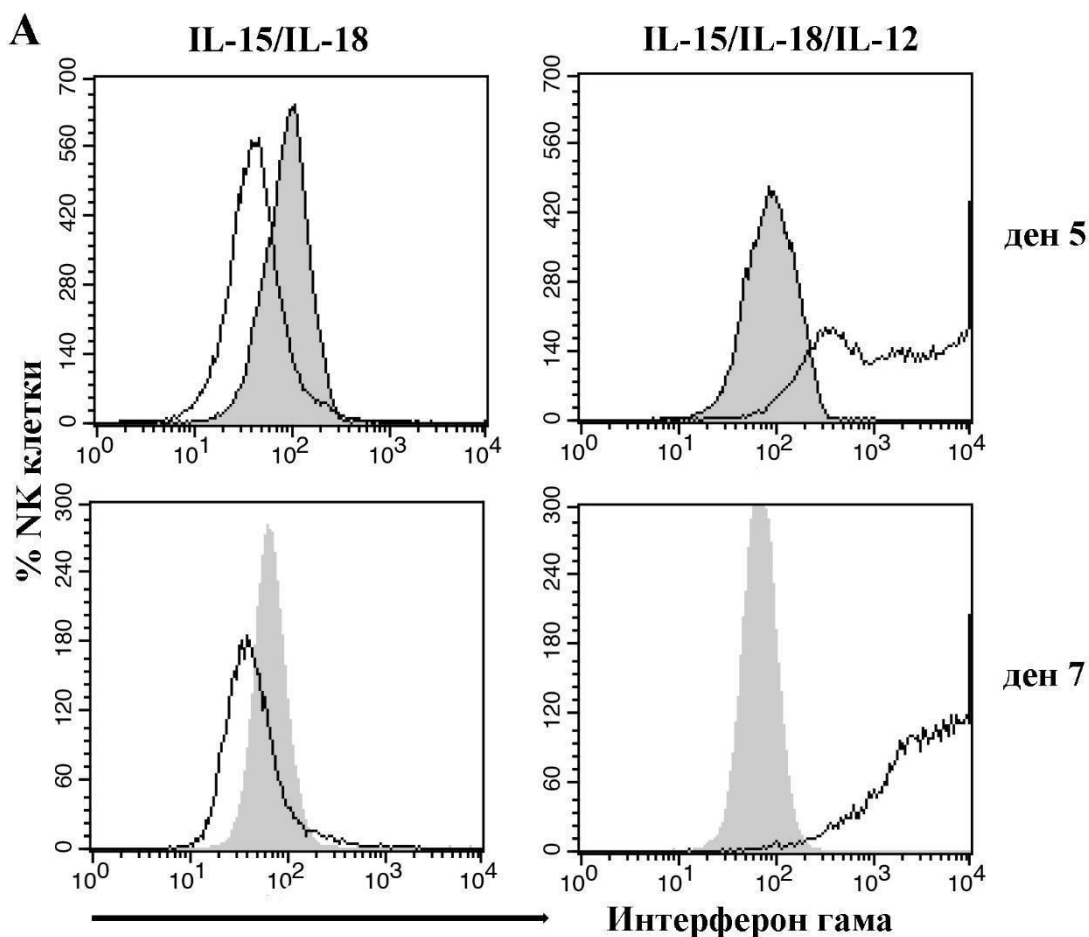
Клетките, които бяха стимулирани с IL-15/IL-18, не показаха секретия на IFN- $\gamma$  и IL-10, за периода от 7 дни на култивиране. За разлика от интензивно пролифериращите клетки, НК клетки към, които бе добавен IL-12 (в началото на култивиране или на ден 2), показаха голяма продукция на интерферон гама (**Фигура 6А**), която бе последвана от високи нива на интерлевкин 10 (**Фигура 6Б**) и на тумор некротизиращ фактор алфа (**Фигура 6Г**). Тази секретия 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 6В**). Резултатите не показаха производство на TGF- $\beta$  от клетките, към които бе прибавен IL-12. Присъствието на цитокина IL-12 доведе до производство на молекулите IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , но не и на TGF- $\beta$ . Обратна корелация се наблюдаваше при НК клетките, които бяха стимулирани само с IL-15/IL-18.



**Фигура 6.** Секреция на интерферон гама, интерлевкин 10, трансформиращ растежен фактор бета, тумор некротизиращ фактор алфа от NK 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 NK клетките. **Б** – Секреция на интерлевкин 10 от NK клетките. **В** – Секреция на трансформиращ растежен фактор бета от NK клетките. **Г** – Секреция на тумор некротизиращ фактор алфа от NK клетките.

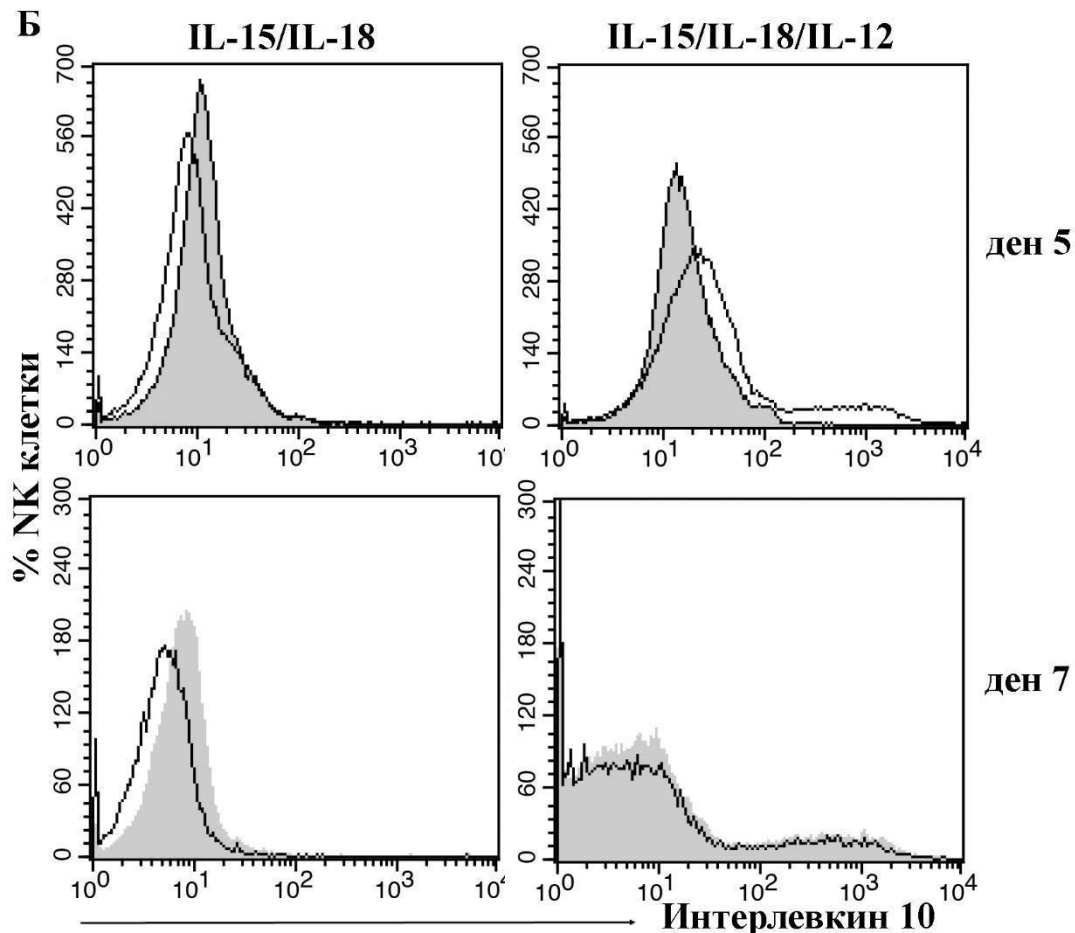
За да потвърдим резултатите от ензимно-свързания имуносорбентен анализ, използвахме вътреклетъчно оцветяване, което е модификация на основното имуофлуоресцентно оцветяване, като открива вътреклетъчни антигени на ниво единични клетки чрез поточна цитометрия. Тъй като най-голяма пролиферация на клетките се наблюдаваше след ден 3, за определяне на секрецията на IFN- $\gamma$  и IL-10 чрез метода на вътреклетъчно оцветяване, използвахме NK 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- $\gamma$  беше изключително висока (Фигура 7А), последвана от продукция на IL-10 (Фигура 7Б). Секреция на търсените молекули не се наблюдаваше при НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18 (Фигура 7А и 7Б).



**Фигура 7А.** Вътреклетъчно оцветяване на IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  или IL-10), а върху ордината – концентрацията на НК клетки, секретирани

съответната молекула (IFN- $\gamma$  или IL-10). **А** – Вътреклетъчно оцветяване на IFN- $\gamma$  на ден 5 в НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18 и IL-15/IL-18/IL-12.

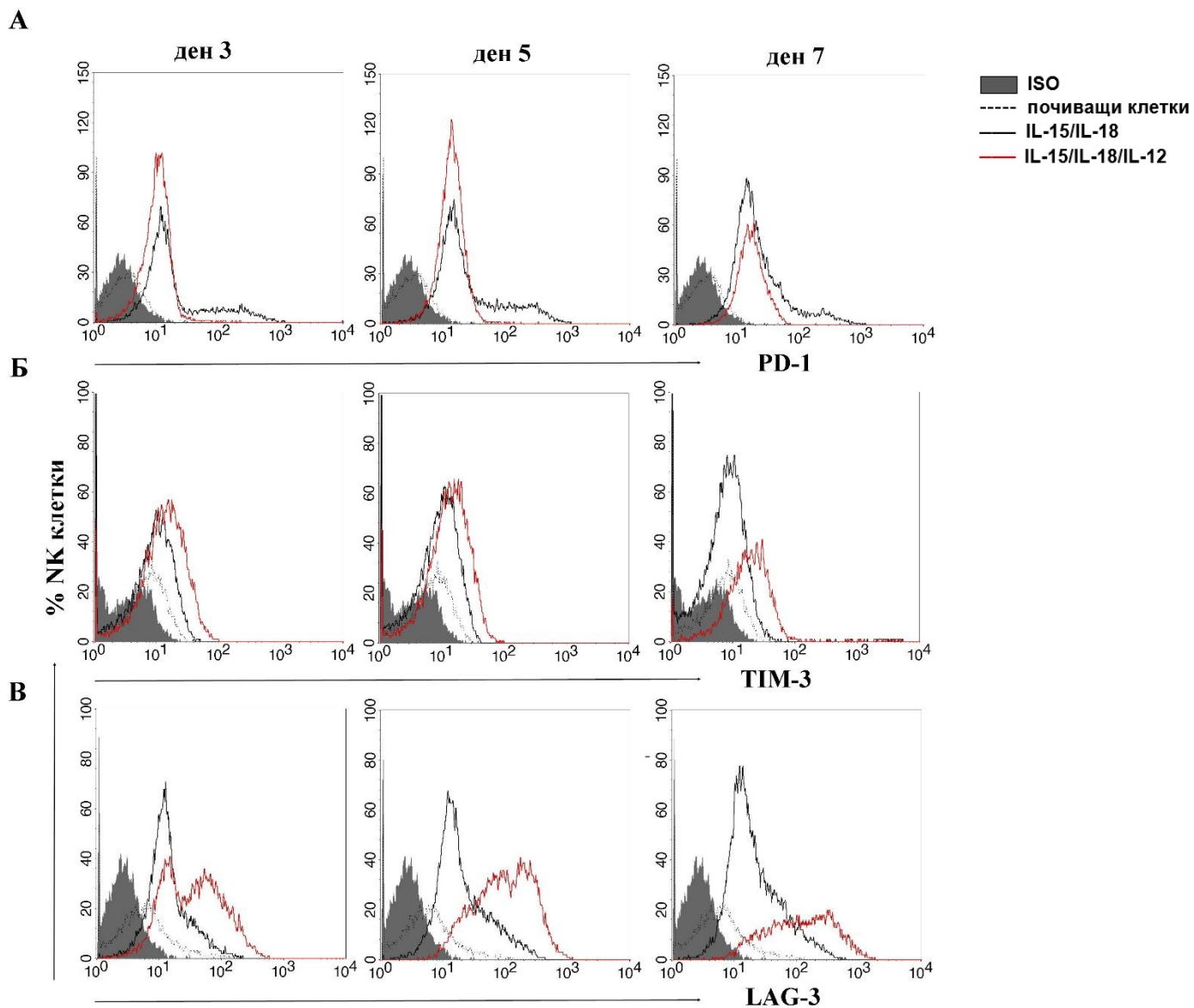


**Фигура 7Б.** Вътреклетъчно оцветяване на IFN- $\gamma$  и IL-10. НК клетките са стимулирани с цитокини IL-15/IL-18, IL-15/IL-18/IL-12 и контрола (ISO). Определянето бе извършено на ден 5 и ден 7 от култивирането. Върху абсцисата е нанесена интензивността на секреция на съответната молекула (IFN- $\gamma$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

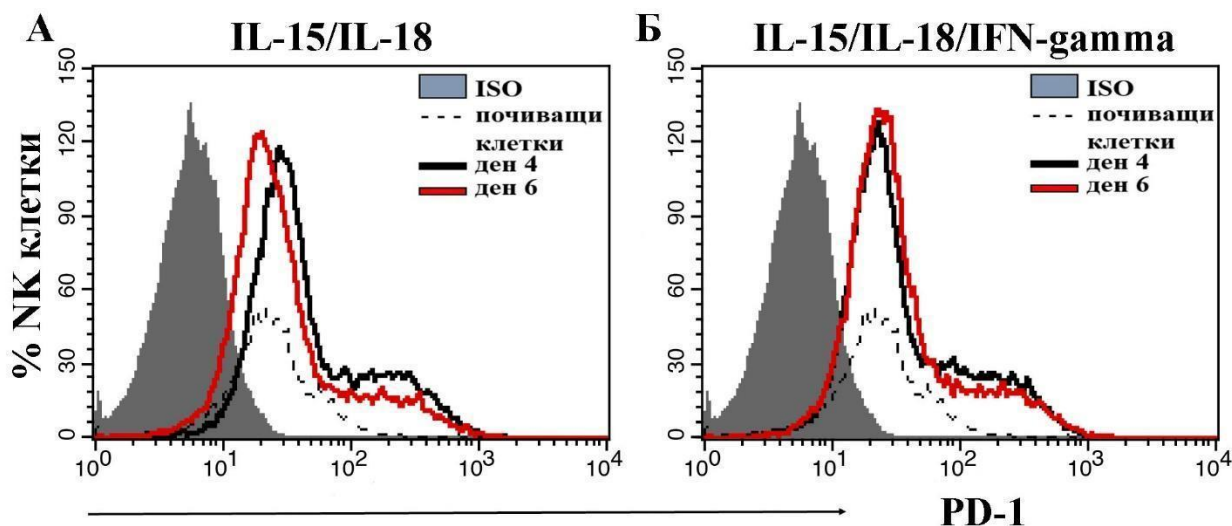
Тъй като именно след стимулация с IL-15/IL-18/IL-12 беше наблюдавана по-слаба пролиферация, по-слаба експресия на активиращи маркери, както и висока секреция на IFN- $\gamma$ , IL-10 и на базата на литературни данни предположихме, че тези

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 NK 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 8А**). Значението на експресията и редукцията на PD-1, регулирана от IL-15, IL-18, IL-12 в NK клетките не беше изяснена, но беше явно видима. NK клетките, които бяха стимулирани с IL-15/IL-18 показаха ниска експресия на инхибиращи контролни точки TIM-3 и LAG-3 (**Фигура 8Б и 8В**), 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 8.** 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 експресиран 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.

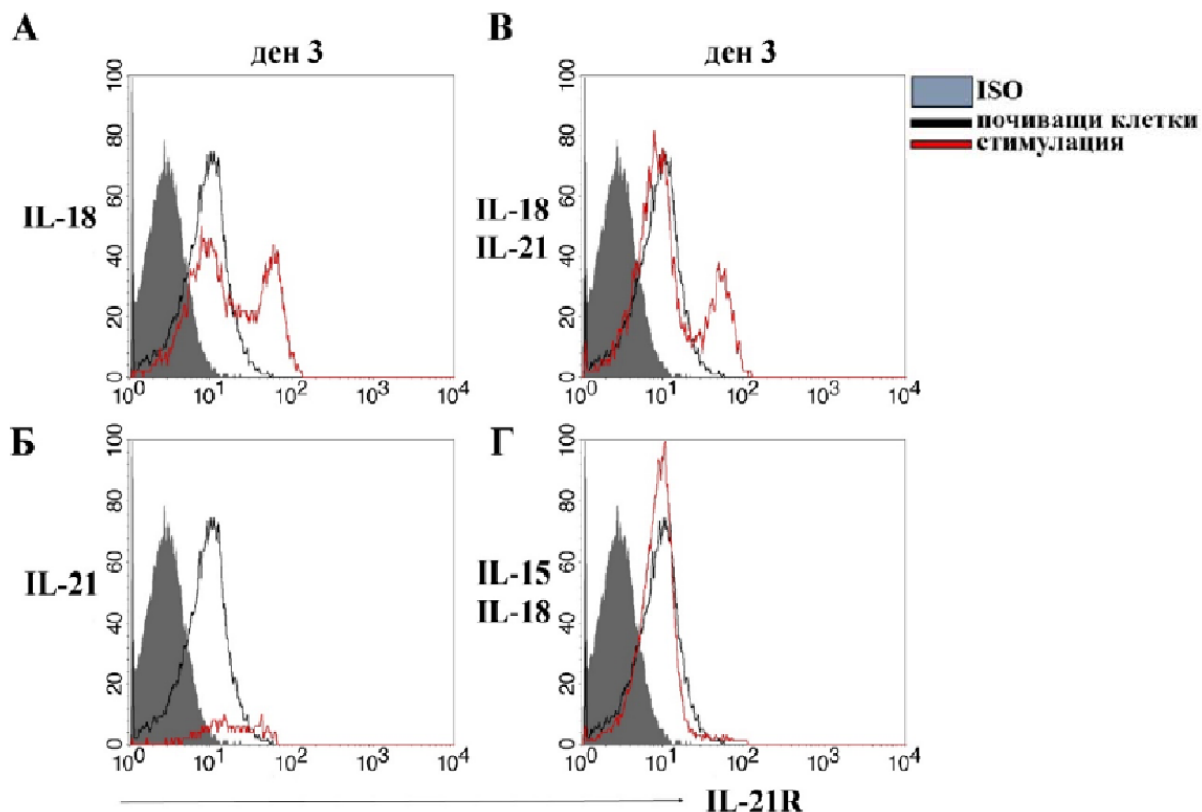
Тъй като IL-12 е силен стимулатор за производството на IFN- $\gamma$ , следваше да проверим дали високата експресия на имунните контролни точки, се дължи на IL-12 или на IFN- $\gamma$ . Стимулирахме NK клетките с IL-15/IL-18 и вместо IL-12 добавихме IFN- $\gamma$  (IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ ). Използвахме три различни концентрации на IFN- $\gamma$  – 0,1 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, а експресията проверихме на ден 4 и ден 6. Както се вижда от **Фигура 9А и Б**, потискането на експресията на PD-1 от IL-12 е интерферон гама независимо. Всички използвани концентрации на IFN- $\gamma$  показваха сходни резултати и по тази причина на **Фигура 9Б** е показана стимулацията с една от използваните концентрации. Екзогенният IFN- $\gamma$  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 9.** 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 експесиран 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 $\mu$ 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.

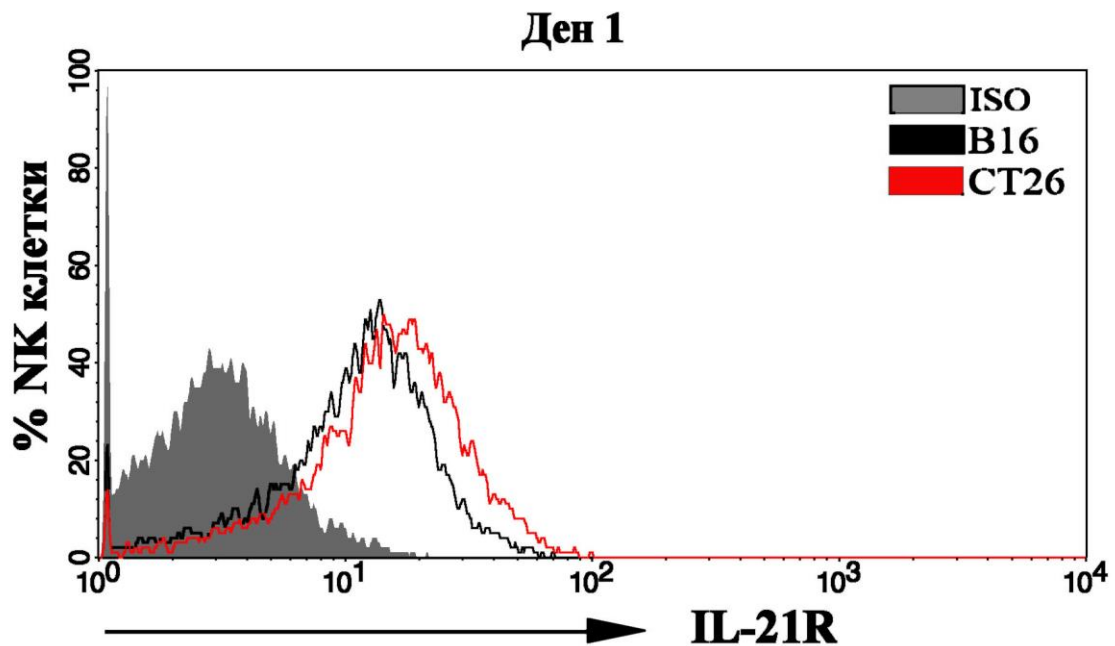
## 6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ НК клетки

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 меланом) 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 10А и 10В**). Единичната стимулация на НК клетките с IL-21 или с IL-15/IL-18 не доведе до повишаване на експресията на рецептора (**Фигура 10Б и 10Г**). Стимулацията на НК клетките с ракови клетъчни линии B16 (клетъчна линия на миша меланом) и CT26 (миши карцином на дебелото черво) само за една нощ на култивиране доведе до увеличаване на експресията на IL-21R (**Фигура 11**).



**Фигура 10.** 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 11.** Експресия на IL-21 рецептора върху НК 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 НК клетки с експресиран рецептор. Проследяване на резултатите на НК клетките, ISO-контрола, НК 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.

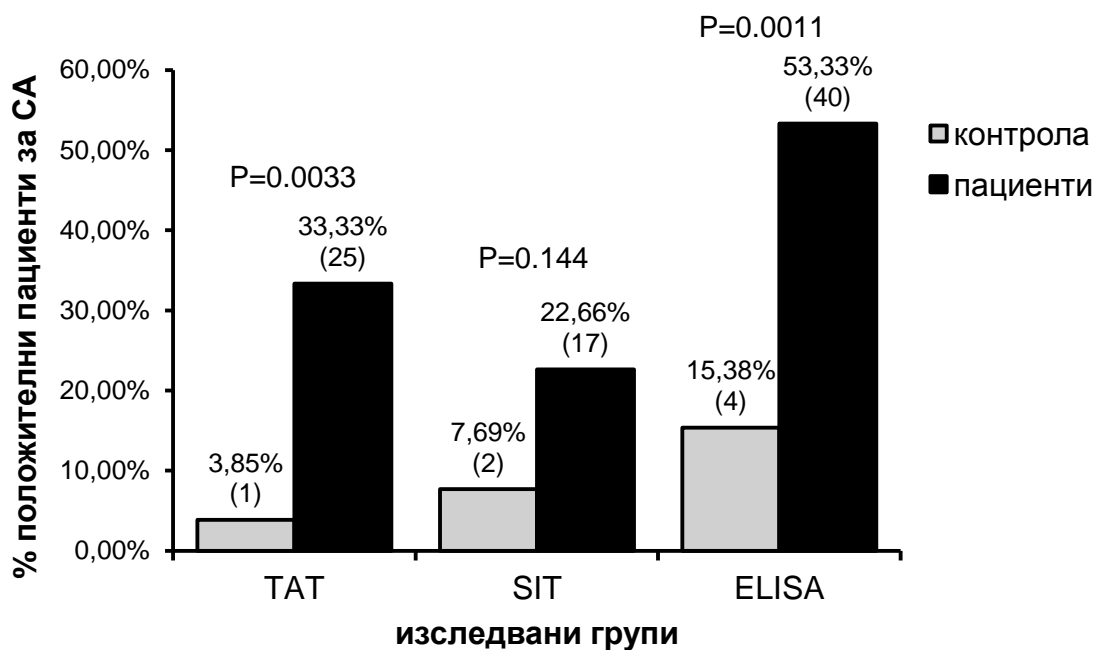
Пациентите са със следните диагнози: първичен стерилитет – 31 души (22 жени и 9 мъже), с вторичен стерилитет, като жените са с хабитуални аборти – 27 души (18 жени и 9 мъже), 17 мъже с възпалителни заболявания като варикоцеле, простатит, крипторхизъм (аномалия на мъжката полова система), боледували от вирусен паротит, 6 от жените с вторичен стерилитет и с хабитуални аборти са изследвани за техния NK профил, като 2 от тях са с висока NK клетъчна активност ( $N \geq 10\%$ ), 4 с висок процент NK 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 доказа статистически значима разлика за честотата на спермоантитела в групата на изследваните пациенти по отношение на контролната група, ( $P < 0,05$ ).

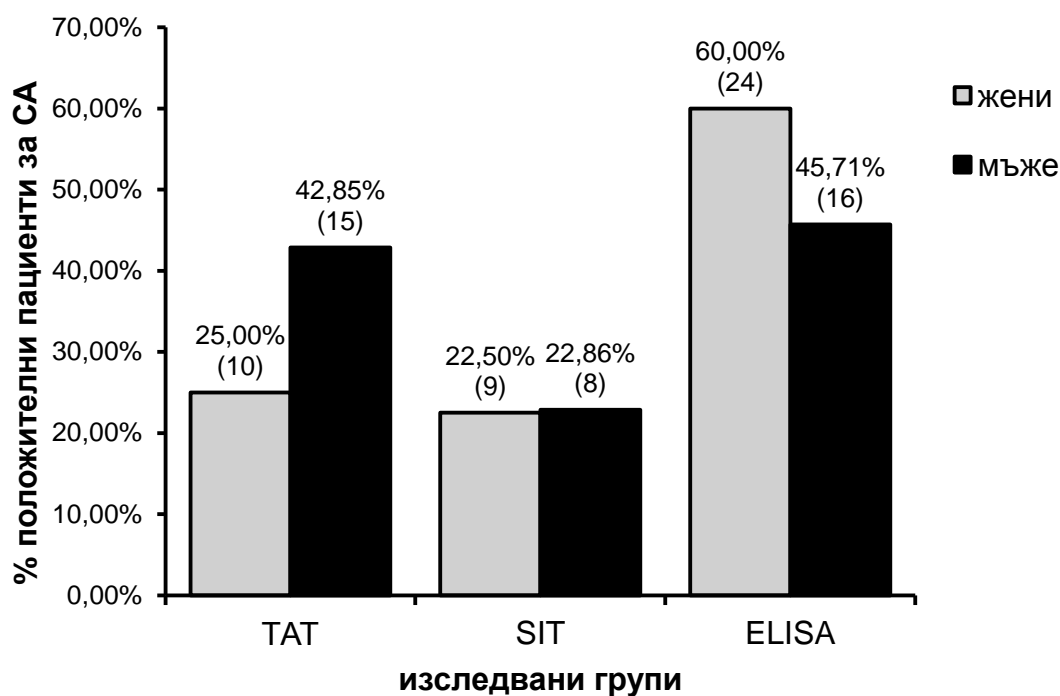
Получените резултати са представени на **Фигура 12**.



**Фигура 12.** Честота на положително реагиращите серуми от изследваните групи по отношение на спермоаглутинаращи (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  $P < 0,05$ ).

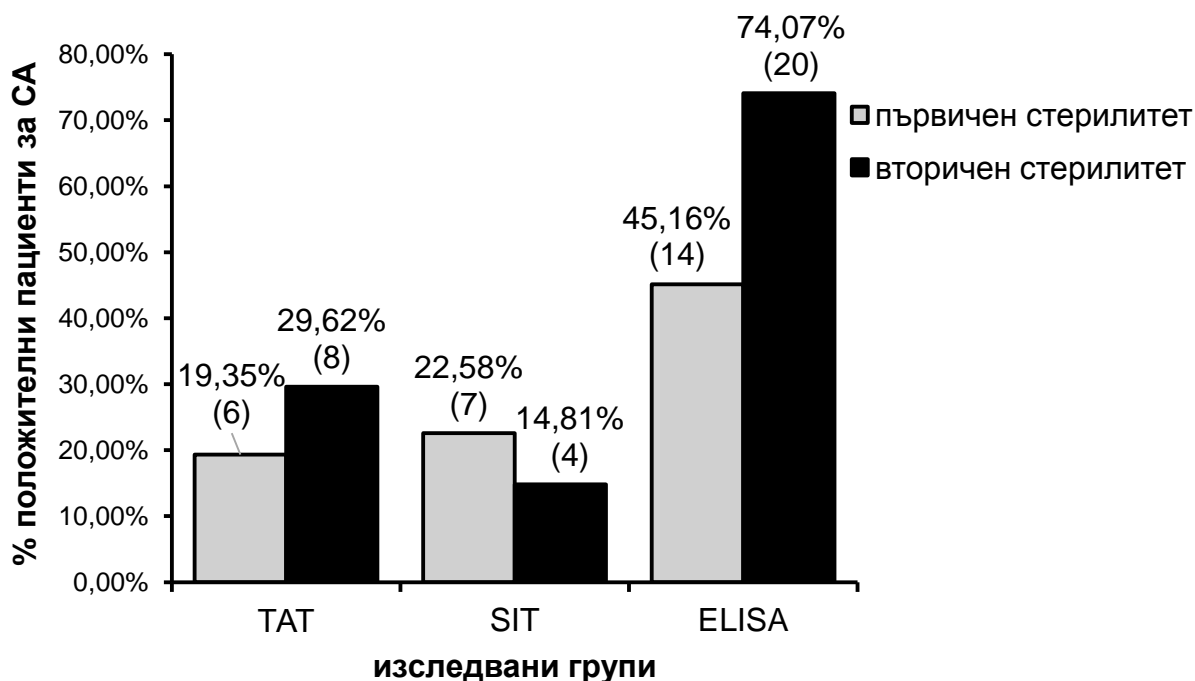
Изследвана беше честотата на положително реагиращите серуми в пациентската група, като бяха сравнени данните за реагиращите в клинично значими стойности на жени и мъже, в трите приложени метода за спермоантитела. След проведените експерименти и анализиране на получените данни не беше установена статистически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

Получените резултати са представени на **Фигура 13**.



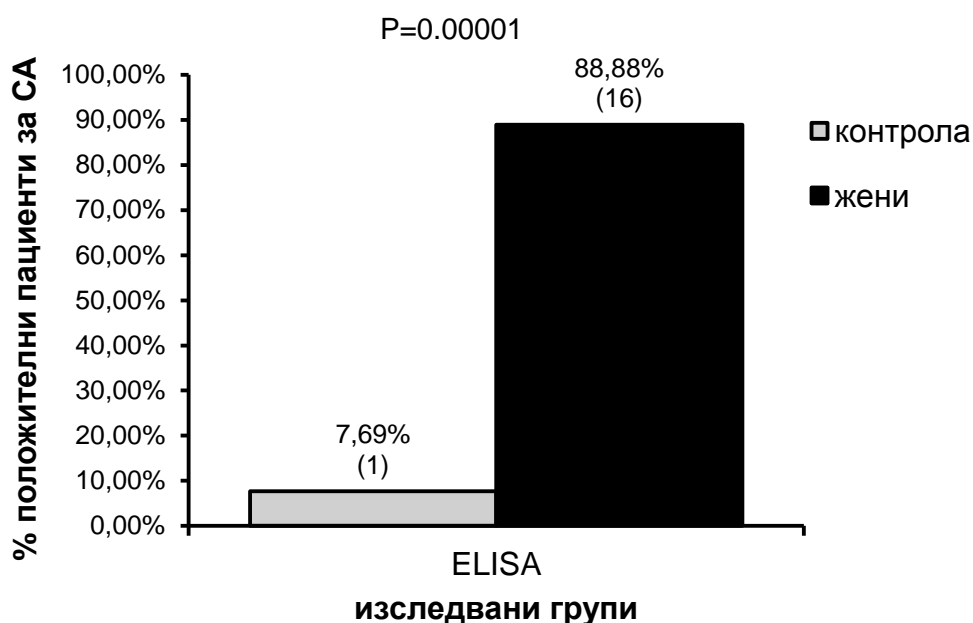
**Фигура 13.** Честота на положително реагиращите серуми от безплодни мъже и жени. Графично е представена процентната честота на положителните резултати и техният брой в скоби по трите метода за изследване на СА, ( $P > 0,05$ ) (TAT –  $P = 0,643$ , SIT –  $P = 1$ , ELISA –  $P = 0,252$ ).

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 14).



**Фигура 14.** 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 15**.



**Фигура 15.** Честота на положително реагиращите жени с вторично безплодие и хабитуални 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 хабитуални 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 10** са представени резултатите на три от шестте пациентки (представителна извадка), а в **Таблица 11** 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<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> от всички NK клетки (референтните граници са N<12%) или процентът CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 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 16 и Фигура 17**).

**Таблица 10.** 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<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> клетки от всички NK клетки, референтните граници са 6.5-13.5%.

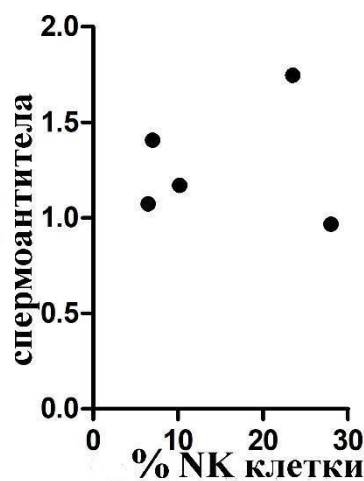
Пациент ♀	% NK клетки	CD16 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	NK клетъчна активност	TAT	SIT	ELISA (Cut off - 0,928)
1	6,46%	<b>20,79%</b>	7%	<b>256</b>	1,102	<b>1,073</b>
2	<b>23,5%</b>	12,1%	<b>11,2%</b>	<2	0,625	<b>1,746</b>
3	10,2%	8,5%	<b>11%</b>	<2	0,410	<b>1,917</b>

**Таблица 11.** 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	<b>Позитивни</b>
Пациент 2	<b>Завишена</b>	В норма	<b>Позитивни</b>
Пациент 3	В норма	<b>Завишени</b>	<b>Позитивни</b>

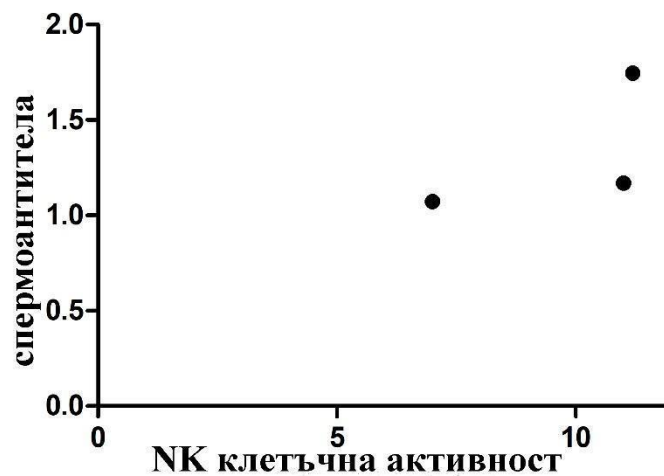
Пациент 4	Завишена	Завишени	Позитивни
Пациент 5	В норма	Завишени	Позитивни
Пациент 6	В норма	Завишени	Позитивни

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 16**). 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.



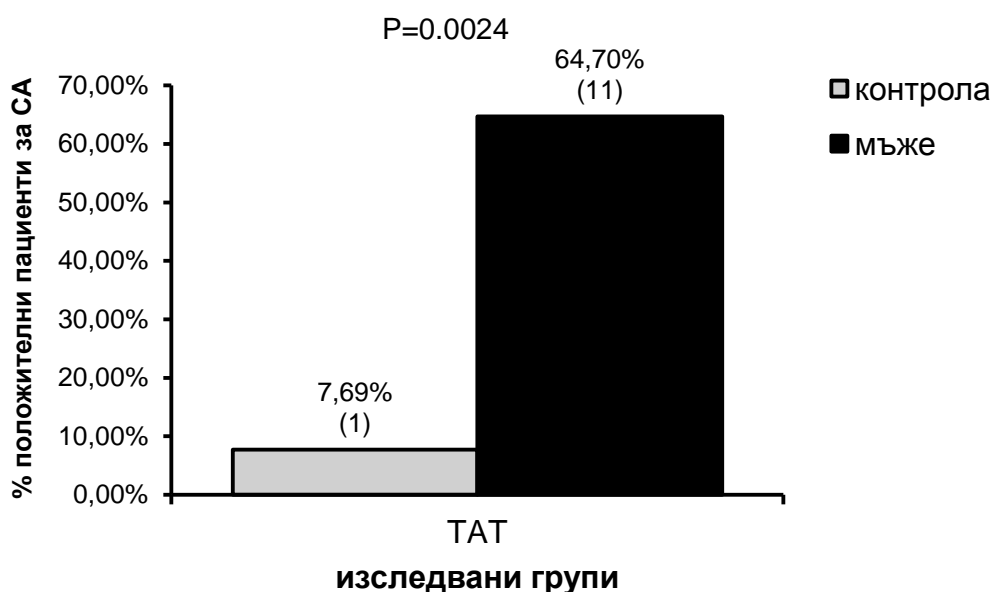
**Фигура 16.** Производство на спермоантитела след прилагане на метода ELISA и % НК клетки при жени с вторичен стерилитет и хабитуални аборти. Графиката е направена с програма GraphPad Prism 5.

Освен, че процентът НК клетки бе повишен при част от пациентките с вторичен стерилитет и хабитуални аборти, но също и НК клетъчната активност (**Фигура 17**), както и производството на спермоантитела. Тази завишена клетъчна активност на клетките естествени убийци повишава и вероятността за възникване на спонтанен аборт.



**Фигура 17.** 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*.

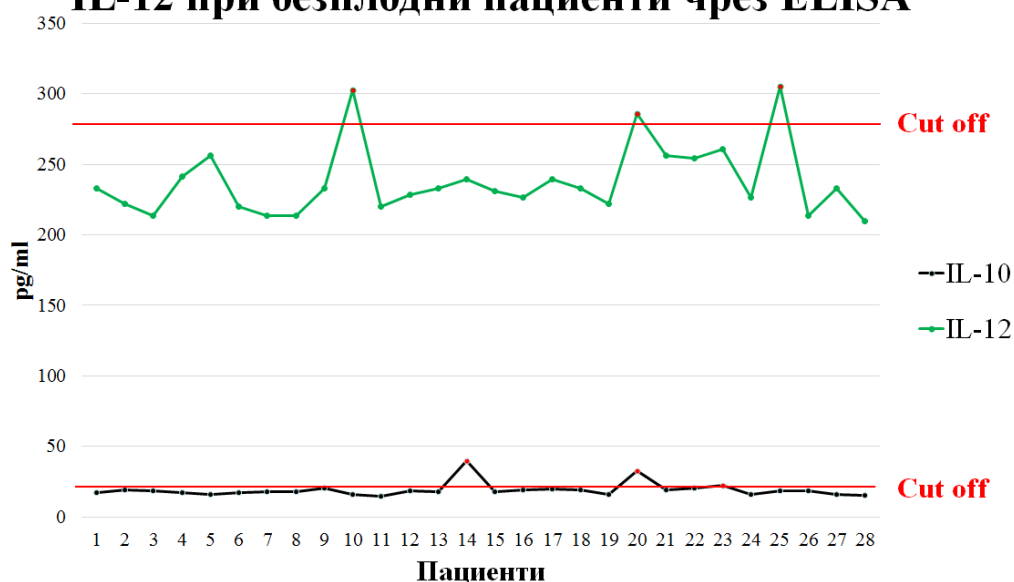
От изследваните 35 мъже, 17 са с възпаление на мъжката репродуктивна система, а останалите са пациенти с първично или вторично безплодие, с нарушения в сперматогенезата и отклонения в спермограмата. Сравнихме получените резултати между тази група и контролната, която включва 13 мъже. Статистическа значима разлика се наблюдаваше след прилагане на спермоаглутинационния тест на Фриберг (ТАТ),  $P < 0.05$  ( $P = 0.0024$ ) (**Фигура 18**).



**Фигура 18.** 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 19** 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 19.** 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 по-висока от Cut off са оцветени в червени точки на графиката.

## **V. ОБСЪЖДАНЕ**

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

За целите и задачите на настоящото изследване беше необходим подходящ протокол за получаване на пречистени НК клетки от опитни животни (лабораторни мишки). За изолиране на НК 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 НК клетъчна популация беше оценена с помощта на поточна цитометрия и при повечето експерименти беше над 90% (**Фигура 2**). 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 НК клетките да се изследва поотделно и в различни комбинации.

### **2. Проследяване на пролиферацията на изолираните от слезка на PL-18KO мишки НК 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 ефektorните лимфоцити – както цитотоксични Т лимфоцити, специфични за определени антигени, така и НК 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, НК 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 имуен 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 (**Фигура 3А и 3Б**). 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 3**, 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- $\kappa$ B сигналните пътища, което води до активиране на експресията на набор от гени, протеинов синтез и въстъпване в делене. Следва да се отбележи, че IL-18 след свързване със своя рецептор задейства NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B и STAT5, води до ефективна пролиферация на NK клетките. Тези

данни за механизма на действие на двата интерлевкина обясняват нашите експериментални резултати (**Фигура 3**) 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 4**). Наличието на закръгляне на клетките и струпвания от клетки-кълстери между ден 3 и 4 от култивирането (**Фигура 4Г**), 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- $\kappa$ B и JAK/STAT. Интерлевкините 15 и 2, които принадлежат към семейство цитокини с 4 алфа спирали, споделят и общи рецептори - IL-2R $\beta$  (CD122) и  $\gamma$ 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  $\gamma$ 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  $\gamma$ c семейството, такъв потенциал е възможен. Описаните ефекти на този цитокин са твърде нееднозначни, като включват както активиране, 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 3В**), повишава се статистически значимо след единична стимулация с IL-18 и двойна стимулация с IL-18/IL-21 (**Фигура 3В**).

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 NK клетките има стимулацията с IL-15/IL-18 (**Фигура 3А и 3Б**). 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 NK клетки при нашествие на патоген или възникване на неоплазми.

При прилагането на комбинации от цитокини отделните им ефекти се наслагват 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 NK клетки инхибира силното пролифериращо действие на IL-15 и IL-18 (**Фигура 3Б**). Това поставя въпроса за биологичното значение на IL-12. Смята се, че основната му роля е да индуцира производството на IFN- $\gamma$  и диференциацията на Th<sub>1</sub> клетките (Okamura et al., 1995; Okamura et al., 1998); на този етап биологичната му роля за вродения имунитет и по-конкретно върху пролиферацията на NK 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 NK клетките. Възможна причина за това е описаното от други автори превръщане на NK клетките в дълго живеещи клетки, наречени „изтощени” NK 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 NK 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” NK 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 6Б и Фигура 7Б**). 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 3А**), за разлика от двойната стимулация, в която присъства и IL-18 и която е високо резултатна в това отношение (**Фигура 3А и 3Б**).

### **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 5 и 8**). Новоизолираните, нестимулирани НК клетки от слезка на IL-18КО мишки имаха ниска експресия на повърхностните маркери NKG2D, CD69, CD107a, CD25, CXCR3 (**Фигура 5А, 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 5А 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 5А и Б**) и увеличаваха експресията на други – CD25, CD107a, CXCR3, NKG2A/С/Е, TIM-3 и LAG-3 (**Фигури 5В, Г, Д, Е и 8Б 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 активиращият рецептор NKG2D е особено важен при задействане на НК отговора спрямо туморните клетки, което потвърждава активизиращите 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 6 и Фигура 7**). 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- $\gamma$  (**Фигура 6А и Фигура 7А**) и на потискащи цитокини като IL-10 (**Фигура 6Б, и Фигура 7Б**). 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 6А, Б и Фигура 7**). В настоящото изследване за първи път се установява, че високото производство на IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ , докато наличието само на един от тези цитокини в средата не води до високо производство на IFN- $\gamma$ .

Трансформираният растежен фактор бета (TGF- $\beta$ ) 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- $\beta$  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 6В**). Според литературни и експериментални данни повишеното количество на TGF- $\beta$  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 5А и Б**) и повишена секреция на TGF- $\beta$  само на ден 5 от култивирането (**Фигура 6В**). Повишена секреция на TNF- $\alpha$  се наблюдава на ден 3 от култивирането след стимулиране на НК клетките с двойна комбинация от цитокини IL-15/IL-18 (**Фигура 6Г**). 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 6Г**). 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- $\gamma$  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 7**). 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 8**). 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 5А и Б**), а повишава тази на рецептора CD25 (IL-2R $\alpha$ ) и на инхибиращия рецептор NKG2A/C/E (**Фигура 5В и 5Е**). 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 5А**).

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 12**.

**Таблица 12.** Промяна на пролиферативната активност, повърхностните молекули и функцията на НК клетките чрез стимулация с цитокини.

	<b>1.Почиващи клетки (resting cells)</b>	<b>2.Интензивно пролифериращи НК клетки</b>	<b>3.IL-12 индуцирани, IL-10 продуциращи НК клетки</b>
Пролиферативна активност	-	+++	+
Цитотоксичност	+++	+++	+
Секреция на цитокини	-	+ -	ко-експресия на IFN- $\gamma$ ++++, IL-10 ++, TNF- $\alpha$ +
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 8А**). 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 5Е**), TIM-3, LAG-3 и (**Фигура 8Б и В**), както и с повишена секреция на IL-10 и IFN- $\gamma$  (**Фигури 6А, 6Б и 7**).

Тъй като добавянето на IL-12 към НК клетки, стимулирани с IL-15/IL-18, индуцира производство и секреция на огромно количество IFN- $\gamma$  (**Фигура 6А и Фигура 7А**), а този цитокин (IFN- $\gamma$ ) действа върху различни типове клетки от имунната система, изглеждаше твърде вероятно IL-12 да упражнява действието си

поне отчасти чрез IFN- $\gamma$ . За да се провери тази хипотеза опитно, бе изследван екзогенният ефект на IFN- $\gamma$  върху IL-15/IL-18 индуцираните НК клетки. За целта включените в този конкретен експеримент НК клетки бяха стимулирани с трите цитокина IL-15/IL-18 и IFN- $\gamma$  (при това бяха приложени различни концентрации на IFN- $\gamma$  – 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 НК клетките с комбинацията IL-15/IL-18/IFN- $\gamma$ . За PD-1 рецептора това е показано на **Фигура 9Б**. Тези резултати сочат, че предизвиканата от IL-12 промяна в експресията на инхибиращите рецептори PD-1, TIM-3 и LAG-3 на НК клетките е IFN- $\gamma$  независима.

Съществуващите в литературата експериментални данни показват, че действието на IL-12 може да бъде IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  нокаут мишки, които стимулираха с IL-15/IL-18, както с комбинацията IL-15/IL-18/IL-12. Когато IL-12 бъде добавен към НК клетки от слезки на нормални мишки, тяхната пролиферация се инхибира, а количеството секретирани IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ , тъй като IL-12 води до същите ефекти върху пролиферацията и при IFN- $\gamma$  нокаут мишки, както и при IL-18 нокаут мишки и екзогенно добавяне на IFN- $\gamma$ . Изводът е, че наблюдаваното при тези експерименти въздействие върху фенотипа на НК клетките най-вероятно се дължи на самия IL-12.

## **6. Проследяване на ефекта на IL-21 върху „изтощени“ НК 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 НК 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 НК клетките с IL-18 или с IL-18/IL-21 (**Фигура 10А 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 10Б**). Пролиферацията на НК клетките и експресията на IL-21 рецептора върху тяхната повърхност се повишават след стимулиране с комбинацията от интерлевкини IL-18/IL-21 (**Фигури 3В и 10А и В**).

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 НК клетките доведе до повишаване на експресията на IL-21 рецептора, и то твърде бързо – само за 1 ден от съвместното култивиране (**Фигура 11**). 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 НК клетките (**Фигура 10 и Фигура 11**). Наличието на лиганд за този рецептор би довело до сигнална трансдукция и е възможност за реактивиране на „изтощените“ НК 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“ НК 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. Kurpysz, P. Попиванов,

Св. Калайджиев и други (Димитрова и Наков, 2003). Най-вероятните причини за развитието на хуморален имуен 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 свръх активирани клетъчни популации, производство на определени интерлевкини и потискане на производството и действието на други (Navrylyuk et al., 2015). Познавайки 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 (TAT), спермоимобилизационен тест на Изожима (SIT) и ELISA (Фигури 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18) и за секрецията на цитокини IL-10 и IL-12 чрез ELISA (Фигура 19), както и процента и активността на NK клетките чрез флоуцитометрия (Фигури 16 и 17), 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 12). Статистически значима разлика бе наблюдавана при пациенти с диагностициран стерилитет спрямо контролната група (фертилни лица) след прилагане на методите TAT и ELISA (Фигура 12). 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 13**). 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 15**).

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 статистическа значима само след прилагане на ELISA ( $P < 0.05$ ) (**Фигура 14**). 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 12**). 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 полесно – 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 NK клетките (**Таблицы 10 и 11 и Фигура 17**) (Moffett et al., 2004).

NK 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 антитяло-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 16, Фигура 17 и Фигура 19**), производство на спермоантитела и секреция на интерлевкини при мъже с възпалителни заболявания (**Фигура 19**). 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 хабитуални 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 16 и 17, Таблицы 10 и 11**), 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 по-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. Образоването 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 така че и двете направени от нас секрецията на IL-10 е висока (**Фигури 6Б и 7Б**), както и че между тях има функционална връзка – наличието на IL-12 има отношение към производството на IL-10 (**Фигури 6Б и 7Б**). 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 важноста 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- $\gamma$  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 18 и 19**). По отношение на установяването на спермоантитела чрез спермоаглутинационен тест на Фриберг (TAT), спермоимобилизационния тест на Изожима (SIT), ELISA и секрецията 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 секрецията 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 НК клетките бе установена при 5 жени с вторичен стерилитет и хабитуални 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 секрецията на IL-10 и IL-12 (**Фигури 16 и 17, Таблици 10 и 11**). 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 NK клетките (чрез поточна цитометрия) (**Фигури 13, 14, 16, 17 и 19, Таблици 10 и 11**). Много вероятна причина за наличие на активирани децидуални NK клетки е тяхната активация от цитокини или формираната от нас хипотеза за активация на NK клетките чрез произведени спермоантитела (**Фигура 20**). Процесите са комплексни, така че и двете направени от нас предположения могат да действат съвместно, за да доведат до повишен процент и активация на NK клетките и да отхвърлят плода. Разбира се, в този процес на активация имат роля и други клетки като Th<sub>1</sub> клетките, макрофаги и други, но NK 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 Th<sub>1</sub> цитокина IL-12, най-вероятно причината за активираните NK субпопулации и повишеният брой клетки, се дължи на друг интерлевкин и/или на произведените и установени от нас спермоантитела (**Фигури 15, 16, 17, 18 и 19**).

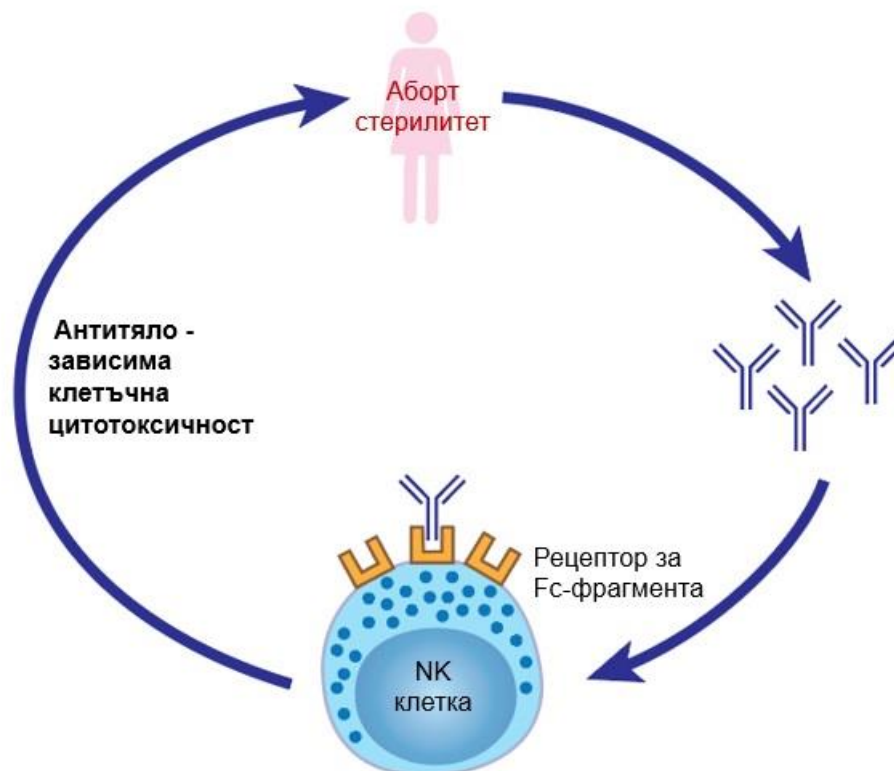
Получените от нас резултати, сравнени с литературни източници, показват, че повишената секреция на цитокини от мъжете с инфертилитет биха могли да бъдат една от причините за техните неуспехи, докато при женския пол повишено съдържание на изследваните цитокини се открива рядко, но наличието на спермоантитела би могло да доведе до негативни ефекти по други механизми, например чрез активиране на NK клетките за антияло-зависима клетъчна цитотоксичност, което изглежда вероятно предвид наблюдавания повишен брой и свръх активация на NK 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 19**). 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.

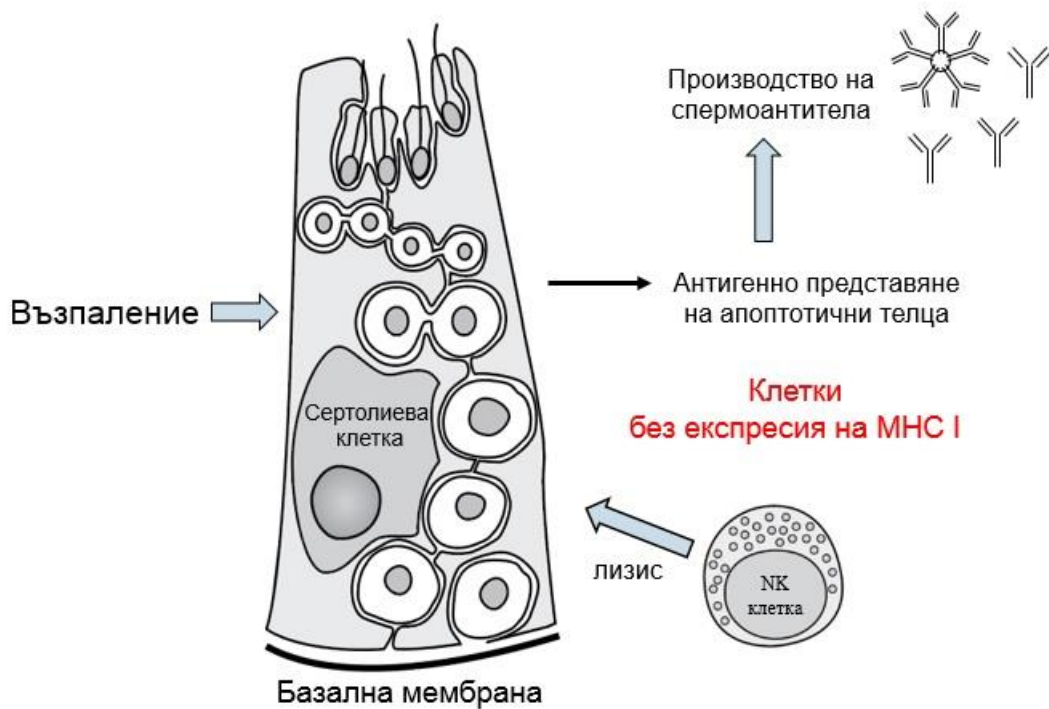
Въз основа на проведеното изследване нашата хипотеза е, че високата концентрация на спермоантитела при жени с вторичен стерилитет и/или хабитуални аборти може да е свързана и с повишен брой и активност на НК клетките. Смятаме, че е възможно тези спермоантитела да активират клетките естествени убийци, 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 20**).



**Фигура 20.** Връзка между производството на спермоантитела при жени с диагностициран стерилитет и активиране на NK 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 NK клетъчна активност и атака на мъжките герминативни клетки, които не експресират или експресират в много ниска степен МНС клас I молекули (**Фигура 21**) (Roberts et al., 1992; Del Zotto et al., 2017). В резултат на цитотоксичното действие, упражнено от NK 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 имунен отговор срещу представените фагоцитирани автоантигени на мъжките герминативни клетки. Формулираните от нас две хипотези (**Фигури 20 и 21**), изискват допълнително потвърждение, чрез анализ на

NK 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 21.** 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) NK 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 NK клетките, докато IL-12 с диференциацията им. Установено е, че клетките естествени убийци в условия на пролиферация имат ефекторна функция, а дълго живеещите NK клетки, индуцирани от IL-12, са вероятно „изтощени“ клетки, които могат да бъдат реактивирани. Тези NK клетки силно експресират имунни контролни точки, което в зависимост от средата им дава възможност да играят супресорна роля.

Наличието на активирани NK клетки в определени периоди от бременността е причина за спонтанни аборти. По този начин NK 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- $\gamma$  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- $\beta$ , TNF- $\alpha$  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. ЛИТЕРАТУРА

1. Димитрова, Д. и Наков, Л.. Терапевтични подходи при безплодието, свързано с продукцията на спермоантитела. Акушерство и гинекология, Vol. 42, №6, 2003, 28-31. (SJR за 2003 - 0,102).
2. Димитрова, Д. Сперматозоидните антигени като обект за разработване на контрацептивна ваксина. Андрология, Vol. 13, №1, 2004, 9-18.
3. Кехайов, И. и Кюркчиев, С. Компендиум по имунология. Венимекс, София, 1999.
4. Конова, Е., Тодорова, К., Луканов, Ц. НК лимфоцити при загуба на плода, асоциирани с автоимунни тиреоидни заболявания. Медицинфо, брой 2/2009.
5. Манолова, И., Иванова, М., Александрова, Е., Стоилов, Р. Роля на Трансформация Растежен Фактор (TGF) - 1 в имунната регулация и автоимунитета. Ревматология, XX, 2012, бр.2:17-23.
6. Маркова, М., Маринова, Цв. (2006). Стволови клетки и лимфопоеза (обзор). Обща медицина 8 (2): 39-43.
7. Калайджиев, С., Димитрова, Д. и Наков, Л. Приложение на SIT и ELISA за откриване на серумни спермоантитела у безплодни пациенти. Акушерство и гинекология, 2'2000, Volume 39, ISSN 0324-0959.
8. Калев, Д. Имунологична панорама на недребноклетъчния белодробен карцином - между "изпълзването" и "прицелването". Inspigo, брой № 2 (40) / април 2017.
9. Adib Rad, H., Basirat, Z., Mostafazadeh, A., Faramarzi, M., Bijani, A., Nouri, H.R., Soleimani Amiri, S. Evaluation of peripheral blood NK cell subsets and cytokines in unexplained recurrent miscarriage. J Chin Med Assoc. 2018 Dec;81(12):1065-1070.
10. Adunyah, S.E., Wheeler, B.J., Cooper, R.S. Evidence for the involvement of LCK and MAP kinase (ERK-1) in the signal transduction mechanism of interleukin-15. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Mar 27; 232(3):754-8.
11. Agematsu, K. Memory B cells and CD27. Histol Histopathol. 2000 Apr; 15(2):573-6.
12. Ahn, W.S., Kim, D.J., Chae, G.T., Lee, J.M., Bae, S.M., Sin, J.I., Kim, Y.W., Namkoong, S.E., Lee, I.P. Natural killer cell activity and quality of life were

- improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer*. 2004 Jul-Aug;14(4):589-94.
13. Airoidi, I., Guglielmino, R., Carra, G., Corcione, A., Gerosa, F., Taborelli, G., Trinchieri, G., Pistoia, V. The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes. *Haematologica*. 2002 Apr; 87(4):434-42.
  14. Alexander, W.S. and Hilton, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:503-29.
  15. Anderson, D.M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem*. 1995 Dec 15; 270(50):29862-9.
  16. Anguille, S., Smits, E.L., Cools, N., Goossens, H., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F. Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties. *J Transl Med*. 2009 Dec 18; 7:109.
  17. Aragane, Y., Riemann, H., Bhardwaj, R.S., Schwarz, A., Sawada, Y., Yamada, H., Luger, T.A., Kubin, M., Trinchieri, G., Schwarz, T. IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol*. 1994 Dec 15; 153(12):5366-72.
  18. Archana, S. S., Selvaraju, S., Binsila, B. K., Arangasamy, A., Krawetz, S. A. Immune regulatory molecules as modifiers of semen and fertility: A review. *Mol Reprod Dev* 2019 Nov;86(11):1485-1504.
  19. Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A., Trinchieri, G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol*. 1998, 160, 5936-5944.
  20. Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Löhning, M., Bräuer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., Hamann, A. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997, 385, 81-83.

21. Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U and Waldmann, T.A. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF- $\kappa$ B site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3; 95(5): 2452-2457.
22. Azoury, S.C., Straughan, D.M., Shukla, V. Immune Checkpoint Inhibitors for Cancer Therapy: Clinical Efficacy and Safety. *Curr Cancer Drug Targets*. 2015; 15(6):452-62.
23. Bacon, C.M., Petricoin, E.F 3rd., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., Lerner, A.C., Johnston, J.A., O'Shea, J.J. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 1; 92(16):7307-11.
24. Beadling, C and Slifka, M.K. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006 Jan-Feb; 54(1):15-24.
25. Becskei, A., Grusby, M.J. Contribution of IL-12R mediated feedback loop to Th1 cell differentiation. *FEBS Lett*. 2007 Nov 13;581(27):5199-206.
26. Beldi-Ferchiou, A. and Caillat-Zucman, S. Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 12;18(10).
27. Berg, J., Vrohling, M., Haller, S., Haimovici, A., Kulig, P., Sledzinska, A., Weller, M. and Becher, B. Intratumoral IL-12 combined with CTLA-4 blockade elicits T cell-mediated glioma rejection. *J Exp Med*. 2013 Dec 16; 210(13): 2803–2811.
28. Bhatt, S., Matthews, J., Parvin, S., Sarosiek, K.A., Zhao, D., Jiang, X., Isik, E., Letai, A., Lossos, I.S. Direct and immune-mediated cytotoxicity of interleukin-21 contributes to antitumor effects in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2015 Sep 24; 126(13):1555-64.
29. Bhatia, S., Curti, B., Ernstoff, M.S., Gordon, M., Heath, E.I., Miller, W.H. Jr., Puzanov, I., Quinn, D.I., Flaig, T.W., VanVeldhuizen, P., Byrnes-Blake, K., Freeman, J.A., Bittner, R., Hunder, N., Souza, S., Thompson, J.A. Recombinant interleukin-21 plus sorafenib for metastatic renal cell carcinoma: a phase 1/2 study. *J Immunother Cancer*. 2014 Jan 27; 2:2.
30. Bi, J. and Tian, Z. NK Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2017 Jun 28;8:760.

31. Bluestone, J.A. Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol* March 1, 1997, 158 (5) 1989-1993.
32. Bolourian, A and Mojtahedi, Z. Possible damage to immune-privileged sites in natural killer cell therapy in cancer patients: side effects of natural killer cell therapy. *Immunotherapy*. 2017 Mar;9(3):281-288.
33. Bolourian, A and Mojtahedi, Z. Blocking natural killer cells in testicular torsion may prevent autoimmunity against low expressing major histocompatibility complex class I germ cells. *Indian J Med Res*. 2018 Feb;147(2):128-131.
34. Boni, C., Fisicaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., Laccabue, D., Zerbini, A., Cavalli, A., Missale, G., Bertoletti, A., Ferrari, C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol*. 2007 Apr; 81(8):4215-25.
35. Borger, P., Kauffman, H.F., Postma, D.S., Esselink, M.T., Vellenga, E. Interleukin-15 differentially enhances the expression of interferon-gamma and interleukin-4 in activated human (CD4+) T lymphocytes. *Immunology*. 1999 Feb; 96(2):207-14.
36. Borst, J., Hendriks, J., Xiao, Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol*. 2005 Jun; 17(3):275-81.
37. Bose, C.K. Immune Checkpoint Blockers and Ovarian Cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2017 Apr-Jun; 38(2):182-189.
38. Bost, K.L., Ramp, W.K., Nicholson, N.C., Bento, J.L., Marriott, I., Hudson, M.C. Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J. Infect. Dis*. 1999, 180, 1912-1920.
39. Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Nutt, S.L. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol*. 2004 Feb 15; 172(4):2048-58.
40. Brazdova, A., Senechal, H., Peltre, G., Poncet, P. Immune Aspects of Female Infertility *Int J Fertil Steril* .Apr-Jun 2016;10(1):1-10.
41. Brombacher, F, Kastelein R.A, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol*. 2003, 24, 207-212.

42. Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A.C., Mages, H.W., Lam, K.P., Coyle, A.J., Kroczek, R.A., Hutloff, A. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol.* 2008 Jan 15; 180(2):774-82.
43. Burton, J.D., Bamford, R.N., Peters, C., Grant, A.J., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., Waldmann, T.A. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24; 91(11):4935-9.
44. Calleja-Agius, J. and Brincat, M. P. Recurrent miscarriages: What is the role of cytokines? *Gynecol Endocrinol .* 2008 Dec;24(12):663-8.
45. Carotta, S. Targeting NK Cells for Anticancer Immunotherapy: Clinical and Preclinical Approaches. *Front Immunol.* 2016;7:152.
46. Caruso, R., Fina, D., Peluso, I., Stolfi, C., Fantini, M.C., Gioia, V., Caprioli, F., Del Vecchio Blanco, G., Paoluzi, O.A., Macdonald, T.T., Pallone, F., Monteleone, G. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3 $\alpha$ , by gut epithelial cells. *Gastroenterology.* 2007 Jan; 132(1):166-75.
47. Ceeraz, S., Nowak, E.C, Burns, C.M, Noelle, R.J. Immune checkpoint receptors in regulating immune reactivity in rheumatic disease. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(5):469.
48. Cerwenka, A., Baron, J.L., Lanier, L.L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25; 98(20):11521-6. Epub 2001 Sep 18.
49. Chapuis, A.G., Ragnarsson, G.B., Nguyen, H.N., Chaney, C.N., Pufnock, J.S., Schmitt, T.M., Duerkopp, N., Roberts, I.M., Pogosov, G.L., Ho, W.Y., Ochsenreither, S., Wölfl, M., Bar, M., Radich, J.P., Yee, C., Greenberg, P.D. Transferred WT1-reactive CD8<sup>+</sup> T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med.* 2013 Feb 27; 5(174):174ra27.
50. Chatterjee, P., Patsoukis, N., Freeman, G.J., Boussiotis, V.A. Distinct roles of PD-1 ITSM and ITIM in regulating interactions with SHP-2, ZAP-70 and Lck, and PD-1-mediated inhibitory function. *Blood* (2013)122:19.

51. Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., Riley, J.L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004 Jul 15; 173(2):945-54.
52. Collison, L.W and Vignali, D.A. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev.* 2008 Dec; 226:248-62.
53. Cooper, A.M. and Khader, S.A. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):33-8.
54. Coquet, J.M., Middendorp, S., van der Horst, G., Kind, J., Veraar, E.A., Xiao, Y., Jacobs, H., Borst, J. The CD27 and CD70 costimulatory pathway inhibits effector function of T helper 17 cells and attenuates associated autoimmunity. *Immunity.* 2013 Jan 24; 38(1):53-65.
55. Cristiani, C.M., Palella, E., Sottile, R., Tallero, R., Garofalo, C., Carbone, E. Human NK Cell Subsets in Pregnancy and Disease: Toward a New Biological Complexity. *Front Immunol.* 2016 Dec 27;7:656.
56. Croce, M., Rigo, V., Ferrini, S. IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *J Immunol Res.* 2015; 2015:696578.
57. Croft, M., So, T., Duan, W., Soroosh, P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev.* 2009 May; 229(1):173-91.
58. Curti, B.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwssen, T., Fox, B.A., Moudgil, T., Miller, W., Haley, D., Coffey, T., Fisher, B., Delanty-Miller, L., Rymarchyk, N., Kelly, T., Crocenzi, T., Bernstein, E., Sanborn, R., Urba, W.J., Weinberg, A.D. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res.* 2013 Dec 15; 73(24):7189- 7198.
59. Daher, S., de Arruda Geraldine Denardi, K., Blotta, M.H., Mamoni, R.L., Reck, A.P., Camano, L., Mattar, R. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2004 Jun;62(1-2):151-7.
60. D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., Chizzonite, R., Wolf, S.F and Trinchieri, G. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin

- 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* 1992 Nov 1; 176(5):1387-98.
61. Dallal, P. M., Son, Y. I., Mailliard, R., Lotze, M. T. Interleukin-18 markedly augments NK cell proliferation and cytotoxicity when combined with low-dose interleukin-2. Volume 191, ISSUE 4, SUPPLEMENT 1, S16, October 01, 2000.
62. Das, M., Zhu, C., Kuchroo, V.K. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev.* 2017 Mar; 276(1):97-111.
63. Deenick, E.K., Avery, D.T., Chan, A., Berglund, L.J., Ives, M.L., Moens, L., Stoddard, J.L., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Tsumura, M., Kobayashi, M., Arkwright, P.D., Averbuch, D., Engelhard, D., Roesler, J., Peake, J., Wong, M., Adelstein, S., Choo, S., Smart, J.M., French, M.A., Fulcher, D.A., Cook, M.C., Picard, C., Durandy, A., Klein, C., Holland, S.M., Uzel, G., Casanova, J.L., Ma, C.S., Tangye, S.G. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med.* 2013 Nov 18; 210(12):2739-53.
64. De Rose, R., Fernandez, C.S., Hedger, M.P., Kent, S.J., Winnall, W.R. Characterisation of macaque testicular leucocyte populations and T-lymphocyte immunity. *J Reprod Immunol.* 2013 Dec;100(2):146-56.
65. de Toter, D., Meazza, R., Zupo, S., Cutrona, G., Matis, S., Colombo, M., Balleari, E., Pierri, I., Fabbi, M., Capaia, M., Azzarone, B., Gobbi, M., Ferrarini, M., Ferrini, S. Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2006 May 1; 107(9):3708-15.
66. Del Zotto, G., Marcenaro, E., Vacca, P., Sivori, S., Pende, D., Della Chiesa, M., Moretta, F., Ingegnere, T., Mingari, M.C., Moretta, A., Moretta, L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017 Mar;92(2):100-114.
67. Di Carlo, E., Comes, A., Orenco, A.M., Rosso, O., Meazza, R., Musiani, P., Colombo, M.P., Ferrini, S. IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN-gamma-dependent CXC chemokines in syngeneic mice. *J Immunol.* 2004 Feb 1; 172(3):1540-7.

68. Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., Raulet, D.H. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 2001 Sep 13; 413(6852):165-71.
69. Dimitrova, D. Kalaydjiev, S., Hristov, L., Nikolov, K., Boyadjiev, T., Nakov, L. Antichlamydial and antisperm antibodies in patients with chlamydial infections. *AJRI* 2004; 52:330-336.
70. Dimitrova, D., Kalaydjiev, S., Mendizova, A., Piryova, E., Nakov, L. Circulating antibodies to human spermatozoa in ulcerative colitis. *Fertility and Sterility*, Vol. 84, № 5, 2005, 1533-1535.
71. Dimitrova, D., Lazarov, V., Hadjiolova, R., Dimova, I., Petkova, N., Krastev, Z. Association between *Helicobacter pylori* infection and presence of anti-sperm antibodies. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2017, Volume 31:1, pages 1-8
72. Dinarello, C.A., Novick, D., Kim, S., Kaplanski, G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 2013 Oct 8; 4:289.
73. Doyle, S.L., Campbell, M., Ozaki, E., Salomon, R.G., Mori, A., Kenna, P.F., Farrar, G.J., Kiang, A.S., Humphries, M.M., Lavelle, E.C., O'Neill, L.A., Hollyfield, J.G., Humphries, P. NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components. *Nat Med*. 2012 May; 18(5):791-8.
74. Dubois, S., Patel, H.J., Zhang, M., Waldmann, T.A., Müller, J.R. Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> T cells and its antitumor action. *J Immunol*. 2008 Feb 15; 180(4):2099-106.
75. Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., Bird, C., Wadhwa, M., Moore, M., Burns, C., Thorpe, R., Stebbings, R. Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4<sup>+</sup> effector memory T-cells. *Br J Pharmacol*. 2010 Oct; 161(3):512-26.
76. Ellery, J.M and Nicholls, P.J. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Feb; 13(1):27-40.
77. Enk, J. and Mandelboim, O. The role of natural cytotoxicity receptors in various pathologies: emphasis on type I diabetes. *Front Immunol*. 2014 Jan 20; 5:4.

78. Farag, S.S and Caligiuri, M.A. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006 May; 20(3):123-37.
79. Feher, A.M and Bajory, Z. A review of main controversial aspects of acute testicular torsion. *J Acute Dis* 2016; 5: 1-8.
80. Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., Caligiuri, M.A. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2001 Jan 15; 193(2):219-31.
81. Fijak, M and Meinhardt, A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev.* 2006 Oct;213:66-81.
82. Flies, A.S., Blackburn, N.B., Lyons, A.B., Hayball, J.D., Woods, G.M. Comparative Analysis of Immune Checkpoint Molecules and Their Potential Role in the Transmissible Tasmanian Devil Facial Tumor Disease. *Front Immunol.* 2017 May 3; 8:513.
83. French, A.R., Holroyd, E.B., Yang, L., Kim, S., Yokoyama, W.M. IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation. *Cytokine.* 2006 Sep;35(5-6):229-34.
84. Gagnon, J., Ramanathan, S., Leblanc, C., Ilangumaran, S. Regulation of IL-21 signaling by suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in CD8 (+) T lymphocytes. *Cell Signal.* 2007 Apr; 19(4):806-16.
85. Galy, A., Travis, M., Cen, D., Chen, B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995 Oct; 3(4):459-73.
86. Gately, M.K., Carvajal, D.M., Connaughton, S.E., Gillessen, S., Warriar, R.R., Kolinsky, K.D., Wilkinson, V.L., Dwyer, C.M., Higgins, G.F. Jr., Podlaski, F.J., Faherty, D.A., Familletti, P.C., Stern, A.S., Presky, D.H. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 31; 795:1-12.
87. Gazzinelli, R.T., Wyszocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., Sher, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma

- synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1994, 1536, 2533-2543.
88. Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N.F., Ma, W., Kumar, A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009 Mar;8(1):40-52.
  89. Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D., Allen, H. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature.* 1997 Apr 10; 386(6625):619-23.
  90. Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L.S. and Anderson, D.M. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 1995 August 1; 14(15): 3654-3663.
  91. Giannubilo, S.R., Landi, B., Pozzi, V., Sartini, D., Cecati, M., Stortoni, P., Corradetti, A., Saccucci, F., Tranquilli, A.L., Emanuelli, M. The involvement of inflammatory cytokines in the pathogenesis of recurrent miscarriage. *Cytokine.* 2012 Apr;58(1):50-6.
  92. Gravisaco, M.J., Mongini, C., Alvarez, E., Ruybal, P., Escalada, A., Sanchez-Lockhart, M., Hajos, S., Waldner, C. IL-2, IL-10, IL-15 and TNF are key regulators of murine T-cell lymphoma growth. *Int J Mol Med.* 2003 Oct; 12(4):627-32.
  93. Greenberg, A.H. The origins of the NK cell, or a Canadian in King Ivan's court. *Clin Invest Med.* 1994 Dec; 17(6):626-31.
  94. Gowda, A., Roda, J., Hussain, S.R., Ramanunni, A., Joshi, T., Schmidt, S., Zhang, X., Lehman, A., Jarjoura, D., Carson, W.E., Kindsvogel, W., Cheney, C., Caligiuri, M.A., Tridandapani, S., Muthusamy, N., Byrd, J.C. IL-21 mediates apoptosis through up-regulation of the BH3 family member BIM and enhances both direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity in primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Blood.* 2008 May 1; 111(9):4723-30.
  95. Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., Spies, T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T

- cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8; 96(12):6879-84.
96. Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., Spies, T. Costimulation of CD8 alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001 Mar; 2(3):255-60.
97. Grosso, J.F., Kelleher, C.C., Harris, T.J., Maris, C.H., Hipkiss, E.L., De Marzo, A., Anders, R., Netto, G., Getnet, D., Bruno, T.C., Goldberg, M.V., Pardoll, D.M., Drake, C.G. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest*. 2007 Nov; 117(11):3383-92.
98. Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R.A., Sato, V., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science*. 1997 Jan 10; 275(5297):206-9.
99. Gu, H., Maeda, H., Moon, J.J., Lord, J.D., Yoakim, M., Nelson, B.H., Neel, B.G. New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct; 20(19):7109-20.
100. Gupta, R, Li, W., Yan, X. J., Barrientos, J., Kolitz, J.E., Allen, S. L., Rai, K., Chiorazzi, N. and Mongini, P. K. A Mechanism for IL-15-driven B-CLL cycling: Roles for AKT and STAT5 in modulating Cyclin D2 and DNA damage response proteins. *J Immunol*. 2019 May 15; 202(10): 2924–2944.
101. Habib, T., Senadheera, S., Weinberg, K., Kaushansky, K. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry*. 2002 Jul 9; 41(27):8725-31.
102. Hamza, T., John B. Barnett and Bingyun Li. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. *Int. J. Mol. Sci*. 2010, 11(3), 789-806.
103. Hanahan, D and Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4; 144(5):646-74.

104. Hastings, W.D., Anderson, D.E., Kassam, N., Koguchi, K., Greenfield, E.A., Kent, S.C., Zheng, X.X., Strom, T.B., Hafler, D.A., Kuchroo, V.K. TIM-3 is expressed on activated human CD4<sup>+</sup> T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol.* 2009 Sep; 39(9):2492-501.
105. Havrylyuk, A., Chopyak, V., Boyko, Y., Kril, I. and Kurpisz, M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent Eur J Immunol.* 2015; 40(3): 337–344.
106. He, L.Z., Prostack, N., Thomas, L.J., Vitale, L., Weidlick, J., Crocker, A., Pilsmaier, C.D., Round, S.M., Tutt, A., Glennie, M.J., Marsh, H., Keler, T. Agonist anti-human CD27 monoclonal antibody induces T cell activation and tumor immunity in human CD27-transgenic mice. *J Immunol.* 2013 Oct 15; 191(8):4174-83.
107. Hendriks, J., Gravesteyn, L.A., Tesselaar, K., van Lier, R.A., Schumacher, T.N., Borst, J. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol.* 2000 Nov; 1(5):433-40.
108. Horst, Ibelgauf. Cytokines in Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia Version 31.4 (Spring/Summer 2013 Edition).
109. Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M. and Martínez-Chapa, S. O. Advantages, Disadvantages and Modifications of Conventional ELISA. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, Springer, December 2017, pp 67-115.
110. Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., Powell, J.D., Pardoll, D.M., Drake, C.G., Vignali, D.A. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004 Oct; 21(4):503-13.
111. Huntington, N.D., Puthalakath, H., Gunn, P., Naik, E., Michalak, E.M., Smyth, M.J., Tabarias, H., Degli-Esposti, M.A., Dewson, G., Willis, S.N., Motoyama, N., Huang, D.C., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., Strasser, A. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol.* 2007 Aug; 8(8):856-63.
112. Ianchi?, R.I., Voznesens'ka, TIu., Shepel', O.A. [Cytokines and their role in reproductive system]. *Fiziol Zh.* 2007; 53(3):82-90.

113. Ilangumaran, S., Ramanathan, S. and Rottapel, R. Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Semin Immunol.* 2004 Dec;16(6):351-65.
114. Imada, K., Bloom, E.T., Nakajima, H., Horvath-Arcidiacono, J.A., Udy, G.B., Davey, H.W. et al. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med.* 1998; 188:2067-74.
115. Jacobo, P., Guazzone, V.A., Theas, M.S., Lustig, L. Testicular autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2011 Feb;10(4):201-4.
116. Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E. Jr., Murphy, K.M. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med.* 1995 May 1;181(5):1755-62.
117. Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Kimura, R., Miyagi, T., Mochizuki, K., Sasaki, Y., Hayashi, N. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer.* 2003 Apr 10; 104(3):354-61.
118. Johnston, J.A., Bacon, C.M., Finbloom, D.S., Rees, R.C., Kaplan, D., Shibuya, K. et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:8705-9.
119. Kalaydjiev, S., Dimitrova, D., Nenova, M., Peneva, S., Dikov, I., Nakov, L. Serum sperm antibodies are not elevated after mumps orchitis. *Fertil. Steril.* Vol. 77, №1, 2002, 76-82.
120. Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Crespo, G., Drozdowskyj, A., Aldeguer, E., Gimenez-Capitan, A., Teixido, C., Molina-Vila, M.A., Viteri, S., De Los Llanos Gil, M., Algarra, S.M., Perez-Ruiz, E., Marquez-Rodas, I., Rodriguez-Abreu, D., Blanco, R., Puertolas, T., Royo, M.A., Rosell, R. Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther Adv Med Oncol.* 2018 Jan 18; 10:1758834017749748.

121. Kasaian, M.T., Whitters, M.J., Carter, L.L., Lowe, L.D., Jussif, J.M., Deng, B., Johnson, K.A., Witek, J.S., Senices, M., Konz, R.F., Wurster, A.L., Donaldson, D.D., Collins, M., Young, D.A., Grusby, M.J. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity*. 2002 Apr; 16(4):559-69.
122. Kaur, G., Thompson, L.A., Dufour, J.M. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Jun;30:36-44.
123. Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., Brasel, K., Morrissey, P.J., Stocking, K., Schuh, J.C., Joyce, S., Peschon, J.J. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*. 2000 Mar 6; 191(5):771-80.
124. Khader, S.A., Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D.M., Swain, S., Pearl, J.E., Ghilardi, N., Desauvage, F.J., Lund, F.E., Cooper, A.M. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 2006 Jul 10; 203(7):1805-15.
125. Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., Yokoyama, W.M. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14; 97(6): 2731-2736.
126. Kim, S.H., Reznikov, L.L., Stuyt, R.J., Selzman, C.H., Fantuzzi, G., Hoshino, T., Young, H.A., Dinarello, C.A. Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18R beta chain. *J Immunol* January 1, 2001, 166 (1) 148-154.
127. Kim, S.H., Han, S.Y., Azam, T., Yoon, D.Y., Dinarello, C.A. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF $\alpha$ . *Immunity*. 2005 Jan; 22(1):131-42.
128. Kim, M., Kim, T.J, Kim, H. M., Doh, J. and Lee, K. M. Multi-cellular natural killer (NK) cell clusters enhance NK cell activation through localizing IL-2 within the cluster. *Sci Rep*. 2017; 7: 40623.
129. Kinoshita, M., Shinomiya, N., Ono, S., Tsujimoto, H., Kawabata, T., Matsumoto, A., Hiraide, H., Seki, S. Restoration of natural IgM production from liver B cells by exogenous IL-18 improves the survival of burn-injured mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol*. 2006 Oct 1; 177(7):4627-35.

130. Kinoshita, M., Miyazaki, H., Ono, S., Seki, S. Immuno enhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J Leukoc Biol.* 2013 May; 93(5):689-98.
131. Klebanoff, C.A., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., Lichtman, M.K., Gattinoni, L., Theoret, M.R., Grewal, N., Spiess, P.J., Antony, P.A., Palmer, D.C., Tagaya, Y., Rosenberg, S.A., Waldmann, T.A., Restifo, N.P. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 17; 101(7):1969-74.
132. Kovats, S., Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J., DeMars, R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990 Apr 13;248(4952):220-3.
133. Krummel, M.F and Allison, J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med.* 1995 Aug 1; 182(2):459-65.
134. Kukita, T., Arima, N., Matsushita, K., Arimura, K., Ohtsubo, H., Sakaki, Y., Fujiwara, H., Ozaki, A., Matsumoto, T and Tei, C. Autocrine and/or paracrine growth of adult T-cell leukaemia tumour cells by interleukin 15. *British Journal of Haematology*, 2002, 119, 467-474.
135. Kumano, M., Hara, I., Furukawa, J., Oniki, S., Nagai, H., Miyake, H., Fujisawa, M. Interleukin-21 activates cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells to generate antitumor response in mouse renal cell carcinoma. *J Urol.* 2007 Oct; 178(4 Pt 1):1504-9.
136. Kusaba, H., Ghosh, P., Derin, R., Buchholz, M., Sasaki, C., Madara, K., Longo, D.L. Interleukin-12-induced interferon-gamma production by human peripheral blood T cells is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1037-43.
137. Kvistborg, P., Philips, D., Kelderman, S., Hageman, L., Ottensmeier, C., Joseph-Pietras, D., Welters, M.J., van der Burg, S., Kapiteijn, E., Michielin, O., Romano, E., Linnemann, C., Speiser, D., Blank, C., Haanen, J.B., Schumacher, T.N. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Sci Transl Med.* 2014 Sep 17; 6(254):254ra128.
138. Lanier, L.L., Corliss, B., Phillips, J.H. Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Rev.* 1997 Feb; 155:145-54.

139. Larkin, J., Hodi, F.S., Wolchok, J.D. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015 Sep 24; 373(13):1270-1.
140. Leong, J. W., Chase, J. M., Romee, R., Schneider, S. E., Sullivan, R. P., Cooper, M. A., and Fehniger, T. A. Pre-activation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like NK cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Apr; 20(4): 463–473.
141. Leroy, S., Dubois, S., Tenaud, I., Chebassier, N., Godard, A., Jacques, Y., Dréno, B. Interleukin-15 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and S?zary syndrome). *Br J Dermatol.* 2001 May; 144(5):1016-23.
142. Letimier, F.A., Passini, N., Gasparian, S., Bianchi, E., Rogge, L. Chromatin remodeling by the SWI/SNF-like BAF complex and STAT4 activation synergistically induce IL-12Rbeta2 expression during human Th1 cell differentiation. *EMBO J.* 2007 Mar 7;26(5):1292-302.
143. Li, Q., Ye, L.J., Ren, H. L., Huyan, T., Li, J., Shi, J.L., Huang, Q.S. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion. *Immunobiology.* 2015 Jul;220(7):876-88. doi: 10.1016/j.imbio.2015.01.009.
144. Lim, H.X., Hong, H.J., Jung, M.Y., Cho, D., Kim, T.S. Principal role of IL-12p40 in the decreased Th1 and Th17 responses driven by dendritic cells of mice lacking IL-12 and IL-18. *Cytokine.* 2013 Aug; 63(2):179-86.
145. Lin, J.X., Migone, T.S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J.A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E.T., Mietz, J., John, S. et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity.* 1995 Apr; 2(4):331-9.
146. Lin, J.X., Du, N., Li, P., Kazemian, M., Gebregiorgis, T., Spolski, R., Leonard, W.J. Critical functions for STAT5 tetramers in the maturation and survival of natural killer cells. *Nat Commun.* 2017 Nov 6;8(1):1320.
147. Ling, P., Gately, M.K., Gubler, U., Stern, A.S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y.C., Hakimi, J. Homology of the p40 subunit of natural killer cell

- stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell*. 1991 Jul 12; 66(1):9-10.
148. Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., Ledbetter, J.A. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*. 1991 Sep 1; 174(3):561-9.
149. Lissoni, P., Rovelli, F., Mandal?, M and Barni, S. Blood concentrations of interleukin-15 in cancer patients and their variations during interleukin-2 immunotherapy: preliminary considerations. *Int J Biol Markers*. 1998 Jul-Sep; 13(3):169-71.
150. Ljunggren, H.G and K?rre, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990 Jul; 11(7):237-44.
151. Lodoen, M.B and Lanier, L.L. Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan; 3(1):59-69.
152. Long, E.O., Kim, S.H., Liu, D., Peterson, M.E and Rajagopalan, S. Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annual Review of Immunology*, 2013; 31, 227 - 258.
153. Loveland, K.L., Klein, B., Pueschl, D., Indumathy, S., Bergmann, M., Loveland, B.E., Hedger, M.P., Schuppe, H.C. Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Nov 20; 8:307.
154. Ma, H.L., Whitters, M.J., Konz, R.F., Senices, M., Young, D.A., Grusby, M.J., Collins, M., Dunussi-Joannopoulos, K. IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma. *J Immunol*. 2003 Jul 15; 171(2):608-15.
155. Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N. and Wei, F. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *Version 1. F1000Res*. 2015; 4: F1000 Faculty Rev-1465.
156. Ma, Z., Li, W., Yoshiya, S., Xu, Y., Hata, M., El-Darawish, Y., Markova, T., Yamanishi, K., Yamanishi, H., Tahara, H., Tanaka, Y., Okamura H. Augmentation of Immune Checkpoint Cancer Immunotherapy with IL18. *Clin Cancer Res*. 2016 Jun 15; 22(12):2969-80.

157. Maegawa, M., Kamada, M., Irahara, M., Yamamoto, S., Yoshikawa, S., Kasai, Y., Ohmoto, Y., Gima, H., Thaler, C. J., Aono, T. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol.* 2002 Mar; 54(1-2):33-42.
158. Makhseed, M., Raghupathy, R., Azizieh, F., Omu, A., Al-Shamali, E., Ashkanani, L. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod.* 2001 Oct;16(10):2219-26.
159. Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannerée, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J.J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E.A., Brousse, N., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Meresse, B. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest.* 2010 Jun; 120(6):2131-43.
160. Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M.L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., Viens, P., Birnbaum, D., Bertucci, F., Moretta, A., Olive, D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest.* 2011 Sep; 121(9):3609-22.
161. Mansoori, M.N., Shukla, P., Kakaji, M., Tyagi, A.M., Srivastava, K., Shukla, M., Dixit, M., Kureel, J., Gupta, S., Singh, D. IL-18BP is decreased in osteoporotic women: Prevents Inflammasome mediated IL-18 activation and reduces Th17 differentiation. *Sci Rep.* 2016 Sep 21;6:33680.
162. Marchissio, M. J.; Frances, D. E.; Carnovale, C. E. and R. A. Marinelli. "Mitochondrial aquaporin-8 knockdown in human hepatoma HepG2 cells causes ROS-induced mitochondrial depolarization and loss of viability." *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012 Oct 15;264(2):246-54.
163. Matsumoto, H., Murakami, Y., Kataoka, K., Notomi, S., Mantopoulos, D., Trichonas, G., Miller, J.W., Gregory, M.S., Ksander, B.R., Marshak-Rothstein, A., Vavvas, D.G. Membrane-bound and soluble Fas ligands have opposite functions in photoreceptor cell death following separation from the retinal pigment epithelium. *Cell Death Dis.* 2015 Nov 19;6:e1986.

164. McLeod, I., Jia, W., He, Y-W. The contribution of autophagy to lymphocyte survival and homeostasis. *Immunol Rev.* 2012; 249:195–204.
165. McQueen, K.L and Parham, P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol.* 2002 Oct; 14(5):615-21.
166. Mirjačić Martinović, K., Babović, N., Džodić, R., Jurišić, V., Matković, S., Konjević, G. Favorable in vitro effects of combined IL-12 and IL-18 treatment on NK cell cytotoxicity and CD25 receptor expression in metastatic melanoma patients. *J Transl Med.* 2015 Apr 14;13:120.
167. Mitra, R., Singh, S. and Khar, A. Anti tumour immune responses. Cambridge University Press. 2003 January 28, Vol. 5.
168. Mittler, R.S., Foell, J., McCausland, M., Strahotin, S., Niu, L., Bapat, A., Hewes, L.B. Anti-CD137 antibodies in the treatment of autoimmune disease and cancer. *Immunol Res.* 2004; 29(1-3):197-208.
169. Miyazaki, T., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Minami, Y., Liu, Z.J., Oishi, I., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Ihle, J.N. et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science.* 1994 Nov 11; 266(5187):1045-7.
170. Miyazaki, T., Liu, Z.J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E.L., Permuter, R.M., Taniguchi, T. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell.* 1995 Apr 21; 81(2):223-31.
171. Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2002 Sep;2(9):656-63.
172. Moffett, A., Regan, L., Braude, P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *BMJ.* 2004 Nov 27;329(7477):1283-5.
173. Monteleone, G., Caruso, R., Fina, D., Peluso, I., Gioia, V., Stolfi, C., Fantini, M.C., Caprioli, F., Tersigni, R., Alessandroni, L., MacDonald, T.T., Pallone, F. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut.* 2006 Dec; 55(12):1774-80.
174. Mori, A., Suko, M., Kaminuma, O., Inoue, S., Ohmura, T., Nishizaki, Y., Nagahori, T., Asakura, Y., Hoshino, A., Okumura, Y., Sato, G., Ito, K., Okudaira,

- H. IL-15 promotes cytokine production of human T helper cells. *J Immunol.* 1996 Apr 1; 156(7):2400-5.
175. Morvan, M.G. and Lanier, L.L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer.* 2016 Jan; 16(1):7-19.
176. Munger, W., DeJoy, S.Q., Jeyaseelan, R. Sr., Torley, L.W., Grabstein, K.H., Eisenmann, J., Paxton, R., Cox, T., Wick, M.M., Kerwar, S.S. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell Immunol.* 1995 Oct 15; 165(2):289-93.
177. Nakahira, M., Tomura, M., Iwasaki, M., Ahn, H.J., Bian, Y., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M., Fujiwara, H. An absolute requirement for STAT4 and a role for IFN-gamma as an amplifying factor in IL-12 induction of the functional IL-18 receptor complex. *J Immunol.* 2001 Aug 1; 167(3):1306-12.
178. Nakahira, M., Ahn, H.J., Park, W.R., Gao, P., Tomura, M., Park, C.S., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M., Fujiwara, H. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *J Immunol.* 2002 Feb 1; 168(3):1146-53.
179. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:423-74.
180. Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 Mar; 12(1):53-72.
181. Naz, R. K. and Evans, L. Presence and modulation of interleukin-12 in seminal plasma of fertile and infertile men. *J Androl.* May-Jun 1998; 19(3):302-7.
182. Nomura, T., Kawamura, I., Tsuchiya, K., Kohda, C., Baba, H., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe, I., Mitsuyama, M. Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells. *Infect Immun.* 2002 Mar; 70(3):1049-55.
183. Nosaka, T., van Deursen, J.M., Tripp, R.A., Thierfelder, W.E., Witthuhn, B.A., McMickle, A.P., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., Ihle, J.N. Defective

- lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science*. 1995 Nov 3; 270(5237):800-2.
184. Nouroz, F., Bibi, F., Noreen, S., Masood, N. Natural killer cells enhance the immune surveillance of cancer. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* (2016) 17, 149-154.
185. Oh, S., Berzofsky, J.A., Burke, D.S., Waldmann, T.A and Perera, L.P. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18; 100(6): 3392-3397.
186. Oh, S., Perera, L.P., Terabe, M., Ni, L., Waldmann, T.A., Berzofsky, J.A. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1; 105(13):5201-6.
187. Okamoto, M., Kato, S., Oizumi, K., Kinoshita, M., Inoue, Y., Hoshino, K., Akira, S., McKenzie, A.N., Young, H.A., Hoshino, T. Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. *Blood*. 2002 Feb 15; 99(4):1289-98.
188. Okamura, H., Tsutsi, H., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S and Kurimoto, M. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995 Nov 2; 378(6552):88-91.
189. Okamura, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol*. 1998 Jun; 10(3):259-64.
190. Okazawa, A., Kanai, T., Nakamaru, K., Sato, T., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Ikeda, M., Kawamura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Okamoto, R., Yamazaki, M., Kurimoto, M., Ishii, H., Watanabe, M., Hibi, T. *Clin Exp Immunol*. 2004 May; 136(2):269-76.
191. Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.P., Wang, G., Qi, C.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., Morse, H.C 3rd, Lipsky, P.E.,

- Leonard, W.J. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol.* 2004 Nov 1; 173(9):5361-71.
192. Papúchová, H., Meissner, T.B., Li, Q., Strominger, J.L., Tilburgs, T. The Dual Role of HLA-C in Tolerance and Immunity at the Maternal-Fetal Interface. *Front. Immunol.* 2019, 10, 2730.
193. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 22; 12(4):252-64.
194. Parry, H.M., Stevens, T., Oldreive, C., Zadran, B., McSkeane, T., Rudzki, Z., Paneesha, S., Chadwick, C., Stankovic, T., Pratt, G., Zuo, J., Moss, P. NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. *Oncotarget.* 2016 Oct 18; 7(42):68513-68526.
195. Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J.L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S.R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F.J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R.D., Foster, D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature.* 2000 Nov 2; 408(6808):57-63.
196. Pazina, T., Shemesh, A., Brusilovsky, M., Porgador, A., Campbell, K.S. Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Front Immunol.* 2017 Mar 30;8:369.
197. Peng, Y.P., Zhu, Y., Zhang, J.J., Xu, Z.K., Qian, Z.Y., Dai, C.C., Jiang, K.R., Wu, J.L., Gao, W.T., Li, Q., Du, Q., Miao, Y. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J Transl Med.* 2013 Oct 20; 11:262.
198. Petrella, T.M., Tozer, R., Belanger, K., Savage, K.J., Wong, R., Smylie, M., Kamel-Reid, S., Tron, V., Chen, B.E., Hunder, N.N., Hagerman, L., Walsh,

- W., Eisenhauer, E.A. Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 20; 30(27):3396-401.
199. Philips, G.K and Atkins, M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Int Immunol*. 2015 Jan; 27(1):39-46.
200. Pillarisetty, V. G., Katz, S. C., Bleier, J. I., Shah, A. B., Dematteo, R. P. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):2612-8.
201. Postow, M.A., Chesney, J., Pavlick, A.C., Robert, C., Grossmann, K., McDermott, D., Linette, G.P., Meyer, N., Giguere, J.K., Agarwala, S.S., Shaheen, M., Ernstoff, M.S., Minor, D., Salama, A.K., Taylor, M., Ott, P.A., Rollin, L.M., Horak, C., Gagnier, P., Wolchok, J.D., Hodi, F.S. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015 May 21; 372(21):2006-17.
202. Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C.Y., Gately, M.K., Gubler, U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26; 93(24):14002-7.
203. Price, J. D., Simpfendorfer, K. R., Mantena, R. R., Holden, J., Heath, W. R., Rooijen, N., Strugnell, R. A., Wijburg, O. L. C. Gamma interferon-independent effects of interleukin-12 on immunity to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* . 2007 Dec; 75(12):5753-62.
204. Qi, Y-Y., Lu, C., Ju, Y., Wang, Zi-E, Li, Y-T., Shen, Y., Lu, Zhi-Mang. Interleukin-18 synergism with interleukin-2 in cytotoxicity and NKG2D expression of human natural killer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(18):7857-61.
205. Quinn, L.S., Anderson, B.G., Strait-Bodey, L., Wolden-Hanson, T. Serum and muscle interleukin-15 levels decrease in aging mice: correlation with declines in soluble interleukin-15 receptor alpha expression. *Exp Gerontol*. 2010 Feb; 45(2):106-12.
206. Razavi, G.S.E and Allen, T. Emerging Role of Interleukins in Cancer Treatment. *Immunome Res* 2015, S: 2: 006.

207. Reina, M., Broccia, M.L., Menegola, E., Di Blasio, A.M., Vigan?, P., Giavini, E. Effects of interleukin-12 administration during the pre- and peri-implantation period on mouse embryo fetal development. *Am J Reprod Immunol.* 2004 May;51(5):345-51.
208. Ribas, A., Kefford, R., Marshall, M.A., Punt, C.J., Haanen, J.B., Marmol, M., Garbe, C., Gogas, H., Schachter, J., Linette, G., Lorigan, P., Kendra, K.L., Maio, M., Trefzer, U., Smylie, M., McArthur, G.A., Dreno, B., Nathan, P.D., Mackiewicz, J., Kirkwood, J.M., Gomez-Navarro, J., Huang, B., Pavlov, D., Hauschild, A. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2013 Feb 10; 31(5):616-22.
209. Robertson, M. J. and Ritz, J. Interleukin 12: Basic Biology and Potential Applications in Cancer Treatment. *Oncologist.* 1996;1(1 & 2):88-97.
210. Roberts, J. M., Taylor, C. T., Melling, G. C., Kingsland, C. R. and Johnson, P.M. Expression of the CD46 antigen, and absence of class I MHC antigen, on the human oocyte and preimplantation blastocyst. *Immunology.* 1992 Jan; 75(1): 202–205.
211. Rochman, Y., Spolski, R., Leonard, W.J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jul; 9(7):480-90.
212. Romee, R., Schneider, S. E., Leong, J. W., Chase, J. M., Keppel, C. R., Sullivan, R. P., Cooper, M. A., and Fehniger, T. A. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood.* 2012 Dec 6; 120(24): 4751–4760.
213. Rose, N.R., Hjort, T., Rumke, Ph., et al. Techniques for detection of iso - and auto-antibodies to spermatozoa. *Clin Exp Med.* 1976; 23:175–199.
214. Salagianni, M., Lekka, E., Moustaki, A., Iliopoulou, E.G., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., Perez, S.A. NK cell adoptive transfer combined with Ontak-mediated regulatory T cell elimination induces effective adaptive antitumor immune responses. *J Immunol.* 2011 Mar 15; 186(6):3327-35.
215. Sarosiek, K.A., Malumbres, R., Nechushtan, H., Gentles, A.J., Avisar, E., Lossos, I.S. Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2010 Jan 21; 115(3):570-80.

216. Sato, N., Sabzevari, H., Fu, S., Ju, W., Petrus, M.N., Bamford, R.N., Waldmann, T.A and Tagaya Y. Development of an IL-15-autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15-transgenic mice requires the cis expression of IL-15R $\beta$ . *Blood*. 2011 Apr 14; 117(15): 4032-4040.
217. Segal, B.M., Dwyer, B.K., Shevach, E.M. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1998, 187, 537-546.
218. Sester, U., Presser, D., Dirks, J., G?rtner, B.C., K?hler, H., Sester, M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant*. 2008 Jul 8(7):1486-97.
219. Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25; 331(6024):1565-70.
220. Schildberg, F.A., Klein, S.R., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):955-72.
221. Sheppard, K.A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., Chaudhary, D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Lett*. 2004 Sep 10; 574(1-3):37-41.
222. Shibuya, H., Yoneyama, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Taniguchi, T. IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: Demonstration of a novel role for c-myc. *Cell*. 1992; 70:57-67.
223. Siegel, A.M., Heimall, J., Freeman, A.F., Hsu, A.P., Brittain, E., Brenchley, J.M., Douek, D.C., Fahle, G.H., Cohen, J.I., Holland, S.M., Milner, J.D. A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory. *Immunity*. 2011 Nov 23; 35(5):806-18.

224. Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P., Rogge, L. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol Rev.* 1999 Aug; 170:65-72.
225. Sivakumar, P.V., Garcia, R., Waggle, K.S., Anderson-Haley, M., Nelson, A., Hughes, S.D. Comparison of vascular leak syndrome in mice treated with IL21 or IL2. *Comp Med.* 2013 Feb; 63(1):13-21.
226. Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Godfrey, D.I. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 2001 Apr; 13(4):459-63.
227. Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L., Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005 Feb; 42(4):501-10.
228. Spiering, M.J. Primer on the Immune System. *Alcohol Res.* 2015;37(2):171-5.
229. Spolski, R and Leonard, W.J. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 May; 13(5):379-95.
230. Srivastava, S., Salim, N., Robertson, M.J. Interleukin-18: biology and role in the immunotherapy of cancer. *Curr Med Chem.* 2010; 17(29):3353-7.
231. Steel, J.C., Ramlogan, C.A., Yu, P., Sakai, Y., Forni, G., Waldmann, T.A and Morris, J.C. Interleukin-15 and its Receptor Augment Dendritic Cell Vaccination Against the neu Oncogene Through the Induction of Antibodies Partially Independent of CD4-help. *Cancer Res.* 2010 Feb 1; 70(3): 1072.
232. Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., McCubrey, J.A. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia.* 2004 Feb; 18(2):189-218.
233. Strengell, M., Matikainen, S., Sirén, J., Lehtonen, A., Foster, D., Julkunen, I., Sareneva, T. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol.* 2003 Jun 1; 170(11):5464-9.
234. Suto, A., Wurster, A.L., Reiner, S.L., Grusby, M.J. IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J Immunol.* 2006 Sep 15; 177(6):3721-7.

235. Sun, C., Fu, B., Gao, Y., Liao, X., Sun, R., Tian, Z., Wei, H. TGF- $\beta$ 1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence. *PLoS Pathog.* 2012; 8(3):e1002594.
236. Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., Cosman, D. UL16-Binding Proteins, Novel MHC Class I-Related Proteins, Bind to NKG2D and Activate Multiple Signaling Pathways in Primary NK Cells. *J Immunol.* 2002; 168:671-9.
237. Syn, N.L., Teng, M.W.L., Mok, T.S.K., Soo, R.A. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol.* 2017 Dec; 18(12):e731-e741.
238. Tato, C.M., Mason, N., Artis, D., Shapira, S., Caamano, J.C., Bream, J.H., Liou, H.C., Hunter, C.A. Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma. *Int Immunol.* 2006 Apr; 18(4):505-13.
239. Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D. et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell.* 1998; 93:841-50.
240. Tersigni, Ch., Meli, F., Neri, C., Iacoangeli, A., Franco, R., Lanzone, A., Scambia, G. and Di Simone, N. Role of Human Leukocyte Antigens at the Feto-Maternal Interface in Normal and Pathological Pregnancy: An Update. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul; 21(13): 4756.
241. Thaxton, J. E and Sharma, S. Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jun; 63(6): 482–491.
242. Thierfelde, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., Ihle, J.N. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature.* 1996 Jul 11;382(6587):171-4.
243. Timmerman, J.M., Byrd, J.C., Andorsky, D.J., Yamada, R.E., Kramer, J., Muthusamy, N., Hunder, N., Pagel, J.M. A phase I dose-finding trial of recombinant interleukin-21 and rituximab in relapsed and refractory low grade B-cell lymphoproliferative disorders. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 15; 18(20):5752-60.

244. Tomura, M., Zhou, X.-Y., Maruo, S., Ahn, H.-J., Hamaoka, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Tanimoto, T., Kurimoto, M. and Fujiwara, H. A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+CD3<sup>-</sup> cells. *J Immunol.* 1998; 160:4738–4746.
245. Trentin, L., Cerutti, A., Zambello, R., Sancetta, R., Tassinari, C., Facco, M., Adami, F., Rodeghiero, F., Agostini, C and Semenzato, G. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood.* 1996; 87(8):3327-3335.
246. Tsutsui, H., Matsui, K., Okamura, H., Nakanishi, K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol Rev.* 2000 Apr; 174:192-209.
247. Twyman-Saint, V.C., Rech, A.J., Maity, A., Rengan, R., Pauken, K.E., Stelekati, E., Benci, J.L., Xu, B., Dada, H., Odorizzi, P.M., Herati, R.S., Mansfield, K.D., Patsch, D., Amaravadi, R.K., Schuchter, L.M., Ishwaran, H., Mick, R., Pryma, D.A., Xu, X., Feldman, M.D., Gangadhar, T.C., Hahn, S.M., Wherry, E.J., Vonderheide, R.H., Minn, A.J. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature.* 2015 Apr 16; 520(7547):373-7.
248. Ugai, S., Shimozaoto, O., Kawamura, K., Wang, Y.Q., Yamaguchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S., Tagawa, M. Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts. *Cancer Gene Ther.* 2003 Mar; 10(3):187-92.
249. Vickram, A.S., Dhama, K., Chakraborty, S., Samad, H.A., Latheef, S.K., Sharun, K., Khurana, S.K., K, A., Tiwari, R., Bhatt, P., K, V., Chaicumpa, W. Role of Antisperm Antibodies in Infertility, Pregnancy, and Potential for Contraceptive and Antifertility Vaccine Designs: Research Progress and Pioneering Vision. *Vaccines (Basel).* 2019 Sep 16;7(3).
250. Vigliano, I., Palamaro, L., Bianchino, G., Fusco, A., Vitiello, L., Grieco, V., Romano, R., Salvatore, M., Pignata, C. Role of the common  $\gamma$  chain in cell cycle progression of human malignant cell lines. *Int Immunol* 2012 Mar;24(3):159-67.

251. Waldmann, T.A. and Tagaya, Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:19-49.
252. Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S and Sondel, P.M. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015; 6: 368.
253. Watford, W.T., Hissong, B.D., Bream, J.H., Kanno, Y., Muul, L., O'Shea, J.J. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev.* 2004 Dec; 202:139-56.
254. Watzl, C. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes Infect.* 2003 Jan; 5(1):31-7.
255. Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., Murphy, K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006 Jun; 24(6):677-88.
256. Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* 2010 Jan 19; 3(105):cm1.
257. Weinberg, A.D., Morris, N.P., Kovacovics-Bankowski, M., Urba, W.J., Curti, B.D. Science gone translational: the OX40 agonist story. *Immunol Rev.* 2011 Nov; 244(1):218-31.
258. Wensveen, F.M., Jelen, V., Poli, B. NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. *Front Immunol.* 2018 Mar 8;9:441.
259. Westwood, J.A., Kelly, J.M., Tanner, J.E., Kershaw, M.H., Smyth, M.J., Hayakawa, Y. Cutting edge: novel priming of tumor-specific immunity by NKG2D-triggered NK cell-mediated tumor rejection and Th1-independent CD4+ T cell pathway. *J Immunol* January 15, 2004, 172 (2) 757-761.
260. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed, 2010.
261. World Health Organization (WHO). International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11) Geneva: WHO 2018.
262. Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.A., Reed, K., Burke, M.M.,

- Caldwell, A., Kronenberg, S.A., Agunwamba, B.U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H.D., Feely, W., Horak, C.E., Hong, Q., Korman, A.J., Wigginton, J.M., Gupta, A., Sznol, M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013 Jul 11; 369(2):122-33.
263. Wolters Kluwer Health, Lippincott, Williams & Wilkins, Cytokine in Stedman's Medical Dictionary, 28th ed., 2006.
264. Xu, M., Liu, M., Du, X., Li, S., Li, H., Li, X., Li, Y., Wang, Y., Qin, Z., Fu, Y.X., Wang, S. Intratumoral Delivery of IL-21 Overcomes Anti-Her2/Neu Resistance through Shifting Tumor-Associated Macrophages from M2 to M1 Phenotype. *J Immunol.* 2015 May 15; 194(10):4997-5006.
265. Yamamoto, K., Shibata, F., Miyasaka, N., Miura, O. The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Oct 11;297(5):1245-52.
266. Yamanishi, K., Mukai, K., Hashimoto, T., Ikubo, K., Nakasho, K., El-Darawish, Y., Li, W., Okuzaki, D., Watanabe, Y., Hayakawa, T., Nojima, H., Yamanishi, H., Okamura, H., Matsunaga, H. Physiological and molecular effects of interleukin-18 administration on the mouse kidney. *J Transl Med.* 2018 Mar 7;16(1):51.
267. Yi, J.S., Cox, M.A., Zajac, A.J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology.* 2010 Apr; 129(4):474-81.
268. Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3400-7.
269. Yoshimoto, Takayuki and Yoshimoto Tomohiro. Cytokine Frontiers. Regulation of Immune Responses in Health and Disease, 2013, 103-123
270. Yoshino, O., Osuga, Y., Koga, K., Tsutsumi, O., Yano, T., Fujii, T., Kugu, K., Momoeda, M., Fujiwara, T., Tomita, K., Taketani, Y. Evidence for the expression of interleukin (IL)-18, IL-18 receptor and IL-18 binding protein in the human endometrium. *Basic science of reproductive medicine, Volume 7, Issue 7, 1 July 2001, Pages 649-654.*

271. Yu, Q., Thieu, V.T., Kaplan, M.H. Stat4 limits DNA methyltransferase recruitment and DNA methylation of the IL-18R $\alpha$  gene during Th1 differentiation. *EMBO J.* 2007 Apr 18;26(8):2052-60
272. Yu, P., Steel, J.C., Zhang, M., Morris, J.C., Waldmann, T.A. Simultaneous blockade of multiple immune system inhibitory checkpoints enhances antitumor activity mediated by interleukin-15 in a murine metastatic colon carcinoma model. *Clin Cancer Res.* 2010 Dec 15; 16(24):6019-28.
273. Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S.E., Oh, S., Kovanen, P.E., Hinrichs, C.S., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Brady, J.N., Restifo, N.P., Berzofsky, J.A., Leonard, W.J. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8 $^{+}$  T cell expansion and function. *J Exp Med.* 2005 Jan 3; 201(1):139-48.
274. Zeng, R., Spolski, R., Casas, E., Zhu, W., Levy, D.E., Leonard, W.J. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood.* 2007 May 15; 109(10):4135-42.
275. Zhang, M., Yao, Z., Dubois, S., Ju, W., M $\ddot{u}$ ller, J.R., Waldmann, T.A. Interleukin-15 combined with an anti-CD40 antibody provides enhanced therapeutic efficacy for murine models of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 5; 106(18):7513-8.
276. Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., Han, D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2014 Sep;11(5):428-37.
277. Zhu, J., Huang, X., Yang, Y. NKG2D is required for NK cell activation and function in response to E1 deleted adenovirus. *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7480-6.
278. Zhu, C., Anderson, A.C., Kuchroo, V.K. TIM-3 and its regulatory role in immune responses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011; 350:1-15.
279. Zou, W and Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun; 8(6):467-77.

## Х. 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.**, Ока, 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. **Pencheva-Demireva M.**, Y. El-Darawish, K. Kavaldzhieva, N. Mladenov, V. Lazarov, D. Dimitrova-Dikandarova, T. Markova, R. Nikolov, H. 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-Dikandarova 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-Dikandarova D., Lazarov V., Kavaldzhieva K., Mladenov N., **Pencheva M.**, Gateva A., Kamenov Z. SERUME ANTIBODIES AGAINST SPERMATOZOA 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.**, Vakrilov G., Dimitrova-Dikandarova 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-Dikandarova 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.