

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk



PRACA DOKTORSKA

mgr Daria Lorek

UDZIAŁ RECEPTORA TLR9 LIMFOCYTÓW B W REGULACJI TOLERANCJI IMMUNOLOGICZNEJ W CIĄŻY

**B CELL TLR9 RECEPTOR IN REGULATION OF IMMUNE
TOLERANCE IN PREGNANCY**

Praca wykonana w Laboratorium
Immunologii Rozrodu

Promotor:

prof. dr hab. Anna Chełmońska-Soyta

Promotor pomocniczy:

dr inż. Anna Sławek

Wrocław, 2024 r.

Podziękowania

*Pragnę serdecznie podziękować Pani Promotor **prof. dr hab. Annie Chelmońskiej-Soycie**, za prowadzenie mnie przez cały czas trwania studiów doktoranckich przez fascynujący świat immunologii; za możliwość realizacji pracy doktorskiej w Laboratorium Immunologii Rozrodu; za poświęcony czas, inspirację do badań, motywację do pracy, a także za nieocenioną życzliwość oraz cierpliwość.*

*Chciałabym również podziękować Pani Promotor pomocniczej **dr inż. Annie Sławek**, za podzielenie się swoim doświadczeniem w pracy laboratoryjnej, szczególnie w technice cytometrii przepływowej; za cenne wskazówki i rady, wsparcie oraz pomoc na każdym etapie badań.*

*Szczególne podziękowania składam także koleżankom z Laboratorium Immunologii Rozrodu: **dr inż. Annie Kędzierskiej** oraz **mgr Paulinie Kubik** za nieustanną gotowość do pomocy, życzliwość oraz stworzenie przyjaznej atmosfery pracy; **dr inż. Annie Kędzierskiej** dodatkowo za pomoc w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi oraz za wprowadzenie do techniki cytometrii przepływowej.*

Na koniec chciałabym również podziękować wszystkim najbliższym mi osobom za nieocenione wsparcie, które otrzymywałam od Was w trakcie całych studiów doktoranckich, za niegasnącą wiarę we mnie oraz dodawanie mi sił i motywacji do pracy.

Daria Lorek

Część wyników badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej przedstawiona została na sesji plakatowej na XV Międzynarodowym Kongresie Międzynarodowego Towarzystwa Immunologii Rozrodu (15th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction, ISIR) odbywającego się w Hamburgu w dniach 14-17 września 2023 r.

Abstrakt został opublikowany w Journal of Reproductive Immunology:

Lorek, D., Kedzierska, A. E., Sławek, A., Kubik, P. & Chelmonska-Soyta, A. *Involvement of TLR9 in the regulation of immune tolerance in early pregnancy in murine abortion-prone model.* J Reprod Immunol 159, 104085 (2023).



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badanie zawarte w pracy doktorskiej zostały sfinansowane w ramach grantu **Preludium 14 Narodowego Centrum Nauki** (nr grantu 2017/27/N/NZ5/02756) pt. „Udział receptora TLR9 limfocyty B w regulacji tolerancji immunologicznej w ciąży”

Kierownik grantu: mgr Daria Lorek

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	7
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	9
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	11
1 WSTĘP	14
1.1 Zmiany adaptacyjne układu odpornościowego w przebiegu ciąży	14
1.2 Limfocyty B	16
1.2.1 Główne populacje limfocytów B	16
1.2.2 Limfocyty B – aktywacja oraz prezentacja antygeny limfocytom Th.....	18
1.2.3 Limfocyty B w ciąży.....	20
1.2.4 Limfocyty B regulatorowe.....	25
1.3 Receptor toll-podobny 9 (TLR9)	32
1.3.1 Ogólna charakterystyka receptora TLR9	32
1.3.2 Wpływ TLR9 na funkcjonowanie limfocytów B	34
1.3.3 Aktywacja TLR9 w ciąży w odpowiedzi na sygnały endogenne	36
2 CEL PRACY	39
3 MATERIAŁY I METODY	41
3.1 Gotowe zestawy i odczynniki chemiczne	41
3.2 Przygotowane bufor i media	42
3.3 Przeciwciała wykorzystane w immunofenotypowaniu komórek.....	42
3.4 Aparatura.....	44
3.5 Zwierzęta doświadczalne	44
3.5.1 Wymaz cytologiczny z pochwy samic myszy i określanie fazy cyklu rujowego samic.....	46
3.5.2 Krycie samic	47
3.5.3 Podaż antagonisty receptora TLR9.....	47
3.5.4 Pobieranie materiału od myszy	48

3.5.5	Izolacja komórek z materiału zwierzęcego.....	50
3.6	Charakterystyka pacjentek zrekrutowanych do badań.....	52
3.6.1	Izolacja PBMC z krwi pacjentek	53
3.7	Restymulacja komórek.....	54
3.8	Immunofenotypowanie limfocytów	54
3.9	Analiza cytometryczna.....	56
3.10	Analiza statystyczna.....	62
4	WYNIKI	63
4.1	Wpływ antagonisty TLR9 ODN 2088 na powodzenie ciąży oraz na ustalenie tolerancji immunologicznej w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem.....	63
4.1.1	Wpływ antagonisty TLR9 ODN 2088 na powodzenie ciąży	63
4.1.2	Wpływ podaży antagonisty TLR9 ODN 2088 na ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 przez limfocyty B śledziony oraz węzłów chłonnych drenujących macicę	64
4.1.3	Ocena ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 przez limfocyty B izolowane z macicy oraz doczesnej po podaży ODN 2088.....	71
4.1.4	Wpływ antagonisty TLR9 ODN 2088 na frekwencję limfocytów CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high} (Breg) oraz ekspresję IL-10 i IL-6 przez te komórki	76
4.1.5	Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych przez limfocyty T po podaży antagonisty TLR9 ODN 2088.....	77
4.1.6	Aktywacja limfocytów T oraz frekwencja Treg po podaży antagonisty TLR9 ODN 2088.....	81
4.2	Określenie ekspresji TLR9, cząsteczek kostymulacyjnych i HLA-DR na wybranych subpopulacjach limfocytów B krwi obwodowej kobiet w pierwszym trymestrze ciąży prawidłowej i po poronieniu.	82
4.2.1	Frekwencja limfocytów B (CD19 ⁺), przejściowych limfocytów B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) oraz limfocytów B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) w krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej	83

4.2.2	Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 na limfocytach B (CD19 ⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej	84
4.2.3	Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w przejściowych limfocytach B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej	85
4.2.4	Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w limfocytach B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.....	86
4.2.5	Ekspresja IL-10 oraz IL-6 w limfocytach B (CD19 ⁺), przejściowych limfocytach B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) oraz limfocytach B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej	87
4.2.6	Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej	88
4.2.7	Frekwencja aktywowanych limfocytów T (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) oraz Treg (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD127 ⁻) w krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej	89
5	DYSKUSJA.....	90
6	WNIOSKI.....	110
7	SPIS TABEL	111
8	SPIS RYCIN.....	112
9	SPIS WYKRESÓW.....	114
10	BIBLIOGRAFIA	117

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

W ciąży, w organizmie matki dochodzi do szeregu zmian anatomicznych i fizjologicznych prowadzących do wytworzenia odpowiedniego środowiska dla rozwijającego się płodu. Przejściowej modulacji musi ulec również układ odpornościowy aby zapewnić jednoczesną ochronę matki i dziecka przed patogenami, jak i akceptację pół-alogenicznego płodu. Prawidłowy przebieg ciąży zależy więc od odpowiedniej regulacji układu odpornościowego, która w głównej mierze zależy od aktywności odporności nabytej, a w szczególności od populacji komórek o właściwościach regulacyjnych, głównie limfocytów T regulatorowych (ang. T regulatory cells, Treg). Ostatnio uwaga wielu grup badawczych skierowana jest również w stronę limfocytów B o właściwościach supresorowych, tzw. limfocytów B regulatorowych (ang. B regulatory cells, Breg) i ich roli w przebiegu prawidłowej jak i patologicznej ciąży.

Limfocyty B są ważnym elementem układu odpornościowego, a w trakcie ciąży zauważa się zarówno zmiany w ich aktywności jak i liczbie. Jak do tej pory ich udział w ciąży badany był głównie w kontekście odpowiedzi humoralnej, jednakże jako komórki prezentujące antygeny (ang. antigen presenting cells, APC), limfocyty te mogą również uczestniczyć w indukcji tolerancji na antygeny ojcowskie.

Receptory toll podobne (ang. toll-like receptors, TLR), w tym TLR9, regulują zarówno aktywność limfocytów B jako APC, ale także jako Breg. Przeprowadzone dotychczas badania nad rolą TLR9 w ciąży skupiały się głównie na aktywacji tych receptorów w późniejszych jej okresach. Pobudzenie TLR9, w następstwie rozpoznania endogennych sygnałów, głównie w postaci mitochondrialnego DNA jak i wolnego płodowego DNA, powiązane było z komplikacjami takimi jak przedwczesny poród czy stan przedrzucawkowy. Jak dotąd nie wiele wiadomo o roli TLR9 we wczesnych okresach ciąży i powiązanych z tym okresem ciąży komplikacjach, a także o jego potencjalnym udziale w kształtowaniu się immunotolerancji.

Celem ogólnym pracy było zbadanie udziału receptora TLR9 w kształtowaniu fenotypu limfocytów B i regulacji tolerancji immunologicznej w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem (♀CBA/J x ♂DBA/J) oraz u kobiet we wczesnej ciąży.

Na podstawie przeprowadzonych badań, wykazano, że zablokowanie sygnalizacji TLR9 u samic szczepu CBA/J krytych samcami szczepu DBA/2J zwiększa prawdopodobieństwo utraty alogenicznej ciąży, natomiast prawdopodobnie nie

decyduje o skutecznej implantacji. Ponadto ograniczenie sygnału ze strony TLR9 powodowało zmiany w fenotypie kostymulacyjnym limfocytów T i B i prowadziło do obniżenia puli limfocytów Treg i aktywowanych limfocytów Th, natomiast nie wpłynęło na frekwencję limfocytów Breg.

W drugiej części badań, dowiedziono, że limfocyty B krwi obwodowej nie wykazują różnic w ekspresji TLR9 pomiędzy kobietami w ciąży oraz po poronieniu (7-14 tydzień ciąży). Sugeruje to brak zaangażowania tego receptora w obserwowaną zmianę fenotypu kostymulacyjnego tych komórek w następstwie poronienia. Natomiast u kobiet po poronieniu odnotowano wzrost frekwencji limfocytów B o fenotypie tolerogennym ($CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$), co w powiązaniu z jednocześnie zaobserwowaną niższą frekwencją aktywowanych limfocytów T sugeruje ich zaangażowanie w przywracanie równowagi immunologicznej zakłóconej wczesną utratą ciąży.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują na zaangażowanie receptora TLR9 w procesy kształtowania tolerancji immunologicznej i utrzymanie ciąży u myszy poprzez kształtowanie fenotypu kostymulacyjnego limfocytów B i wpływ na frekwencję limfocytów Treg. Natomiast u kobiet po poronieniu receptor TLR9 prawdopodobnie nie bierze udziału w procesie przywracania zaburzonej równowagi immunologicznej, w którym zaangażowane są limfocyty Breg o fenotypie $CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

During pregnancy, a series of anatomical and physiological changes occur in the mother's body, creating an appropriate environment for the developing fetus. The immune system must also undergo temporary modulation to simultaneously protect both the mother and the fetus from pathogens while accepting the semi-allogeneic fetus. Therefore, the proper progression of pregnancy depends on the appropriate regulation of the immune system, which is largely dependent on acquired immunity activity, particularly on the regulatory cell populations, mainly regulatory T cells (Tregs). Recently, research has also focused on B cells with suppressive properties, known as regulatory B cells (Bregs), and their role in both normal and pathological pregnancy.

B cells are an important component of the immune system, and during pregnancy, both their activity and number undergo changes. To date, their role in pregnancy has been mainly studied in the context of the humoral response. However, as antigen-presenting cells (APCs), B cells may also participate in inducing tolerance to paternal antigens.

Toll-like receptors (TLRs), including TLR9, regulate the activity of B cells as both APCs and Bregs. Research on the role of TLR9 in pregnancy has mainly focused on the activation of these receptors in later stages of pregnancy. Activation of TLR9, following the recognition of endogenous signals (cell-free mitochondrial DNA and cell-free fetal DNA), has been associated with complications such as preterm birth and preeclampsia. However, little is known about the role of TLR9 in the early stages of pregnancy and associated complications, as well as its potential involvement in shaping immunotolerance.

The overall aim of this study was to investigate the role of the TLR9 receptor in shaping the B cell phenotype and regulating immunological tolerance in the murine abortion-prone model of pregnancy (♀CBA/J x ♂DBA/J) and in women during early pregnancy.

The study demonstrated that blocking TLR9 signaling in female CBA/J mice mated with DBA/2J males increases the likelihood of losing an allogenic pregnancy but does not affect successful implantation. Additionally, reducing TLR9 signaling caused changes in the costimulatory phenotype of T and B cells and led to a decrease in Treg cell numbers and activated Th cells, but did not affect the frequency of Breg.

In the second part of the study, it was shown that peripheral blood B cells do not exhibit differences in TLR9 expression between pregnant women and those after miscarriage (7-14 weeks of pregnancy). This suggests that this receptor is not involved in the observed change in the costimulatory phenotype of these cells following a miscarriage. However, women after miscarriage showed an increased frequency of B cells with a tolerogenic phenotype ($CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$), which, combined with the observed decrease in activated T cells, suggests their involvement in restoring the immunological balance disrupted by early pregnancy loss.

In summary, the studies indicate the involvement of the TLR9 receptor in shaping immunological tolerance and maintaining pregnancy in mice by influencing the B cell costimulatory phenotype and Treg frequency. In contrast, in women after miscarriage, TLR9 is likely not involved in restoring the disrupted immunological balance, where Breg $CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$ play a role.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AP-1	- białko aktywujące 1 (ang. activator protein 1)
APC	- komórki prezentujące antygen (ang. antigen presenting cells)
APS	- zespół antyfosfolipidowy (ang. antiphospholipid syndrome)
ASRM	- Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu (ang. American Society for Reproductive Medicine)
AT1	- receptor typu I angiotensyny II (ang. angiotensin II receptor type 1)
AT1-AA	- agonistyczne autoprzeciwciała przeciwko receptorowi typu I angiotensyny II (ang. angiotensin II type 1 receptor agonistic autoantibodies)
BAFF	- czynnik aktywujący limfocyty B (ang. B-cell activating factor)
BCR	- receptor limfocyty B (ang. B cell receptor)
BMI	- wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
Breg	- limfocyty B regulatorowe (ang. B regulatory cells)
CD	- antygen różnicowania komórkowego (ang. cluster of differentiation)
CD40L	- ligand dla cząsteczki CD40 (ang. CD40 ligand)
cffDNA	- wolne płodowe DNA (ang. cell free fetal DNA)
CpG	- sekwencja DNA zawierająca motyw cytozyna-fosforan-guanozyna
CTLA-4	- antygen 4 limfocyty T cytotoksycznego (ang. cytotoxic T cell antigen 4)
DAMP	- struktury molekularne związane z uszkodzeniem/zagrożeniem (ang. danger/damage associated molecular patterns)
DC	- komórki dendrytyczne (ang. dendritic cells)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
dpc	- dni po pokryciu (ang. day post coitum)
EDTA	- kwas kwas etylenodiaminetetraoctowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
ESHRE	- Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (ang. European Society of Human Reproduction and Embryology)
EVT	- komórki trofoblastu pozakosmówkowego (ang. extravillous trophoblast cells)
FasL	- ligand Fas (ang. Fas ligand)
FBS	- płodowa surowica bydlęca (ang. fetal bovine serum)
FcR	- receptor dla fragmentu Fc przeciwciała (ang. Fc Receptor)
FDC	- komórka dendrytyczna grudek (ang. follicular dendritic cells)
FO	- limfocyty grudek (ang. follicular cells)
limfocyty	
Foxp3	- czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za powstawanie limfocytów T regulatorowych (ang. forkhead box P3)
GC	- ośrodek rozmnażania (ang. germinal centre)
GM-CSF	- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
hCG	- ludzka gonadotropina kosmówkowa (ang. human chorionic gonadotropin)

HLA	- ludzki antygen leukocytarny (ang. human leukocyte antigen)
Ig	- immunoglobulina (ang. immunoglobulin)
IKKα	- kinaza κB α (ang. κB kinase α)
IL	- interleukina (ang. interleukin)
i.p	- podanie dootrzewnowe (ang. intraperitoneal injection)
IRAK-4/-1	- kinaza 1/4 związana z receptorem interleukiny 1 (ang. interleukin 1 receptor associated kinase 1/4)
IRF7	- czynnik regulujący interferon 7 (ang. interferon regulatory factor 7)
IUGR	- Wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu (ang. intrauterine growth restriction)
LAC	koktajl aktywujący leukocyty (ang. Leukocyte Activation Cocktail)
LIF	- czynnik hamujący białaczkę (ang. leukemia inhibitory factor)
LPS	- lipolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)
LRR	- powtórzenia bogate w leucynę (ang. leucine-rich repeats)
MAPK	- kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. mitogen activated protein kinase)
mBreg	- limfocyty B regulatorowe pamięci (ang. memory B regulatory cells)
MFI	- mediana intensywności fluorescencji (ang. median fluorescence intensity)
MHC	- główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)
mRNA	- informacyjny/matrycowy RNA (ang. messenger RNA)
mtDNA	- mitochondrialne DNA (ang. mitochondrial DNA)
Myd88	- gen 88 odpowiedzi pierwotnej różnicowania szpiku; białko adaptorowe receptorów TLR (ang. myeloid differentiation primary response 88)
MZ	- limfocyty strefy brzeżnej śledziony (ang. marginal zone cells)
limfocyty	
NF-κB	- jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κB (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NK	- komórki NK (ang. natural killer cells)
ODN	- oligodeoksynukleotydy (ang. oligodeoxynucleotides)
PALN	- paraaortalne węzły chłonne (ang. paraaortic lymph nodes)
PAMP	- wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen-associated molecular pathern)
PBMC	- komórki jednojądrzaste z krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	- sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. phosphate-buffered saline)
PE	- stan przedrzucawkowy (ang. preeclampsia)
pDC	- plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (ang. plasmacytoid dendritic cells)
PMA	- forbol 12-mirystynian 13-octanu (ang. phorbol 12-myristate-13-acetate)
PRP	- receptor rozpoznający wzorce (ang. pattern recognition receptor)

pTreg	- obwodowe limfocyty T regulatorowe (ang. peripheral-derived regulatory T cells)
pTreg	- limfocyty T regulatorowe indukowane na obwodzie (ang. peripheral-derived regulatory T cells)
RCF	- względna siła odśrodkowa będąca wielokrotnością przyspieszenia ziemskiego G (ang. relative centrifugal force)
RIF	- powtarzające się niepowodzenia implantacji (ang. recurrent implantation failure)
RPL	- nawracające utraty ciąży (ang. recurrent pregnancy loss)
RPM	- obroty na minutę; liczba pełnych obrotów wirnika (ang. revolutions per minute)
SA	- spontaniczne poronienie (ang. spontaneous abortion)
s-Flt1	- fms-podobna kinaza tyrozynowa 1 (ang. soluble fms-related tyrosine kinase 1) inna nazwa: rozpuszczalny receptor typu 1 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. soluble vascular endothelial growth factor receptor-1, sVEGFR1)
sIg	- immunoglobulina powierzchniowa (ang. surface immunoglobulin)
SPF	- środowisko wolne od specyficznych patogenów (ang. Specific Pathogen Free)
sTLR	- zewnątrzkomórkowy receptor TLR (ang. surface TLR)
TAB1/2	- białko 1/2 wiążące kinazę aktywowaną przez TGF- β (ang. TGF- β activated kinase 1 binding protein 1/2)
TAK1	- kinaza 1 aktywowana przez transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β activated kinase 1)
tBreg	- przejściowe limfocyty B pamięci (ang. transitional B regulatory cells)
TGF-β	- transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β)
Th	- limfocyty T pomocnicze (ang. T helper cells)
TIM-1	- immunoglobulina komórek T i domena 1 mucyny (ang. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1)
TIR	- receptor interleukiny 1 (ang. toll/interleukin-1 receptor/resistance protein)
TLR	- receptor toll-podobny (ang. toll-like receptors)
TNF-α	- czynnik martwicy nowotworów α (ang. tumor necrosis factor α)
TRAF-6/-3	- czynnik 6/3 związany z receptorem TNF (ang. TNF receptor associated factor 6/3)
Treg	- limfocyt T regulatorowy (ang. T regulatory cell)
TSLP	- limfopoetyna zrębu grasicy (ang. thymic stromal lymphopoetin)
tTreg	- grasicze limfocyty T regulatorowe (ang. thymus-derived regulatory T cells)
uNK	- maciczne komórki NK (ang. uterus natural killer cells)
VEGFA	- czynnik wzrostu śródbłonka typu A (ang. vascular endothelial growth factor A)
WHO	- Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

1 WSTĘP

1.1 Zmiany adaptacyjne układu odpornościowego w przebiegu ciąży

W ciąży, w organizmie matki dochodzi do szeregu zmian anatomicznych i fizjologicznych prowadzących do wytworzenia odpowiedniego środowiska dla rozwijającego się płodu. Aby ciąża mogła zakończyć się powodzeniem adaptacji musi ulec większość układów organizmu, w tym szczególnie układ odpornościowy.

W latach 50 ubiegłego wieku sądzono, iż ciąża związana jest z ogólnym osłabieniem odpowiedzi odpornościowej matki celem akceptacji obcych antygenów ojcowskich obecnych w tkankach płodu^{1,2}. Jednak współczesna wiedza wskazuje, że ulega on ulega raczej przejściowej modulacji niż wyciszeniu, aby możliwa była jednoczesna obrona organizmu przed patogenami jak i akceptacja pół-alogenicznego płodu³. W ciąży obserwuje się ciągłe zmiany, głównie w lokalnej, odpowiedzi odpornościowej, ponieważ każdy etap ciąży wymaga unikalnego środowiska immunologicznego. Dzięki odpowiednim interakcjom pomiędzy komórkami układu odpornościowego matki, a sygnałami dostarczonymi przez płód oraz łożysko, możliwa jest zmiana odpowiedzi prozapalnej, dominującej w pierwszych tygodniach ciąży, na przeciwzapalną korzystną przez większość ciąży i ponownie na prozapalną podczas porodu⁴.

Zmiany w liczbie jak i funkcjonowaniu komórek układu odpornościowego w macicy rozpoczynają się jeszcze przed implantacją zarodka. Hormony płciowe, progesteron oraz estrogeny, regulują wydzielanie przez komórki endometrium chemokin i cytokin rekrutujących głównie komórki dendrytyczne (ang. dendritic cells, DC), makrofagi, komórki NK (ang. natural killer cells) oraz limfocyty T do macicy^{5,6}. Ponadto obecność nasienia w żeńskich drogach rozrodczych uruchamia mechanizmy, które dodatkowo wspomagają migrację komórek układu odpornościowego do macicy, oraz wpływają na ich aktywację. Pęcherzyki nasienne i gruczoły krokowe wydzielają m.in. cytokiny, w tym transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β , TGF- β) oraz prostaglandyny, które oddziałują z komórkami nabłonkowymi błony śluzowej szyjki macicy i macicy, aktywując syntezę cytokin i indukując zmiany komórkowe i molekularne przypominające klasyczną kaskadę zapalną⁷⁻¹⁰.

Powodzenie ciąży zależy również od wytworzenia przez układ odpornościowy matki tolerancji na antygeny ojcowskie oraz płodowe. Obecnie uważa się, że

kluczowymi komórkami odpowiedzialnymi za tolerancję w ciąży są limfocyty T regulatorowe (ang. T regulatory cells, Treg). Badania wskazują, że również limfocyty B wydzielające IL-10 oraz IL-35, czyli tzw. limfocyty B regulatorowe (ang. B regulatory cells, Breg) mogą pełnić tę rolę¹¹⁻¹⁵. Ponadto pozostałe komórki układu odpornościowego obecne na styku maczyno-płodowym, takie jak makrofagi¹⁶, DC¹⁷ oraz limfocyty T $\gamma\delta$ ¹⁸ zależnie od fazy ciąży charakteryzują się tolerogennym fenotypem lub jak w przypadku macicznych komórek NK (ang. uterine NK cells, uNK) obniżoną cytotoksycznością¹⁹.

Tolerancja immunologiczna w ciąży kształtuje się bardzo wcześnie, ponieważ jak wykazano u myszy, już na etapie zapłodnienia, podczas którego komórki układu odpornościowego matki, głównie komórki prezentujące antygeny (ang. antigen presenting cells, APC), wychwytyują aloantygeny obecne w nasieniu. APC migrują do lokalnych węzłów chłonnych i pod wpływem cytokin, głównie TGF- β i prostaglandyn pochodzących z nasienia, nabywają fenotypu toleroennego i indukują powstawanie Treg specyficznych względem antygenów ojcowskich^{20,21}. W późniejszym okresie ciąży, to również trofoblast staje się źródłem czynników lokalnie modulujących układ odpornościowy. Komórki trofoblastu pozakosmówkowego (ang. extravillous trophoblast cells, EVT) wykazują ekspresję nieklasycznych cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC) klasy Ib (HLA-E, HLA-G) i ograniczoną ekspresję klasycznych MHC klasy Ia (HLA-C). Oddziałują one z receptorami na komórkach NK hamując ich właściwości cytotoksyczne^{22,23}. Dodatkowo EVT oraz łożysko uwalniają mediatory immunosupresyjne takie jak IL-10 czy IL-35^{24,25}. Łożysko produkuje także cytokiny, hormony oraz inne czynniki, które dostają się do krążenia maczynego i wpływają na systemowe funkcjonowanie układu odpornościowego²⁶. Wraz z rozwojem ciąży do krążenia matki przedostają się również antygeny płodowe, głównie z łożyska, które mogą być prezentowane w obwodowych narządach limfatycznych i prowadzić do zwiększenia się puli Treg²¹.

W promowaniu tolerancji również ważną rolę odgrywa środowisko hormonalne. Progesteron zwiększa poziom HLA-G²⁷, a w wysokich stężeniach jest silnym induktorem cytokin typu Th2²⁸. Promuje on również powstawanie Treg²⁹, komórek T $\gamma\delta$ ³⁰ i wydzielanie asymetrycznych przeciwciał przez limfocyty B³¹. Z drugiej strony progesteron ogranicza migrację i funkcje konwencjonalnych limfocytów T³², cytotoksycznych komórek NK³³, neutrofili³⁴ i makrofagów. Innym hormonem

kształtującym tolerancję w ciąży jest estradiol. Hormon ten wspomaga m.in. indukcję Treg³⁵ oraz hamuje odpowiedź komórek Th17³⁶. Z kolei regulacyjne działanie ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (ang. human chorionic gonadotropin, hCG) polega m.in. na indukcji proliferacji uNK³⁷ oraz indukcji proliferacji i różnicowaniu się tolerogennych komórek dendrytycznych³⁸. Ponadto hCG przyczynia się do rekrutacji Treg do macicy³⁹⁻⁴¹, a także może promować aktywację limfocytów B w kierunku Breg^{42,43}.

Oprócz dobrze znanych i szczegółowo zbadanych adaptacji limfocytów T, komórek NK, komórek dendrytycznych, a także makrofagów wykazano, że również limfocyty B ulegają głębokim modyfikacjom i adaptacjom w czasie ciąży^{44,45}. Komórki te, pomimo tego iż stanowią niewielki procent wszystkich limfocytów obecnych na styku maczyno-płodowym^{46,47}, to są ważnym elementem układu odpornościowego w ciąży. Ich nieprawidłowa liczba oraz aktywność towarzyszy wielu komplikacjom ciąży. Dlatego też, w ostatnich latach uwaga wielu grup badawczych skierowana jest w stronę roli limfocytów B, a szczególności Breg, w przebiegu prawidłowej jak i patologicznej ciąży.

1.2 Limfocyty B

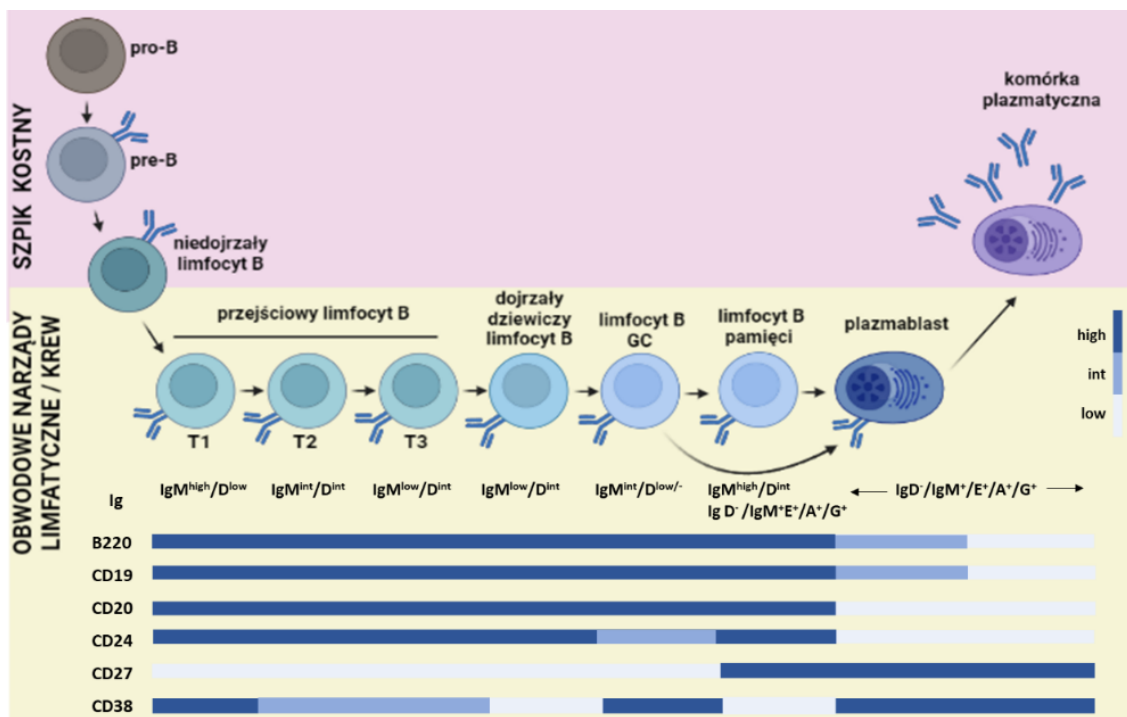
1.2.1 Główne populacje limfocytów B

Limfocyty B to jedna z głównych populacji komórek układu odpornościowego. Ich podstawowym zadaniem jest produkcja przeciwciał w odpowiedzi na antygen, co jest zasadniczym elementem nabytej humoralnej odpowiedzi odpornościowej. Ponadto komórki te są zdolne do prezentacji antygenów oraz do wydzielania cytokin. Fenotypowo limfocyty B charakteryzuje obecność receptorów immunoglobulinowych dla antygenów – receptorów limfocytów B (ang. B cell receptor, BCR), ale także innych receptorów powierzchniowych m.in. MHC klasy I i II, CD20, CD19, CD40, CD86, CD80, CD72, CD24, CD27, biorących udział w rozpoznawaniu i prezentacji antygenów, a także będących markerami różnicowania.

Limfocyty B dojrzewają i różnicują się w procesie hematopoezy. W życiu płodowym, proces ten rozpoczyna się już w pęcherzyku żółtkowym, natomiast w miarę postępu embriogenezy funkcję hematopoetyczną przejmuje wątroba płodowa. Większość limfocytów B, które wywodzą się z komórek macierzystych wątroby

płodowej różnicują się w limfocyty B-1, natomiast limfocyty B powstające z prekursorów obecnych w szpiku kostnym różnicują się w linię B-2. Limfocyty B-1 obecne są głównie w otrzewnej i opłucnej, jednakże mogą również migrować do obwodowych narządów limfatycznych takich jak śledziona czy węzły chłonne. W krwi obwodowej występują one mniej licznie. Wśród tej populacji rozróżnia się limfocyty B-1a oraz B-1b na podstawie odpowiednio obecności lub braku antygenu CD5 w ich błonie komórkowej^{48,49}.

Z kolei limfocyty B-2 to tzw. konwencjonalne limfocyty B. Komórki te po kontakcie z antygenem, a następnie aktywacji produkują przeciwciała o wysokim powinowactwie⁵⁰. Ogólnie ich dojrzewanie można podzielić na dwie fazy. Pierwsza, niezależna od antygenu, odbywa się w szpiku kostnym. Natomiast druga faza dojrzewania zachodzi w obwodowych narządach limfatycznych i zależna jest od specyficznego rozpoznania antygenu przez dziewicze limfocyty B, a także od pomocy ze strony limfocytów T pomocniczych (ang. T helper cells, Th). Rozdzielenie dojrzewania na etapy implikuje obecność we krwi obwodowej odmiennych fenotypowo subpopulacji limfocytów B (rycina 1). Wśród limfocytów B krwi można wyróżnić pięć głównych podtypów tych komórek charakteryzujących się ekspresją specyficznych antygenów: przejściowe limfocyty B, dziewicze limfocyty B, limfocyty B pamięci po przełączeniu klas, limfocyty B bez przełączenia klas oraz plazmablasty. U zdrowych osób stanowią one odpowiednio około 4%, 50%, 15%, 18% i 5% obwodowych limfocytów B⁵¹⁻⁵⁴.



Rycina 1. Schemat przedstawiający dojrzewanie limfocytów B wraz z ekspresją wybranych antygenów zewnątrzkomórkowych u człowieka.

GC - ośrodek rozmnażania (ang. germinal centre); high - wysoka ekspresja; int - średnia ekspresja; low - niska ekspresja; T1-T3 - stadia przejściowych limfocytów B;

Opracowanie własne na podstawie⁵¹⁻⁵³; Schemat wykonano w programie BioRender.com.

1.2.2 Limfocyty B – aktywacja oraz prezentacja antygeny limfocytom Th

Prezentacja antygenów dziewiczemu limfocytom T $CD4^+$ przez komórki APC odbywa się w obwodowych narządach limfatycznych. Jej celem jest rozwinięcie swoistej odpowiedzi na dany antygen. Jak dotąd najlepiej poznanymi i efektywnymi APC w procesie aktywacji dziewiczych limfocytów T są DC. Reakcje pomiędzy DC jako APC, a limfocytami T zostały uznane jako model oddziaływań prowadzących do aktywacji limfocytów T. Jednak DC nie są jedynymi komórkami prezentującymi antygeny limfocytom Th, ponieważ również limfocyty B mogą prezentować antygeny grasiczozależne.

Limfocyty B ulegają aktywacji w momencie rozpoznania przez BCR antygeny, który może być rozpuszczalnym antygenem, antygenem w kompleksach immunologicznych lub antygenem obecnym na komórkach np. komórkach dendrytycznych grudek (ang. follicular dendritic cells, FDC)^{55,56}. BCR umożliwia limfocytowi B rozpoznanie i pobranie antygeny nawet jeżeli jego stężenie jest bardzo niskie, co odróżnia go od pozostałych APC, które wymagają znacznie wyższych stężeń antygeny do aktywacji i prezentacji. Wykazano, że cytokiny (m.in. IL-4, IL-21, IL-2,

IL-13, TGF- β)⁵⁷⁻⁶⁰, czynnik aktywujący limfocyty B (ang. B-cell activating factor, BAFF)^{61,62} oraz receptory toll-podobne (ang. toll-like receptors, TLR)^{63,64} dostarczają dodatkowych sygnałów, które wzmacniają efektywną prezentację antygenów.

W przypadku limfocytów B jako APC ogólny schemat odpowiada interakcjom pomiędzy DC a limfocytami T, jednak istnieją pewne różnice. Uważa się, że limfocyty B w porównaniu z DC są słabszymi APC. Większość badań wskazuje, że limfocyty B raczej nie biorą udziału w aktywacji dziewiczych limfocytów T. Powszechnie uważa się, że prezentuje on antygeny uprzednio już aktywowanym limfocytom T (np. przez DC), głównie w celu uzyskania sygnałów niezbędnych do przeżycia, proliferacji czy przełączania klas przeciwciał. Część badań wskazuje jednak na zdolność limfocytów B do indukcji Treg. Udowodniono, że limfocyty B w warunkach *in vitro* mogą indukować ekspansję alogenicznych limfocytów T CD4⁺Foxp3⁺, lecz znacznie słabiej wpływają na proliferację limfocytów T CD4⁺Foxp3⁺⁶⁵. Z drugiej strony wykazano, że limfocyty B śledziony przekształcają alogeniczne, dziewicze limfocyty T w regulatorowe limfocyty T Foxp3⁺ w obecności TGF- β i IL-2, z kolei limfocyty B otrzewnej w tych samych warunkach mogą indukować limfocyty Th17, co wskazuje na odmienne właściwości konwencjonalnych limfocytów B-2 zasiedlających śledzionę oraz limfocytów B-1 rezydujących w otrzewnej⁶⁶.

Nowsze badania sugerują również na zdolność limfocytów B do aktywacji limfocytów CD4⁺CD25⁻ w kierunku limfocytów T o charakterze regulatorowym. Aktywowane w ten sposób limfocyty T badacze nazwali limfocytami Treg indukowanymi przez limfocyty B (ang. Treg-of-B cells). Komórki te charakteryzują się brakiem ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3, natomiast posiadają markery wydzielają IL-10. Co jest istotne, obecność IL-10 nie jest konieczna do indukcji Treg-of-B, lecz jedynie kontakt pomiędzy limfocytom T, a limfocytom B⁶⁷.

Limfocyty B-1 w większości działają niezależnie od sygnałów dostarczanych przez limfocyty T^{68,69}. Mogą jednak prezentować antygeny limfocytom T, co wykazano zarówno *in vitro*⁷⁰ jak i *in vivo*^{71,72}. Potwierdza to również fakt, iż limfocyty B-1 posiadają markery związane z prezentacją antygenów i kostymulacją, takie jak MHC klasy II, CD80 i CD86⁷⁰. Co więcej, doniesienia Zimeckiego i wsp. wskazują, że limfocyty B-1 mogą wykazywać większe zdolności do prezentacji antygenów od konwencjonalnych limfocytów B-2, ponieważ wywołują większą proliferację limfocytów T specyficznych względem antygenów⁷¹.

1.2.3 Limfocyty B w ciąży

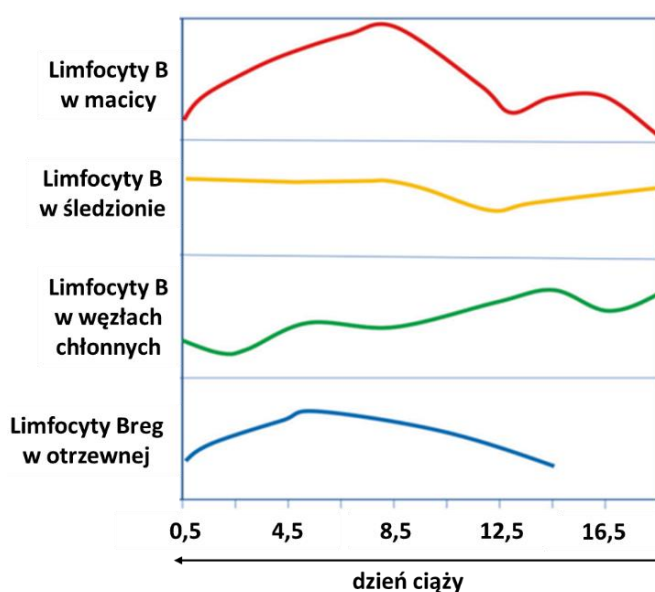
Pomimo tego, iż limfocyty B na styku maczyno-płodowym^{46,47} stanowią nieznaczny odsetek wszystkich limfocytów, to mają wyraźnie korzystny wpływ na prawidłowy przebieg ciąży. Badania wskazują na aktywne zaangażowanie limfocytów B w rozwój ciąży, co szczególnie widoczne jest w przypadku powikłań ciąży, w których obserwuje się nieprawidłowości w ogólnej liczbie limfocytów B oraz we frekwencji różnych subpopulacji tych komórek^{15,42,73–76}. Ponadto ich znaczenie w ciąży potwierdzają obserwacje ciężarnych kobiet, które stosowały Rytuksymab – chimeryczne przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko powierzchniowemu antygenowi CD20. Lek ten powoduje zmniejszenie liczby krążących limfocytów B⁷⁷. Udowodniono, że leczenie Rytuksymabem przed zajściem w ciążę i w jej trakcie, skutkuje wyższym odsetkiem powikłań ciąży, takich jak samoistne poronienia, porody przedwczesne czy stan przedrzucawkowy^{78,79}. Z kolei u myszy wykazano, że brak dojrzałych limfocytów B wiąże się ze zmniejszoną liczebnością miotu, zmniejszoną wielkością płodów i większą podatnością na infekcje prenatalne⁸⁰. Z drugiej strony, w przebiegu prawidłowej ciąży dochodzi do obniżenia ogólnej liczby krążących limfocytów B zarówno u kobiet^{44,81} jak i u samic myszy⁴⁵. Spowodowane jest to zahamowaniem limfopoety w szpiku kostnym w drugiej połowie ciąży w wyniku działania estrogenów⁸² oraz migracją limfocytów B do łożyska⁸³.

W zależności od stopnia zaawansowania ciąży, w różnych kompartmentach organizmu kobiet i samic myszy zauważa się zmienne proporcje różnych subpopulacji limfocytów B⁵⁴. Zmiany dotyczą głównie trzeciego trymestru ciąży. W krwi obwodowej u kobiet w tym okresie ciąży w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży obserwuje się zmniejszenie odsetka przejściowych limfocytów B o fenotypie CD19⁺IgD⁺CD38^{high} oraz CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}, limfocytów B pamięci bez przełączenia klas o fenotypie CD19⁺IgD⁺CD38⁻ oraz CD19⁺IgD⁺CD27⁺, limfocytów B pamięci spoczynkowych o fenotypie CD19⁺IgD⁻CD38⁻, plazmablastów CD19⁺IgD⁻CD38^{high}, limfocytów B-1 o fenotypie CD5⁺CD20⁺ oraz CD19⁺CD5⁺, a także limfocytów CD19⁺CD5⁺CD1d⁺. Wzrost frekwencji natomiast jest obserwowany w przypadku limfocytów B dziewiczych o fenotypie CD19⁺IgD⁺CD38⁺^{44,76,81,84,85}. W pierwszym trymestrze ciąży, u kobiet nie obserwuje się zazwyczaj zmian we frekwencji subpopulacji limfocytów B w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży^{76,86}.

Badania z udziałem ciężarnych samic myszy dostarczyły dodatkowych informacji odnośnie innych kompartmentów organizmu. Analiza komórek wykazała mniejszą aktywność limfopoetyczną szpiku kostnego w ciąży, głównie w drugiej połowie, o czym świadczył spadek liczby wczesnych stadiów limfocytów B, takich jak pre/pro limfocytów B ($B220^{int}slgM^{-}$) czy niedojrzałych limfocytów B ($B220^{int}slgM^{+}$) w porównaniu z samicami niebędącymi w ciąży. Z kolei na podstawie wzrostu liczby dojrzałych limfocytów B ($B220^{+}slgM^{+}$) w szpiku kostnym w tym okresie ciąży wnioskuje się, że tempo dojrzewania limfocytów B jest znacznie wyższe w ciąży niż przed ciążą. Zahamowanie limfopoetyzy wpływa na ogólną liczbę limfocytów B w krwi obwodowej oraz w śledzionie, głównie w drugiej połowie ciąży, w której obserwowany jest spadek liczby tych komórek. W krwi obwodowej ciężarnych samic dochodzi także do zmniejszenia liczby niedojrzałych ($sIgM^{+}sIgD^{low}$), przejściowych ($CD19^{+}sIgM^{+}sIgD^{+}$) oraz dojrzałych limfocytów B ($sIgM^{low}sIgD^{low}$). Węzły chłonne drenujące macicę oraz otrzewną z kolei charakteryzuje napływ limfocytów B. W węzłach chłonnych widoczny jest wzrost liczby dojrzałych ($B220^{+}C93^{+}$, $B220^{+}CD21^{+}$), niedojrzałych ($B220^{+}C93^{-}$) i aktywowanych limfocytów B ($B220^{+}CD19^{+}CD80^{+}CD86^{+}$) u samic w ciąży w porównaniu z samicami niebędącymi w ciąży, a w otrzewnej dochodzi do zwiększenia liczby limfocytów B-1 ($CD19^{+}CD23^{+}$) i B-2 ($CD19^{+}CD23^{-}$)^{12,87}.

U kobiet w doczesnej we wczesnych etapach ciąży limfocyty B stanowią około 1,5% wszystkich limfocytów. Frekwencja tych komórek wzrasta w trakcie ciąży do około 3%, a przed porodem stanowią one około 2% wszystkich limfocytów doczesnej^{14,46,54}. W doczesnej zidentyfikowano populację dziewiczych limfocytów B ($CD19^{+}CD27^{-}IgD^{+}$), których frekwencja w pierwszym trymestrze wynosi około 40% wszystkich komórek $CD19^{+}$. Wraz z rozwojem ciąży następuje spadek frekwencji tej subpopulacji limfocytów B. Odwrotną sytuację obserwuje się w przypadku limfocytów B pamięci po przełączeniu klas ($CD19^{+}CD27^{+}IgD^{-}$), ponieważ procentowy udział tej populacji w ogólnej liczbie limfocytów B doczesnej wzrasta z ~15% w pierwszym trymestrze, do ~40% w momencie porodu. Badaczom udało się również oznaczyć w doczesnej limfocyty B pamięci bez przełączenia klas ($CD19^{+}CD27^{+}IgD^{+}$), których frekwencja jest stała w trakcie ciąży (~10% limfocytów B). Z kolei frekwencja plazmablastów ($CD19^{+}CD27^{+}CD38^{+/high}IgD^{-}$) wzrasta w drugim trymestrze w porównaniu z pierwszym, jednakże nie przekracza ona 5% wszystkich limfocytów B doczesnej¹⁴.

W macicy myszy w od momentu implantacji następuje wzrost frekwencji limfocytów B, gdzie ich najwyższe stężenie obserwuje się w połowie ciąży (około 15% wszystkich limfocytów). Zidentyfikowano populację limfocytów B pamięci ($B220^+CD19^+CD21^+CD27^+$), komórek plazmatycznych ($B220^+CD27^+CD38^+CD138^+$) oraz przejściowych limfocytów B ($B220^+CD19^+CD24^+IgM^{high}IgD^{low}$), które w okresie okołoinplantacyjnym stanowią odpowiednio ~55%, ~10% oraz ~15% wszystkich limfocytów B macicy¹². Dodatkowo w macicy myszy w okresie okołoinplantacyjnym (5,5 dzień ciąży) w porównaniu do macicy w fazie estrus można zaobserwować wyższą frekwencję aktywowanych limfocytów B ($B220^+CD19^+CD80^+CD86^+$), co według autorów publikacji może sugerować o zaangażowaniu limfocytów B w implantację zarodków¹². Na rycinie 2 przedstawiono zmiany jakie zachodzą w ogólnej liczbie limfocytów B w macicy, śledzionie oraz węzłach chłonnych, a także Breg w otrzewnej, w miarę postępu ciąży u myszy.



Rycina 2. Zmiany całkowitej liczby limfocytów B w macicy, śledzionie i w węzłach chłonnych oraz zmiany całkowitej liczby limfocytów Breg w otrzewnej w miarę postępu ciąży u myszy. Opracowano własne na podstawie schematu z ⁵⁴.

Wydaje się, że zmiany jakie zachodzą w trakcie ciąży w populacjach limfocytów B w śledzionie, a mianowicie zwiększenie stosunku limfocytów B strefy brzeżnej (ang. marginal zone, MZ) do limfocytów B grudek (ang. follicular, FO), mogą mieć znaczenie dla rozwoju prawidłowej ciąży, ponieważ zauważono, że proporcje te są zaburzone w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem ($\text{♀CBA/J} \times \text{♂DBA/2J}$)

w porównaniu z prawidłową ciążą (♀CBA/J x ♂Balb/c)^{74,87}. Wydaje się, że ekspansja limfocytów B strefy brzeżnej śledziony może stanowić mechanizm kompensujący limfopenię limfocytów B obserwowaną podczas ciąży, maksymalizując w ten sposób zdolność układu odpornościowego matki do ochrony, poprzez szybkie wydzielanie naturalnych przeciwciał w odpowiedzi na wniknięcie patogenu⁸⁷.

Dane odnośnie stężenia immunoglobulin w ciąży nie są jednoznaczne. Nie mniej jednak, u ciężarnych kobiet jak i myszy, szczególnie we wczesnych okresach ciąży, odnotowuje się wyższe stężenia immunoglobulin IgM, IgA i IgG w surowicy niż u kobiet i samic myszy niebędących w ciąży^{45,86}. Z kolei w trzecim trymestrze ciąży u kobiet stężenie wymienionych przeciwciał jest niższe niż to obserwowane u kobiet nieciężarnych⁸⁸.

Limfocyty B są również źródłem przeciwciał asymetrycznych. Są to przeciwciała, które z powodu przyłączenia się grupy oligosacharydowej do jednej z domen zmiennych fragmentu Fab są niezdolne do tworzenia kompleksów z antygenem. W związku z czym, nie aktywują efektorowych mechanizmów odpornościowych, takich jak wiązanie dopełniacza i fagocytoza, ale działają jako przeciwciała blokujące⁸⁹. Zauważono, że w przebiegu prawidłowej ciąży asymetryczne przeciwciała skierowane przeciwko antygenom ojca stanowią jeden z mechanizmów zapobiegających odpowiedzi układu odpornościowego matki przeciwko tym antygenom⁹⁰. Ich niedostateczne wytwarzanie obserwowane jest w przypadku spontanicznych poronień (ang. spontaneous abortion, SA) oraz nawracających strat ciąż (ang. recurrent pregnancy loss, RPL)^{91,92}.

Z kolei przeciwciałami, które mają niekorzystny wpływ na utrzymanie ciąży są przeciwciała antyfosfolipidowe. Jest to heterogenna grupa immunoglobulin skierowanych przeciwko ujemnie naładowanym fosfolipidom, kofaktorom lub kompleksom fosfolipid-kofaktor, które zwykle występują w błonach komórkowych monocytów, komórek trofoblastu, śródbłonna i płytek krwi. Obecność przeciwciał antyfosfolipidowych, które obejmują antykoagulant toczniowy, przeciwciała antykardiolipinowe (IgG/IgM) i przeciwciała przeciwko beta2-glikoproteinie-I (IgG/IgM), jest czynnikiem etiopatologicznym zespołu antyfosfolipidowego (ang. antiphospholipid syndrome, APS)⁹³. Ta choroba autoimmunizacyjna charakteryzuje się stanem nadkrzepliwości, który może prowadzić do wewnątrzmacicznej śmierci płodu, samoistnych poronień, zakrzepicy żył głębokich i stanu przedrzucawkowego⁹⁴. Nie określono, która dokładnie populacja limfocytów B

jest odpowiedzialna za produkcję autoprzeciwciał związanych z APS. Zauważono jednak, że zwiększona liczba limfocytów B z ekspresją CD5 (limfocyty B-1a) we krwi obwodowej pacjentek z APS dodatnio koreluje z wysokimi poziomami autoprzeciwciał⁹⁵. Oprócz przeciwciał antyfosfolipidowych wykazano, obecność innych autoprzeciwciał, które mogą wpływać na prawidłowy przebieg ciąży. Jednymi z nich są agonistyczne autoprzeciwciała przeciwko receptorowi typu I angiotensyny II (ang. angiotensin II type 1 receptor agonistic autoantibody, AT1-AA). AT1-AA naśladują działanie naturalnego ligandu receptora typu I angiotensyny II (ang. angiotensin II receptor type 1, AT1) i wiążą się ze stosunkowo dużym powinowactwem z receptorem AT1 obecnym w łożysku. Prowadzi to do aktywacji wewnątrzkomórkowej kaskady, która z kolei indukuje wytwarzanie czynników antyangiogennych odgrywających rolę w rozwoju stanu przedrzucawkowego^{96,97}. Z przeprowadzonych *in vitro* badań wynika, że limfocytami B odpowiedzialnymi za produkcję AT1-AA w stanie przedrzucawkowym mogą być komórki CD19⁺CD5⁺ (B-1a). Czynnikiem, który prawdopodobnie wpływa na aktywację tych komórek jest hCG, którego wyższe stężenie obserwuje się u pacjentek w trzecim trymestrze ciąży ze stwierdzonym stanem przedrzucawkowym w porównaniu z kobietami w prawidłowej ciąży. Komórki te charakteryzuje wysoki poziom ekspresji receptora dla tego hormonu. Udowodniono także, iż frekwencja limfocytów B-1a w krwi kobiet w trzecim trymestrze ciąży z objawami stanu przedrzucawkowego nie ulega obniżeniu jak w przypadku kobiet w prawidłowej ciąży. Ponadto stwierdzono obecność komórek CD19⁺CD5⁺ w łożysku kobiet ze stanem przedrzucawkowym, natomiast w łożyskach kobiet w prawidłowej ciąży nie odnotowano występowania tej populacji limfocytów⁷⁶.

Limfocyty B mogą również wpływać na działanie układu odpornościowego w ciąży na drodze innej niż poprzez wydzielanie immunoglobulin. Obecnie wiadomo, że limfocyty B są zdolne do immunosupresji poprzez wydzielanie cytokin lub poprzez bezpośredni kontakt z komórką efektorową. Limfocyty B o wymienionych właściwościach nazwano limfocytami B regulatorowymi i uważa się, że mogą odgrywać znaczącą rolę w regulacji tolerancji immunologicznej w ciąży.

1.2.4 Limfocyty B regulatorowe

1.2.4.1 Powstawanie oraz fenotyp limfocytów B regulatorowych

Pierwsze prace dotyczące immunosupresyjnej funkcji limfocytów B pojawiły się w pracach z lat 70 ubiegłego wieku^{98,99}. Jednak dopiero ponad 20 lat później odkryto mechanizmy, które odpowiedzialne są za supresyjne działanie tej grupy limfocytów. Po badaniach na mysim modelu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu i rdzenia, które wykazały, że limfocyty B mogą być odpowiedzialne za przebieg choroby i powrót do zdrowia, zaczęto dokładnie badać także inne schorzenia autoimmunizacyjne, w celu sprawdzenia analogicznej funkcji limfocytów B, a także mechanizmów wyjaśniających ten fenomen¹⁰⁰. Obecnie rolę Breg, pozytywną jak i negatywną, upatruje się w również w innych stanach chorobowych w tym w nowotworach^{101–103}, alergiach^{104,105}, infekcjach bakteryjnych i wirusowych¹⁰⁶, ale także w transplantologii^{107,108} i w przebiegu ciąży^{11,15,42–44,80,109}.

Limfocytami B regulatorowymi nazywamy limfocyty B, które mają właściwości immunosupresyjne. W przeciwieństwie do limfocytów T regulatorowych, Breg nie są odrębną subpopulacją limfocytów B, ponieważ jak dotąd nie udało się zidentyfikować cząsteczki, czynnika transkrypcyjnego (odpowiednika FoxP3 dla Treg) lub zestawu markerów, które w jasny sposób pozwoliłyby wyróżnić populację limfocytów Breg. Dlatego, część badaczy uważa, że limfocyty Breg powinny pozostać funkcjonalnie zdefiniowaną subpopulacją w oparciu o ich zdolność do hamowania odpowiedzi prozapalnych *in vitro* lub *in vivo*^{110,111}.

Dane literaturowe wskazują, że różne subpopulacje limfocytów B mogą w odpowiednim środowisku cytokinowym lub po odpowiedniej stymulacji antygenem wykazywać, prawdopodobnie przejściowe, właściwości immunosupresyjne. Jak dotąd zidentyfikowano kilka fenotypów limfocytów Breg, które mogą różnić się mechanizmem działania. W tabeli nr 1 oraz nr 2 podano najczęściej badane subpopulacje limfocytów B, odpowiednio u ludzi i myszy, mogące wykazywać właściwości immunosupresyjne wraz z udowodnionym lub przypuszczalnym mechanizmem działania.

Rodzaj/Typ limfocytów Breg	Fenotyp	Wydzielana cząsteczka oraz zbadany lub potencjalny mechanizm działania	Bibliografia
Limfocyty B10/limfocyty B pamięci	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺	-IL-10: hamowanie produkcji TNF- α przez monocyty; -IL-35	112,113
Niedojrzałe/Przejęciowe limfocyty B	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ^{high}	-IL-10, CD80/CD86: indukcja Treg; hamowanie powstawania Th17 oraz Th1 z naiwnych limfocytów T; hamowanie produkcji cytokin prozapalnych; -IL-35	113–117
Komórki Br1	CD19 ⁺ CD25 ^{high} CD71 ^{high} CD73 ⁻	-IL-10: hamowanie odpowiedzi zapalnej oraz indukcja Treg;	118
Plazmablasty	CD19 ⁺ CD27 ^{int} CD38 ^{high}	-IL-10, TGF- β : hamowanie odpowiedzi efektorowej limfocytów T cytotoksycznych; hamowanie DC; -IL-35	42,113,119,120
Limfocyty B GrB⁺	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD1d ⁺ IgM ⁺ CD147 ⁺	-Granzym B: degradacja receptora limfocytów T;	121,122
CD5⁺CD1d⁺	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high}	-IL-10: hamowanie odpowiedzi Th17;	123
-	CD19 ⁺	-CD39/CD73	124
-	CD24 ⁻ CD38 ⁺	-Granzym B: hamowanie limfocytów CD4 ⁺ CD25 ⁻ ;	125

Tabela 1. Tabela przedstawiająca najczęściej badane subpopulacje limfocytów B regulatorowych u ludzi wraz z udowodnionym lub przypuszczalnym mechanizmem działania.

Rodzaj/Typ limfocytów Breg	Fenotyp	Wydzielana cząsteczka oraz zbadany lub potencjalny mechanizm działania	Bibliografia
B10	C19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high}	-IL-10: indukcja Treg i supresja limfocytów efektorowych CD4 ⁺ i CD8 ⁺ ; hamowanie odpowiedzi Th17; -IL-35	11,43,112,126–129
Limfocyty strefy brzeżnej śledziony	CD19 ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁻	-IL-10: hamowanie limfocytów efektorowych CD4 ⁺ i CD8 ⁺ ;	130,131
T2mzp cells	CD19 ⁺ CD21 ^{high} CD23 ^{high}	-IL-10: indukcja Treg oraz supresja limfocytów efektorowych CD4 ⁺ i CD8 ⁺ ;	132,133
-	CD19 ⁺ IL-35 ⁺ /IL19 ⁺ IL10 ⁺	-IL-10: aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT;	43
Limfocyty B Tim-1⁺	CD19 ⁺ Tim-1 ⁺	-IL-10: hamowanie limfocytów efektorowych CD4 ⁺ i regulacja odpowiedzi Th1 Th17;	134–136
Plazmablasty	CD138 ⁺ CD44 ^{high}	-IL-10: hamowanie DC i limfocytów efektorowych CD4 ⁺ i wzrost ekspresji IL-10 przez limfocyty T;	119
Limfocyty B cytotoksyczne	CD19 ⁺ CD5 ⁺ FasL ⁺	-FAS-L: indukcja śmierci limfocytów T;	137,138

Tabela 2. Tabela przedstawiająca najczęściej badane subpopulacje limfocytów B regulatorowych u myszy wraz z udowodnionym lub przypuszczalnym mechanizmem działania.

1.2.4.2 Wpływ limfocytów B regulatorowych na inne komórki układu odpornościowego

Immunosupresyjne działanie Breg, podobnie jak Treg, opiera się zarówno na pośrednim jak i bezpośrednim oddziaływaniu z komórkami efektorowymi (tabela nr 1 i 2). Jednym z mechanizmów jest wydzielanie cytokin o właściwościach supresorowych takich jak IL-10, TGF- β czy IL-35. Zdolność do wydzielania IL-10 uważane jest za jedno z głównych kryteriów klasyfikacji danej subpopulacji limfocytów B jako Breg. Jak dotąd jest to też najlepiej zbadany mechanizm działania tej grupy komórek. Z danych literaturowych wynika, że Breg poprzez ekspresję IL-10 mogą m.in. wspomagać różnicowanie się dziewiczych limfocytów T CD4⁺ w kierunku Treg^{43,104,112,114,115,119,126–129,132,133}, hamować odpowiedź limfocytów efektorowych Th1, Th17 oraz CD8⁺^{43,112,126–131,134}. IL-10 wydzielana przez Breg przyczynia się również do hamowania aktywacji makrofagów i dojrzewania DC, a także może wspierać wytwarzanie DC o właściwościach immunosupresyjnych^{42,119}.

Breg poprzez wydzielane TGF- β przyczyniają się do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu i tlenku azotu przez komórki regulatorowe pochodzenia mieloidalnego, co o z kolei prowadzi do zahamowania proliferacji komórek efektorowych CD4⁺ i CD8⁺¹³⁹. Dowiedziono, że dzięki TGF- β Breg mogą prowadzić również do konwersji dziewiczych limfocytów CD4⁺ w Treg^{140,141}.

Kolejną immunosupresyjną cytokiną wydzielaną przez Breg jest IL-35. Aktywuje ona inne limfocyty B do ekspresji IL-10 oraz IL-35. Może być również odpowiedzialna za hamowanie efektorowych komórek Th1 oraz Th17. Cytokina ta jest także zaangażowana w różnicowanie i proliferację limfocytów Treg indukowanych na obwodzie^{142–144}.

Oprócz wydzielania cytokin, Breg zdolne są również do produkcji granzymu B, przez co mogą negatywnie regulować odpowiedź typu Th1 i Th17 oraz prowadzić do zahamowania proliferacji limfocytów CD4⁺ poprzez degradację łańcucha ζ kompleksu TCR^{121,122}.

Breg działają również na drodze bezpośredniego kontaktu z komórką efektorową poprzez ekspresję ligandów Fas (ang. Fas ligand, FasL). FasL oddziałuje z receptorem Fas na komórkach docelowych indukując ich apoptozę. Dane literaturowe wskazują, że Breg w ten sposób może powodować apoptozę komórek efektorowych CD4⁺, CD8⁺ oraz limfocytów Th17^{137,138,145}.

Inną cząsteczką powierzchniową Breg jest immunoglobulina komórek T i domena 1 mucyny (ang. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1, TIM-1), która poprzez oddziaływanie z fosfatydyloseryną i prawdopodobnie poprzez interakcję z APC posiadającymi na swojej błonie komórkowej TIM-4, prowadzi do zahamowania odpowiedzi odpornościowej komórek Th1, Th17 i CD8⁺, jak również indukuje powstawanie Treg przy udziale TGF- β oraz IL-10^{135,146}.

Limfocyty B regulatorowe, podobnie jak pozostałe aktywowane limfocyty B, mogą oddziaływać z limfocytami T poprzez cząsteczki kostymulacyjne: CD40, CD80 oraz CD86¹⁴⁰. Wykazano, że ludzkie limfocyty Breg poprzez interakcję za pośrednictwem CD80 oraz CD86 wraz z synergistycznym działaniem IL-10 mogą stłumić odpowiedź prozapalną Th1^{114,147}. Zwiększony poziom CD80, CD86 oraz CD40 na limfocytach B powiązany jest z konwersją limfocytów T w kierunku Treg^{140,148}. Jednakże, mechanizm działania Breg za pośrednictwem cząsteczek kostymulacyjnych, szczególnie CD80 i CD86, jest nadal słabo poznany.

1.2.4.3 Powstawanie limfocytów Breg

Tak jak wcześniej wspomniano, limfocyty B w różnych stadiach rozwoju i dojrzewania mogą różnicować się w limfocyty B regulatorowe. Wydaje się, że liczba jak i aktywność Breg wzrasta w odpowiedzi na stan zapalny, ponieważ zauważono zwiększenie się liczby Breg w fazie zaostrzenia objawów w niektórych chorobach autoimmunizacyjnych^{132,149} oraz w schorzeniach i stanach chorobowych o podłożu zapalnym w tym nowotworach^{101–103}, alergiach^{104,105} oraz infekcjach bakteryjnych i wirusowych¹⁰⁶.

Czynnikami mogących brać udział w indukcji Breg są cytokiny. Cytokinami, które mogą indukować powstawanie Breg, zarówno u ludzi, jak i u myszy, są m.in. IL-1 β , IL-6, IL-21, czynnik stymulujący tworzenie kolonii i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)^{133,150,151}, ale także BAFF oraz ligand indukujący proliferację (ang. a proliferation-inducing ligand, APRIL)^{152–155}. Dane literaturowe wskazują, iż także cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-10 czy IL-35, mogą wpływać na różnicowanie się limfocytów B w kierunku Breg¹⁴².

Inną istotną drogą powstawania limfocytów B regulatorowych jest aktywacja poprzez receptor BCR. Doświadczenia z udziałem myszy, u których BCR został

pozbawiony funkcjonalności wykazywały zmniejszoną ekspresję IL-10 w odpowiedzi na stymulację receptora TLR9, niż u myszy z w pełni funkcjonalnym BCR^{131,156,157}. Przypuszcza się, że różnicowanie się limfocytów B w kierunku Breg poprzez aktywację BCR pozwala na powstanie Breg specyficznych względem antygeny, co w przypadku rozpoznania przez BCR własnych antygenów może prowadzić do ich tolerancji¹⁵⁸.

Wśród receptorów TLR najczęściej rozpatrywanymi w kontekście aktywacji Breg są TLR9 oraz TLR4, które odpowiednio pobudzane są przez sekwencje DNA zawierające niemetylowany motyw cytozyna-fosforan-guanozyna (CpG) lub lipopolisacharydy bakteryjne (ang. lipopolysaccharid, LPS)^{159–161}.

Indukcja limfocytów Breg może również być następstwem zaangażowania cząsteczek kostymulacyjnych obecnych na limfocytach B. Wykazano, że sygnały pochodzące z interakcji pomiędzy cząsteczką CD40 i ligandem dla CD40 (ang. CD40 ligand, CD40L) są niezbędne do aktywacji i różnicowania się limfocytów B w kierunku Breg. Wskazuje to, że cząsteczki kostymulacyjne mogą być również zaangażowane w powstawanie Breg. Powszechnie, w warunkach *in vitro* stosuje się synergistyczne działania BCR/CD40/TLR oraz cytokin w celu uzyskanie optymalnej funkcji immunosupresorowej przez limfocyty B^{114,162}.

W kontekście ciąży można rozważyć różne czynniki wpływające na aktywację limfocytów B w kierunku Breg. Badania na limfocytach uzyskanych od pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi wykazały, że limfocyty B w odpowiedzi na estrogeny oraz progesteron wydzielają IL-10^{163–166}. Jednak związek między tymi hormonami, a Breg w ciąży nie jest jasny i nadal jest badany. W eksperymentach *in vitro* wykazano również, że czynniki wydzielane przez komórki trofoblastu, m.in. hCG, mogą stymulować limfocyty B do ekspresji IL-10^{43,109}.

1.2.4.4 Rola limfocytów B regulatorowych w ciąży

Limfocyty T regulatorowe do pewnego czasu były uważane za główną populację komórek odpowiedzialną za wytworzenie tolerancji wobec antygenów płodu. Obecnie sugeruje się, że również Breg mogą brać udział w tym procesie, jednakże wiedza na temat mechanizmów działania Breg w ciąży opiera się w głównej mierze na wynikach badań u osób z chorobami autoimmunizacyjnymi lub zwierzęcych modelach tych chorób i próbach ich interpretacji w odniesieniu do ciąży. Jak do tej pory niewiele prac

poświęcono badaniom nad bezpośrednim wpływem tej populacji komórek na przebieg ciąży jak również ich roli w stanach patologicznych ciąży.

Pierwszą publikacją, która wskazała nowy nurt badań immunologów rozrodu była praca opublikowana przez zespół A. Zenclussen w 2013 roku¹⁵. Wykorzystując mysz model ciąży zagrożonej poronieniem (♀CBA/J x ♂DBA/2J) wykazali oni, że jedną z przyczyn, która może być odpowiedzialna za resorpcję płodów w tym modelu jest zbyt niska, w porównaniu do ciąży prawidłowej (♀CBA/J x ♂BALB/c), frekwencja limfocytów Breg o fenotypie CD19⁺CD5⁺CD1d^{high}. Dodatkowo pozytywną rolę Breg w ciąży potwierdzili przez adoptywny transfer limfocytów B z ekspresją IL-10 pochodzących od samic w prawidłowej ciąży, który w modelu poronnym zmniejszył liczbę zresorbowanych płodów. Zaproponowany mechanizm działania Breg opierał się głównie na immunoregulacyjnym działaniu IL-10. Breg hamowały aktywację komórek dendrytycznych, a także przyczyniły się do zwiększenia frekwencji Treg¹⁵. Wykazano także, że u myszy w ciąży Breg odpowiadają za stłumienie odpowiedzi immunologicznej podczas zakażenia bakteryjnego oraz wpływają pozytywnie na populację Treg i ekspresję IL-4, a negatywnie na ekspresję cytokin prozapalnych takich jak TNF- α , Th17 oraz IL-6⁸⁰.

Dalsze badania wykazały wzrost frekwencji limfocytów CD19⁺CD24^{high}CD27⁺ w krwi obwodowej ciężarnych kobiet w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży^{42,43}. Komórki te, były odpowiedzialne za hamowanie ekspresji TNF- α przez limfocyty T. Efektu takiego nie zaobserwowano w przypadku spontanicznych poronień⁴². U kobiet potwierdzono również zdolność limfocytów CD19⁺ izolowanych z doczesnej z 1 i 2 trymetru ciąży, po stymulacji *in vitro*, do produkcji IL-10¹⁴.

Z kolei z badań Breg w krwi obwodowej kobiet w trzecim trymestrze ciąży wynika, że w tym okresie ciąży dochodzi do spadku odsetka limfocytów o fenotypie CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}, CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ oraz CD19⁺CD5⁺CD1d⁺IL-10⁺ w porównaniu do stanu przed ciążą^{44,85}. Przedwczesne porody związane są z jeszcze większym spadkiem odsetka Breg o fenotypie CD19⁺CD1d^{high}CD5⁺IL-10⁺ oraz CD19⁺CD38^{high}CD24^{high}IL-10⁺ niż obserwowany jest on fizjologicznie¹⁶⁷.

Wydaje się, że podobnie jak Treg, aktywacja Breg następuje bardzo szybko w ciąży. W macicy myszy z okresie okołoinplantacyjnym (5,5 dzień ciąży) można zauważyć wzrost limfocytów B zdolnych do wydzielania IL-10. Limfocyty te charakteryzują się wyższą ekspresją cząsteczek kostymulacyjnych CD80 i CD86 oraz markera aktywacji CD27 w porównaniu ze stanem przed ciążą, co może świadczyć

o ich zaangażowaniu w prawidłową implantację zarodka¹². Badania przeprowadzone przez nasz zespół wykazały niższy odsetek Breg z ekspresją IL-35 w 3 dniu ciąży w węzłach chłonnych drenujących macicę oraz we krwi obwodowej u myszy w modelu ciąży zagrożonej poronieniem w porównaniu z grupą myszy w prawidłowej ciąży¹¹. W tym modelu zaobserwowano także niższą frekwencję w populacji Breg z ekspresją IL-10 we krwi obwodowej. Również w macicy (3 dzień ciąży) i w doczesnej (14 dzień ciąży) odnotowano niższy odsetek CD19⁺IL-35⁺ w modelu ciąży zagrożonej poronieniem w porównaniu z prawidłową ciążą¹¹.

1.3 Receptor toll-podobny 9 (TLR9)

1.3.1 Ogólna charakterystyka receptora TLR9

TLR9, podobnie jak pozostałe receptory toll-podobne, należy do receptorów rozpoznających wzorce (ang. pattern recognition receptor, PRR). TLR oprócz rozpoznawania unikalnych antygenów mikrobiologicznych, tak zwanych wzorców molekularnych związanych z patogenami (ang. pathogen-associated molecular pathern, PAMP), zaangażowane są również w rozpoznawanie cząsteczek pochodzenia endogennego, czyli wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniami (ang. damage-associated molecular pattern, DAMP), uwalnianych lub wydzielanych przez komórki po urazach tkanek lub ich przebudowie^{168–170}.

TLR lokalizują się zarówno w endosomach i błonie cytoplazmatycznej różnych komórek układu odpornościowego^{171–176} jak i w narządowo swoistych komórkach nabłonkowych. Obecne są również w komórkach śródbłónka, kardiomiocytach i adipocytach^{177,178}. Wykazano, że zarówno komórki nabłonka i podścieliska ludzkiego endometrium charakteryzują się ekspresją genów dla TLR1-6 i TLR9, a profil ekspresji TLR zależy jest od fazy cyklu miesięczkowego^{179–181}. Również w mysich komórkach nabłonka endometrium potwierdzono ekspresję TLR1-6 na poziomie mRNA. Według autorów ekspresja TLR7 oraz TLR9 w tych komórkach prawdopodobnie występuje jedynie okresowo i może być zależna od fazy cyklu rujowego¹⁸². Ponadto wykazano ekspresję TLR1-10 (na poziomie mRNA) w ludzkim łożysku oraz doczesnej^{183–187}.

TLR9 należy do wewnątrzkomórkowych receptorów TLR¹⁸⁸. Udowodniono jednak, że może się on również lokalizować w błonie komórkowej jednojądrzastych komórek krwi obwodowej¹⁸⁹, w tym limfocytach B, gdzie działa jako negatywny

regulator aktywacji TLR9 w endosomach¹⁹⁰. Ponadto TLR9 może być obecny w błonach komórkowych neutrofili¹⁹¹ oraz erytrocytów^{192,193}. Jednak jaką dokładnie rolę pełnią zewnątrzkomórkowe TLR9 (ang. surface TLR9, sTLR9) nie jest do końca jasne.

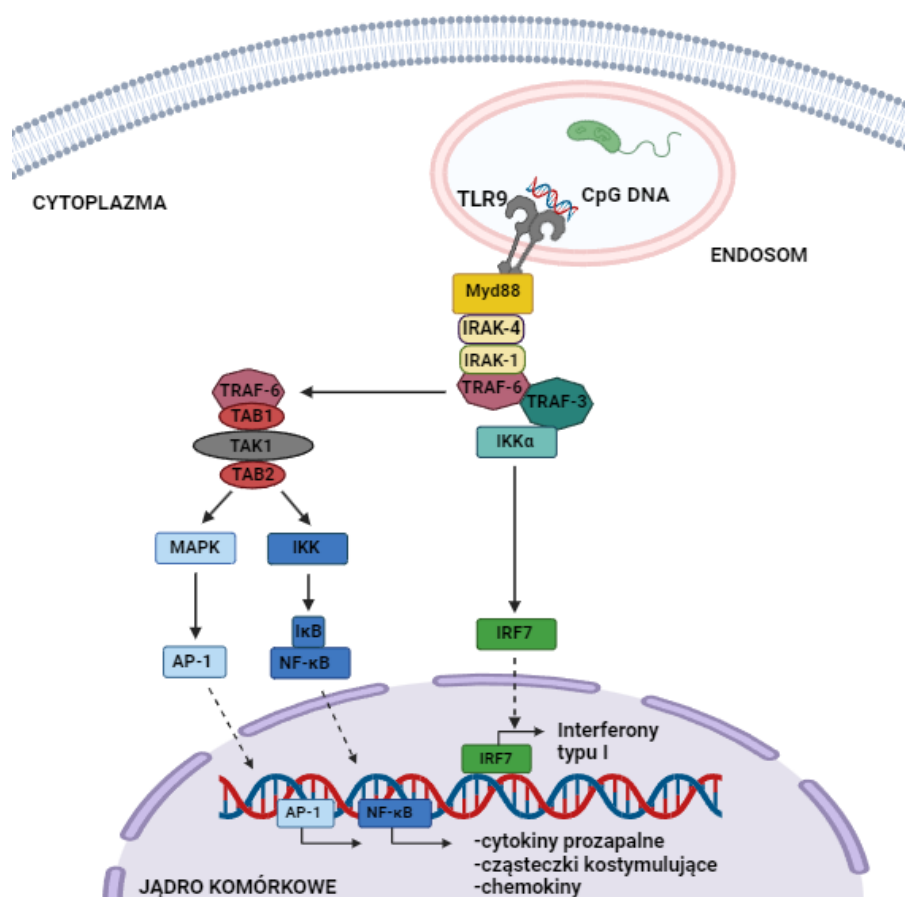
Podobnie jak pozostałe TLR, TLR9 to transbłonowa glikoproteina typu I i zbudowana z zewnątrzkomórkowej N-końcowej domeny z licznymi powtórzeniami bogatymi w leucynę (ang. leucine-rich repeats, LRR), pojedynczej domeny transbłonowej oraz C-końcowej cytoplazmatycznej domeny sygnałowej TIR (ang. toll/interleukin-1 receptor)^{255,256}.

TLR9 pobudzany jest przez wirusowe lub bakteryjne DNA zawierające motywy CpG (cytozyna-fosforan-guanozyna)^{194–196}, u których cytozyna, w przeciwieństwie do wyższych organizmów, ulega słabej metylacji¹⁹⁷. TLR9 rozpoznaje również syntetyczne oligodeoksynukleotydy (ang. oligonucleotides, ODN) z motywem CpG¹⁹⁸. TLR9 zaangażowany jest również w wychwytywanie uwolnionego z własnych komórek wolnego mitochondrialnego DNA (ang. mitochondrial DNA, mtDNA)¹⁹⁹ oraz wolnego płodowego DNA (ang. cell free fetal DNA, cffDNA), które również charakteryzuje słabą metylacją cytozyny motywów CpG²⁰⁰.

Związanie przez domenę zewnątrzkomórkową ligandu wyzwala aktywację domeny TIR, która asocjuje z białkiem adaptorowym Myd88 (ang. myeloid differentiation primary response gene 88)²⁰¹. Sygnały przekazywane są przez szereg kolejnych białek adaptorowych aktywujących kinazy, co ostatecznie prowadzi do translokacji czynników transkrypcyjnych NF-κB (ang. nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) lub IRF7 (ang. interferon regulatory factor 7) do jądra komórkowego. Ponadto sygnały te mogą uruchamiać kinazy z rodziny MAPK (ang. mitogen-activated protein kinases), co skutkuje m.in. aktywacją czynników transkrypcyjnych należących do rodziny AP-1 (ang. activator protein 1). NF-κB i AP-1 są odpowiedzialne za transkrypcję genów cytokin prozapalnych, w tym IL-6, IL-12 i TNF-α, oraz regulację ekspresji genów dla cząsteczek kostymulacyjnych, takich jak CD80 i CD86²⁰². Z kolei IRF7 aktywuje ekspresję genów dla interferonów typu I²⁰³. Na rycinie 3 przedstawiono schemat szlaku sygnalizacji komórkowej za pośrednictwem TLR9.

Zauważono, że powtarzające się sekwencje telomerowe ssaków, które są zdolne do tworzenia tzw. G-tetrad, hamują aktywację układu odpornościowego indukowaną przez CpG DNA pochodzenia bakteryjnego. Mechanizm działania polega na zakłóceniu przez te powtarzające się sekwencje kolokalizacji TLR9 z CpG DNA w pęcherzykach

endosomalnych przy jednoczesnym zachowaniu niezmienionego wychwytu komórkowego i wiązaniu się do receptora²⁰⁴. Na podstawie tych sekwencji telomerowych powstały syntetyczne ODN działające jako antagoniści TLR9²⁰⁵.



Rycina 3. Schemat przedstawiający szlak sygnalizacji komórkowej za pośrednictwem TLR9. AP-1 (ang. activator protein 1), IKK α (ang. κ B kinase α), IRAK-4/-1 (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4), IRF7 (ang. interferon regulatory factor 7), MAPK (ang. mitogen-activated protein kinase), Myd88 (ang. myeloid differentiation primary response 88), NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), TAB1/2 (ang. TGF- β activated kinase 1 binding protein 1), TAK1 (ang. transforming growth factor β -activated kinase 1), TRAF-6/-3 (ang. TNF receptor-associated factor 6/3); Schemat wykonany w programie BioRender.com na podstawie^{206,207}

1.3.2 Wpływ TLR9 na funkcjonowanie limfocytów B

Limfocyty B, zarówno ludzkie jak i mysie, wykazują wysoką ekspresję TLR9. Sygnalizacja za pośrednictwem TLR9 prowadzi do zwiększonej aktywacji limfocytów B promując zarówno wrodzoną, jak i nabytą odpowiedź odpornościową. Aktywność tego receptora ułatwia prezentację antygeny limfocytom B poprzez zwiększenie ekspresji MHC klasy II, CD40, CD86 oraz CD80. Dodatkowo obserwuje

się zwiększoną syntezę cytokin prozapalnych (np. IL-6, TNF- α) oraz przeciwzapalnych (np. IL-10), a także proliferację komórek, różnicowanie się limfocytów B do komórek plazmatycznych i wydzielanie immunoglobulin^{208–213}. Wydaje się, że stymulacja TLR, w tym TLR9, może być rozpatrywana jako trzeci sygnał, po aktywacji BCR i pomocy ze strony limfocytów T, niezbędny do aktywacji dziewiczych limfocytów B⁶⁴.

Limfocyty B na każdym etapie różnicowania charakteryzują się różnym poziomem ekspresji TLR9. Ekspresja TLR9 zwiększa się w miarę przechodzenia limfocytów B od spoczynkowych do dojrzałych aktywowanych limfocytów B²¹⁴, stąd limfocyty B pamięci wykazują wyższy poziom ekspresji TLR9 niż dziewicze limfocyty B²¹⁵. Udowodniono, że limfocyty B pamięci konstytutywnie wykazują ekspresję wielu TLR, w tym TLR9^{214,215}, a *in vitro* agoniści tych receptorów mogą bezpośrednio aktywować tę subpopulację limfocytów B do różnicowania się w komórki plazmatyczne wydzielające przeciwciała o wysokim powinowactwie. *In vivo* jednak, związanie BCR z antygenem wydaje się być nadal niezbędne do pełnej aktywacji limfocytów B pamięci. Po uzyskaniu pomocy ze strony limfocytów T lub dodatkowej stymulacji za pośrednictwem TLR, w tym TLR9, pobudzenie limfocytów B pamięci może być o wiele efektywniejsze²¹⁶. Z kolei w przypadku dziewiczych limfocytów B wykazano, że zwiększają one ekspresję TLR9 po stymulacji BCR²¹⁵.

Limfocyty B wykazują bardzo słabą zdolność do endocytozy, szczególnie większych antygenów (np. bakterii), dlatego BCR i TLR9 prawdopodobnie działają synergistycznie. BCR może internalizować związany antygen i dostarczać go do endosomów, gdzie po pobudzeniu przez CpG DNA receptor TLR9 uruchamia dodatkowe ścieżki sygnalizacyjne. To połączenie wewnętrznych i zewnętrznych sygnałów receptorowych prowadzi do bardziej skutecznej aktywacji limfocytów B²¹⁷. Ponadto w aktywacji TLR9 limfocytów B mogą pośrednio uczestniczyć białka, które wykazują zdolność wiązania fragmentów DNA i dostarczają je do przedziałów endosomalnych, jak np. LL-37 (u myszy jego odpowiednikiem jest białko CRAMP), czy CD205 (DEC-205). LL-37 na drodze elektrostatycznych oddziaływań może wiązać się niespecyficznie z fragmentami DNA, w tym wolnym DNA^{218,219}, mtDNA²²⁰ a także CpG ODN²²¹. Udowodniono, że kompleksy DNA-LL-37 aktywują TLR9 limfocytów B, co skutkuje zwiększoną ekspresją powierzchniowych markerów aktywacji CD40 i CD86, jak również zwiększoną produkcją IL-6 i IgG²²¹. Wykazano, że również związanie CpG ODN przez CD205 limfocytów B może prowadzić do wzrostu ekspresji CD40, CD86, MHC klasy II oraz wydzielania IL-6 przez te limfocyty²²².

Badania wskazują, że TLR9 może również ulegać ekspresji na powierzchni limfocytów B, służąc jako negatywny regulator aktywacji endosomalnego TLR9¹⁹⁰. Z drugiej strony, badania Lu i wsp. wykazały, że w przypadku stymulacji ligandami, sTLR9 może przemieszczać się do endosomu limfocytu B i tym samym aktywować szlak sygnalizacji tego receptora, co objawia się wzrostem ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych i MHC klasy II²²³.

1.3.3 Aktywacja TLR9 w ciąży w odpowiedzi na sygnały endogenne

W kontekście ciąży aktywność sygnałów dostarczanych za pośrednictwem TLR9 można rozpatrywać w kilku aspektach. Oprócz dobrze poznanej roli w ochronie matki i dziecka przed patogenami, receptor ten może również brać udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej w następstwie rozpoznania endogennych sygnałów.

Wykazano, że zarówno wolne mtDNA, jak i cffDNA mogą przyczyniać się w ciąży do powstawania stanu zapalnego na drodze zależnej od TLR9. Wolne mtDNA oraz cffDNA obecne są w krążeniu matczynym w trakcie prawidłowo rozwijającej się ciąży, a ich stężenie zmienia się w trakcie jej trwania (stężenie wolnego mtDNA²²⁴ sukcesywnie spada, a cffDNA²²⁵ wzrasta) oraz w przypadku powikłań ciąży.

Aktywacja TLR9 przez cffDNA rozpatrywana jest w kontekście powstawania stanu zapalnego niezbędnego do wywołania porodu^{226,227}. Z drugiej strony udowodniono, że stymulacja TLR9 przez cffDNA, podobnie jak syntetyczne deoksyrybonukleotydy oraz DNA pochodzenia bakteryjnego, u ciężarnych samic myszy może prowadzić do resorpcji płodów, przedwczesnego porodu i stanu przedrzucawkowego (ang. preeclampsia, PE)²⁰⁰.

W przypadku powikłań ciąży, wykazano wyższe stężenia mtDNA^{228–231} oraz cffDNA^{231,232} w surowicy i w osoczu kobiet z PE, chociaż nie wszystkie badania są zgodne w tej kwestii²³³. Cushen i wsp. dowiedli, że stężenia zarówno wolnego mtDNA jak i mtDNA zamkniętego w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, jest niższe w osoczu kobiet z objawami PE w porównaniu z stężeniem u kobiet w prawidłowo rozwijającej się ciąży²³³. Nie mniej jednak, udowodniono, że aktywacja TLR9 w ciąży może być powiązana jest z charakterystycznymi cechami stanu przedrzucawkowego²³⁴, tj. m.in. z aktywacją neutrofili²³⁵, wydzielaniem przez łożysko wyższych stężeń cytokin prozapalnych, w tym IL-6, TNF- α , oraz czynników antyangiogennych jak

rozpuszczalny receptor typu 1 naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. soluble vascular endothelial growth factor receptor-1, sFtl-1), a także niższych stężeń czynników proangiogennych m.in. czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego typu A (ang. vascular endothelial growth factor A, VEGFA)²³⁶. Ponadto kobiety z objawami PE charakteryzują się wyższą ekspresją TLR9 w łożysku oraz plazmocytoidalnych komórkach dendrytycznych (pDC) oraz komórkach dendrytycznych krwi obwodowej^{236–238}.

W przypadku szczurzego modelu wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu (ang. intrauterine growth restriction, IUGR) w łożyskach wykazano wyższą ekspresję TLR9, w porównaniu z ekspresją w łożyskach ciężarnych samic z grupy kontrolnej. W aktywacji TLR9 w IUGR wskazywano na rolę zarówno wolnego mtDNA, ale także DNA pochodzącego z zaburzonej flory bakteryjnej jelit²³⁹.

Z kolei u kobiet po spontanicznym poronieniu, niezależnie od tego czy uwarunkowane jest ono genetyczną wadą płodu czy innym czynnikiem, obserwuje się wyższe stężenia cfDNA, jak i całkowitego wolnego DNA w osoczu w porównaniu ze stężeniem występującym u kobiet w tym samym okresie prawidłowo rozwijającej się ciąży^{240,241}. Jak do tej pory badania wczesnych okresów ciąży i powiązanych z nimi powikłaniami ciąży, nie były intensywnie prowadzone w kontekście aktywacji TLR9. Kang i wsp. wykazali jednak, że doczesna kobiet po spontanicznym poronieniu w pierwszym trymestrze ciąży charakteryzuje się wyższą ekspresją TLR9 niż doczesna pobrana od kobiet w prawidłowej ciąży¹⁸⁶, co potencjalnie może mieć związek z obserwowanym wyższym stężeniem cfDNA.

TLR9 może odgrywać również rolę w implantacji zarodków, ponieważ dowiedziono, że endometrium kobiet charakteryzuje się znacznie wyższą ekspresją *Tlr9* w fazie lutealnej cyklu menstruacyjnego niż w fazie folikularnej oraz podczas menstruacji¹⁸¹. Wzrost ekspresji tego receptora w tym okresie może więc zwiększać receptywność endometrium. Z drugiej jednak strony, w biopsjach endometrium pobranych od kobiet z powtarzającymi się niepowodzeniami implantacji (ang. recurrent implantation failure, RIF) poziom ekspresji *Tlr9* był istotnie podwyższony w okresie tzw. okna implantacyjnego, jeżeli porównywano go z poziomem ekspresji w biopsjach pobranych od zdrowych kobiet w tym samym dniach cyklu²⁴². Uważa się, że jedną z przyczyn RIF jest brak równowagi immunologicznej, pomiędzy reakcjami pro- i przeciwzapalnymi²⁴³, dlatego autorzy badań sugerowali, iż TLR9 może pośredniczyć w nadmiernej zapalnej odpowiedzi odpornościowej endometrium i może

być jednym z czynników, które wpływają na zaburzoną receptywność endometrium u tych pacjentek²⁴².

Badania nad TLR9 w ciąży prowadzono również w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem, gdzie wykazano, że doczesna samica w tym modelu charakteryzuje się wyższą ekspresją TLR9 niż w przypadku prawidłowej ciąży. Ponadto w modelu tym, aktywacja TLR9, poprzez podaż agonisty tego receptora w 6,5 dniu ciąży, prowadziła do wyższego odsetka resorpcji płodów¹⁸⁶. Z kolei badania prowadzone przez nasz zespół wykazy, że limfocyty B pobrane z śledzion samicy myszy w ciąży zagrożonej poronieniem w okresie przedimplantacyjnym (3 dzień ciąży) cechuje wyższa ekspresja mRNA, ale niższa białka dla TLR9 w porównaniu z prawidłową ciążą. Różnice w ekspresji wspomnianych cząsteczek na poziomie mRNA i białka mogą wskazywać na dynamiczne zmiany jakie mogą zachodzić w tym okresie ciąży w limfocytach B²⁴⁴ oraz sugerować o zaangażowaniu TLR9.

2 CEL PRACY

Na podstawie przedstawionej literatury wynika, że limfocyty B charakteryzują się skomplikowaną biologią i złożonym fenotypem, w których swój istotny udział ma receptor TLR9. W kontekście ciąży może to skłaniać do zadania następujących pytań stanowiących przesłanki tej dysertacji:

- czy receptor TLR9 może być zaangażowany (pośrednio lub bezpośrednio) w rozpoznanie antygenów ojcowskich i sprzyjać rozwojowi tolerancji w okresie okołoinplantacyjnym biorąc pod uwagę prozapalny charakter tego procesu?
- czy receptor TLR9 może być zaangażowany w indukcję limfocytów Breg w tym okresie ciąży u myszy i przeciwdziałać poronieniu?
- czy u kobiet w czasie bezpośrednio następującym po poronieniu zmienia się ekspresja tego receptora oraz frekwencja i fenotyp kostymulacyjny limfocytów B wskazując na ich zaangażowanie jako komórek prezentujących antygen?
- czy istnieje związek pomiędzy ekspresją receptora TLR9, a frekwencją i fenotypem limfocytów Breg u kobiet po spontanicznym poronieniu?

Dlatego też, biorąc pod uwagę wpływ receptora TLR9 na dojrzewanie i funkcje limfocytów B, a także jego zaangażowanie w powstawanie limfocytów Breg, celem ogólnym pracy było zbadanie udziału receptora TLR9 w kształtowaniu fenotypu kostymulacyjnego limfocytów B i regulacji tolerancji immunologicznej we wczesnej ciąży u kobiet i w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem.

Realizacja celu ogólnego obejmowała następujące cele szczegółowe:

1. Ocena wpływu podaży antagonisty TLR9 we wczesnej ciąży w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem na:
 - a) powodzenie ciąży,
 - b) fenotyp kostymulacyjny limfocytów B,
 - c) ekspansję limfocytów B regulatorowych,
 - d) ekspresję ligandów na limfocytach B dla cząsteczek kostymulacyjnych obecnych na limfocytach T.

2. Określenie ekspresji TLR9, cząsteczek kostymulacyjnych i HLA-DR wybranych populacjach limfocytów B krwi obwodowej kobiet pierwszym trymestrze ciąży prawidłowej i po poronieniu.
3. Określenie ekspresji ligandów dla cząsteczek kostymulacyjnych obecnych na limfocytach T w krwi obwodowej kobiet w pierwszym trymestrze ciąży prawidłowej i po poronieniu.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 Gotowe zestawy i odczynniki chemiczne

Nazwa	Przeznaczenie	Producent (nr kat. producenta)
Brefeldin a Solution (Brefeldyna a w DMSO)	składnik medium do restymulacji komórek	Biolegend (420601)
CD16/CD32 (klon: 93)	blokowanie mysich receptorów FcR	eBioscience (14-0161-82)
Cytocolor™	zestaw do barwienia rozmazów cytologicznych wg. Szczepanika	Merck Millipore (115355)
Cytofix®	utrwalacz cytologiczny	Samko
DNase I	składnik medium do trawienia enzymatycznego macicy	Roche/ Merck Millipore (1010415900)
EDTA (roztwór 0,5mM, pH=8)	składnik buforów	Laboratorium Chemii Ogólnej, IITD, Wrocław
FBS (plodowa surowica bydlęca), pochodzenie: Ameryka Południowa, inaktywowana termicznie	składnik medium do restymulacji komórek	Biowest (S181H)
HBSS (Hank's balanced salt solution) z Ca²⁺, Mg²⁺	składnik medium do trawienia enzymatycznego macicy	Biowest (X0509-500)
Human TruStain FcX™	blokowanie ludzkich receptorów FcR	Biolegend (422302)
Jonomycyna	składnik medium do restymulacji komórek	Cayman Chemical (11932)
Liberase TM Reserch Grade	składnik medium do trawienia enzymatycznego macicy	Roche (05401119001)
Lymphosep	gradient do izolacji ludzkich PBMC	Biowest (L0560)
Monensin a Solution (Monenzyna a w 70% roztworze etanolu)	składnik medium do restymulacji komórek	Biolegend (420701)
ODN 2088	antagonista mysiego TLR9	InvivoGen (trl-2088)
PMA (forbol 12-mirystynian 13-octanu)	składnik medium do restymulacji komórek	Cayman Chemical (10008014)
RPMI-1640 z L-glutaminą i czerwienią fenolową	składnik medium do restymulacji komórek	Biowest (L0500)
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set: Transcription Factor Fix, Perm Buffer, Diluent	zestaw do wewnątrzkomórkowego oznaczania cytokin oraz wewnątrzjądrowych czynników transkrypcyjnych metodą cytometrii przepływowej	Biolegend(424401)
ZombieRed™ dye	barwnik do znakowania martwych komórek w oznaczeniach cytometrycznych	Biolegend (423110)

3.2 Przygotowane bufory i media

- **PBS** (sól fizjologiczna buforowana fosforanem): 0,01 M bufor fosforanowy, 2,7 mM KCl i 137 mM NaCl w wodzie destylowanej; pH=7,4;
- **Bufor FACS**: 0,5 mM EDTA, 0,002% azydek sodu oraz 1% inaktywowana płodowa surowica bydlęca (ang. fetal bovine serum, FBS) w PBS;
- **Bufor do sortowania**: 2mM EDTA i 2% FBS w PBS;
- **ODN 2088**: liofilizat rozpuszczony w sterylnym buforze PBS, a następnie rozdzielony na porcje po 100 µl (50 µg lub 100 µg na porcję); do momentu użycia przetrzymywany w -20°C;
- **Medium do restymulacji komórek**: medium RPMI-1640 (z L-glutaminą) z dodatkiem 0,1 µg/ml PMA, 1 µg/ml Jonomycyny, 10 µg/ml Brefeldyny a i 2 µM Monenzyny A;
- **Płyn Türka**: 0,1% roztwór fioletu gencjany w 3% kwasie octowym;
- **Medium do trawienia enzymatycznego**: medium HBSS (z Ca^{2+} , Mg^{2+}) z dodatkiem 30 ug/ml DNAzy i i 0,28 WU/ml liberazy TM;
- **Bufor lizujący erytrocyty**: 0,83% NH_4Cl w wodzie destylowanej;

3.3 Przeciwciała wykorzystane w immunofenotypowaniu komórek

Antygen	Fluorochrom	Klon	µg/test	Kontrola izotypowa	Producent
CD19	FITC	6D5	0,25 µg	-	Biolegend
CD5	AF700	53-7.3	0,125 µg	-	Biolegend
CD1d	PE/Cy7	1B1	0,125 µg	-	Biolegend
CD86	BV650	GL-1	0,125 µg	Rat IgG2a, κ	Biolegend
CD80	BV510	16-10A1	0,25 µg	Arm. Hamster IgG	Biolegend
CD40	PerCp/Cy5.5	3/23	0,5 µg	Rat IgG2a, κ	Biolegend
I-A/I-E (MHC II)	APC/Cy7	M5/114.15.2	0,06 µg	Rat IgG2b, κ	Biolegend
TLR9	PE	S18025A	0,25 µg	Rat IgG1, κ	Biolegend
CD3	FITC	17A2	0,25 µg	-	Biolegend
CD45	BV605	30-F11	0,015 µg	-	Biolegend
CD4	AF700	GK1.5	0,15 µg	-	Biolegend
CD40L	PE/Cy7	MR1	0,125 µg	Arm. Hamster IgG	Biolegend
CTLA-4	APC	UC10-B9	1 µg	Arm. Hamster IgG	Biolegend
CD28	BV786	37.51	2 µg	Hamster IgG, λ	BD

Tabela 3. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek mysich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko mysim antygenom zewnątrzkomórkowym;

Antygen	Fluorochrom	Klon	µg/test	Kontrola izotypowa	Producent
CD19	FITC	HIB19	0,5 µg	-	Biolegend
CD38	AF700	HIT2	0,25 µg	-	Biolegend
CD27	APC/Cy7	O323	0,1 µg	-	Biolegend
CD24	BV421	ML5	0,1 µg	-	Biolegend
CD86	BV650	IT2.2	0,5 µg	Mouse IgG2b,κ	Biolegend
CD80	PE/Cy7	2D10	0,5 µg	Mouse IgG1,κ	Biolegend
CD40	BV510	5C3	0,3 µg	Mouse IgG1,κ	Biolegend
HLA-DR	PerCp/Cy5.5	L243	0,6 µg	Mouse IgG2a, κ	Biolegend
TLR9	PE	Eb72-1665	0,75 µg	Rat Ig2a, κ	BD
CD3	FITC	UCHT1	0,2 µg	-	Biolegend
CD4	AF700	RPA-T4	0,25 µg	-	Biolegend
CD25	PE/Cy7	BC96	0,3 µg	-	Biolegend
CD127	APC/Cy7	A019D5	0,3 µg	-	Biolegend
CTLA-4	PerCP/Cy5.5	BNI3	0,3 µg	Mouse IgG2a, κ	Biolegend
CD28	BV421	CD28.2	0,3 µg	Mouse IgG1, κ	Biolegend
CD40-L	BV605	24-31	0,75 µg	Mouse IgG1, κ	Biolegend

Tabela 4. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek ludzkich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko ludzkim antygenom zewnątrzkomórkowym;

Antygen	Fluorochrom	Klon	µg/test	Kontrola izotypowa	Producent
IL-6	APC	MP5-0F3	0,25 µg	Rat IgG1, κ	Biolegend
IL-10	BV421	JES5-6E3	0,5 µg	Rat IG2b, κ	Biolegend
IL-10	PE	JES5-6E3	1 µg	RatIgG2b, κ	Biolegend
TLR9	PE	S18025A	0,25 µg	Rat IgG1, κ	Biolegend
FoxP3	BV421	MF-14	0,8 µg	-	Biolegend

Tabela 5. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek mysich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko mysim antygenom wewnątrzkomórkowym;

Antygen	Fluorochrom	Klon	µg/test	Kontrola izotypowa	Producent
IL-10	APC	JES3-19F1	0,1 µg	Rat IgG2a,κ	Biolegend
IL-6	PE	MQ2-13A5	0,125 µg	Rat IgG1,κ	Biolegend
TLR9	PE	Eb72-1665	0,75 µg	Rat Ig2a, κ	Beckton Dickinson
FoxP3	PE	259D	0,2 µg	-	Biolegend

Tabela 6. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek ludzkich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko ludzkim antygenom wewnątrzkomórkowym;

3.4 Aparatura

- Wirówki: MPW-352, MPW-350R, MPW-260R (MPW Med. Instruments);
- Inkubator CO₂: Innova® CO-48 (New Brunswick Scientific);
- Komora laminarna: HFsafe-1200 (Heal Force);
- Mikroskopy świetlne: Olympus SZ61 (Olympus), Eclipse E200 (Nikon)
- Cytometr przepływowy wyposażony w lasery: 355 nm, 405 nm, 488 nm, 640 nm; LSRFortessa™ (Becton Dickinson);

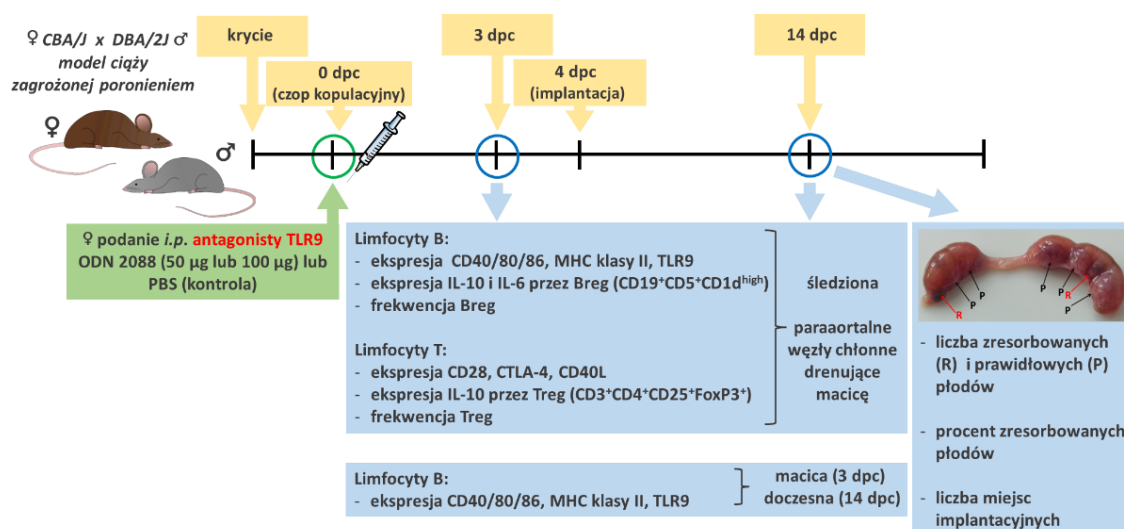
3.5 Zwierzęta doświadczalne

W pracy wykorzystano myszy szczepu CBA/J (samice) oraz DBA/2J (samce). Zwierzęta zostały zakupione z hodowli Charles River Laboratoire (Francja). Przed przystąpieniem do doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (nr zgody: 036/2021/P1) na przeprowadzenie eksperymentów przedstawionych w rozprawie doktorskiej. W trakcie wszystkich doświadczeń myszy utrzymywane były w warunkach standardu SPF (ang. Specific Pathogen Free), tj. w pomieszczeniach za ścisłą barierą higieniczną i wolnych od określonych, swoistych dla gatunku mikroorganizmów i pasożytów. Eksperymenty przeprowadzano na mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem (ang. abortion – prone model of pregnancy).

Charakterystyczną cechą mysiego modelu ciąży zagrożonej poronieniem, czyli krzyżówki samicy szczepu CBA/J (haplotyp H-2^k) z samcem szczepu DBA/2J (haplotyp H-2^d), jest wyższy odsetek resorbowanych płodów w porównaniu do ciąży prawidłowej [krzyżówka samicy szczepu CBA/J z samcem szczepu BALB/c (haplotyp H-2^d)]. u samic CBA/J pokrytych samcem DBA/2J, począwszy od 7 dnia ciąży, następuje utrata kontaktu komórkowego pomiędzy komórkami doczesnej, a komórkami stożka pozałożyskowego. Towarzyszy temu infiltracja komórek NK, leukocytów (limfocytów CD8⁺, limfocytów B i granulocytów), komórek tucznych, oraz obserwuje się przewagę cytokin prozapalnych. W 12 dniu ciąży można już zauważyć różnicę pomiędzy zresorbowanymi, a prawidłowymi płodami^{245–248}. W modelu tym jednak nie każdy płód ulega resorpcji. Resorpcje od czasu do czasu występują w każdej alogenicznej ciąży u myszy, w tym w krzyżówce CBA/J x BALB/c, stanowiącej model prawidłowej ciąży. Jednak w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem

resorpcje są wyraźnie spowodowane czynnikami immunologicznymi, a jak większość badań wskazuje, szczególnie niewykształceniem się tolerancji na aloantygeny^{249–255}. Ponieważ samce DBA/2J i BALB/c posiadają taki sam haplotyp głównego układu zgodności tkankowej, to przypuszcza się, że przyczyną niedostatecznej liczby i aktywności Treg jest nieodpowiednia odpowiedź układu odpornościowego samicy na aloantygeny obecne w plazmie nasienia należące do słabych antygenów zgodności tkankowej^{255,256}. Wszystkie manipulacje, których celem było przywrócenie tolerancji antygenów samca/płodu (np. podaż IL-10²⁵⁷, TGF- β ²⁵⁸, wzrost ekspresji CTLA-4²⁵⁹, adoptywny transfer Treg²⁴⁹ i Breg¹⁵) lub ograniczenie niekorzystnego stanu zapalnego związanego z naciekiem komórek odpornościowych, prowadziły do istotnego spadku liczby resorbowanych płodów²⁶⁰. Model ten jest więc klasycznym i często wykorzystywanym modelem zwierzęcym do badania poronień tła immunologicznego²⁶⁰.

Na rycinie 4 przedstawiono schematycznie doświadczenie nad wpływem antagonisty TLR9 na powodzenie ciąży oraz na zmianę immunofenotypu limfocytów B oraz T w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem.



Rycina 4. Schemat doświadczenia nad wpływem antagonisty TLR9 na powodzenie ciąży oraz na zmianę immunofenotypu komórek w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem.
dpc - day post coitum (dzień po kryciu samicy); i.p – intraperitoneal injection (podanie dootrzewnowe);

3.5.1 Wymaz cytologiczny z pochwy samic myszy i określanie fazy cyklu rujowego samic

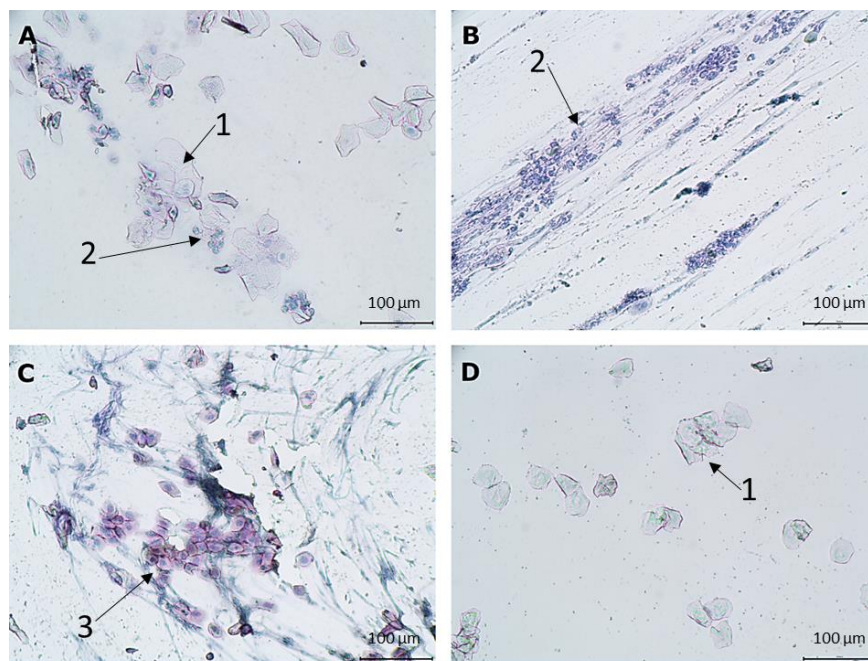
Od samic myszy szczepu CBA/J zawsze o tej samej porze (około godziny 9.00-10.00) pobierano z pochwy wymaz poprzez delikatne obracanie wymazówki (sterylny patyczek o długości około 4-5 cm z nawiniętą na końcówkę bawełnianą watą). Następnie wydzielinę delikatnie rozprowadzano na szkiełku podstawowym i utrwalano za pomocą komercyjnie dostępnego utrwalacza cytologicznego Cytofix® (Samko). Tak przygotowany wymaz wybarwiano wykorzystując zestaw do barwienia cytologicznego Cytocolor™ (Merck Millipore), który bazuje na metodzie barwienia według Szczepanika, zgodnie z dołączonym przez producenta protokołem.

Preparaty oglądano pod mikroskopem świetlnym przy powiększaniu 200x i 400x. Na podstawie obecności charakterystycznych komórek określano fazę cyklu rujowego. W tabeli nr 7 przedstawiono rodzaje komórek, które występują w każdej z faz cyklu płciowego u myszy.

Faza cyklu rujowego	Jądrzaste komórki nabłonkowe	Zrogowaciale komórki nabłonkowe	Leukocyty
Metestrus	-	+	+
Diestrus	-	-	+
Proestrus	+	-	-
Estrus	-	+	-

Tabela 7. Obecność charakterystycznych komórek w wymazie z pochwy w każdym z etapów cyklu rujowego samic myszy (opracowano na podstawie²⁶¹); „+”- obecność komórek, „-” – brak komórek;

Na rycinie nr 5 przedstawiano przykładowe zdjęcia z mikroskopu z każdej z faz cyklu rujowego samic myszy szczepu CBA/J.



Rycina 5. Zdjęcia mikroskopowe (powiększenie 200x) wymazów z pochwy myszy przedstawiające charakterystyczne komórki obecne w każdej z faz cyklu rujowego.

1-zrogowaciałe komórki nabłonkowe, 2- leukocyty, 3-jądrzaste komórki nabłonkowe;

A-metestrus, B-diestrus, C-proestrus, D-estrus

3.5.2 Krycie samic

Ponieważ u samic myszy owulacja występuje w fazie estrus, samice myszy CBA/J w fazie poprzedzającej owulację czyli w fazie proestrus, umieszczano w klatce z samcem szczepu DBA/2J (1 samica : 1 samiec). Samice przenoszono zawsze o tej samej porze, tj. pomiędzy godziną. 18.00, a 19.00. Następnego dnia rano, tj. około godziny 8.00, na podstawie braku lub obecności czopa kopulacyjnego w pochwie samicy stwierdzano czy doszło do krycia. Dzień ten określano jako 0 dzień ciąży. Skutecznie pokryte myszy CBA/J przenoszono do osobnej klatki.

3.5.3 Podaż antagonisty receptora TLR9

Samicom, natychmiast po stwierdzeniu obecności czopa kopulacyjnego, podawano dootrzewnowo 100 µl PBS (grupa kontrolna) lub antagonistę receptora TLR9 ODN 2088 (Invivogen) w dawce 50 µg lub 100 µg rozpuszczonego w 100 µl PBS. Dawki preparatu dobrano na podstawie innego badania z udziałem ciężarnych samic, w którym zarówno 50 µg jak i 100 µg ODN 2088 odwracało negatywny wpływ

jednoczesnego podania CpG ODN na resorpcję płodów. Była to dawka bezpieczna dla zwierząt²⁶².

ODN 2088 jest kompetycyjnym inhibitorem TLR9, który wiąże się z wysokim powinowactwem z wewnątrzkomórkowym TLR9, ale nie indukuje dalszej stymulacji szlaku zależnego od tego receptora. Był on niejednokrotnie wykorzystywany w badaniach *in vitro* m.in. w celu zahamowania aktywacji TLR9 przez mtDNA^{263–265}, DNA pochodzenia bakteryjnego²⁶⁶ oraz CpG ODN²⁰⁵, jak również *in vivo*, gdzie u myszy jego podaż odwracała aktywacyjne działanie mtDNA²⁶⁷. u myszy stosowano go również w celu odwrócenia niekorzystnego wpływu CpG ODN na powodzenie ciąży²⁶². Ponadto związek ten wykazywał działanie protekcyjne w szczurzym modelu ostrego uszkodzenia nerek²⁶⁸ oraz w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym po zawale mięśnia sercowego²⁶⁹, hamując w obu przypadkach stan zapalny związany z aktywnością TLR9.

3.5.4 Pobieranie materiału od myszy

3.5.4.1 Eutanazja

W celu pobrania narządów do badań, samice uśmiercano w 3 lub 14 dniu ciąży poprzez dyslokację kręgów szyjnych po uprzedniej inhalacji 5% izofluranem (Laboratorios Karizoo S.A.). Płody uśmiercano przez dekapitację.

3.5.4.2 Pobieranie śledziony oraz węzłów chłonnych

Śledzionę wycinano za pomocą narzędzi chirurgicznych i do czasu izolacji komórek umieszczano na szalce z zimnym PBS. Podobnie postępowano z węzłami chłonnymi. Do analiz odpreparowywano paraaortalne węzły chłonne (ang. paraaortic lymph nodes, PALN), które drenują macicę. Całość manipulacji przeprowadzano w sterylnych warunkach.

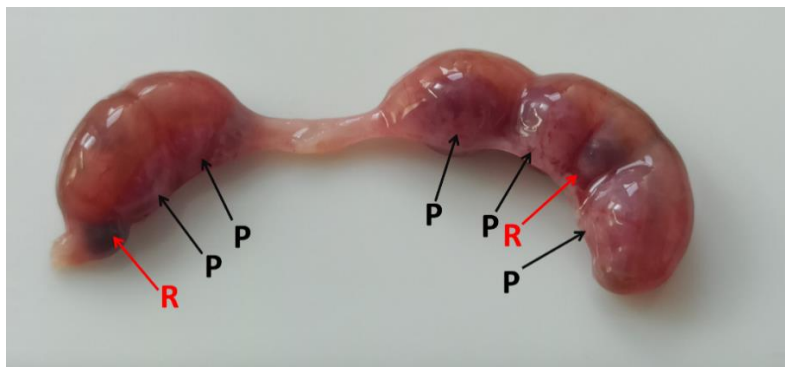
3.5.4.3 Pobieranie macicy oraz potwierdzanie ciąży

Macice od myszy w 3 jak i w 14 dniu ciąży odpreparowano i umieszczano na szalce z zimnym PBS.

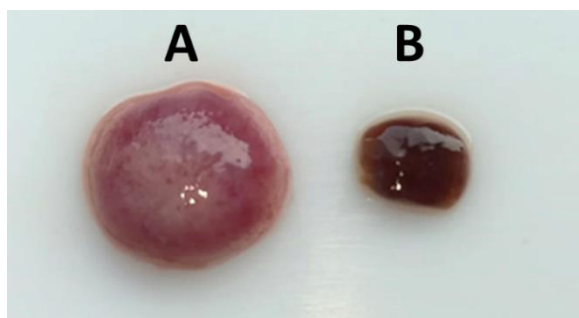
Ciążę potwierdzano *post mortem*. Macicę samic uśmierconych w 3 dniu ciąży, umieszczano na szalce i przy pomocy igły i strzykawki każdy róg macicy przepłukiwano PBS w celu wypłukania zarodków. Następnie po mikroskopem sprawdzano obecność zarodków. Do dalszych badań przeznaczano tkanki od myszy, w macicach których stwierdzano obecność zarodków.

U samic uśmiercanych w 14 dniu ciąży, ciążę potwierdzono makroskopowo na podstawie obecności płodów. W tym dniu ciąży u myszy widoczne jest już wyraźnie łożysko oraz bardzo dobrze można odróżnić żywe jak i zresorbowane płody/miejsca resorpcyjne (rycina nr 6). Liczbę zresorbowanych zarodków określono na podstawie wielkości i wyglądu łożyska. Łożyska zresorbowanych płodów charakteryzowały się ciemniejszą barwą (krwotoczną), mniejszymi rozmiarami i brakiem obecności wyraźnych tkanek płodu w porównaniu ze łożyskami z prawidłowo rozwiniętymi płodami (rycina nr 7). Procent zresorbowanych płodów (ang. abortion rate) obliczono zgodnie ze wzorem²⁵⁴:

$$\frac{\text{liczba zresorbowanych płodów}}{(\text{liczba żywych płodów} + \text{liczba zresorbowanych płodów})} \times 100 \%$$



Rycina 6. Zdjęcia macicy myszy szczepu CBA/J będącej w ciąży zagrożonej poronieniem (14 dzień ciąży). Na zdjęciu zaznaczono prawidłowe (P) oraz zresorbowane płody myszy (R).



Rycina 7. Zdjęcie łożyska wraz z doczesną zdrowego (A) i zresorbowanego płodu (B) samicy myszy szczepu CBA/J będącej w ciąży zagrożonej poronieniem (14 dzień ciąży);

3.5.5 Izolacja komórek z materiału zwierzęcego

3.5.5.1 Izolacja komórek z śledziony oraz węzłów chłonnych

Śledzionę przenoszono na polistyrenowe sitka (wielkość porów 40 μm) znajdujące się na szalce z roztworem 0,83% NH_4Cl (bufor lizujący erytrocyty). Przy pomocy tłoczka od strzykawki tkankę delikatnie przecierano, a następnie komórki przenoszono do polistyrenowych probówek i odwirowano (czas = 10 min, $\text{RCF} = 300 \times g$, temp. = 4°C). Roztwór NH_4Cl zlewano, splenocyty przepłukano zimnym PBS i odwirowano w warunkach jak wyżej. Krok ten powtarzano. Tak uzyskane komórki zawieszano w 1 ml PBS i zliczano je w komorze Bürkera po uprzednim rozcieńczeniu zawiesiny w płynie Türka.

Podobnie postępowano z węzłami chłonnymi, przy czym nie wykorzystywano 0,83% NH_4Cl – tkankę przecierano tylko w buforze PBS.

Całość izolacji komórek ze śledzion, jak i węzłów chłonnych, wykonywano w sterylnych warunkach.

3.5.5.2 Izolacja komórek z macicy

Odpreparowane i pobrane macice od myszy w 3 dniu ciąży umieszczano w probówkach typu eppendorf i w obecności 1 ml medium do trawienia enzymatycznego (skład podano w tabeli nr 8) cięto nożyczkami chirurgicznymi przez około 20 sekund. Następnie otrzymaną zawiesinę inkubowano w łaźni wodnej w 37°C z delikatnym mieszaniem (100 rpm). Po pierwszych 10 minutach inkubacji, macicę ponownie cięto nożyczkami przez około 20 sekund. Następnie w odstępach

10 minutowych próbkę delikatnie wytrząsano w rękach (około 20 sekund). Macię łącznie trawiono enzymatycznie przez 40 minut. W kolejnym kroku otrzymaną zawiesinę komórek przefiltrowywano najpierw przez sitko o porach 70 μm , a następnie przez sitko o porach 40 μm . Za każdym razem sitka przemywano buforem do sortowania (PBS z dodatkiem 2mM EDTA i 2% FBS). Otrzymane komórki wirowano (czas = 4 min, RCF = 300 x g, temp. = 21°C), a osad zawieszano w 1 ml medium RPMI-1640 (Biowest) i nawarstwiano na 500 μl inaktywowaną płodową surowicę bydlęcą (Biowest). Ponownie wirowano (czas = 10 min, RCF = 200 x g, temp. = 21°C), a powstały osad komórek zawieszano w 1 ml PBS i komórki zliczano w komorze Bürkera po uprzednim rozcieńczeniu zawiesiny w płynie Türka.

Składniki medium do trawienia enzymatycznego	Stężenie
Medium HBSS z jonami Ca^{2+} Mg^{2+}	-
DNAza I	30 $\mu\text{g/ml}$
Liberaza TM	0,28 WU/ml

Tabela 8. Składniki medium do trawienia enzymatycznego macicy myszy; WU= Jednostka Wunscha (ang. Wunsch Unit);

3.5.5.3 Izolacja komórek z doczesnej

Od każdej myszy w 14 dniu ciąży odpreparowywano doczesne z dwóch łożysk prawidłowych płodów zgodnie z metodą opisaną przez Croy i wsp.²⁷⁰. Odpreparowane doczesne przenoszono na polistyrenowe sitka (wielkość porów 40 μm) znajdujące się na szalce z PBS i przy pomocy tłoczka od strzykawki delikatnie przecierano. Otrzymana zawiesinę komórek przenoszono do próbek i wirowano (czas = 10 min, RCF = 300 x g, temp. = 15°C). Otrzymany osad komórek przemywano PBS i ponownie wirowano w warunkach jak wcześniej. Osad zawieszano w PBS i komórki zliczano w komorze Bürkera po uprzednim rozcieńczeniu zawiesiny w płynie Türka. Wyizolowane komórki z dwóch doczesnych łączono razem i traktowano je jako jedną próbkę.

3.6 Charakterystyka pacjentek rekrutowanych do badań

Przed przystąpieniem do badań uzyskano zgodę komisji bioetycznej (Nr KB 535/2018, KB 462/2021). Kobiety rekrutowane do badań były pacjentkami Szpitala Specjalistycznego im. A. Falkiewicza we Wrocławiu, i Kliniki Ginekologii i Położnictwa Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu lub Centrum Medycznego Zdrowa Kobieta we Wrocławiu. Wszystkie kobiety uczestniczące w eksperymencie wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniach.

Na podstawie przeprowadzonej ankiety, z udziału w badaniach zostały wykluczone pacjentki, które w trakcie ciąży spożywały alkohol, paliły papierosy; u których stwierdzono aktualną lub przebytą w ciąży infekcję, jakiegokolwiek choroby przewlekłe (autoimmunizacyjne, genetyczne, nowotworowe itd.), kobiety z anomaliami anatomicznymi macicy, a także kobiety, które zaszły w ciążę po zastosowaniu procedur wspomaganego rozrodu. Pacjentki zostały zapytane o liczbę przebytych ciąż oraz ich przebieg (bez komplikacji, powikłania) oraz sposób urodzenia dziecka (naturalny, przez cesarskie cięcie). Dodatkowo w ankiecie zawarte były pytania odnośnie przyjmowanych w trakcie ciąży leków, suplementów diety, witamin. Kobiety podały również swój wiek oraz masę ciała i wzrost w celu obliczenia BMI (ang. body mass index).

Wiek ciąży został określony na podstawie daty ostatniej miesiączki oraz potwierdzony za pomocą badania ultrasonograficznego dopochwowego podczas wizyty w gabinecie ginekologicznym.

Kobiety po poronieni: Grupa pacjentek składała się z 30 kobiet, które zgłosiły się do szpitala z powodu rozpoznania obumarcia wczesnej ciąży (7-14 tydzień ciąży). Materiał do badań (krew z żyły łokciowej) został pobrany przed podaniem pacjentce jakiegokolwiek leków. Z grupy tej wykluczono pacjentki, u których w badaniu USG stwierdzono puste jajo płodowe.

Kobiety w prawidłowej ciąży: Do grupy tej zakwalifikowano 24 pacjentki we wczesnej ciąży (7-14 tydzień ciąży), u kobiet tych w momencie kwalifikacji do badań ciąża przebiegała prawidłowo. Materiał do badań pobrano podczas rutynowej wizyty w gabinecie ginekologicznym po standardowych badaniach. Pacjentki w tej grupie

badanej nie zgłaszały utraty ciąży w przeszłości, a ich poprzednie ciąże przebiegały bez komplikacji.

W tabeli nr 9 przedstawiono charakterystykę pacjentek z podziałem na dwie grupy: kobiety po poronieniu oraz kobiety w prawidłowej ciąży. Pacjentki w obu grupach nie różniły się pod względem wieku, BMI, tygodnia ciąży, liczby ciąż zakończonych żywym porodem, natomiast wykazano istotnie statystycznie różnice pod względem liczby poronień.

	Kobiety po poronieniu n=30	Kobiety w prawidłowej ciąży n=24
Wiek (lata) ($p > 0,05$)	30,63 $\pm$ 4,23	29,29 $\pm$ 4,43
BMI (kg/m²) ($p > 0,05$)	22,36 $\pm$ 2,68	23,44 $\pm$ 3,10
Tydzień ciąży ($p > 0,05$)	9,5 $\pm$ 1,40	9,75 $\pm$ 2,67
Liczba ciąż zakończonych żywym porodem (w przeszłości) # ($p > 0,05$)	0,53 $\pm$ 0,68	1,00 $\pm$ 1,02
Liczba poronień ## ($p < 0,0001$)	1,4 $\pm$ 0,2	0

Tabela 9. Charakterystyka pacjentek zrekrutowanych do badań; Dane przedstawione są jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe; n=liczba pacjentek;

Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych lub testu u Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

do liczby żywych porodów wliczone zostały jedynie ciąże zakończone żywym porodem w przeszłości (dane z ankiety);

do liczby poronień wliczone zostały wszystkie poronienia z przeszłości (dane z ankiety) jak i ostatnie poronienie, z powodu którego pacjentka zgłosiła się do szpitala;

3.6.1 Izolacja PBMC z krwi pacjentek

W celu izolacji komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) od pacjentek pobrano krew z żyły łokciowej do sterylnych probówek zawierających heparynę litową. Krew, rozcieńczoną dwukrotnie PBS, nawarstwiano na gradient o gęstości 1.077 g/ml (Lymphosep, Biowest). Następnie komórki wirowano przez 30 minut w 21°C przy obrotach wirówki równych 400 x g, a powstałe na styku faz wyraźne pasmo zawierające PBMC przenoszono do osobnej probówki. W kolejnym kroku komórki dwukrotnie przepłukiwano PBS

(wirowanie: czas = 10 min, RCF = 250 x g, temp. = 21°C). Osad komórek zawieszano w 1 ml RPMI-1640 (Biowest) i zliczano je w komorze Bürkera po uprzednim rozcieńczeniu zawiesiny w płynie Türka.

3.7 Restymulacja komórek

Komórki wyizolowane z węzłów chłonnych, śledziony i PBMC restymulowano w celu cytometrycznego oznaczenia cytokin (IL-10 oraz IL-6). 1 mln komórek zawieszano w 1 ml medium do restymulacji (skład podano w tabeli nr 10) i inkubowano na płytce 24-dołkowej przez 4 godziny w 37°C w inkubatorze z 5% CO₂.

Składnik medium do restymulacji		Stężenie
RPMI-1640 (z L-glutaminą i czerwienią fenolową)		-
Inaktywowana płodowa surowica bydlęca (ang. fetal bovine serum, FBS)		10%
Koktajl aktywujący leukocyty (ang. Leukocyte Activation Cocktail, LAC)	Forbol 12-mirystynian 13-octanu (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)	0,1 µg/ml
	Jonomycyna	1 µg/ml
Brefeldyna A		10 µg/ml
Monenzyna A		2 µM

Tabela 10. Skład medium do restymulacji komórek w celu cytometrycznej identyfikacji IL-10 oraz IL-6

3.8 Immunofenotypowanie limfocytów

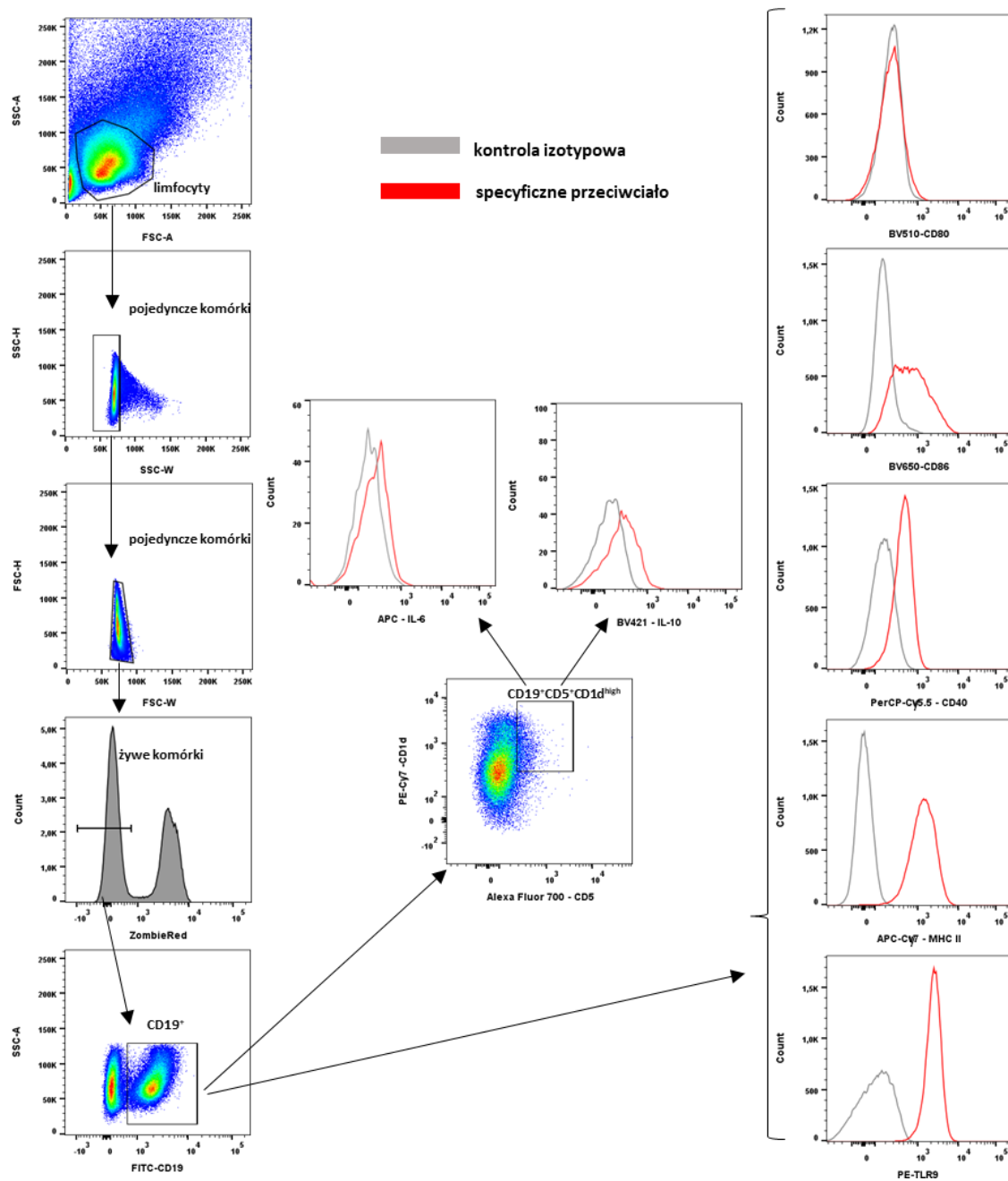
Komórki, po restymulacji jak i bezpośrednio wyizolowane, inkubowano ze specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi lub kontrolami izotypowymi skoniugowanymi z fluorochromami w celu określenia poziomu ekspresji badanych antygenów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych.

Komórki po restymulacji przenoszono z dołków płytki 24-dołkowej do probówek, odwirowywano (czas = 5 min, RCF = 300 x g, temp. = 15°C), zawieszano w PBS i ponownie odwirowywano (czas = 5 min, RCF = 300 x g, temp. = 15°C) celem

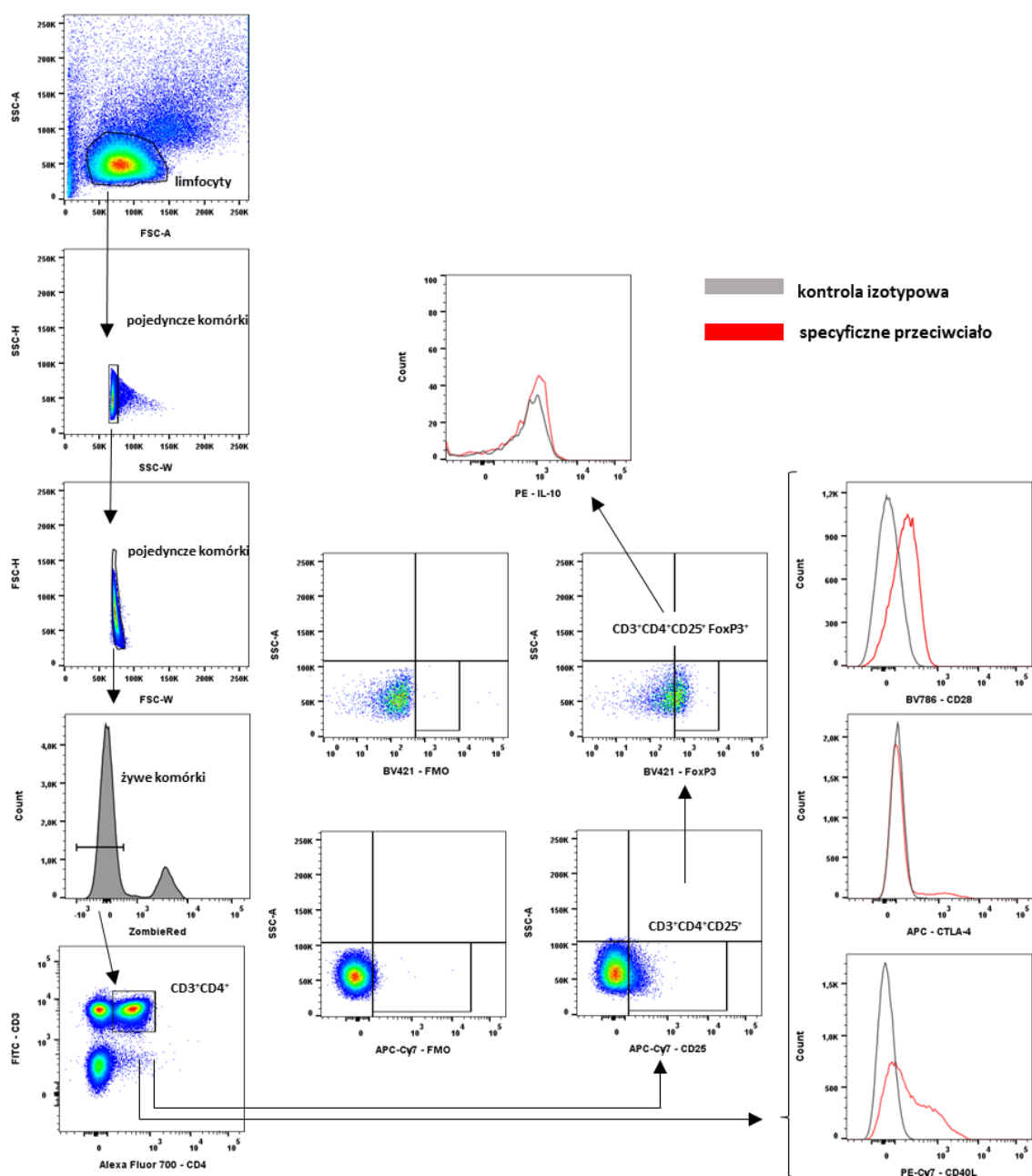
odpłukania pozostałości medium hodowlanego. Osad komórek, zawieszano w 100 μ l PBS. W przypadku komórek, których nie restymulowano, po ich zliczeniu, 1 mln komórek zawieszano również w 100 μ l PBS. Do zawiesiny dodawano odczynnika znakującego martwe komórki ZombieRedTM (Biolegend) w rozcieńczeniu 1 : 200 (dla komórek wyizolowanych z macicy oraz doczesnej w rozcieńczeniu 1 : 100). Komórki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po tym czasie, w celu zablokowania receptorów FcR, do każdej próbki dodawano 5 μ l Human TruStain FcXTM (Biolegend) w przypadku komórek ludzkich lub przeciwciała monoklonalne skierowanego przeciwko antygenom CD16/CD32 (klon: 93, eBioscience) w stężeniu 0,5 μ g/ μ l w przypadku komórek mysich. Próbkę inkubowano przez 10 minut w ciemności w temperaturze 4°C. Następnie dodawano przeciwciała monoklonalne (skoniugowane w fluorochromami) skierowane przeciwko antygenom zewnątrzkomórkowym w ustalonych wcześniej stężeniach lub odpowiednie kontrole izotypowe (skoniugowane z tymi samymi fluorochromami i dodawane w tych samych stężeniach co specyficzne przeciwciała monoklonalne) (tabela nr 3 i 4). Komórki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C w ciemności. Po tym czasie dodawano do próbek 500 μ l buforu do barwienia FACS i odwirowywano (czas = 5 min, RCF = 300 x g, temp. = 15°C) celem odpłukania niezwiązanych z antygenem przeciwciał. Osad komórek zawieszano w 300 μ l odczynnika Transcription Factor Fix z zestawu True-NuclearTM Transcription Factor Buffer Set (Biolegend) i inkubowano przez noc (około 18 godz.) w temperaturze 4°C w ciemności. Po tym czasie komórki odwirowywano (czas = 5 min, RCF = 300 x g, temp. = 15°C), osad komórek przemywano 500 μ l odczynnika permeabilizującego błonę komórkową Perm Buffer z zestawu True-NuclearTM Transcription Factor Buffer Set (Biolegend) i ponownie odwirowywano w warunkach jak wcześniej. Osad komórek zawieszano w 100 μ l Perm Buffer i po ponownym zablokowaniu receptorów FcR (warunki jak wcześniej) dodawano przeciwciała monoklonalne (skoniugowane z fluorochromami) rozpoznającymi wybrane antygeny wewnątrzkomórkowe w stężeniach wcześniej dobranych lub odpowiednie kontrole izotypowe (skoniugowane z tymi samymi fluorochromami i dodawane w tych samych stężeniach co specyficzne przeciwciała monoklonalne) (tabela nr 5 i 6). Komórki inkubowano przez 60 minut w temperaturze 4°C w ciemności, a następnie dwukrotnie odpłukiwano niezwiązane przeciwciała 500 μ l Perm Buffer. Osad komórek zawieszano w 350 μ l 1% buforowanej formaliny i analizowano na cytometrze przepływowym LSRFortessaTM (Becton Dickinson).

3.9 Analiza cytometryczna

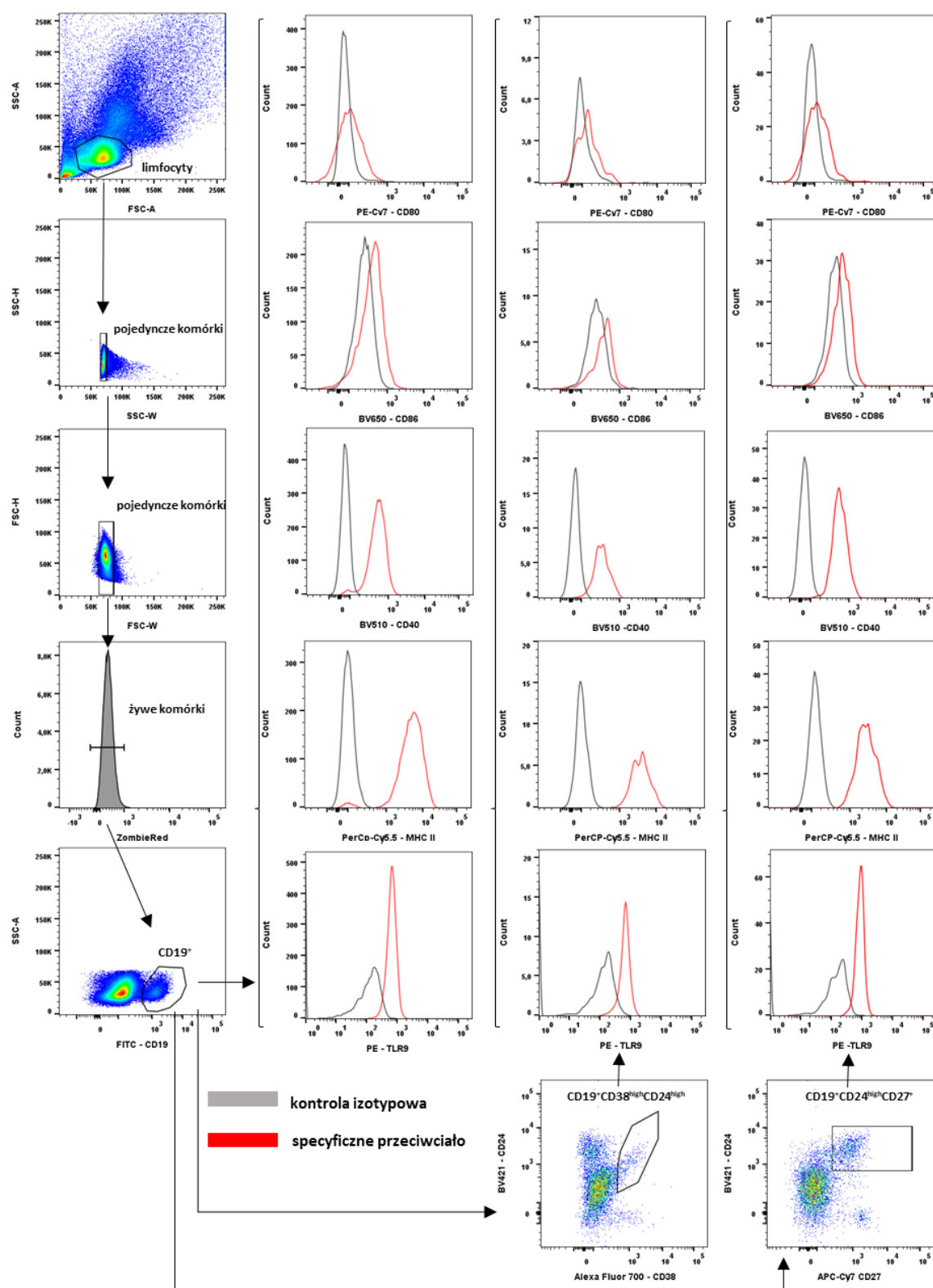
Analizę danych uzyskanych z cytometrii przepływowej wykonano w programie FlowJo v10.8.1 (FlowJo LLC). Przed przystąpieniem do analiz, dla każdego panelu oznaczeń wykonano automatyczną kompensację fluorescencji. Po zabramkowaniu odpowiedniej populacji komórek, określano ekspresję badanych białek na podstawie różnicy mediany fluorescencji pomiędzy specyficznym przeciwciałem, a medianą fluorescencji pochodzącą z odpowiedniej kontroli izotypowej (median fluorescence intensity, MFI). Na rycinach 8-12 przedstawiono strategię bramkowania.



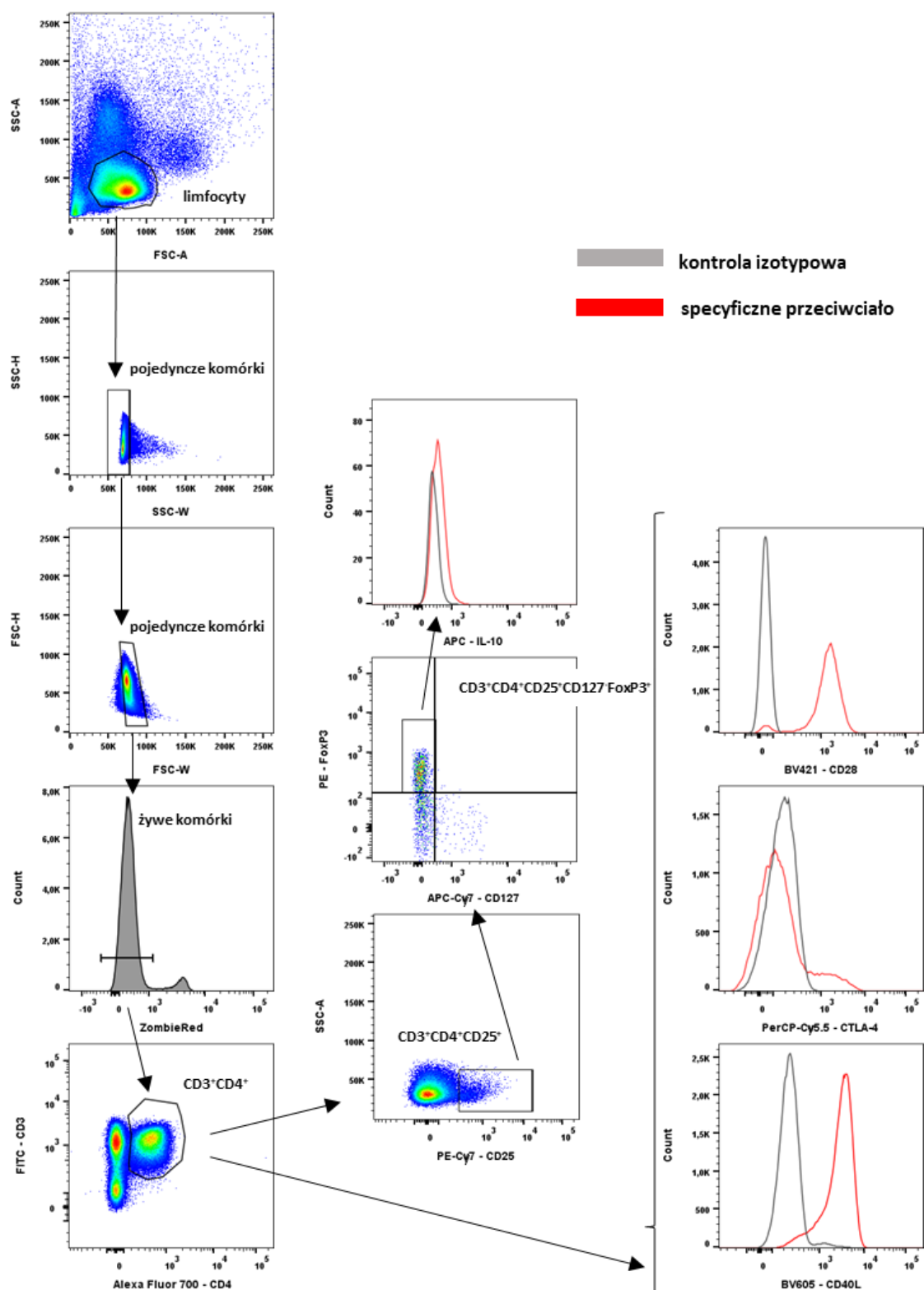
Rycina 8. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania śledzionowych limfocytów B oraz określenia ekspresji MHC klasy II, cząsteczek kostymulacyjnych oraz TLR9 w doświadczeniu z udziałem mysiego modelu ciąży zagrożonej poronieniem.



Rycina 9. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania limfocytów T węzłów chłonnych oraz określenia ekspresji IL-10 oraz receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych w doświadczeniu z udziałem mysiego modelu ciąży zagrożonej poronieniem.



Rycina 10. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania limfocytów B (CD19⁺), przejściowych limfocytów B (CD19⁺CD38^{high}CD24^{high}) oraz limfocytów B pamięci (CD19⁺CD24^{high}CD27⁺) w krwi obwodowej pacjentek oraz określenia ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR (MHC klasy II) oraz TLR9 w tych komórkach.



Rycina 12. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania limfocytów T w krwi obwodowej pacjentek oraz określenia ekspresji IL-10 oraz receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych.

3.10 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism v 5.03 (GraphPad Software). Wyniki odstające odrzucono na podstawie testu Grubssa. Normalność rozkładu danych sprawdzono testem Shapiro-Wilka. W przypadku porównywania trzech grup między sobą użyto testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ang. one-way ANOVA) z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w badanych grupach nie były homogenne. Homogenność wariancji w grupach w tym przypadku sprawdzano za pomocą testu Barletta.

z kolei porównując wyniki pomiędzy dwoma grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych, z poprawką Welcha gdy wariancje w grupach, zbadane za pomocą testy Fishera, nie były homogenne lub testu u Manna-Whitneya, gdy dane dodatkowo nie pochodziły z rozkładu normalnego.

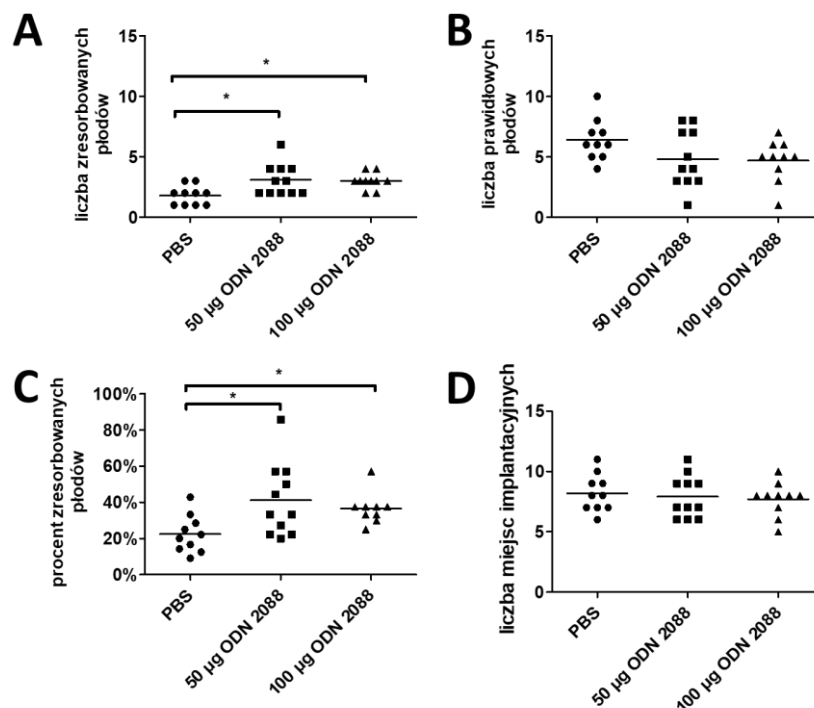
Dokładny opis testów statystycznych jakie użyto porównując dane pomiędzy grupami umieszczony został w podpisach pod wykresami. Wyniki uznano za istotne statystycznie gdy $P < 0,05$.

4 WYNIKI

4.1 Wpływ antagonisty TLR9 ODN 2088 na powodzenie ciąży oraz na ustalenie tolerancji immunologicznej w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem

4.1.1 Wpływ antagonisty TLR9 ODN 2088 na powodzenie ciąży

W celu sprawdzenia jaki wpływ na powodzenie ciąży ma podanie antagonisty TLR9 ODN 2088, myszy w 14 dniu ciąży uśmiercono oraz zliczono liczbę zresorbowanych oraz prawidłowych płodów, a także policzono miejsca implantacyjne (sumaryczna liczba prawidłowych i zresorbowanych płodów). Na wykresie 1 przedstawiono dane z przeprowadzonego eksperymentu. Po podaniu ODN 2088, zarówno w dawce 50 µg jak i 100 µg, zaobserwowano zwiększoną liczbę i odsetek zresorbowanych płodów ($P < 0,05$) w stosunku do wszystkich miejsc implantacyjnych (na wykresie 1 odpowiednio a i C) w porównaniu z grupą kontrolną samic, które otrzymały PBS. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w liczbie prawidłowych płodów (wykres 1 B) oraz liczbie miejsc implantacyjnych (wykres 1 D).



Wykres 1. Wpływ podażi antagonisty TLR9 na powodzenie ciąży u myszy CBA/J po kryciu samcami DBA/2J. Liczba zresorbowanych płodów (A), liczba prawidłowych płodów (B), procent zresorbowanych płodów (C) oraz sumaryczna liczba miejsc implantacyjnych (D) w 14 dniu ciąży po podaniu ODN 2088 lub PBS (kontrola). Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10). Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.
* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

4.1.2 Wpływ podażi antagonisty TLR9 ODN 2088 na ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 przez limfocyty B śledziony oraz węzłów chłonnych drenujących macicę

Celem eksperymentu było sprawdzenie wpływu podażi antagonisty TLR9 ODN 2088 na kostymulacyjny fenotyp limfocytów B, ekspresję MHC klasy II oraz TLR9 w dwóch dniach ciąży myszy – w 3 oraz 14 dniu ciąży. Badania postanowiono przeprowadzić w tych dniach ciąży, ponieważ 3 dzień ciąży jest ostatnim dniem przed implantacją, która u myszy rozpoczyna się pomiędzy 4 a 5 dniem po pokryciu. Z kolei w 14 dniu ciąży, łożysko jest w pełni rozwinięte i kontakt pomiędzy matką, a płodem jest ustabilizowany. Dodatkowo w modelu tym, w 14 dniu ciąży bardzo dobrze można odróżnić prawidłowe jak i zresorbowane płody/miejsca resorpcyjne.

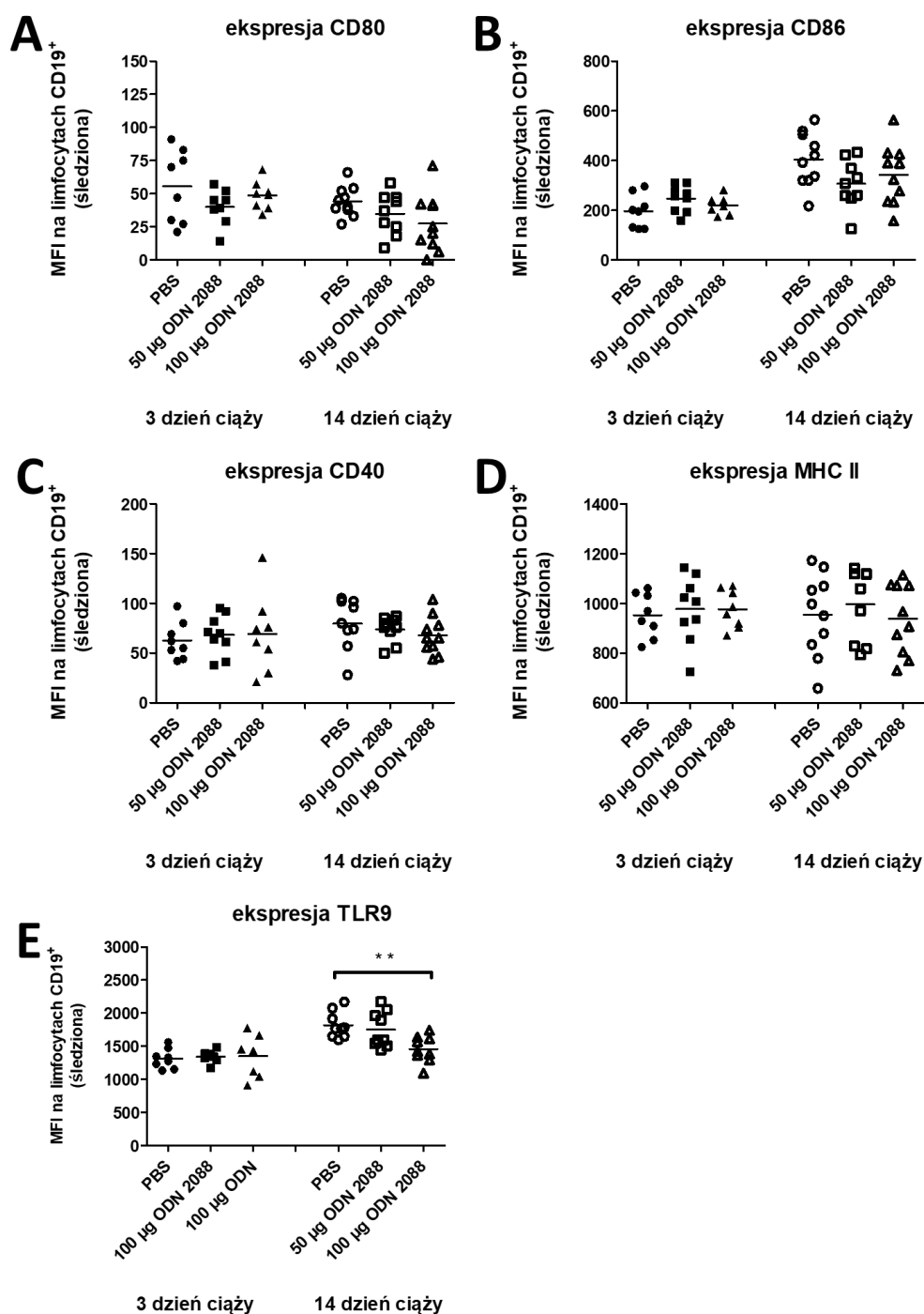
Z przeprowadzonych analiz cytometrycznych wynika, że podaż 50 µg jak i 100 µg ODN 2088 nie wpłynęła na ekspresję CD80 na śledzionowych limfocytach B

w obydwu badanych dniach ciąży (wykres 2 A). Z kolei limfocyty B węzłów chłonnych charakteryzowały się spadkiem ekspresji CD80 w 3 dniu ciąży po podaży 50 µg antagonisty TLR9 ($P<0,05$), a w 14 dniu ciąży po podaży 100 µg ODN 2088 ($P<0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną myszy (wykres 3 A).

W przypadku cząsteczki CD86 zauważono wzrost jej ekspresji na limfocytach B węzłów chłonnych w 3 dniu ciąży po podaniu 50 µg ODN 2088 ($P<0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną (wykres 3 B). Była to jedyna obserwowana zmiana w ekspresji tej cząsteczki na limfocytach B.

Analiza ekspresji cząsteczki CD40 oraz MHC klasy II na limfocytach B pochodzących z śledziony oraz węzłów chłonnych samic nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami badanymi oraz grupą kontrolną myszy zarówno w 3 jak i 14 dniu ciąży (wykres 2 C i D oraz wykres 3 C i D).

Podaż ODN 2088 nie spowodowała zmian ekspresji TLR9 w limfocytach B w śledzionie (wykres 2 E) i węzłach chłonnych (wykres 3 E) w 3 dniu ciąży. Natomiast podanie 100 µg ODN 2088 przyczyniło się do spadku ekspresji tego receptora w 14 dniu ciąży zarówno w limfocytach B śledziony ($P<0,01$; wykres 2 E) jak i węzłów chłonnych ($P<0,05$, wykres 3E) w porównaniu z grupą kontrolną.

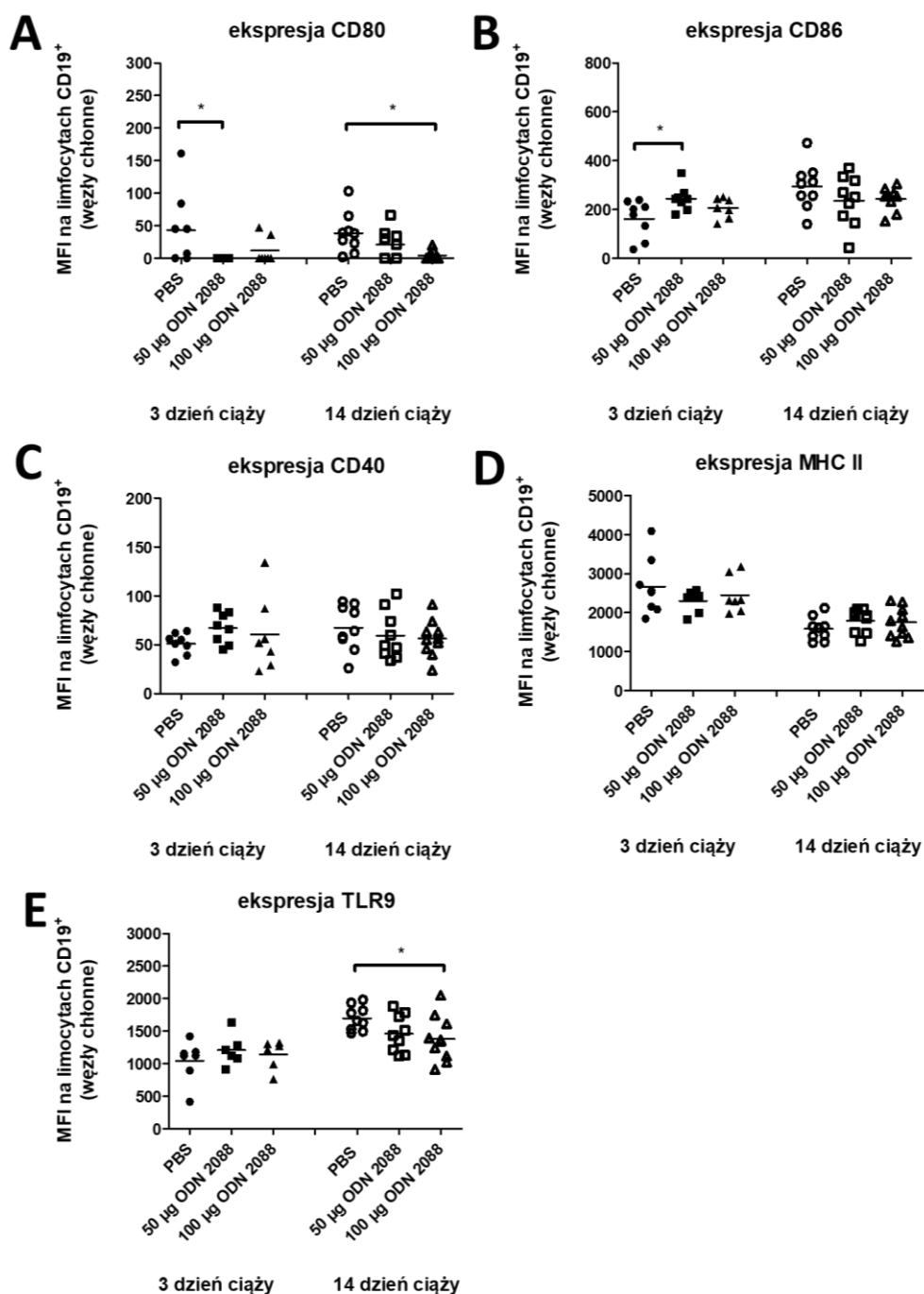


Wykres 2. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w śledzionowych limfocytach B (CD19⁺) w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisza z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001



Wykres 3. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w limfocytach B (CD19⁺) wyizolowanych z węzłów chłonnych drenujących macicę w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10).

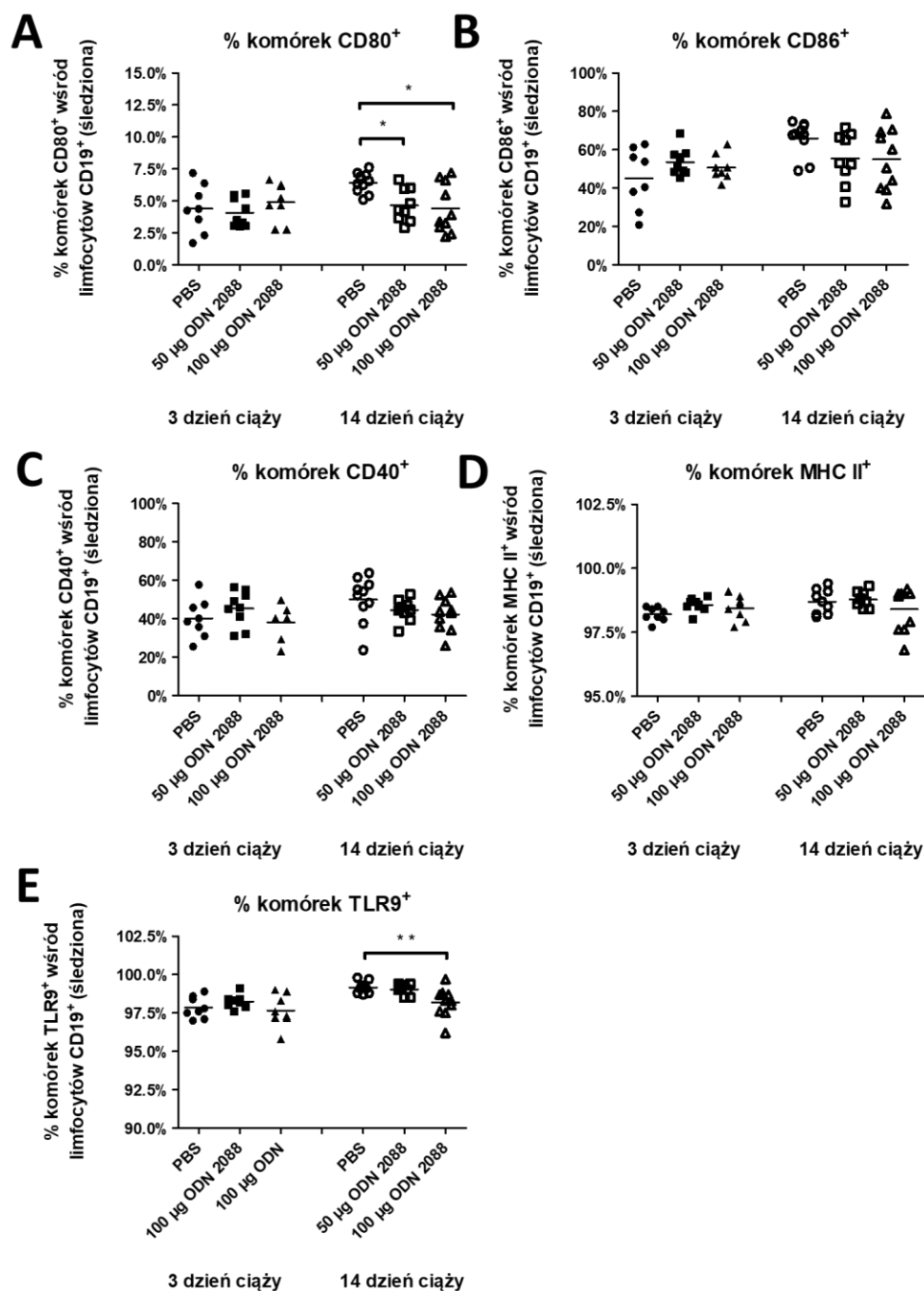
Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Sprawdzono również zmianę frekwencji limfocytów B z ekspresją badanych białek po podaży antagonisty TLR9. W przypadku limfocytów B z ekspresją CD80 zauważono jedynie spadek frekwencji tych komórek wśród śledzionowych limfocytów B w 14 dniu ciąży po podaży 50 μ g ($P<0,05$) jak i 100 μ g ($P<0,05$) ODN 2088 w porównaniu z grupą kontrolną (wykres 4 A). Natomiast nie odnotowano zmian w frekwencji tych komórek w 3 dniu ciąży w śledzionie (wykres 4 A) i w węzłach chłonnych (wykres 5 A), jak i w 14 dniu ciąży w węzłach chłonnych (wykres 5 A) pomiędzy badanymi grupami myszy.

Nie odnotowano zmian w frekwencji limfocytów B z ekspresją CD86, CD40, MHC klasy II wśród śledzionowych limfocytów B (wykres 4 B, C, D) i limfocytów B pochodzących z węzłów chłonnych (wykres 5 B, C, D) w dwóch badanych dniach ciąży pomiędzy grupą myszy które otrzymały ODN 2088, a grupą kontrolną.

W przypadku limfocytów B z ekspresją TLR9 wykazano jedynie spadek frekwencji w 14 dniu ciąży zarówno w śledzionie ($P<0,05$; wykres 4 E) jak i węzłach chłonnych ($P<0,01$; wykres 5 E) po podaży 100 μ g ODN 2088. W 3 dniu ciąży pomiędzy analizowanymi grupami myszy nie odnotowano różnic w frekwencji komórek CD19⁺TLR9⁺ wśród limfocytów B pochodzących z obydwu badanych narządów (wykres 4 E i wykres 5 E).

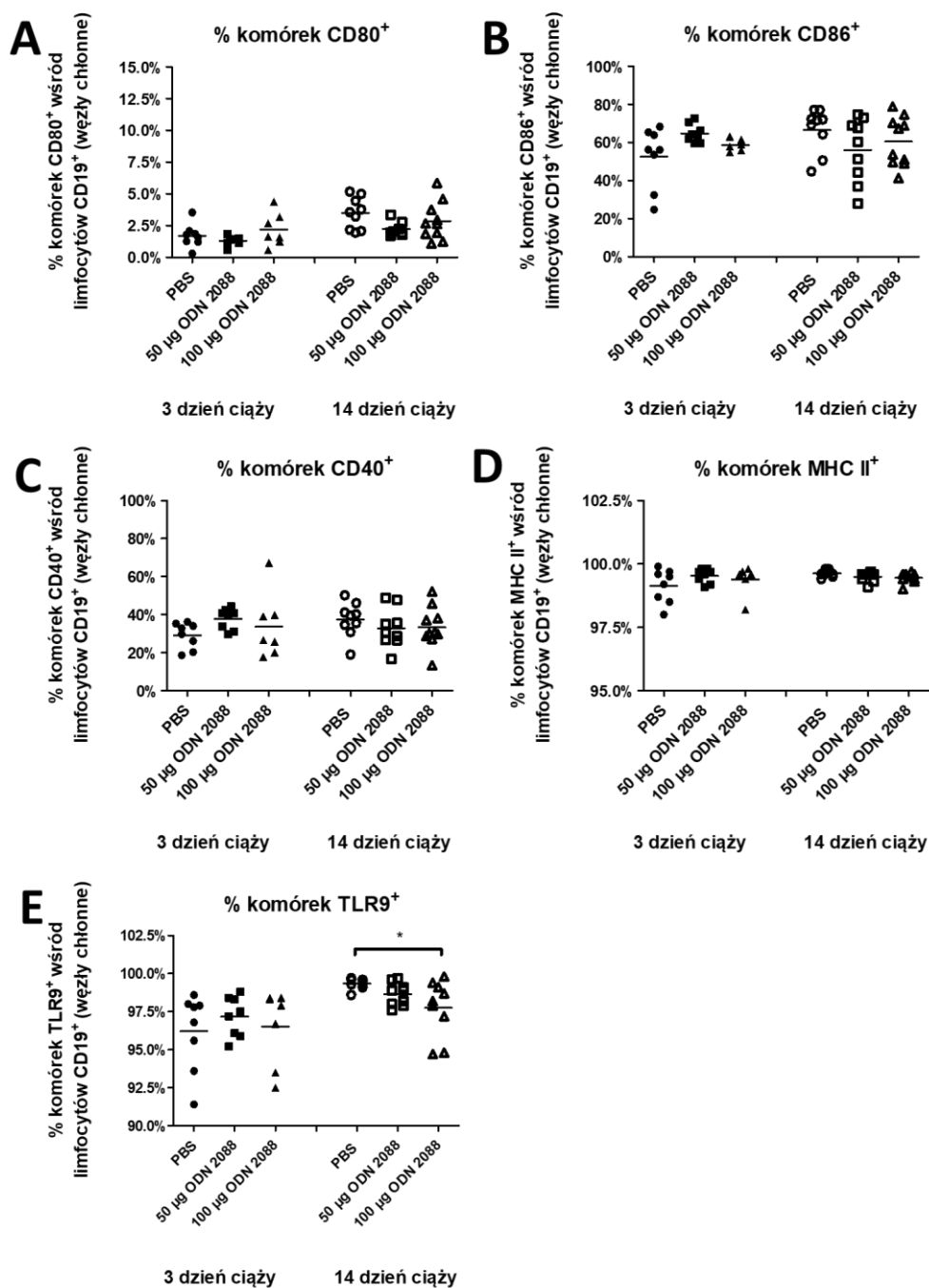


Wykres 4. Frekwencja limfocytów B (CD19⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19⁺ śledziona w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001



Wykres 5. Frekwencja limfocytów B (CD19⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19⁺ węzłów chłonnych drenujących macicę w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

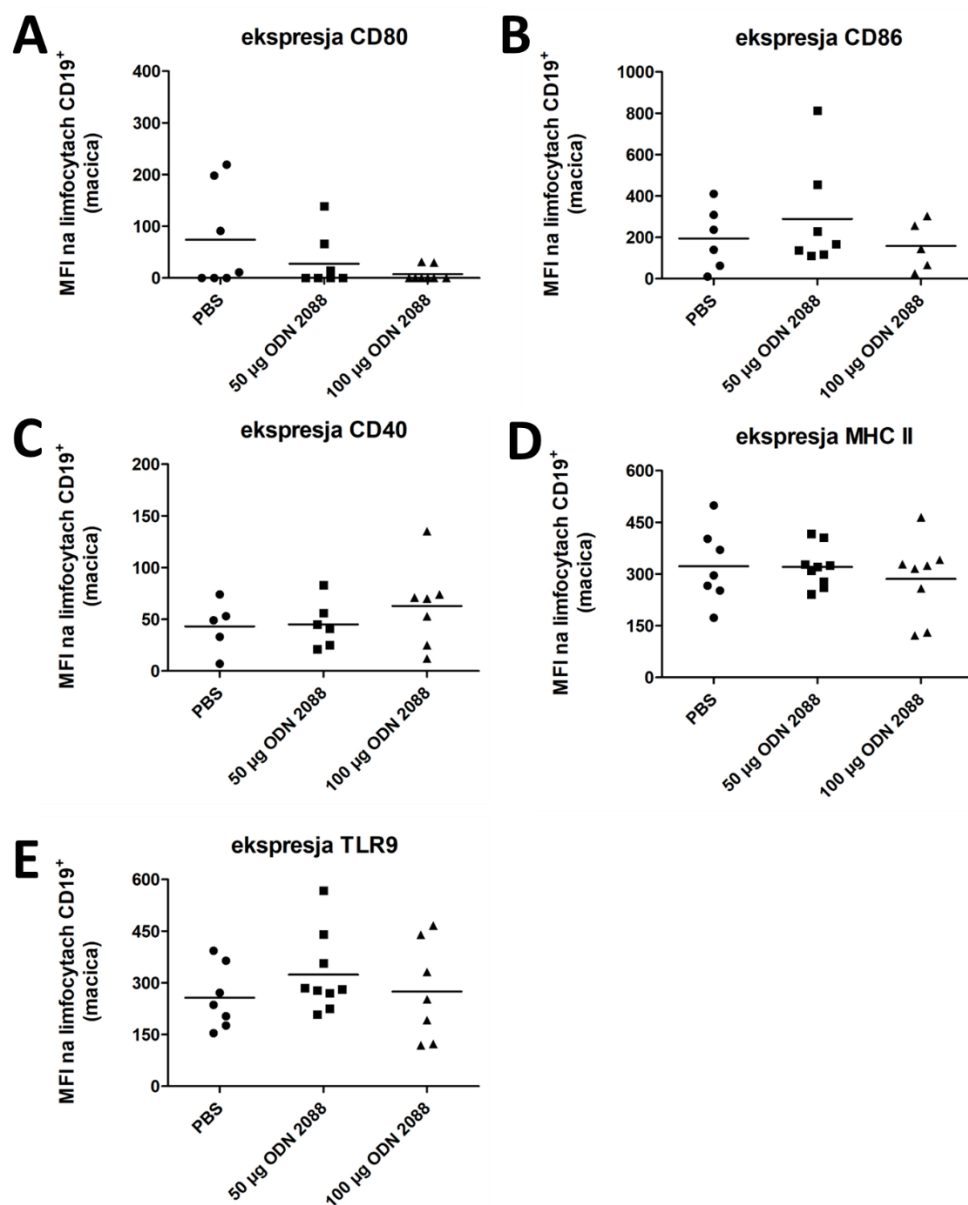
* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

4.1.3 Ocena ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 przez limfocyty B izolowane z macicy oraz doczesnej po podaży ODN 2088

Analizując ekspresję wybranych antygenów na limfocytach B macicy w 3 dniu ciąży nie zaobserwowano istotnych różnic w ich ekspresji pomiędzy grupą myszy, która otrzymała antagonistę receptora TLR9 w dawce 50 µg lub 100 µg, a grupą kontrolną (wykres 6). Dodatkowo w macicy frekwencja limfocytów B o fenotypie CD19⁺CD80⁺, CD19⁺CD86⁺, CD19⁺CD40⁺, CD19⁺MHC II⁺ oraz CD19⁺TLR9⁺ (wykres 7) nie różniła się pomiędzy myszami, które otrzymały ODN 2088 (w dawce 50 µg lub 100 µg), a zwierzętami, którym podano PBS.

Natomiast w doczesnej w 14 dniu ciąży limfocyty B wykazywały niższą ekspresję TLR9 w grupie myszy, którym podano ODN2088 w dawce 50 µg ($P<0,05$) jak i 100 µg ($P<0,001$), niż limfocyty B pochodzące od samic z grupy kontrolnej (wykres 8 E). Ekspresja pozostałych badanych antygenów na limfocytach B doczesnej nie różniła się pomiędzy porównywanymi grupami myszy.

Jedyną różnicę jaką zaobserwowano w przypadku frekwencji limfocytów B doczesnej z ekspresją badanych antygenów, to niższy procent komórek CD19⁺TLR9⁺ w grupie myszy po iniekcji 100 µg ODN 2088 ($P<0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną (wykres 8E).

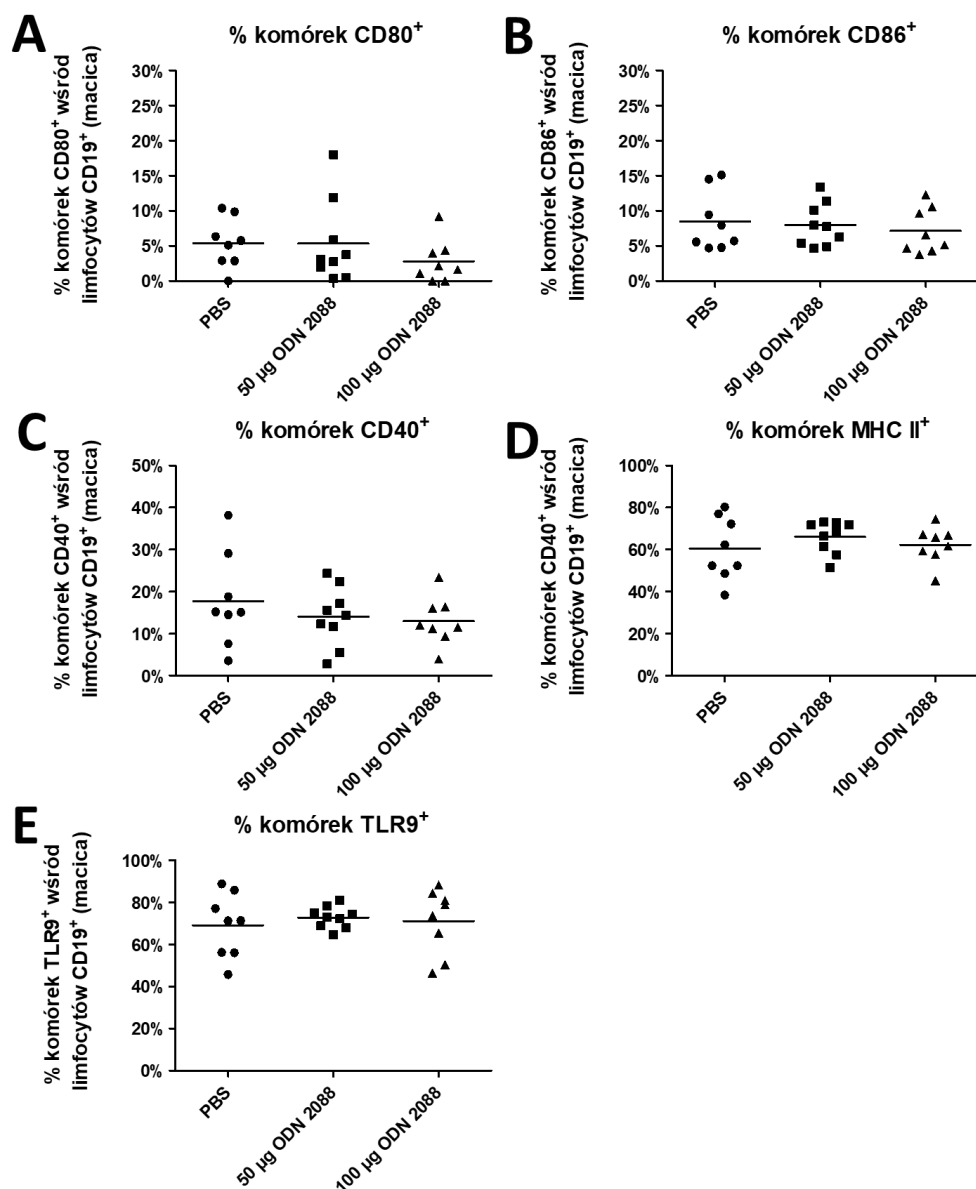


Wykres 6. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w limfocytach B (CD19⁺) macicy w 3 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=6-9).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

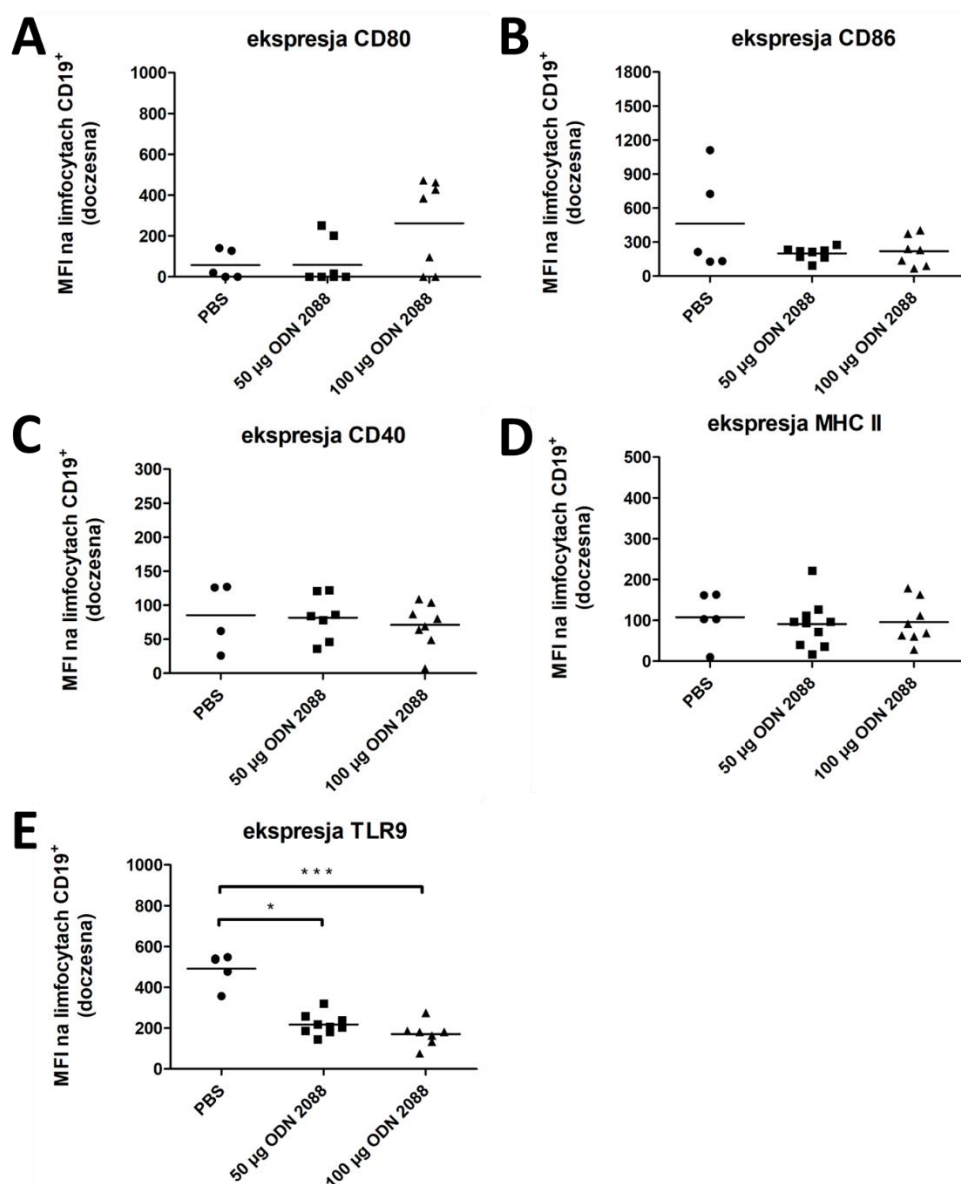


Wykres 7. Frekwencja limfocytów B (CD19⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19⁺ macicy w 3 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=6-9).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

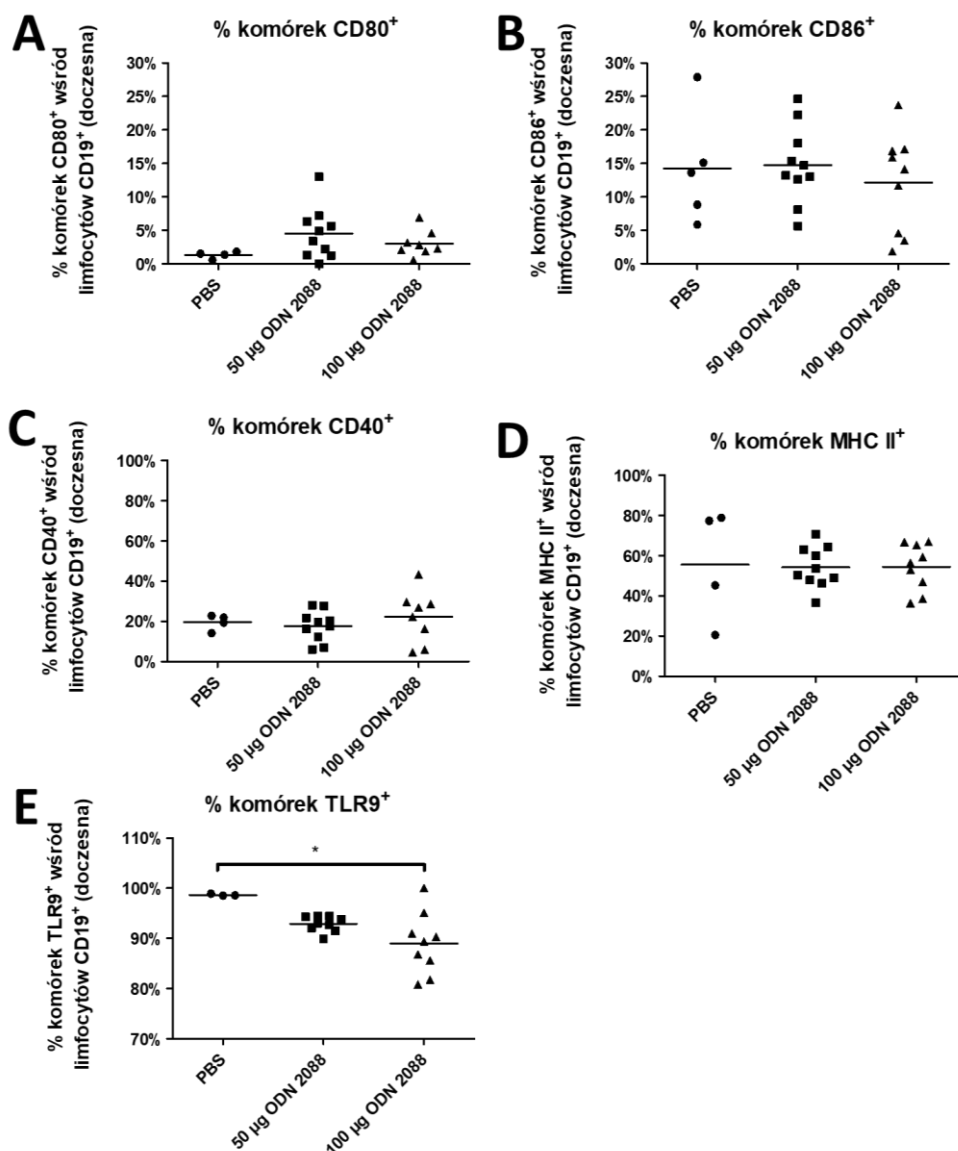


Wykres 8. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w limfocytach B (CD19⁺) doczesnej w 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=4-9).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

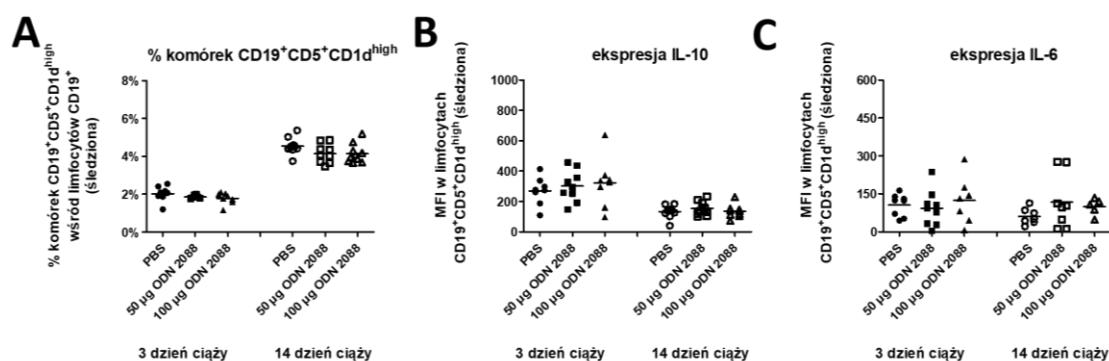


Wykres 9. Frekwencja limfocytów B (CD19⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19⁺ doczesnej w 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola). Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=4-9). Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.
* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

4.1.4 Wpływ antagonisty TLR9 ODN 2088 na frekwencję limfocytów CD19⁺CD5⁺CD1d^{high} (Breg) oraz ekspresję IL-10 i IL-6 przez te komórki

W celu określenia wpływu antagonisty TLR9 na frekwencję limfocytów Breg wybrano populację limfocytów B o fenotypie CD19⁺CD5⁺CD1d^{high}, ponieważ w modelu ciąży zagrożonej poronieniem wykazano, że komórki o tym fenotypie mogą uczestniczyć w regulacji tolerancji immunologicznej m.in. poprzez wydzielanie IL-10^{11,15,43}. Ponadto jest to najczęściej badana subpopulacja limfocytów B pod kątem aktywności supresyjnej u myszy.^{11,43,112,126–129}

Analiza frekwencji limfocytów CD19⁺CD5⁺CD1d^{high} wśród limfocytów B śledziony oraz węzłów chłonnych drenujących macicę w 3 i 14 dniu ciąży nie wykazała różnic pomiędzy samicami, które otrzymały ODN 2088 a samicami z grupy kontrolnej (wykres 10 a oraz wykres 11 A). Limfocyty te charakteryzowały się również ekspresją IL-10 oraz IL-6 na takim samym poziomie we wszystkich analizowanych grupach myszy dwóch badanych dniach ciąży (wykres 10 B i C oraz wykres 11 B i C).

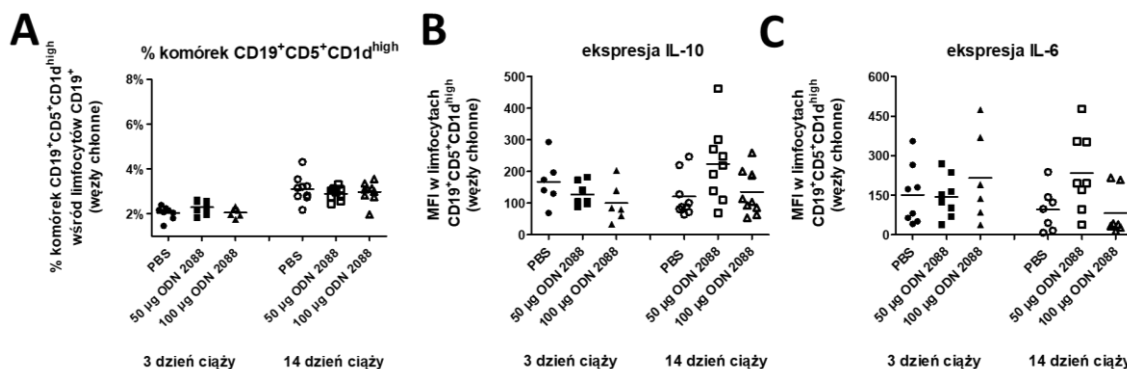


Wykres 10. Frekwencja śledzionowych limfocytów CD19⁺CD5⁺CD1d^{high} wśród limfocytów B (CD19⁺) oraz ekspresją IL-10 oraz IL-6 przez śledzionowe limfocyty CD19⁺CD5⁺CD1d^{high} w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola)

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001



Wykres 11. Frekwencja limfocytów $CD19^+CD5^+CD1d^{high}$ wśród limfocytów B ($CD19^+$) pochodzących z węzłów chłonnych drenujących macicę oraz ekspresją IL-10 oraz IL-6 przez limfocyty $CD19^+CD5^+CD1d^{high}$ w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy ($n=8-10$).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

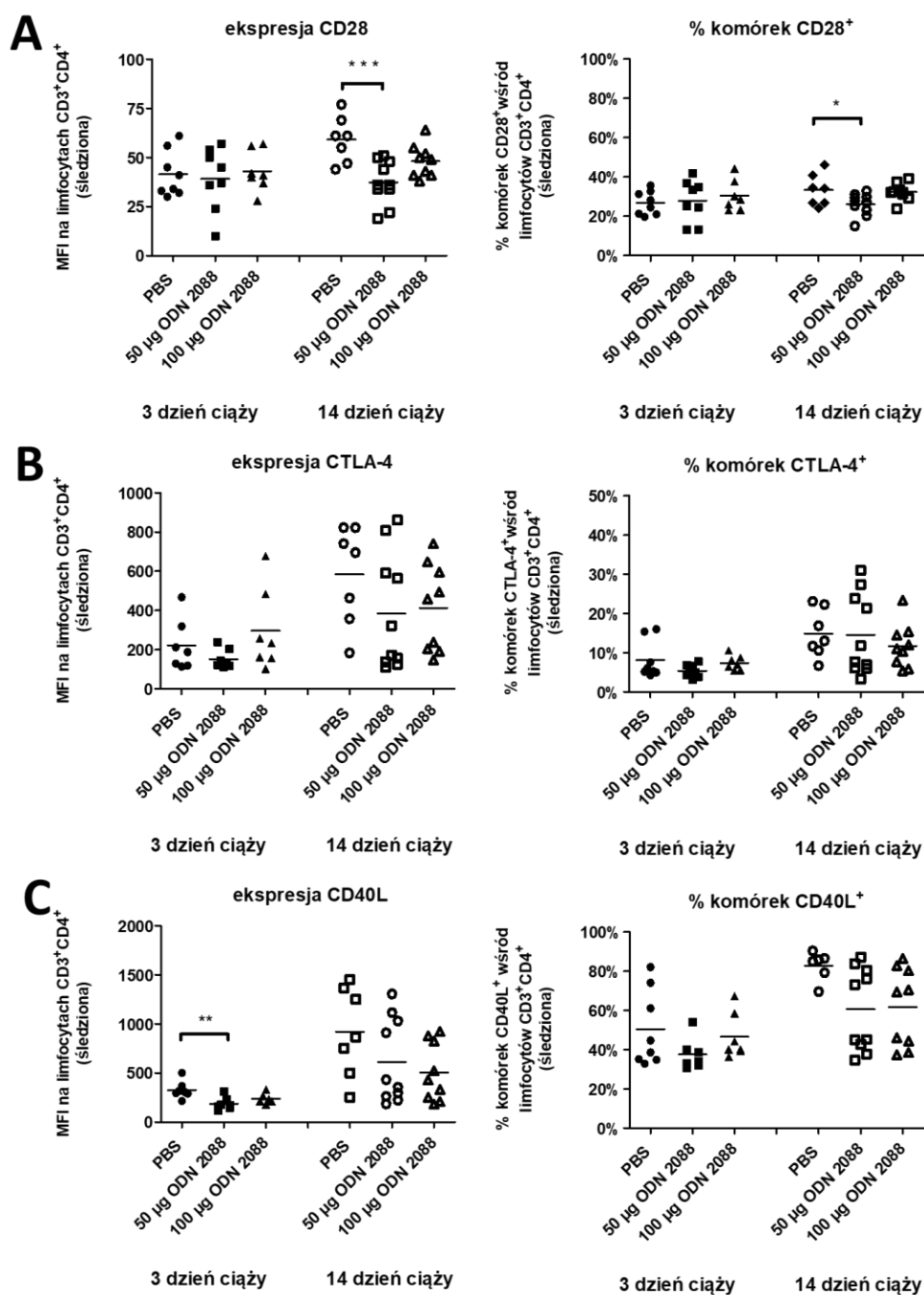
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.1.5 Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych przez limfocyty T po podaży antagonisty TLR9 ODN 2088

U samic po zastosowaniu 50 μ g ODN 2088 śledzionowe limfocyty T w 14 dniu ciąży charakteryzowały się spadkiem ekspresji cząsteczki CD28 ($P < 0,001$) w porównaniu z grupą kontrolną myszy (wykres 12 A). Dodatkowo zaobserwowano zmniejszenie się frekwencji komórek $CD3^+CD4^+CD28^+$ ($P < 0,05$) wśród limfocytów T śledziony (14 dzień ciąży) w grupie myszy, której podano 50 μ g antagonisty receptora TLR9 (wykres 12 A). W limfocytach T pochodzących z węzłów chłonnych drenujących macicę nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji CD28 pomiędzy badanymi grupami zarówno w 3 jak i w 14 dniu ciąży. Nie odnotowano również zmian w frekwencji limfocytów z ekspresją tego białka wśród wszystkich limfocytów T węzłów chłonnych (wykres 13 A).

U samic myszy nie zaobserwowano również zmian w ekspresji cząsteczki CTLA-4 na śledzionowych jak i pochodzących z węzłów chłonnych drenujących macicę limfocytach T w 3 jak i 14 dniu ciąży pomiędzy grupą samic, które otrzymały ODN 2088 w dawce 50 μ g i 100 μ g, a grupą myszy po podaży PBS. Nie zauważono również różnic w frekwencji komórek $CTLA-4^+CD3^+CD4^+$ w populacji limfocytów T śledziony i węzłów chłonnych pomiędzy badanymi grupami myszy w obu dniach ciąży (wykres 12 B oraz 13 B).

Natomiast po podaży 50 μ g antagonisty TLR9 wykazano niższą, w porównaniu z grupą kontrolną, ekspresję CD40L ($P<0,01$) w 3 dniu ciąży na śledzionowych limfocytach T oraz na limfocytach T pochodzących z węzłów chłonnych drenujących macicę po podaniu 50 μ g ($P<0,001$) i 100 μ g ($P<0,001$) ODN 2088. W przypadku 14 dnia ciąży nie odnotowano różnic w ekspresji tego białka na komórkach CD3⁺CD4⁺ śledziony oraz węzłów chłonnych drenujących macicę pomiędzy badanymi grupami myszy. Również frekwencja limfocytów T z ekspresją CD40L wśród wszystkich limfocytów śledziony oraz węzłów chłonnych drenujących macicę nie uległa zmianie w 3 i 14 dni ciąży po podaniu ODN 2088 (wykres 12 C i wykres 13 C).

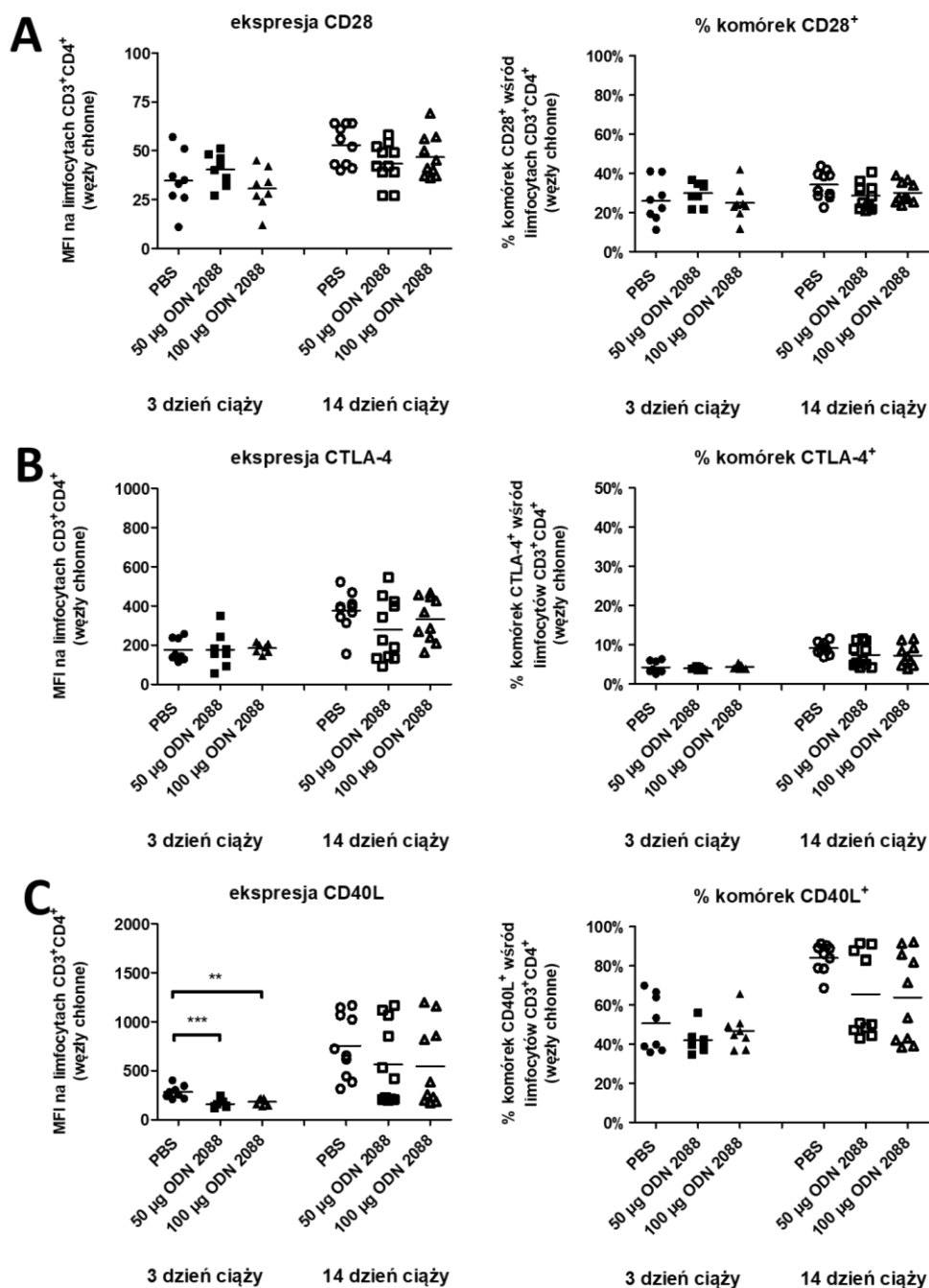


Wykres 12. Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na śledzionowych limfocytach T (CD3⁺CD4⁺) w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola) oraz frekwencja limfocytów T z ekspresją tych cząsteczek wśród limfocytów T śledziony.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskala-Wallisza z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001



Wykres 13. Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T (CD3⁺CD4⁺) wyizolowanych z węzłów chłonnych drenujących macicę w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola) oraz frekwencja limfocytów T z ekspresją tych cząsteczek wśród limfocytów T węzłów chłonnych.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy (n=8-10).

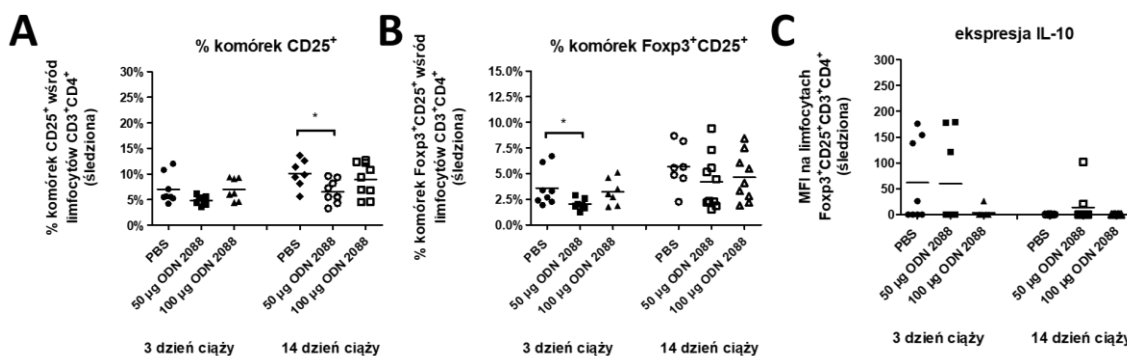
Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto ang. one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

4.1.6 Aktywacja limfocytów T oraz frekwencja Treg po podaży antagonisty TLR9 ODN 2088

Analizując frekwencję limfocytów T z ekspresją markera aktywacji (CD25), wykazano, że w 14 dniu ciąży w grupie samic po podaży 50 μ g ODN 2088 frekwencja tych limfocytów jest niższa zarówno w śledzionie ($P < 0,05$) jak i w węzłach chłonnych drenujących macicę ($P < 0,01$) w porównaniu z grupą kontrolną (wykres 14 A oraz wykres 15 A). Z kolei w 3 dniu ciąży, podaż antagonisty TLR9 nie miała wpływu na frekwencję limfocytów T z ekspresją CD25 zarówno w śledzionie jak i w węzłach chłonnych (wykres 14 A oraz wykres 15 A).

Grupa samic po podaży 50 μ g ODN 2088 w porównaniu do grupy kontrolnej charakteryzowała się spadkiem frekwencji limfocytów $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ wśród wszystkich limfocytów T węzłów chłonnych ($P < 0,05$; 14 dzień ciąży) i śledziony ($P < 0,01$; 3 dzień ciąży) w porównaniu z grupą kontrolną (wykres 14 B oraz wykres 15 B). W przypadku analizy ekspresji IL-10 w limfocytach $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami samic w 3 i 14 dniu ciąży zarówno w węzłach chłonnych drenujących macicę jak i w śledzionie (wykres 14 C oraz wykres 15 C).

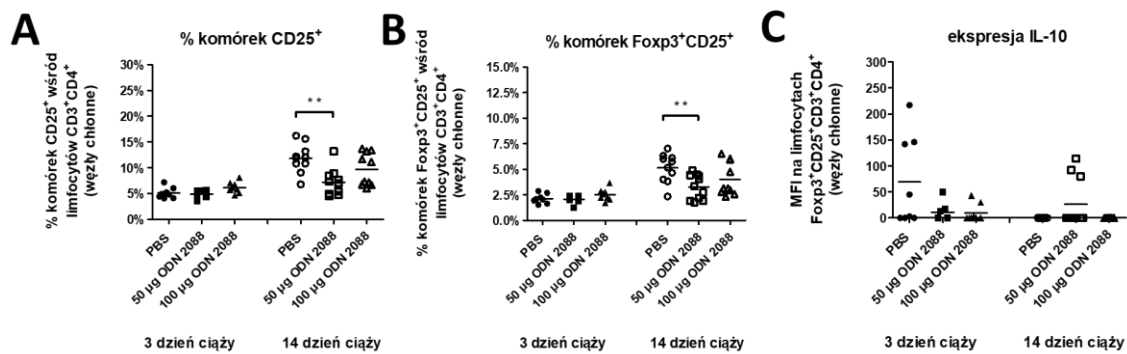


Wykres 14. Frekwencja limfocytów $CD3^+CD4^+CD25^+$ oraz $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ wśród limfocytów T śledziony oraz ekspresją IL-10 przez limfocyty $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy ($n=8-10$).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunneta lub testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$



Wykres 15. Frekwencja limfocytów $CD3^+CD4^+CD25^+$ oraz $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ wśród limfocytów T^+ węzłów chłonnych drenujących macicę oraz ekspresją IL-10 przez limfocyty $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych samic wraz z średnią dla badanej grupy ($n=8-10$).

Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi użyto testu one-way ANOVA z testem post-hoc Dunnetta lub testu Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego lub gdy wariancje w grupach nie były homogenne.

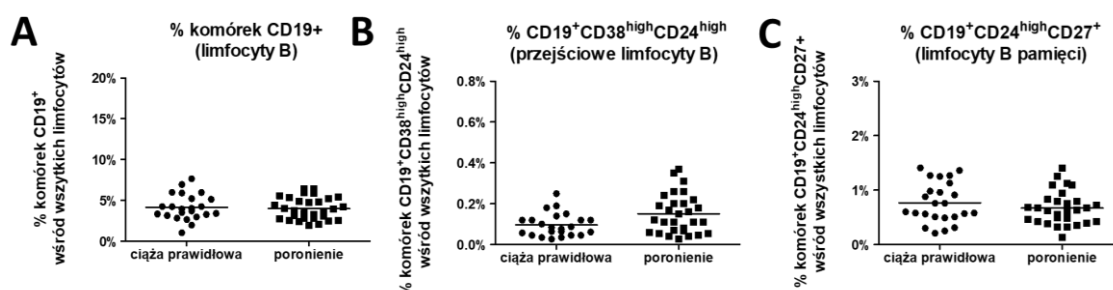
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.2 Określenie ekspresji TLR9, cząsteczek kostymulacyjnych i HLA-DR na wybranych subpopulacjach limfocytów B krwi obwodowej kobiet w pierwszym trymestrze ciąży prawidłowej i po poronieniu.

W pracy doktorskiej postanowiono skupić się na analizie ekspresji TLR9, cząsteczek kostymulacyjnych i HLA-DR w ogólnej populacji limfocytów B krwi obwodowej ($CD19^+$), a także w dwóch wybranych subpopulacjach limfocytów B: limfocytach B przejściowych o fenotypie $CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$ oraz w limfocytach B pamięci o fenotypie $CD19^+CD24^{high}CD27^+$. Subpopulacje te wybrane zostały z tego względu, iż jak dotąd są najlepiej scharakteryzowanymi subpopulacjami limfocytów B mogącymi, po odpowiedniej stymulacji, wykazywać właściwości immunosupresyjne m.in. poprzez wydzielanie IL-10^{114,126}. Dlatego też, populacje limfocytów B o podanym fenotypie nazywane są często przez badaczy limfocytami Breg odpowiednio przejściowymi limfocytami Breg (ang. transitional regulatory B cells, tBreg) oraz regulatorowymi limfocytami B pamięci (ang. memory regulatory B cells, mBreg)²⁷¹.

4.2.1 Frekwencja limfocytów B ($CD19^+$), przejściowych limfocytów B ($CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$) oraz limfocytów B pamięci ($CD19^+CD24^{high}CD27^+$) w krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej

Badania nie wykazały istotnych statystycznie różnic w frekwencji limfocytów B (wykres 16 A), przejściowych limfocytów (wykres 16 B) i limfocytów B pamięci (wykres 17 B) wśród limfocytów krwi obwodowej pomiędzy kobietami po poronieniu a kobietami w ciąży prawidłowej.

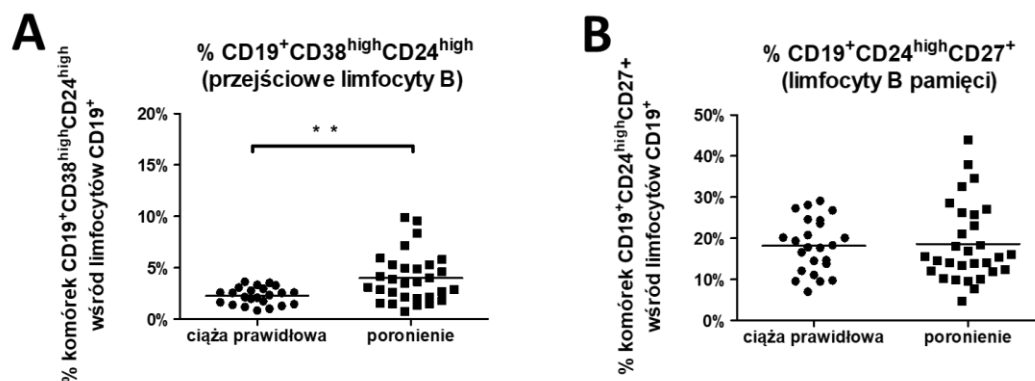


Wykres 16. . Frekwencja limfocytów B ($CD19^+$), przejściowych limfocytów B ($CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$) oraz limfocytów B pamięci ($CD19^+CD24^{high}CD27^+$) wśród limfocytów krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welcha) lub testu u Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Kobiety po poronieniu w porównaniu z kobietami w prawidłowej ciąży charakteryzowały się wyższym odsetkiem przejściowych limfocytów B ($P < 0,01$) wśród limfocytów B krwi obwodowej (wykres 17 A). Natomiast frekwencja limfocytów B pamięci wśród limfocytów B krwi obwodowej nie różniła się pomiędzy dwiema analizowanymi grupami pacjentek (wykres 17 B).



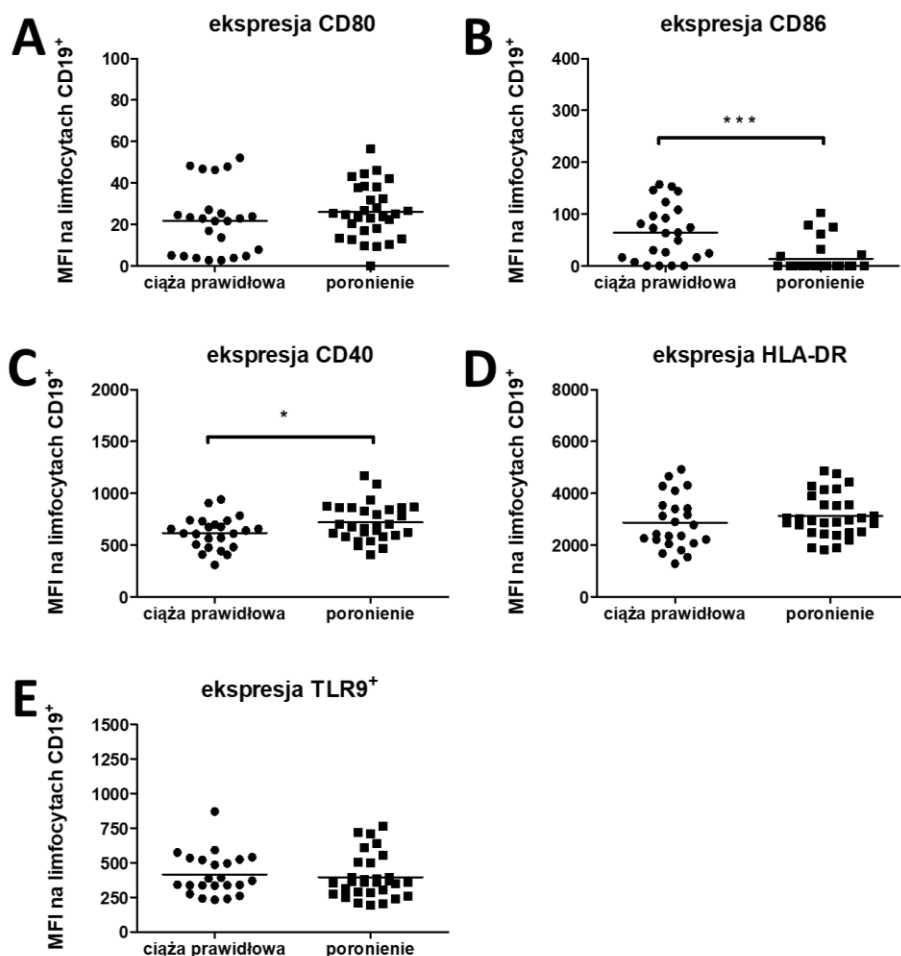
Wykres 17. Frekwencja przejściowych limfocytów B ($CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$) oraz limfocytów B pamięci ($CD19^+CD24^{high}CD27^+$) wśród limfocytów B krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welcha) lub testu χ^2 Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.2.2 Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 na limfocytach B ($CD19^+$) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej

Limfocyty B krwi obwodowej pacjentek po poronieniu charakteryzowały niższą ekspresją CD86 ($P < 0,001$) oraz wyższą ekspresją CD40 ($P < 0,05$) w porównaniu z pacjentkami w ciąży prawidłowej (wykres 18 B i C). Z kolei poziom ekspresji CD80, HLA-DR oraz TLR9 na tych limfocytach był podobny w dwóch analizowanych grupach kobiet (wykres 18 A, D, E).



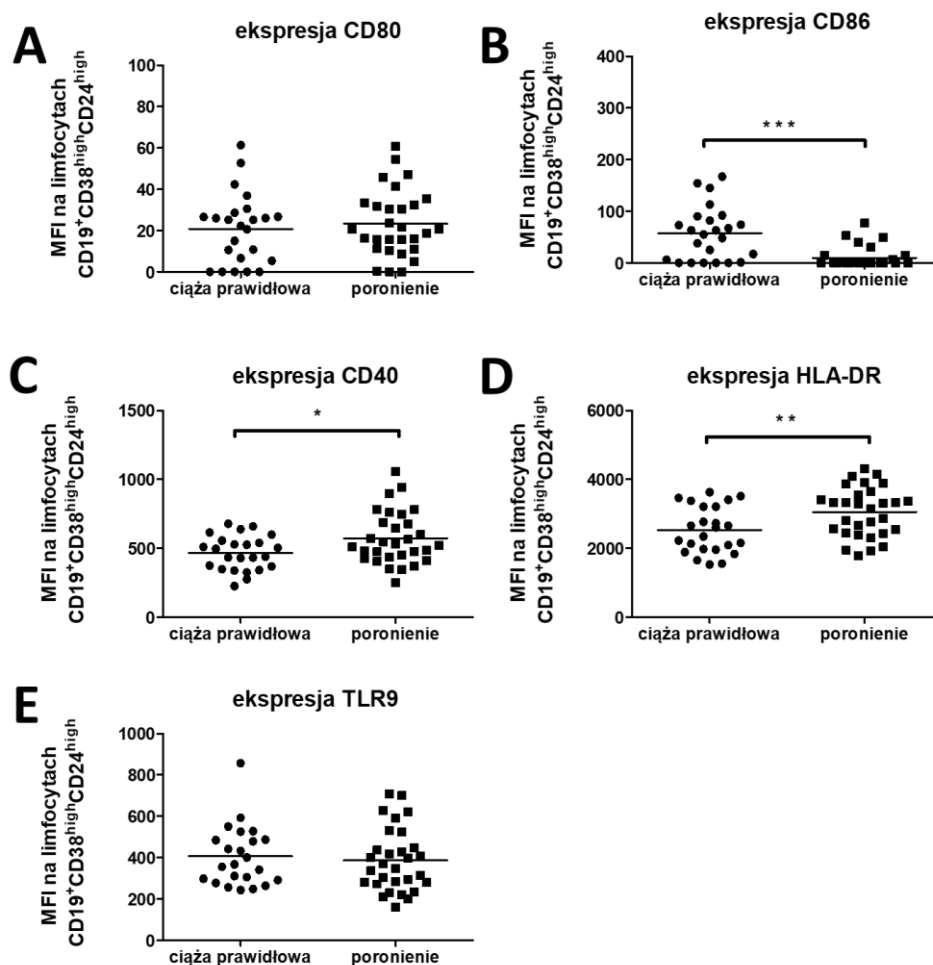
Wykres 18. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w limfocytach B (CD19⁺) krwi obwodowej pacjentek po ciąży prawidłowej oraz w ciąży prawidłowej.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welcha) lub testu μ Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.2.3 Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w przejściowych limfocytach B (CD19⁺CD38^{high}CD24^{high}) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej

Przejściowe limfocyty B krwi obwodowej kobiet po poronieniu charakteryzowały się niższą ekspresją CD86 ($P < 0,001$) w porównaniu z kobietami w ciąży prawidłowej (wykres 19 B). Z kolei poziom ekspresji cząsteczki CD40 ($P < 0,05$) oraz HLA-DR ($P < 0,01$) w tej populacji limfocytów był wyższy u pacjentek, u których doszło do poronienia, niż u kobiet w prawidłowej ciąży (wykres 19 C i D). Ekspresja CD80 oraz TLR9 była na podobnym poziomie w obydwu badanych grupach kobiet (wykres 19 A i E).



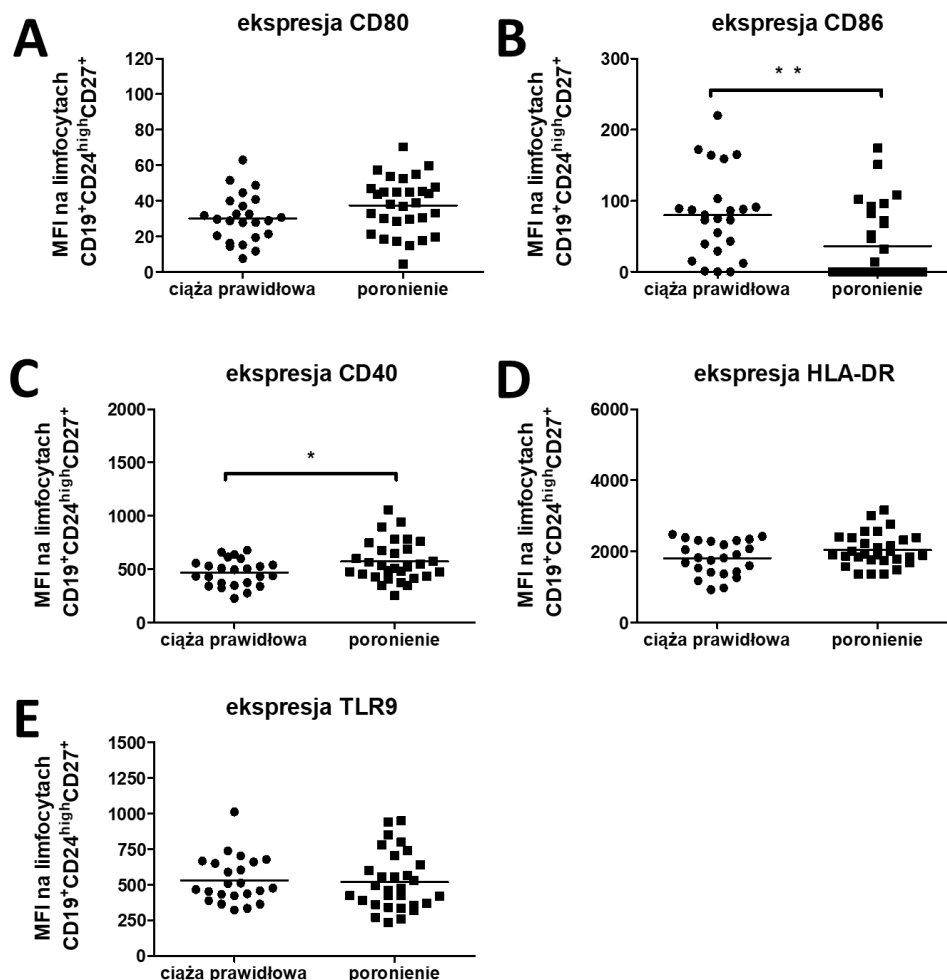
Wykres 19. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w przejściowych limfocytach B (CD19⁺CD38^{high}CD24^{high}) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welcha) lub testu u Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.2.4 Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w limfocytach B pamięci (CD19⁺CD24^{high}CD27⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej

Limfocyty B pamięci krwi obwodowej kobiet po poronieniu charakteryzowały się niższą ekspresją CD86 ($P < 0,01$) w porównaniu z kobietami w ciąży prawidłowej (wykres 20 B). Z kolei poziom ekspresji cząsteczki CD40 ($P < 0,05$) w tych limfocytach był wyższy u pacjentek, u których doszło do poronienia, niż u kobiet w prawidłowej ciąży (wykres 20 C). Ekspresja CD80, HLA-DR oraz TLR9 była na podobnym poziomie w obu badanych grupach kobiet (wykres 20 A, D i E).



Wykres 20. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w limfocytach B pamięci (CD19⁺CD24^{high}CD27⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.

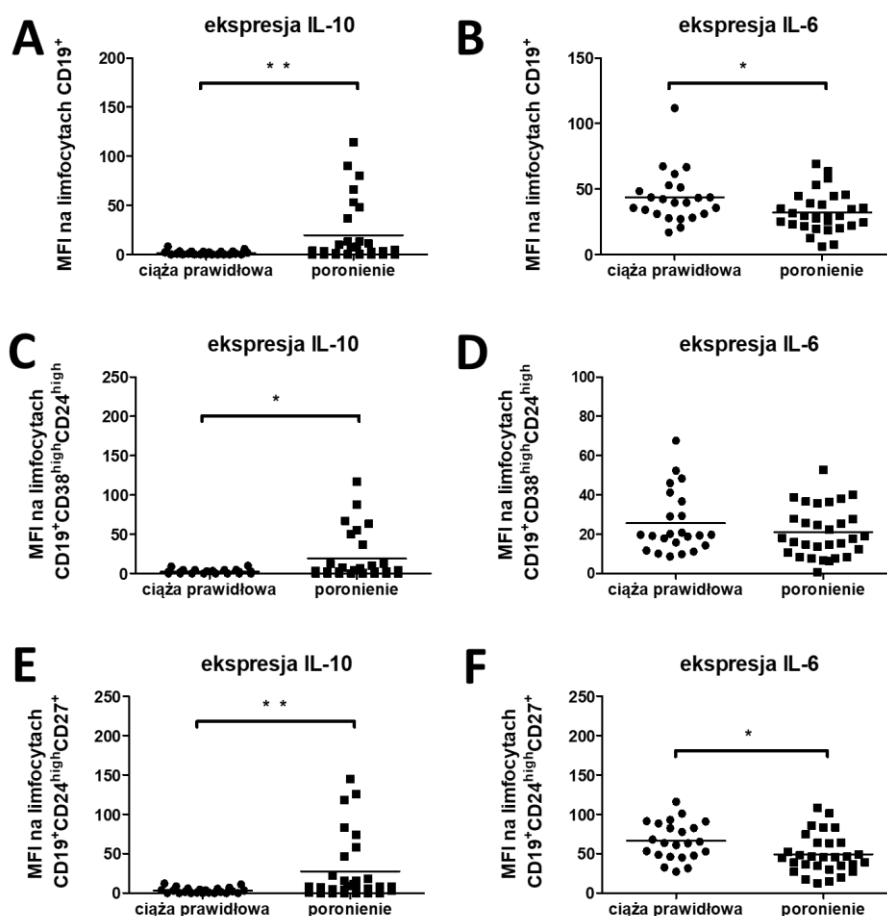
Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welch) lub testu *u* Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.2.5 Ekspresja IL-10 oraz IL-6 w limfocytach B (CD19⁺), przejściowych limfocytach B (CD19⁺CD38^{high}CD24^{high}) oraz limfocytach B pamięci (CD19⁺CD24^{high}CD27⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej

Badania wskazały na wyższą ekspresję IL-10 w limfocytach B ($P < 0,01$) oraz w subpopulacji limfocytów B przejściowych ($P < 0,05$) oraz limfocytów B pamięci ($P < 0,01$) krwi obwodowej u kobiet po poronieniu, niż u pacjentek w ciąży prawidłowej (wykres 21 A, C, E). Z kolei pacjentki w ciąży prawidłowej charakteryzowały się wyższym poziomem ekspresji IL-6 w limfocytach B ($P < 0,05$) oraz limfocytach B pamięci ($P < 0,05$), niż kobiety po poronieniu (wykres 21 B, F). Ekspresja IL-6 przez

prześciowe limfocyty B nie różniła się pomiędzy analizowanymi grupami kobiet (wykres 21 D).



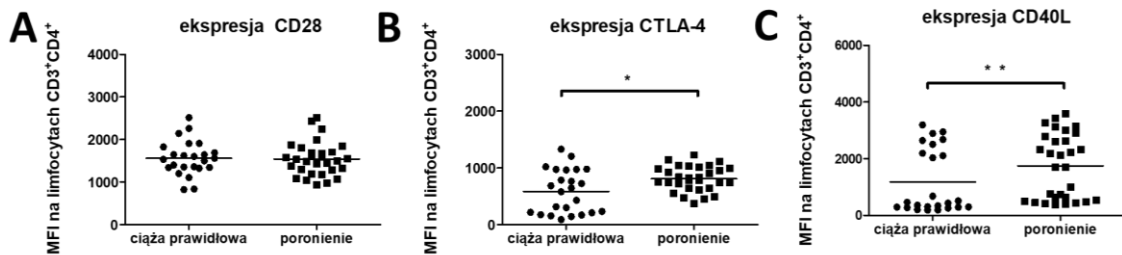
Wykres 21. Ekspresja IL-10 oraz IL-6 w limfocytach B ($CD19^+$), prześciowych limfocytach B ($CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$) oraz limfocytach B pamięci ($CD19^+CD24^{high}CD27^+$) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welch) lub testu u Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.2.6 Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej

Pacjentki po poronieniu charakteryzowały się wyższą ekspresją cząsteczek CTLA-4 ($P < 0,05$) oraz CD40L ($P < 0,01$) na limfocytach T krwi obwodowej niż kobiety w prawidłowej ciąży (wykres 22 A i C). Nie wykazano natomiast różnic w ekspresji CD28 na tych limfocytach pomiędzy analizowanymi grupami pacjentek (wykres 22 A).



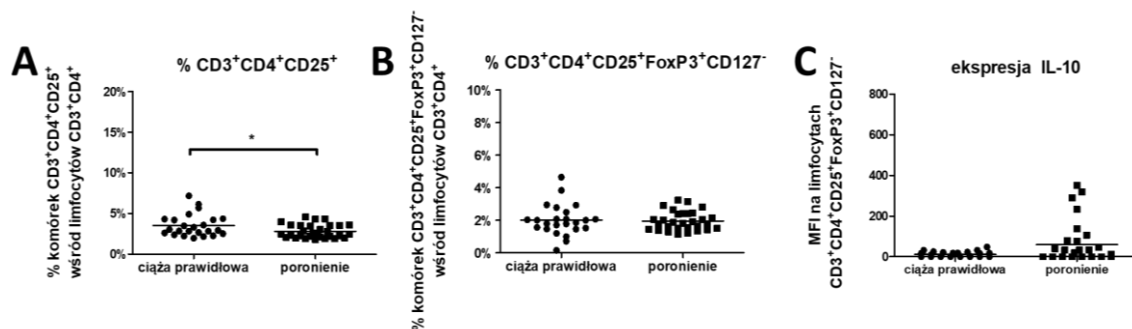
Wykres 22. Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welcha) lub testu u Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.2.7 Frekwencja aktywowanych limfocytów T ($CD3^+CD4^+CD25^+$) oraz Treg ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^-$) w krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej

Limfocyty T krwi obwodowej pacjentek po poronieniu charakteryzowały się niższą frekwencją aktywowanych limfocytów T ($P < 0,05$) niż pacjentki w ciąży prawidłowej (wykres 23 A). Natomiast procent limfocytów Treg wśród limfocytów $CD3^+CD4^+$ krwi obwodowej nie różnił się pomiędzy badanymi grupami kobiet (wykres 23 B). Również ekspresja IL-10 przez limfocyty Treg była na podobnym poziomie pomiędzy pacjentkami po poronieniu, a pacjentkami w ciąży prawidłowej (wykres 23 C).



Wykres 23. Frekwencja aktywowanych limfocytów T ($CD3^+CD4^+CD25^+$) oraz Treg ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^-$).

Wykresy przedstawiają wyniki dla poszczególnych pacjentek wraz z średnią dla badanej grupy. Porównując wyniki pomiędzy grupami użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych (gdy wariancje w grupach nie były homogenne z poprawką Welcha) lub testu u Manna-Whitneya, gdy dane nie pochodziły z rozkładu normalnego.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

5 DYSKUSJA

Medycyna jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki. Niewątpliwie ogromny postęp dokonał się również w obszarze badań nad rozrodem. Nadal jednak jednym z podstawowym wyzwań współczesnej medycyny pozostaje problem niepłodności, którą definiujemy jako niemożność uzyskania klinicznej ciąży po co najmniej 12 miesiącach regularnego współżycia bez zastosowania środków zabezpieczających²⁷². Szacuje się, że problem ten dotyczy około 15% par, z czego u około 30% nie można zdefiniować wyraźnej przyczyny niepłodności^{273,274}. Kolejnym problemem są poronienia, które ogólnie definiowane są jako samoistne wewnątrzmaciczne utraty ciąży w okresie poprzedzającym uzyskanie przez płód zdolności do samodzielnego przeżycia. Precyzyjniej, Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) terminem poronienie określa wydalenie lub ekstrakcję płodu ważącego mniej niż 500 g, co odpowiada około 22 tygodniowi ciąży²⁷². Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu (ang. American Society for Reproductive Medicine, ASRM) za poronienie uznaje natomiast kliniczną utratę ciąży przed 20 tygodniem jej trwania²⁷⁵, a z kolei zgodnie z Europejskim Towarzystwem Rozrodu Człowieka i Embriologii (ang. European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) poronienie to utrata ciąży do 24 tygodnia jej trwania²⁷⁶. Szacuje się, że problem poronień dotyczy od 10% do 15% wszystkich rozpoznanych ciąży. Część par starających się o potomstwo doświadcza również nawracających strat ciąży (ang. recurrent pregnancy loss, RPL). W zależności od definicji (zgodnie z ESHRE i ASRM utrata dwóch lub więcej ciąży; historycznie utrata trzech lub więcej ciąży) problem ten dotyczy 0,8%-3% kobiet²⁷⁷⁻²⁸⁰. Z kolei 10%-15% par decydujących się na zapłodnienie pozaustrojowe zmagają się z powtarzającymi się niepowodzeniami implantacji (ang. recurrent implantation failure, RIF), definiowanymi jako brak ciąży po przynajmniej trzech transferach dobrej jakości zarodków u kobiet poniżej 40 roku życia²⁸¹⁻²⁸³.

Niepłodność, poronienia, nawracające straty ciąży, a także powtarzające się niepowodzenia implantacji mogą być powiązane z nieprawidłowym działaniem układu odpornościowego. Reakcje odpornościowe przebiegające lokalnie, ale również ogólnoustrojowo decydują o powodzeniu ciąży na każdym jej etapie – od momentu zapłodnienia i implantacji, aż do porodu²⁸⁴. Zapłodnienie oraz implantacja charakteryzują się lokalnymi reakcjami zapalnymi związanymi z odpowiednio

obecnością nasienia w macicy i zagnieżdżeniem się blastocysty w endometrium^{4,8}. Podobnie, po okresie wyciszenia procesów zapalnych w drugim trymestrze ciąży, zbliżający się poród związany jest z kaskadą nasilających się reakcji zapalnych prowadzących do wydalenia płodu i łożyska²⁸⁵. Prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego na każdym etapie ciąży pozwala na zachowanie odpowiedniej równowagi pomiędzy reakcjami pro- i przeciwzapalnymi.

Krytycznym momentem z punktu widzenia przebiegu całej ciąży jest okres przedimplantacyjny^{254,286,287}. W okresie tym, w wyniku reakcji zapalnych powiązanych, m.in. z obecnością nasienia w macicy, indukowane są Treg specyficzne względem antygenów ojcowskich²⁸⁸. Występujące w tym czasie zaburzenia w odpowiedzi odpornościowej względem aloantygenów wpływają na liczebność oraz aktywność supresyjną Treg^{249,289,290}. Wykazano, że w momencie implantacji obecność zarówno Treg specyficznych względem aloantygenów, jak i zrekrutowanych Treg pochodzenia grasicznego (thymus-derived Treg, tTreg), niezbędna jest do odpowiedniej inwazji trofoblastów i przebudowy naczyń macicznych²¹. Udowodniono, że brak kontroli stanu zapalnego przez Treg podczas implantacji jest jedną z przyczyn zaburzeń płodności powiązanych z wczesną ciążą (np. RIF czy spontaniczne poronienia), ale także powikłań położniczych związanych z późniejszym okresem ciąży w tym stanem przedrzucawkowym czy zahamowaniem wzrostu płodu^{291–294}.

Mysi model ciąży zagrożonej poronieniem (krzyżówka ♀CBA/J x ♂DBA/2J), który charakteryzuje się wysokim wskaźnikiem samoistnej resorpcji płodów, podkreśla krytyczne znaczenie Treg w procesie implantacji. U ciężarnych samic w tym modelu w okresie przed- i okołimplantacyjnym obserwuje się niższą frekwencję limfocytów Treg, a wyższą limfocytów Th1²⁵⁰, co jest skutkiem niekorzystnej odpowiedzi immunologicznej układu odpornościowego samicy względem aloantygenów obecnych w płazmie nasienia samca DBA/2J^{249,256}. Adoptywny transfer Treg, pochodzących od ciężarnych samic CBA/J po kryciu samcem BALB/c, prowadzi do zmniejszenia liczby zresorbowanych płodów, ale tylko wtedy, gdy dokonywany jest przed implantacją zarodka²⁴⁹. Odkrycia te potwierdzają, że Treg odgrywają zasadniczą rolę w macicy, szczególnie w okresie okołimplantacyjnym, gdzie ich obecność wymagana jest do kontrolowania stanu zapalnego, co umożliwia prawidłowej implantację, a następnie rozwój zarodka i płodu.

Osiągnięcie stanu tolerancji uwarunkowane jest w głównej mierze zdolnością komórek APC do prezentacji aloantygenów limfocytom T. Wykazano, że rozwój

specyficznych względem ojcowskich antygenów Treg indukowany jest głównie przez niedojrzałe maciczne DC, tj. charakteryzujące się obniżoną ekspresją cząsteczek kostymulacyjnych oraz MHC klasy II²⁹⁵. Wydaje się, że zarówno utrzymywanie niedojrzałego statusu DC, jak i równowagi pomiędzy konwencjonalnymi DC oraz plazmocytoidalnymi DC, wykazującymi większe zdolności do indukcji Treg, może mieć zasadnicze znaczenie w regulacji wielkości populacji Treg w ciąży. Tolerogeny fenotyp możliwy jest do osiągnięcia m.in. dzięki ekspozycji DC na płyn nasienny^{295,296} w trakcie zapłodnienia jak i dzięki endokrynnemu działaniu hormonów^{297,298}.

Wpływ stopnia dojrzałości APC na powodzenie ciąży potwierdzono również w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem, wykazując, że DC samic CBA/J po kryciu DBA/2J wykazują bardziej dojrzały fenotyp nie samice CBA/J w ciąży prawidłowej²⁹⁹. Ponadto wykazano, że dootrzewnowa podaż przeciwciał blokujących CD80/CD86 lub tylko CD86 podczas implantacji prowadziło do spadku liczby resorbowanych płodów. Zahamowanie sygnalizacji CD80/CD86 wpłynęło prawdopodobnie na przywrócenie zaburzonej immunotolerancji, gdyż zastosowanie przeciwciał blokujących skutkowało wzrostem frekwencji limfocytów T CD4⁺CD25⁺, z których większość posiadała wewnątrzkomórkową ekspresję CTLA-4. Obserwowano również przesuniecie równowagi cytokinowej Th1/Th2 w kierunku Th2^{300,301}.

Kwestia prawidłowego fenotypu kostymulacyjnego APC we wczesnej ciąży nie wydaje się być jednak oczywista. Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały, że zablokowanie w 3,5 dniu ciąży alogenicznej sygnalizacji za pośrednictwem CD86 (przeciwciała blokujące) oraz zwiększanie aktywności CD40 (przeciwciała aktywujące) wiąże się z istotnie niższym występowaniem ciąż obserwowanych w 10,5 dniu po efektywnym pokryciu. W tym samym układzie doświadczalnym blokowanie sygnalizacji za pośrednictwem CD80 oraz CD40 nie miało znaczenia w powodzeniu ciąży.

Uwaga badaczy w kontekście prezentacji antygenów oraz indukcji tolerancji w ciąży skupiona była głównie w kontekście DC, rzadziej makrofagów i ich oddziaływań z limfocytami T. Limfocyty B ze względu na zdolność do prezentacji antygenów, a zarazem hamowanie aktywności limfocytów efektorowych jako Breg, mogą uczestniczyć we wczesnym ustaleniu immunotolerancji w ciąży. W mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem wykazano zdolność Breg do ograniczania nadmiernej reakcji komórek efektorowych względem aloantygenów. Adoptywny transfer Breg w okresie przedimplantacyjnym odwrócił poronny fenotyp samic CBA/J krytych

samcem DBA/2J¹⁵. Ponadto wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały, że u samic w ciąży prawidłowej obserwuje się wyższy odsetek limfocytów Breg z ekspresją IL-35 niż w ciąży zagrożonej poronieniem¹¹. Rola limfocytów B jako APC w ciąży, w tym wczesnej ciąży, jest natomiast słabiej poznana. Nie mniej jednak wykazano, że u samic myszy w ciąży alogenicznej limfocyty B w macicy i w węzłach chłonnych w okresie okołomplantacyjnym (5,5 dzień ciąży) wykazują wyższą ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych CD80 i CD86 niż w fazie estrus. Zmiana fenotypu kostymulacyjnego tych komórek może więc świadczyć o ich zaangażowaniu w odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem limfocytów T¹². Z drugiej strony Muzzio i wsp. wykazali, że odsetek limfocytów B CD19⁺CD23⁻CD5⁺CD86⁺ B-1a w otrzewnej u myszy w ciąży zagrożonej poronieniem w 14 dniu ciąży był istotnie wyższy niż u samic w prawidłowej ciąży lub u samic niebędących w ciąży. Co może wskazywać na również na ich udział w patogenezę poronień w tym modelu, szczególnie że autorzy wykazali, że komórki te powodują różnicowanie dziewiczych limfocytów T w komórki Th17 i Th1⁷⁵.

Wśród cząsteczek regulujących prezentację antygenów przez APC można wymienić receptory TLR. Większość badań wskazuje, że aktywacja TLR9, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* prowadzi do wzrostu potencjału kostymulacyjnego przez APC, takich jak DC czy makrofagi^{302,303}. Podobny efekt obserwuje się w przypadku limfocytów B. Uznaje się, że sygnały odbierane za pośrednictwem tego receptora wzmacniają prezentację antygenów oraz powodują wzrost wydzielania cytokin prozapalnych (np. IL-6, TNF- α)^{111,304} przez limfocyty B, a także wpływają na ich różnicowanie^{213,305,306}. Z drugiej strony aktywacja limfocytów B ligandami TLR9 jest również powszechnie stosowana w doświadczeniach *in vitro* w celu indukcji ekspresji IL-10^{131,213,307}. TLR9 regulują więc zarówno funkcję limfocytów B jako komórek prezentujących antygeny jak i komórek o właściwościach supresorowych, co jest silną przesłanką do uznania TLR9 jako jednego z czynników biorących udział w procesie kształtowania się wczesnej alotolerancji w ciąży. Ponadto wcześniejsze nasze badania wykazały, że śledzionowe limfocyty B samic w ciąży zagrożonej poronieniem w okresie przedimplantacyjnym (3 dzień ciąży) cechuje wyższa ekspresja mRNA, ale niższa białka dla TLR9 w porównaniu z prawidłową ciążą. Różnice w ekspresji wspomnianych cząsteczek na poziomie mRNA i białka mogą wskazywać na zmiany jakie mogą zachodzić we wczesnym okresie ciąży w limfocytach B oraz sugerować o zaangażowaniu TLR9 w indukcję poronnego fenotypu²⁴⁴.

Dlatego też w celu sprawdzenia wpływu TLR9 na ustalenie tolerancji immunologicznej we wczesnej ciąży w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem, samicom CBA/J po zapłodnieniu samcem DBA/2J podano antagonistę receptora TLR9 – ODN 2088.

Przeprowadzone badania wskazują iż, zahamowanie sygnalizacji TLR9 krótko po pokryciu prowadzi do wzrostu liczby zresorbowanych płodów. Można więc sądzić, iż w okresie przedimplantacyjnym aktywacja TLR9 jest niezbędna do indukcji mechanizmów immunologicznych chroniących przed poronieniem. Sun i wsp. wykazali, że dootrzewnowa podaż samicom ODN 2088 w 6,5 lub 14 dniu alogenicznej ciąży (♀BALB/c x ♂C57BL/6) nie prowadziła do komplikacji w ciąży tj. resorpcji zarodków i przedwczesnego porodu³⁰⁸. Na podstawie tych badań oraz doświadczenia przeprowadzonego w pracy doktorskiej, można wnioskować, iż jedynie w okresie przedimplantacyjnym, sygnalizacja TLR9 jest niezbędna do prawidłowego rozwoju ciąży. Nie wydaje się to zaskakujące z uwagi na fakt, iż okres poprzedzający implantację, w tym zapłodnienie, powiązane są z lokalnymi reakcjami zapalnymi. Wyniki tego doświadczenia potwierdzają koncepcje Gil Mor i wsp., że zarówno silne środowisko prozapalne przewyższające możliwości lokalnej kontroli jak i brak stymulacji zapalnej lub zbyt silnie działające czynniki przeciwzapalne mogą być przyczyną niepowodzeń implantacji³⁰⁹. Z drugiej strony wykorzystany model badawczy, tj. mysy model ciąży zagrożonej poronieniem, charakteryzuje się nietypową odpowiedzią immunologiczną względem aloantygenów ojca obecnych w nasieniu. Dlatego też, aby potwierdzić przypuszczenia o korzystnej, z punktu widzenia prawidłowego rozwoju ciąży, roli TLR9 w okresie przedimplantacyjnym, analogiczne badania należałoby przeprowadzić u samic w prawidłowej ciąży.

Okres przedimplantacyjny, tak jak już wspomniano, powiązany jest z kontrolowanym stanem zapalnym, dlatego też manipulacje, które mają na celu jego ograniczanie mogą utrudniać implantację zarodków. Dlatego też, oprócz wpływu zahamowania sygnalizacji TLR9 tuż po zapłodnieniu na resorpcję płodów, sprawdzono czy pomiędzy grupą kontrolną, a badaną występują różnice w liczbie implantowanych zarodków. Wykazano, że prawdopodobnie podaż ODN 2088 oraz powiązane z tym zmiany w komórkach układu odpornościowego (obserwowane w naszym przypadku w limfocytach B i T) nie wpływają na liczbę implantowanych zarodków, ponieważ była ona na podobnym poziomie pomiędzy badanymi grupami samic. Możliwe, iż zahamowanie sygnalizacji TLR9 po zapłodnieniu, wynikające z podaży agonisty tego

receptora, przy braku dodatkowych czynników wpływających negatywnie na implantację, może być rekompensowane przez inne mechanizmy lub rola tego receptora może nie być na tyle istotna w implantacji, by był on czynnikiem warunkującym powodzenie tego procesu w badanym mysim modelu ciąży. Należałoby mieć jednak mieć na uwadze, że u kobiet powikłania ciąży, które występują w połowie i późnym okresie ciąży, takie jak zahamowanie wzrostu płodu czy stan przedrzucawkowy, mogą mieć swój początek już we wczesnej ciąży, w tym w okresie implantacji zarodka. Przyczyną tych powikłań ciąży może m.in. zmniejszona inwazja trofoblastu czy też zaburzona przebudowa tętnic maciczo-łożyskowych, które w następstwie mogą prowadzić do niedostatecznego ukrwienia łożysk. Nieprawidłowości te mogą być powiązane z aktywnością układu odpornościowego, w tym Treg^{310,311}. Dlatego też, sam fakt podobnej liczby miejsc implantacyjnych w 14 dniu ciąży pomiędzy samicami, które otrzymały ODN 2088, a samicami kontrolnymi nie musi świadczyć o prawidłowej implantacji zarodków po podaży inhibitora TLR9. Wyjaśnienie tej kwestii wymagałoby jednak dodatkowych badań.

Jak do tej pory nie przeprowadzono badań, których celem byłoby sprawdzenie roli TLR9 w procesie implantacji i wczesnej ciąży u myszy jak i u kobiet. Na podstawie wyższej ekspresji *Tlr9* w endometrium zdrowych kobiet w fazie lutealnej cyklu można jedynie wnioskować o jego korzystnym wpływie na receptywność endometrium¹⁸¹. Z drugiej strony zbyt wysoka ekspresja *TLR9*, którą obserwuje się w endometrium kobiet z RIF w okresie tzw. okna implantacyjnego, może świadczyć o jego udziale w nadmiernej odpowiedzi zapalnej zaburzającej implantację²⁴². Wynika z tego, iż jedynie optymalne pobudzenie TLR9 w okresie okołointplantacyjnym może być czynnikiem wspierającym prawidłową implantację.

Celem doświadczenia było również sprawdzenie wpływu zahamowania sygnalizacji TLR9 na zmianę fenotypu kostymulacyjnego limfocytów B, mogącego sprzyjać ustaleniu tolerancji. Uzyskane wyniki wskazują, że ograniczenie aktywności TLR9 tuż po zapłodnieniu modyfikuje ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych (CD80 oraz CD86) w ogólnej populacji limfocytów B węzłów chłonnych w 3 i 14 dniu ciąży oraz prowadzi do zmiany w frekwencji śledzionowych limfocytów B z ekspresją CD80 w 14 dniu ciąży (tabela 11). W przypadku limfocytów B macicy i doczesnej nie odnotowano różnic w fenotypie kostymulacyjnym jak i w frekwencji limfocytów B z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych i MHC klasy II, pomiędzy samicami, które otrzymały ODN 2088, a samicami którym podano PBS (tabela 12).

Spadek ekspresji CD80 jak i wzrost ekspresji CD86 w przedimplantacyjnym dniu ciąży dotyczył limfocytów B paraaortalnych węzłów chłonnych drenujących macicę. Z kolei w 14 dniu ciąży niższa ekspresja CD80 obserwowana był w przypadku węzłów chłonnych, a niższa frekwencja CD19⁺CD80⁺ wśród limfocytów B śledziona. Wyniki te wskazują, że zahamowanie sygnałów pochodzących od TLR9 może wywierać długotrwały, obserwowany w 14 dniu ciąży, wpływ na fenotyp limfocytów kostymulacyjny B oraz frekwencję limfocytów B, zarówno w lokalnej (węzły chłonne drenujące macicę) jak i w systemowej odpowiedzi odpornościowej (śledziona). Długofalowy skutek wpływu zahamowania sygnalizacji TLR9 widoczny jest również widoczny w przypadku ekspresji TLR9 przez limfocyty B jak i frekwencji limfocytów CD19⁺TLR9⁺. U samic 14 dniu ciąży, po podaży ODN 2088, odnotowano niższą ekspresję tego receptora, jak i obniżoną frekwencję limfocyt B TLR9⁺ zarówno w śledzionie, węzłach chłonnych drenujących macicę jak i doczesnej. Co ciekawe zmian tych nie zaobserwowano w przypadku 3 dnia ciąży pomiędzy samicami które otrzymały antagonistę TLR9, a grupą kontrolną. Wy tłumaczeniem tego zjawisko może być fakt, że ekspresja receptorów TLR podlega ścisłej kontroli zarówno na poziomie transkrypcji jak i poprzez kompartmentację tych receptorów w komórkach³¹². Ten ścisły nadzór jest niezbędny w przeciwdziałaniu niebezpiecznej dla życia aktywacji receptorów TLR prowadzącej do niekontrolowanego wyrzutu cytokin i konsekwencji z tym związanych. Skutkiem wiązania dsDNA wirusów z TLR9 jest przejściowe 24-godzinne obniżenie ekspresji zależne od aktywności kompleksu NF-κB (p50/p65)³¹³. Jednakże niektóre wirusy, w tym wirus HPV, powodują nieodwracalne obniżenie ekspresji tego białka poprzez hamowanie tworzenia kompleksu p50/p65 unikając w ten sposób odpowiedzi odpornościowej³¹⁴. ODN 2088 przeciwdziała wiązaniu naturalnych i sztucznych ligandów TLR9. Jego hamujące działanie na proliferację i żywotność limfocytów B jest widoczne nawet do kilkunastu godzin po inicjacji aktywacji przez swoiste ligandy²⁰⁵. Jednak pomimo stosunkowo szybkich zmian w ekspresji TLR9 obserwowanych w warunkach *in vitro* ekspresja tego receptora na poziomie ogólnoustrojowym może być odmienna. Jak do tej pory nie przeprowadzono badań farmakodynamiki tego związku. Możemy jedynie przypuszczać, że mechanizm hamowania przez niego ekspresji TLR9 może być podobny do wywoływanego przez niektóre ligandy pochodzenia wirusowego. Dlatego też zmiany w ekspresji TLR9 po podaży ODN 2088 w naszych badaniach były widoczne jedynie w 14 dniu ciąży.

		limfocyty CD19 ⁺									
		CD80		CD86		CD40		MHC II		TLR9	
		MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
3 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	węzły chłonne	↓*	-	↑*	-	-	-	-	-	-	-
	śledziona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 dzień ciąży 100 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	śledziona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	śledziona	-	↓*	-	-	-	-	-	-	-	-
14 dzień ciąży 100 µg ODN 2088	węzły chłonne	↓*	-	-	-	-	-	-	-	↓*	↓*
	śledziona	-	↓*	-	-	-	-	-	-	↓***	↓***

Tabela 11. Podsumowanie zmian w ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 na limfocytach B oraz frekwencji limfocytów B z ich ekspresją w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.

↓- spadek w stosunku do grupy kontrolnej, ↑- wzrost w stosunku do grupy kontrolnej, "-" - brak zmian w stosunku do grupy kontrolnej; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

		limfocyty CD19 ⁺									
		CD80		CD86		CD40		MHC II		TLR9	
		MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
3 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	macica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 dzień ciąży 100 µg ODN 2088		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	doczesna	-	-	-	-	-	-	-	-	↓*	-
14 dzień ciąży 100 µg ODN 2088		-	-	-	-	-	-	-	-	↓****	↓*

Tabela 12. Podsumowanie zmian w ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 na limfocytach B oraz frekwencji limfocytów B z ich ekspresją w macicy (3 dzień ciąży) oraz w doczesnej (14 dzień ciąży) po podaży dootrzewnowej ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.

↓- spadek w stosunku do grupy kontrolnej, ↑- wzrost w stosunku do grupy kontrolnej, "-" - brak zmian w stosunku do grupy kontrolnej; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Odziaływanie pomiędzy APC, a limfocytami T opiera się na wzajemnym przekazywaniu sygnałów, dlatego oprócz ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach B, sprawdzono również ekspresję ich receptorów na limfocytach T. W 3 dniu ciąży obserwowano jedynie zmiany w ekspresji CD40L. Zarówno w węzłach chłonnych jak i śledzionie w tym okresie ciąży ekspresja tego receptora była istotnie niższa po podaży antagonisty TLR9. W 14 dniu ciąży w śledzionie zaobserwowano również niższą ekspresję CD28 na limfocytach T oraz niższą frekwencję limfocytów CD3⁺CD4⁺CD28⁺ (tabela 13).

		limfocyty CD3 ⁺ CD4 ⁺					
		CD28		CTLA-4		CD40L	
		MFI	%	MFI	%	MFI	%
3 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-	-	↓*	-
	śledziona	-	-	-	-	↓*	-
3 dzień ciąży 100 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-	-	↓*	-
	śledziona	-	-	-	-	-	-
14 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-	-	-	-
	śledziona	↓*	↓*	-	-	-	-
14 dzień ciąży 100 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-	-	-	-
	śledziona	-	-	-	-	-	-

Tabela 13. Podsumowanie zmian w ekspresji receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T oraz frekwencji limfocytów T z ich ekspresją w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.

↓- spadek w stosunku do grupy kontrolnej, ↑- wzrost w stosunku do grupy kontrolnej, ”-” - brak zmian w stosunku do grupy kontrolnej; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

		limfocyty CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	limfocyty Treg: CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	
		% wśród CD3 ⁺ CD4 ⁺	% wśród CD3 ⁺ CD4 ⁺	ekspresja IL-10
3 dzień ciąży	węzły chłonne	-	-	-
50 µg ODN 2088	śledziona	-	↓**	-
3 dzień ciąży	węzły chłonne	-	-	-
100 µg ODN 2088	śledziona	-	-	-
14 dzień ciąży	węzły chłonne	↓*	↓**	-
50 µg ODN 2088	śledziona	↓*	-	-
14 dzień ciąży	węzły chłonne	-	-	-
100 µg ODN 2088	śledziona	-	-	-

Tabela 14. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów CD3⁺CD4⁺CD25⁺, Treg oraz Treg z ekspresją IL-10 w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.

↓ - spadek w stosunku do grupy kontrolnej, ↑ - wzrost w stosunku do grupy kontrolnej, "-" - brak zmian w stosunku do grupy kontrolnej

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Sygnały przekazywane pomiędzy limfocytami B i limfocytami T są dobrze poznane w kontekście interakcji CD40-CD40L. CD40 obecny jest na APC, w tym limfocytach B³¹⁵. CD40L z kolei znajduje się na aktywowanych limfocytach T, a jego ekspresja wzrasta po stymulacji TCR³¹⁶. Aktywacja CD40 na limfocytach B jest kluczowa do rozwinięcia się swoistej aktywacji tych komórek, rozwinięcia odpowiedzi humoralnej oraz wytworzenia limfocytów B pamięci. U ludzi i myszy, zarówno CD80 jak i CD86 ulegają zwiększonej ekspresji po aktywacji CD40, czyniąc limfocyty B bardziej wydajnymi APC³¹⁷. Z drugiej strony, związanie CD28 limfocytów T przez CD80/CD86 zwiększa ekspresję CD40L, wskazując w ten sposób na obecność dodatniej pętli aktywacji obejmującej CD40 limfocytu B i CD28 limfocytu T^{318,319}.

Obserwowana w przeprowadzonym badaniu niższa ekspresja CD40L na limfocytach T w 3 dniu ciąży po podaży antagonisty TLR9 może świadczyć o słabszej aktywacji tych komórek w tym okresie ciąży. Konsekwencją tego może być niższa niż w grupie kontrolnej frekwencja aktywowanych limfocytów T (CD3⁺CD4⁺CD25⁺), którą obserwuje się w 14 dniu ciąży w śledzionie oraz węzłach chłonnych. Ponadto w 14 dniu

cięży odnotowano niższą ekspresję CD28 oraz niższą frekwencję limfocytów CD3⁺CD4⁺CD28⁺, co dodatkowo może być przyczyną niższej frekwencji aktywowanych limfocytów T w 14 dniu ciąży w grupie samic po podaży ODN 2088. Tak jak wspomniano, słabszy sygnał CD40-CD40L skutkuje niższą ekspresją CD80/CD86 na APC. Dlatego też wykazana obniżona ekspresja CD80 na limfocytach B jak i frekwencja CD19⁺CD80⁺ w porównaniu do grupy kontrolnej, może być zarówno następstwem bezpośredniego wpływu podaży inhibitora TLR9 na limfocyty B, jak i efektem interakcji pomiędzy limfocytym B oraz limfocytym T. Obie badane populacje limfocytów mogą więc na skutek obustronnych oddziaływań prowadzić do wzajemnej słabszej aktywacji, która obserwowana jest u samic po podaży ODN 2088.

W przypadku limfocytów B nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w ekspresji MHC klasy II oraz CD40 w badanych dniach ciąży, co może wskazywać na wybiórczą regulację cząsteczek kostymulacyjnych przez ODN2088. Dlatego zasadniczym pytaniem jest, czy komórki te mogły poprzez oddziaływanie wpłynąć na zmiany aktywacji dziewiczych limfocytów T? W związku z tym, że limfocyty B są słabszymi APC w aktywacji dziewiczych limfocytów T, a ODN 2088 podawany był systemowo, można się spodziewać, że DC lub makrofagi mogły przyczynić się do słabszej aktywacji limfocytów T. Z drugiej jednak strony, zmiany ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych są dynamiczne, i tak jak wspomniano, ich wzajemne oddziaływania są skomplikowane i mają złożonych charakter. Dodatkowo wspomagane są ekspresją wielu różnych cytokin, które nie były przedmiotem badań. Dlatego obraz wpływu ODN 2088 na wzajemne oddziaływania międzykomórkowe jest niepełny.

Z punktu widzenia regulacji aktywności Treg, krytyczna jest równowaga pomiędzy wiązaniem CD80/CD86 przez CD28 oraz CTLA-4. CTLA-4 ulega konstytutywnej ekspresji w Treg i uważana jest za kluczową cząsteczkę wspomagającą immunosupresję. Wiążąc się z CD80/CD86 ogranicza ich dostępność dla aktywującego ligandu CD28, hamując jednocześnie ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych na APC³²⁰. Jednakże to sygnalizacja pomiędzy CD28 oraz głównie CD86 jest niezbędna do przeżycia, proliferacji oraz aktywacji Treg³²¹. U samic po podaży ODN 2088 odnotowano spadek frekwencji Treg zarówno w 3 jak i 14 dniu ciąży. Ekspresja IL-10 przez Treg była jednak na podobnym poziomie pomiędzy badanymi grupami samic (tabela 14). Można przypuszczać, że obserwowany wynik w grupie samic po podaży ODN 2088 może również być konsekwencją niedostatecznego pobudzenia Treg, co w konsekwencji może prowadzić do słabszej proliferacji tych komórek. Teorię tę może

potwierdzać obserwowana niższa ekspresja CD28 w limfocytach T w 14 dniu ciąży u samic po podaży inhibitora TLR9. Z drugiej jednak strony, limfocyty B w 3 dniu ciąży charakteryzują się wyższą ekspresją CD86, co mogłoby wskazywać na zdolność do silniejszej interakcji z CD28 i w konsekwencji do silniejszego pobudzenia limfocytów T oraz Treg.

Oprócz Treg innymi ważnymi komórkami o właściwościach supresorowych są Breg. Jak wspomniano we wstępie pracy, aktywacja limfocyty B w kierunku Breg zależy od wielu różnych czynników m.in. sygnalizacji za pośrednictwem BCR, interakcji CD40-CD40L, a także aktywacji TLR, w tym TLR9³²². Dlatego też, podaż inhibitora TLR9 mogła wpłynąć bezpośrednio na frekwencję oraz aktywność tej grupy komórek. Ponadto obserwowana niższa ekspresja CD40L na limfocytach T po podaży ODN 2088, mogła również przyczynić się do słabszej interakcji pomiędzy limfocytami T, a B i w konsekwencji ograniczyć indukcję Breg.

W modelu ciąży zagrożonej poronieniem wykazano, że Breg o fenotypie CD19⁺CD5⁺CD1d^{high}, mogą uczestniczyć w regulacji tolerancji immunologicznej^{11,15}. Dlatego też w przeprowadzonym doświadczeniu postanowiono wybrać tę populację limfocytów B w celu sprawdzenia wpływu zahamowania TLR9 na frekwencję Breg. Badania (tabela 15) wykazały, że frekwencja limfocytów Breg o fenotypie CD19⁺CD5⁺CD1d^{high}, zarówno w 3 jak i w 14 dniu ciąży w śledzionie i węzłach chłonnych, nie uległa zmianie po podaży antagonisty TLR9. Breg charakteryzują się ekspresją IL-10, jednak komórki te mogą jednocześnie wydzielać cytokiny prozapalne, również po stymulacji TLR9, co może zasadniczo wykluczać lub ograniczać ich funkcję supresorową^{111,323}. Zbadano więc zarówno ekspresję IL-10 jak i IL-6 w limfocytach Breg. Wykazano jednak brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji tych cytokin pomiędzy analizowanymi grupami samic. Wyniki te wskazują na prawdopodobny brak bezpośredniego jak i pośredniego wpływu zahamowania sygnalizacji TLR9 tuż po zapłodnieniu na frekwencję Breg oraz ekspresję przez nie badanych cytokin, w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem.

		limfocyty CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high} (Breg)		
		% wśród CD19 ⁺	ekspresja IL-10	ekspresja IL-6
3 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-
	śledziona	-	-	-
3 dzień ciąży 100 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-
	śledziona	-	-	-
14 dzień ciąży 50 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-
	śledziona	-	-	-
14 dzień ciąży 100 µg ODN 2088	węzły chłonne	-	-	-
	śledziona	-	-	-

Tabela 15. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów Breg oraz ekspresji IL-10 oraz IL-6 przez Breg w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.

↓ - spadek w stosunku do grupy kontrolnej, ↑ - wzrost w stosunku do grupy kontrolnej, "-" - brak zmian w stosunku do grupy kontrolnej; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Jak do tej niewiele prac wskazywało na pozytywną rolę aktywacji receptorów TLR na powodzenie ciąży. Jednak badania przeprowadzone przez Chan i wsp. wykazały, że u myszy receptor TLR4 komórek nabłonka macicy jest istotnym mediatorem miejscowej reakcji zapalnej w okresie przedimplantacyjnym, która indukuje wytwarzanie komórek Treg. Ciężarne samice myszy pozbawione genu *Tlr4* charakteryzowały się zwiększoną liczbą resorbowanych zarodków, a także wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu, które po części mogło być również skutkiem niedostatecznego wykształcenia się łożyska na wczesnych etapach ciąży. Samice *TLR4*^{-/-} jak i myszy kontrolne wykazywały jednak podobną liczbę implantowanych zarodków³²⁴. Wyniki uzyskane w przeprowadzonym przez nas doświadczeniu, mogą wskazywać że TLR9 może pełnić podobną rolę w ciąży do TLR4. Badania przeprowadzone przez nasz zespół jak i przez Chan i wsp. wskazują na podobny wynik ciąży w przypadku ograniczenia sygnalizacji rozpatrywanych receptorów TLR, ponieważ zarówno ograniczenie aktywności TLR9, jak i TLR4 nie wpływało na liczbie implantowanych zarodków, natomiast obserwowano wyższy procent resorpcji płodów, w porównaniu do kontrolnych samic. Nasze wyniki również

wskazywały na niższą frekwencję Treg po zahamowaniu sygnalizacji TLR9, podobnie jak praca Chan i wsp.

W badaniach z udziałem myszy *TLR4*^{-/-} nie zidentyfikowano jakie dokładnie ligandy odpowiedzialne są za pobudzenie TLR4, jednak autorzy skłaniali się ku teorii, że obecne w nasieniu alarminy, takie jak β -defensyny oraz fragmenty hialuronianu, mogą aktywować ten receptor^{324,325}. W przypadku TLR9 również możemy jedynie spekulować o potencjalnych ligandach, mogących odgrywać rolę w pobudzaniu tego receptora w przedimplantacyjnym okresie ciąży. Mogą być one zarówno pochodzenia matczynego jak i ich źródłem może być plazma nasienia. Wśród czynników wpływających na aktywację receptorów TLR9 możemy rozpatrywać m.in. DNA bakterii pochodzących z mikroflory zasiedlającej endometrium macicy. Obecnie coraz częściej wskazuje się na udział mikrobiomu macicy w receptywności endometrium³²⁶ oraz w kształtowaniu sprzyjającego środowiska immunologicznego³²⁷. Mikroorganizmy poprzez aktywację TLR mogą również pływać na prezentację antygenów przez APC³²⁶. Innym źródłem ligandów dla TLR9 może być plazma nasienia. Udowodniono, że gruczoły dodatkowe uwalniają spore ilości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających m.in. białka, DNA, RNA i lipidy, które mają zdolność regulowania odpowiedzi immunologicznej endometrium oraz jak wykazano w badaniach *in vitro*, mogą również modulować funkcję APC³²⁸⁻³³⁰.

W drugiej części pracy doktorskiej postanowiono ocenić czy istnieje związek pomiędzy ekspresją receptora TLR9, a immunofenotypem i profilem kostymulacyjnym limfocytów B, a także frekwencją i fenotypem limfocytów Breg u kobiet w ciąży prawidłowej oraz po poronieniu.

Prowadzenie badań nad złożonymi procesami biologicznymi u ludzi m.in. takimi jak wczesna ciąża i jej niepowodzenia, jest o wiele bardziej skomplikowane niż w przypadku doświadczalnych modeli zwierzęcych. Wynika to zarówno z ograniczonego dostępu do materiału pobieranego *in situ*, szczególnie u zdrowych pacjentek, jak i innych przeszkód natury organizacyjnej i oczywistych przyczyn natury etycznej. Stosunkowo łatwo dostępnym, bezpiecznym w kontekście pozyskiwania, a także co istotne, nie budzącym etycznych kontrowersji, materiałem biologicznym, który można uzyskać zarówno od pacjentek po spontanicznym poronieniu jak i od kobiet w prawidłowej ciąży, jest krew obwodowa. W kontekście analizowanego problemu badawczego, nie jest to idealny materiał do analizy, ponieważ jak już wspomniano, reakcje immunologiczne decydujące o powodzeniu ciąży przebiegają

lokalnie w macicy oraz w lokalnych węzłach chłonnych. Nie mniej jednak, zmiany immunofenotypowe limfocytów krwi obwodowej mogą stanowić wgląd w zjawiska towarzyszące prawidłowej jak i patologicznej ciąży przede wszystkim ze względu na relokację komórek układu odpornościowego i ogólne zmiany adaptacyjne na poziomie ustrojowym, które towarzyszą ciąży.

Przeprowadzone dotychczas badania nad rolą TLR9 w ciąży u kobiet skupiały się głównie na aktywacji tych receptorów w późniejszych jej okresach. Aktywacja TLR9, podobnie jak pobudzenie pozostałych TLR, związana była z powikłaniami ciąży, w tym przedwczesnym porodem oraz stanem przedrzucawkowym^{226,233,236–239}. W przypadku wymienionych komplikacji zauważa się wyższe stężenie cffDNA w krążeniu matczynym, które aktywuje TLR9 i w konsekwencji doprowadzają do niekorzystnych odpowiedzi zapalnych^{200,230,262,331,332}. Miejsowe i ogólne procesy immunologiczne towarzyszące poronieniu mają również znamiona reakcji zapalnych^{333–335}, w której może uczestniczyć TLR9. W porównaniu do kobiet w prawidłowej ciąży, w osoczu kobiet po spontanicznym poronieniu niezależnie od tego czy uwarunkowane jest ono genetyczną wadą płodu czy innymi czynnikami, obserwuje się wyższe stężenia cffDNA jak i całkowitego wolnego DNA^{240,241}. Dlatego też, można przypuszczać, że u kobiet po spontanicznym poronieniu cffDNA jako alarmina może pobudzać TLR9 limfocytów B wpływając m.in. na ich aktywację w kierunku APC oraz Breg. Dane literaturowe wskazują, że PBMC wyizolowane od kobiet w prawidłowej ciąży jak i ludzka linia komórkowa limfocytów B (Namalwa), charakteryzująca się wysoką ekspresją TLR9, pod wpływem płodowego DNA może aktywować prozapalny czynnik transkrypcyjny NF-κB²⁰⁰.

Analiza ekspresji TLR9 na limfocytach B oraz wybranych subpopulacjach limfocytów B (przejściowe limfocyty B oraz limfocyty B pamięci) nie wskazały na oczekiwane różnice pomiędzy badanymi grupami kobiet. Można więc sądzić, iż obserwowane zmiany ekspresji HLA-DR jak i cząsteczek kostymulacyjnych nie są bezpośrednio powiązane z aktywnością TLR9 w tych komórkach. Brak różnic można tłumaczyć również przypuszczeniem, że limfocyty B charakteryzują się stałą wysoką ekspresją TLR9, a odpowiedź na zróżnicowane stężenie cffDNA nie jest regulowana na poziomie ekspresji tego receptora. Zdolność do rozpoznawania własnych kwasów nukleinowych przez TLR może być regulowana na wielu poziomach ze względu na konieczność zachowania aktywności w zwalczaniu infekcji i z drugiej strony groźby rozwoju chorób z autoagresji wskutek zbyt szerokiego i intensywnego rozpoznania

własnych antygenów wywodzących się z kwasów nukleinowych³¹². Niewątpliwie badania te należałoby również poszerzyć o sprawdzenie stężenia cffDNA w surowicy lub osoczu, aby wykazać czy rzeczywiście pomiędzy badanymi grupami kobiet obserwowano różnice w jego stężeniu.

U kobiet w prawidłowej ciąży, jak i po poronieniu sprawdzono frekwencję limfocytów B oraz dwóch wybranych subpopulacji limfocytów B (przejściowe limfocyty B i limfocyty B pamięci), a także zbadano ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych oraz HLA-DR na tych komórkach (tabela 16).

Jak dotąd badania subpopulacji limfocytów B w krwi kobiet w ciąży prowadzone były głównie w trzecim trymestrze oraz w powikłaniach ciąży powiązanych z tym okresem ciąży^{44,75,76,167}. Nieliczne prace wskazują, że na wczesnym etapie ciąży nie dochodzi do zmian zarówno w ogólnej frekwencji limfocytów B w krwi obwodowej, jak i w różnych subpopulacjach limfocytów B (limfocyty B przejściowe, pamięci bez przełączenia klas i po przełączaniu klas, limfocyty B1a)^{76,86}. Z kolei inne badania wykazują, że kobiety w pierwszym trymestrze ciąży charakteryzują się wyższym odsetkiem limfocytów B pamięci ($CD19^+CD24^{high}CD27^+$)^{42,43}. Z kolei spadek tej populacji komórek może być powiązany ze spontanicznym poronieniem⁴². W przeprowadzonych przez nas analizach nie zaobserwowaliśmy różnic pomiędzy kobietami w ciąży, a kobietami po poronieniu w odniesieniu do ogólnej frekwencji limfocytów B ($CD19^+$) w krwi obwodowej. W przeciwieństwie do wspomianej pracy⁴², nasze badania nie wskazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami kobiet w frekwencji limfocytów B o fenotypie $CD19^+CD24^{high}CD27^+$. U kobiet po poronieniu wykazano natomiast wyższą frekwencję przejściowych limfocytów B ($CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$).

Przejściowe limfocyty B są etapem pośrednim w rozwoju pomiędzy niedojrzałymi komórkami linii B szpiku kostnego, a w pełni dojrzałymi, dziewiczymi limfocytami B w krwi obwodowej i wtórnych tkankach limfatycznych³³⁶. Ich podwyższony poziom u kobiet po poronieniu może wskazywać więc na aktywację układu odpornościowego w odpowiedzi na toczący się stan zapalny i wzmożoną rekrutacją niedojrzałych/przejściowych limfocytów B do krwi. W badaniach przeprowadzonych przez Lima i wsp., kobiety po porodzie, w porównaniu do trzeciego trymestru ciąży oraz w porównaniu do kobiet nie będących w ciąży, również wykazywały w krwi obwodowej wyższą frekwencją limfocytów B o fenotypie $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$. Pośrednio wskazuje na udział tych komórek w przywracaniu homeostazy wywołanej

urazem tkanek macicy w trakcie porodu, a w przypadku naszych badań stanem zapalnym związanym z poronieniem. Innym wyjaśnieniem mogą być zmiany jakie zachodzą w dojrzewaniu limfocytów – u kobiet wzrost frekwencji przejściowych limfocytów B może świadczyć o wolniejszym tempie dojrzewania.

Oprócz wymienionych różnic w frekwencji przejściowych limfocytów B pomiędzy kobietami we wczesnej ciąży i po poronieniu, badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały, że limfocyty B w obu grupach kobiet wykazują również odmienny fenotyp kostymulacyjny (tabela 16).

	CD19 ⁺	CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high} (przejściowe limfocyty B)	CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺ (limfocyty B pamięci)
% wśród limfocytów	-	-	-
% wśród CD19 ⁺	nd.	↑***	-
ekspresja CD80 (MFI)	-	-	-
ekspresja CD86 (MFI)	↓***	↓***	↓**
ekspresja CD40 (MFI)	↑*	↑*	↑*
ekspresja HLA-DR (MFI)	-	↑***	-
ekspresja TLR9 (MFI)	-	-	-
ekspresja IL-10 (MFI)	↑***	↑*	↑***
ekspresja IL-6 (MFI)	↓*	-	↓*

Tabela 16. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów B, przejściowych limfocytów B oraz limfocytów B pamięci w krwi obwodowej pomiędzy pacjentkami po poronieniu, a kobietami w ciąży. W tabeli przedstawiono również zmiany w ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR, TLR9, IL-10 oraz IL-6 przez limfocyty B oraz wybrane subpopulacje limfocytów B pomiędzy pacjentkami po poronieniu, a kobietami w ciąży.

↓- spadek w stosunku do kobiet w ciąży, ↑- wzrost w stosunku do kobiet w ciąży, "- " - brak zmian w stosunku do kobiet w ciąży; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

	limfocyty CD3 ⁺ CD4 ⁺
ekspresja CD28 (MFI)	-
ekspresja CTLA-4 (MFI)	↑*
ekspresja CD40L (MFI)	↑**

Tabela 17. Podsumowanie zmian w ekspresji receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T u pacjentek po poronieniu w porównaniu do kobiet w ciąży.

↓- spadek w stosunku do kobiet w ciąży, ↑- wzrost w stosunku do kobiet w ciąży, "-" - brak zmian w stosunku do kobiet w ciąży; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

limfocyty CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	limfocyty CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD127 ⁻ (Treg)	
% wśród CD3 ⁺ CD4 ⁺	% wśród CD3 ⁺ CD4 ⁺	ekspresja IL-10
↓*	-	-

Tabela 18. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów CD3⁺CD4⁺CD25⁺, Treg ekspresji IL-10 przez Treg w krwi obwodowej pomiędzy pacjentkami po poronieniu, a kobietami w ciąży.

↓- spadek w stosunku do kobiet w ciąży, ↑- wzrost w stosunku do kobiet w ciąży, "-" - brak zmian w stosunku do kobiet w ciąży; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Zarówno ogólna populacja limfocytów B jak i dwie analizowane subpopulacje limfocytów B wykazywały u kobiet po poronieniu niższą ekspresję CD86 oraz wyższą CD40. Dodatkowo przejściowe limfocyty B w grupie kobiet po poronieniu charakteryzowały się wyższą ekspresją HLA-DR.

Jak do tej pory nie przeprowadzono badań określających fenotyp kostymulacyjny obwodowych limfocytów B u ciężarnych kobiet. Badania, w których analizowano ekspresję głównie CD80 oraz CD86 na DC w krwi obwodowej nie wskazały jednoznacznie na prawidłowy immunofenotyp APC w ciąży. Miwa i wsp. wykazali, że we wczesnej ciąży zarówno w krwi obwodowej jak i w doczesnej wzrasta frekwencja DC oraz monocytów z ekspresją CD86³³⁷. Z drugiej strony badania przeprowadzone przez Bachy i wsp. pokazały, że do 30 tygodnia ciąży w krwi obwodowej obserwowana jest niższa frekwencja mieloidalnych DC (mDC) wykazujących ekspresję CD86

i HLA-DR w porównaniu do stanu przed ciążą, a dopiero po 30 tygodniu ciąży następuje sukcesywny wzrost frekwencji mDC CD86⁺, który trwa aż do porodu³³⁸. W przypadku spontanicznych poronień badacze wykazali, że monocyty i DC w krwi obwodowej oraz w doczesnej charakteryzują się niższą ekspresją cząsteczki CD86³³⁷. Z kolei Jin i wsp. sugerowali wpływ sygnałów kostymulacyjnych na patogenezę poronień, ponieważ ich badania wykazały, że komórki doczesnej kobiet po spontanicznym poronieniu charakteryzują się wyższą ekspresją CD86 niż komórki pobrane z doczesnej kobiet w prawidłowej ciąży. Autorzy wnioskowali również o udziale CD86 w indukcji immunologicznie niesprzyjającego środowiska powiązanego z limfocytami T, ponieważ komórki te izolowane z doczesnej kobiet po spontanicznym poronieniu charakteryzowały się niższą ekspresją CTLA-4 oraz wyższą CD28 w stosunku grupy kontrolnej, a także *in vitro* wydzielaly wyższe stężenia cytokin powiązanych z odpowiedzią Th1^{339 337–339}.

Przedstawiony w pracy doktorskiej obraz kostymulacyjny limfocytów B oraz badanych subpopulacji limfocytów B u kobiet po poronieniu wskazują na aktywację tych komórek. Co ciekawe, pobudzenie tych komórek prowadzi najprawdopodobniej do indukcji Breg, ponieważ zarówno przejściowe limfocyty B jak i limfocyty B pamięci w grupie kobiet po poronieniu wykazują wyższą ekspresję IL-10, a dodatkowo limfocyty B pamięci niższą ekspresję IL-6. Wynik ten z jednej strony może być zaskakujący, ponieważ Breg, podobnie jak Treg uznano za komórki sprzyjające prawidłowemu rozwojowi ciąży, a ich spadek utożsamiany jest z poronieniami⁴². Z drugiej jednak strony, Breg odpowiedzialne są za tłumienie odpowiedzi zapalnej i utrzymywanie równowagi pomiędzy reakcjami pro- i przeciwzapalnymi. IL-10 jest ważnym regulatorem odporności ograniczającym stan zapalny i cytokina ta jest niezbędna do utrzymania równowagi immunologicznej³⁴⁰. Tak jak wspomniano, poronienie powiązane jest z obecnością stanu zapalnego, dlatego też wyższa ekspresja IL-10 przez limfocyty B może u kobiet po poronieniu może prowadzić do przywrócenia zakłóconej równowagi immunologicznej spowodowanej uszkodzeniem tkanek.

Badania Nova-Lamperti i wsp., wskazują, że w przypadku przejściowych limfocytów B, indukcja za pośrednictwem CD40 prowadzi do wyższej ekspresji IL-10, która w autokryny sposób może obniżać ekspresję CD86 na limfocytach B³⁴¹. Nasze badania potwierdzają te obserwacje, ponieważ przejściowe Breg kobiet po poronieniu wykazują jednocześnie niższą ekspresję CD86, a wyższą CD40, co przy obserwowanym wyższym poziomie ekspresji CD40L przez limfocyty T może

wskazywać na możliwe interakcje pomiędzy limfocytami B i T (tabela 17). Obecność przejściowych limfocytów B u kobiet po poronieniu może również hamować aktywację limfocytów T. Wskazuje na to wyższa ekspresję CTLA-4 jak i niższa frekwencja limfocytów $CD3^+CD4^+CD25^+$ u kobiet po poronieniu w porównaniu do kobiet w prawidłowej ciąży (tabela 17 i tabela 18). Obserwacje te są również zbieżne z wynikami otrzymanymi przez Nova-Lamperti i wsp., które wskazywały na kontrolę aktywacji limfocytów T przez przejściowe limfocyty B wykazujące ekspresję IL-10³⁴¹.

W przypadku limfocytów B pamięci, które u kobiet po spontanicznym poronieniu charakteryzują się podobnym do przejściowych limfocytów B fenotypem tolerogennym, można podejrzewać, że zmiana ich fenotypu w następstwie poronienia, również ma celu przywrócenie zaburzonej równowagi immunologicznej.

6 WNIOSKI

1. Zablockowanie sygnalizacji TLR9 u samic szczepu CBA/J krytych samcami szczepu DBA/2J zwiększa prawdopodobieństwo utraty alogenicznej ciąży, natomiast prawdopodobnie nie decyduje o skutecznej implantacji.
2. W mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem zahamowanie stymulacji TLR9 powodując zmiany w fenotypie kostymulacyjnym limfocytów T i B i prowadzi do obniżenia puli limfocytów Treg i aktywowanych limfocytów Th o fenotypie $CD3^+CD4^+CD25^+$, natomiast nie wpływa na frekwencję limfocytów Breg.
3. TLR9 nie jest bezpośrednio zaangażowany w kształtowanie fenotypu kostymulacyjnego limfocytów B u kobiet po spontanicznym poronieniu.
4. U kobiet w następstwie poronienia spontanicznego wzrost frekwencji limfocytów B o fenotypie tolerogennym w powiązaniu z obniżoną frekwencją aktywowanych limfocytów T sugeruje ich zaangażowanie w przywracaniu równowagi immunologicznej zakłóconej poronieniem.

7 SPIS TABEL

Tabela 1. Tabela przedstawiająca najczęściej badane subpopulacje limfocytów B regulatorowych u ludzi wraz z udowodnionym lub przypuszczalnym mechanizmem działania.....	26
Tabela 2. Tabela przedstawiająca najczęściej badane subpopulacje limfocytów B regulatorowych u myszy wraz z udowodnionym lub przypuszczalnym mechanizmem działania.....	27
Tabela 3. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek mysich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko mysim antygenom zewnątrzkomórkowym;	42
Tabela 4. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek ludzkich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko ludzkim antygenom zewnątrzkomórkowym;	43
Tabela 5. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek mysich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko mysim antygenom wewnątrzkomórkowym;	43
Tabela 6. Przeciwciała wykorzystywane w immunofenotypowaniu komórek ludzkich; przeciwciała podane w tabeli skierowane są przeciwko ludzkim antygenom wewnątrzkomórkowym;	43
Tabela 7. Obecność charakterystycznych komórek w wymazie z pochwy w każdym z etapów cyklu rujowego samic myszy (opracowano na podstawie ²⁶¹); „+”- obecność komórek, „-” – brak komórek;.....	46
Tabela 8. Składniki medium do trawienia enzymatycznego macicy myszy; WU= Jednostka Wunscha (ang. Wunsch Unit);	51
Tabela 9. Charakterystyka pacjentek zrekrutowanych do badań; Dane przedstawione są jako średnie ± odchylenie standardowe; n=liczba pacjentek;.....	53
Tabela 10. Skład medium do restymulacji komórek w celu cytometrycznej identyfikacji IL-10 oraz IL-6	54
Tabela 11. Podsumowanie zmian w ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 na limfocytach B oraz frekwencji limfocytów B z ich ekspresją w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.	97

Tabela 12. Podsumowanie zmian w ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 na limfocytach B oraz frekwencji limfocytów B z ich ekspresją w macicy (3 dzień ciąży) oraz w doczesnej (14 dzień ciąży) po podaży dootrzewnowej ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.	97
Tabela 13. Podsumowanie zmian w ekspresji receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T oraz frekwencji limfocytów T z ich ekspresją w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.	98
Tabela 14. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , Treg oraz Treg z ekspresją IL-10 w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.....	99
Tabela 15. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów Breg oraz ekspresji IL-10 oraz IL-6 przez Breg w śledzionie oraz węzłach chłonnych w 3 oraz 14 dniu ciąży po dootrzewnowej podaży ODN 2088 w dawce 50 µg oraz 100 µg.	102
Tabela 16.. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów B, przejściowych limfocytów B oraz limfocytów B pamięci w krwi obwodowej pomiędzy pacjentkami po poronieniu, a kobietami w ciąży. W tabeli przedstawiono również zmiany w ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR, TLR9, IL-10 oraz IL-6 przez limfocyty B oraz wybrane subpopulacje limfocytów B pomiędzy pacjentkami po poronieniu, a kobietami w ciąży.	106
Tabela 17. Podsumowanie zmian w ekspresji receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T u pacjentek po poronieniu w porównaniu do kobiet w ciąży.	107
Tabela 18. Podsumowanie zmian w frekwencji limfocytów CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , Treg ekspresji IL-10 przez Treg w krwi obwodowej pomiędzy pacjentkami po poronieniu, a kobietami w ciąży.....	107

8 SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat przedstawiający dojrzewanie limfocytów B wraz z ekspresją wybranych antygenów zewnątrzkomórkowych u człowieka.	18
--	----

Rycina 2. Zmiany całkowitej liczby limfocytów B w macicy, śledzionie i w węzłach chłonnych oraz zmiany całkowitej liczby limfocytów Breg w otrzewnej w miarę postępu ciąży u myszy.	22
Rycina 3. Schemat przedstawiający szlak sygnalizacji komórkowej za pośrednictwem TLR9. AP-1 (ang. activator protein 1), IKK α (ang. κ B kinase α), IRAK-4/-1 (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4), IRF7 (ang. interferon regulatory factor 7), MAPK (ang. mitogen-activated protein kinase), Myd88 (ang. myeloid differentiation primary response 88), NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), TAB1/2 (ang. TGF-beta activated kinase 1 binding protein 1), TAK1 (ang. transforming growth factor β -activated kinase 1), TRAF-6/-3 (ang. TNF receptor-associated factor 6/3);	34
Rycina 4. Schemat doświadczenia nad wpływem antagonisty TLR9 na powodzenie ciąży oraz na zmianę immunofenotypu komórek w mysim modelu ciąży zagrożonej poronieniem.	45
Rycina 5. Zdjęcia mikroskopowe (powiększenie 200x) wymazów z pochwy myszy przedstawiające charakterystyczne komórki obecne w każdej z faz cyklu rujowego. ...	47
Rycina 6. Zdjęcia macicy myszy szczepu CBA/J będącej w ciąży zagrożonej poronieniem (14 dzień ciąży). Na zdjęciu zaznaczono prawidłowe (P) oraz zresorbowane płody myszy (R).	49
Rycina 7. Zdjęcie łożyska wraz z doczesną zdrowego (A) i zresorbowanego płodu (B) samicy myszy szczepu CBA/J będącej w ciąży zagrożonej poronieniem (14 dzień ciąży);.....	50
Rycina 8. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania śledzionowych limfocytów B oraz określenia ekspresji MHC klasy II, cząsteczek kostymulacyjnych oraz TLR9 w doświadczeniu z udziałem mysiego modelu ciąży zagrożonej poronieniem.	57
Rycina 9. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania limfocytów T węzłów chłonnych oraz określenia ekspresji IL-10 oraz receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych w doświadczeniu z udziałem mysiego modelu ciąży zagrożonej poronieniem.....	58

Rycina 10. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania limfocytów B (CD19 ⁺), przejściowych limfocytów B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) oraz limfocytów B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) w krwi obwodowej pacjentek oraz określenia ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR (MHC klasy II) oraz TLR9 w tych komórkach.	59
Rycina 11. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania limfocytów B (CD19 ⁺), przejściowych limfocytów B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) oraz limfocytów B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) w krwi obwodowej pacjentek oraz określenia ekspresji IL-10 oraz IL-6 w tych komórkach.....	60
Rycina 12. Przykładowe przedstawienie wykresów punktowych dot-plot oraz histogramów dla strategii bramkowania limfocytów T w krwi obwodowej pacjentek oraz określenia ekspresji IL-10 oraz receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych	61

9 SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Wpływ podaży antagonisty TLR9 na powodzenie ciąży u myszy CBA/J po kryciu samcami DBA/2J. Liczba zresorbowanych płodów (A), liczba prawidłowych płodów (B), procent zresorbowanych płodów (C) oraz sumaryczna liczba miejsc implantacyjnych (D) w 14 dniu ciąży po podaniu ODN 2088 lub PBS (kontrola).	64
Wykres 2. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w śledzionowych limfocytach B (CD19 ⁺) w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	66
Wykres 3. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w limfocytach B (CD19 ⁺) wyizolowanych z węzłów chłonnych drenujących macicę w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	67
Wykres 4. Frekwencja limfocytów B (CD19 ⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19 ⁺ śledziony w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	69

Wykres 5. Frekwencja limfocytów B (CD19 ⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19 ⁺ węzłów chłonnych drenujących macicę w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	70
Wykres 6. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w limfocytach B (CD19 ⁺) macicy w 3 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	72
Wykres 7. Frekwencja limfocytów B (CD19 ⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19 ⁺ macicy w 3 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	73
Wykres 8. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 w limfocytach B (CD19 ⁺) doczesnej w 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	74
Wykres 9. Frekwencja limfocytów B (CD19 ⁺) z ekspresją badanych cząsteczek kostymulacyjnych, MHC klasy II oraz TLR9 wśród limfocytów CD19 ⁺ doczesnej w 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	75
Wykres 10. Frekwencja śledzionowych limfocytów CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high} wśród limfocytów B (CD19 ⁺) oraz ekspresją IL-10 oraz IL-6 przez śledzionowe limfocyty CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high} w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola)	76
Wykres 11. Frekwencja limfocytów CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high} wśród limfocytów B (CD19 ⁺) pochodzących z węzłów chłonnych drenujących macicę oraz ekspresją IL-10 oraz IL-6 przez limfocyty CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{high} w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	77
Wykres 12. Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na śledzionowych limfocytach T (CD3 ⁺ CD4 ⁺) w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola) oraz frekwencja limfocytów T z ekspresją tych cząsteczek wśród limfocytów T śledziony.	79
Wykres 13. Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T (CD3 ⁺ CD4 ⁺) wyizolowanych z węzłów chłonnych drenujących macicę w 3 i 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola) oraz frekwencja limfocytów T z ekspresją tych cząsteczek wśród limfocytów T węzłów chłonnych.	80

Wykres 14. Frekwencja limfocytów CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ oraz CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ wśród limfocytów T śledziony oraz ekspresją IL-10 przez limfocyty CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).	81
Wykres 15. Frekwencja limfocytów CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ oraz CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ wśród limfocytów T ⁺ węzłów chłonnych drenujących macicę oraz ekspresją IL-10 przez limfocyty CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ w 3 oraz 14 dniu ciąży po podaniu samicom ODN 2088 lub PBS (kontrola).....	82
Wykres 16. . Frekwencja limfocytów B (CD19 ⁺), przejściowych limfocytów B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) oraz limfocytów B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) wśród limfocytów krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.	83
Wykres 17. Frekwencja przejściowych limfocytów B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) oraz limfocytów B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) wśród limfocytów B krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.....	84
Wykres 18. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w limfocytach B (CD19 ⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.	85
Wykres 19. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w przejściowych limfocytach B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.	86
Wykres 20. Ekspresja cząsteczek kostymulacyjnych, HLA-DR oraz TLR9 w limfocytach B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.	87
Wykres 21. Ekspresja IL-10 oraz IL-6 w limfocytach B (CD19 ⁺), przejściowych limfocytach B (CD19 ⁺ CD38 ^{high} CD24 ^{high}) oraz limfocytach B pamięci (CD19 ⁺ CD24 ^{high} CD27 ⁺) krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.	88
Wykres 22. Ekspresja receptorów dla cząsteczek kostymulacyjnych na limfocytach T krwi obwodowej pacjentek po poronieniu oraz w ciąży prawidłowej.....	89
Wykres 23. Frekwencja aktywowanych limfocytów T (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) oraz Treg (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD127 ⁻).	89

10 BIBLIOGRAFIA

1. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol.* 1953;7:320-337.
2. Billington WD. The immunological problem of pregnancy: 50 Years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *J Reprod Immunol.* 2003;60(1):1-11. doi:10.1016/S0165-0378(03)00083-4
3. Abu-Raya B, Michalski C, Sadarangani M, Lavoie PM. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.575197
4. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1221(1):80-87. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x
5. Park DW, Yang KM. Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med.* 2011;38(4):179-185. doi:10.5653/cerm.2011.38.4.179
6. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2010;63(6):601-610. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x
7. Sharkey DJ, Tremellen KP, Jasper MJ, Gemzell-Danielsson K, Robertson SA. Seminal Fluid Induces Leukocyte Recruitment and Cytokine and Chemokine mRNA Expression in the Human Cervix after Coitus. *The Journal of Immunology.* 2012;188(5):2445-2454. doi:10.4049/jimmunol.1102736
8. Sharkey DJ, Macpherson AM, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(7):491-501. doi:10.1093/molehr/gam028
9. Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 2005;322(1):43-52. doi:10.1007/s00441-005-1127-3
10. Jaiswal MK, Mallers TM, Larsen B, et al. V-ATPase upregulation during early pregnancy: A possible link to establishment of an inflammatory response during preimplantation period of pregnancy. *Reproduction.* 2012;143(5):713-725. doi:10.1530/REP-12-0036
11. Slawek A, Lorek D, Kedzierska AE, Chelmonska-Soyta A. Regulatory B cells with IL-35 and IL-10 expression in a normal and abortion-prone murine pregnancy model. *American Journal of Reproductive Immunology.* Published online March 24, 2020. doi:10.1111/aji.13217
12. Guzman-Genuino RM, Eldi P, Garcia-Valtanen P, Hayball JD, Diener KR. Uterine B Cells Exhibit Regulatory Properties During the Peri-Implantation Stage of Murine Pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10(December):1-12. doi:10.3389/fimmu.2019.02899

13. Busse M, Langwisch S, Tedford K, Fischer KD, Zenclussen AC. Maternal B cell signaling orchestrates fetal development in mice. *Development (Cambridge)*. 2022;149(8). doi:10.1242/dev.199783
14. Benner M, Feyaerts D, Garcia-Carrión CC, et al. Clusters of tolerogenic B cells feature in the dynamic immunological landscape of the pregnant uterus. *Cell Rep*. 2020;32(13):108204.
15. Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S, Zenclussen AC. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biol Reprod*. 2013;89(4). doi:10.1095/biolreprod.113.110791
16. Gomez-Lopez N, Garcia-Flores V, Chin PY, et al. Macrophages exert homeostatic actions in pregnancy to protect against preterm birth and fetal inflammatory injury. *JCI Insight*. 2021;6(19).
17. Tagliani E, Erlebacher A. Dendritic cell function at the maternal-fetal interface. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011;7(5):593-602.
18. Nörenberg J, Jaksó P, Barakonyi A. Gamma/delta T cells in the course of healthy human pregnancy: Cytotoxic potential and the tendency of CD8 expression make CD56+ $\gamma\delta$ T cells a unique lymphocyte subset. *Front Immunol*. 2020;11:596489.
19. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):434-444.
20. Robertson SA, Ingman W V, O'leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. *Transforming Growth Factor B-a Mediator of Immune Deviation in Seminal Plasma*. Vol 57.; 2002. www.elsevier.com/locate/jreprimm
21. Tsuda S, Nakashima A, Shima T, Saito S. New paradigm in the role of regulatory T cells during pregnancy. *Front Immunol*. 2019;10(MAR). doi:10.3389/fimmu.2019.00573
22. King A, Allan DSJ, Bowen M, et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol*. 2000;30(6):1623-1631. doi:10.1002/1521-4141(200006)30:6<1623::AID-IMMU1623>3.0.CO;2-M
23. Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology*. 2009;127(1):26-39. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03019.x
24. Lombardelli L, Logiodice F, Kullolli O, et al. At Embryo Implantation Site IL-35 Secreted by Trophoblast, Polarizing T Cells towards IL-35+ IL-10+ IL-4+ Th2-Type Cells, Could Favour Fetal Allograft Tolerance and Pregnancy Success. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9). doi:10.3390/ijms23094926
25. Svensson-Arvelund J, Mehta RB, Lindau R, et al. The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages. *The Journal of Immunology*. 2015;194(4):1534-1544. doi:10.4049/jimmunol.1401536

26. Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Front Physiol.* 2018;9(AUG). doi:10.3389/fphys.2018.01091
27. Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod.* 2006;21(1):46-51.
28. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol.* 1995;155(1):128-133.
29. Mao G, Wang J, Kang Y, et al. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology.* 2010;151(11):5477-5488.
30. Liang Q, Tong L, Xiang L, et al. Correlations of the expression of $\gamma\delta$ T cells and their co-stimulatory molecules TIGIT, PD-1, ICOS and BTLA with PR and PIBF in the peripheral blood and decidual tissues of women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Clin Exp Immunol.* 2021;203(1):55-65.
31. Kelemen K, Bognar I, Paal M, Szekeres-Bartho J. *A Progesterone-Induced Protein Increases the Synthesis of Asymmetric Antibodies 1.* Vol 167.; 1996.
32. Arenas-Hernandez M, Romero R, Xu Y, et al. Effector and activated T cells induce preterm labor and birth that is prevented by treatment with progesterone. *J Immunol.* 2019;202(9):2585-2608.
33. Faust Z, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am J Reprod Immunol.* 1999;42(2):71-75.
34. Milne SA, Henderson TA, Kelly RW, Saunders PT, Baird DT, Critchley HOD. Leukocyte populations and steroid receptor expression in human first-trimester decidua; regulation by antiprogesterin and prostaglandin E analog. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(7):4315-4321.
35. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, et al. Cutting Edge: Estrogen Drives Expansion of the CD4+CD25+ Regulatory T Cell Compartment. *The Journal of Immunology.* 2004;173(4):2227-2230. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2227
36. Chen RY, Fan YM, Zhang Q, et al. Estradiol Inhibits Th17 Cell Differentiation through Inhibition of ROR γ T Transcription by Recruiting the ER α /REA Complex to Estrogen Response Elements of the ROR γ T Promoter . *The Journal of Immunology.* 2015;194(8):4019-4028. doi:10.4049/jimmunol.1400806
37. Kane N, Kelly R, Saunders PTK, Critchley HOD. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology.* 2009;150(6):2882-2888.
38. Schumacher A, Heinze K, Witte J, et al. Human Chorionic Gonadotropin as a Central Regulator of Pregnancy Immune Tolerance. *The Journal of Immunology.* 2013;190(6):2650-2658. doi:10.4049/jimmunol.1202698

39. Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, d'Hauterive SP. Human chorionic gonadotropin: A hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol*. 2010;85(1):93-98. doi:10.1016/j.jri.2009.11.008
40. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, et al. Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy. *The Journal of Immunology*. 2009;182(9):5488-5497. doi:10.4049/jimmunol.0803177
41. Wan H, Versnel MA, Leijten LME, et al. Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. *J Leukoc Biol*. 2008;83(4):894-901. doi:10.1189/jlb.0407258
42. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, et al. Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;70(6):448-453. doi:10.1111/aji.12157
43. Liu J, Chen X, Hao S, et al. Human chorionic gonadotropin and IL-35 contribute to the maintenance of peripheral immune tolerance during pregnancy through mediating the generation of IL-10+ or IL-35+ Breg cells. *Exp Cell Res*. 2019;383(2). doi:10.1016/j.yexcr.2019.111513
44. Lima J, Martins C, Leandro MJ, et al. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: A prospective observational study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2016;16(1). doi:10.1186/s12884-016-0927-7
45. Muzzio DO, Soldati R, Ehrhardt J, et al. B cell development undergoes profound modifications and adaptations during pregnancy in mice. *Biol Reprod*. 2014;91(5). doi:10.1095/biolreprod.114.122366
46. Bartmann C, Segerer SE, Rieger L, Kapp M, Sütterlin M, Kämmerer U. Quantification of the Predominant Immune Cell Populations in Decidua Throughout Human Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2014;71(2):109-119. doi:10.1111/aji.12185
47. Feyaerts D, Benner M, Van Cranenbroek B, Van Der Heijden OWH, Joosten I, Van Der Molen RG. Human uterine lymphocytes acquire a more experienced and tolerogenic phenotype during pregnancy. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-03191-0
48. Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2006;5(6):403-408. doi:10.1016/j.autrev.2005.10.007
49. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):34-46. doi:10.1038/nri2901
50. LeBien TW, Thomas *, Tedder F. B lymphocytes: how they develop and function. Published online 2008. doi:10.1182/blood
51. Crickx E, Weill JC, Reynaud CA, Mahévas M. Anti-CD20-mediated B-cell depletion in autoimmune diseases: successes, failures and future perspectives. *Kidney Int*. 2020;97(5):885-893. doi:10.1016/j.kint.2019.12.025
52. Schroeder HW, Radbruch A, Berek C. B-Cell Development and Differentiation. In: *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Elsevier; 2019:107-118.e1. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00007-7

53. DiSano KD, Gilli F, Pachner AR. Memory B Cells in Multiple Sclerosis: Emerging Players in Disease Pathogenesis. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.676686
54. Wang L, Jiang P, Zhao S, et al. The dynamic profile and potential function of B-cell subsets during pregnancy. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(4):1082-1084.
55. Hughes CE, Benson RA, Bedaj M, Maffia P. Antigen-presenting cells and antigen presentation in tertiary lymphoid organs. *Front Immunol.* 2016;7:481.
56. Carrasco YR, Batista FD. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity.* 2007;27(1):160-171.
57. Defrance T, Carayon P, Billian G, et al. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med.* 1994;179(1):135-143.
58. Andersen HT, Schröder SA, Bonding P. Unilateral deafness after acoustic neuroma surgery: subjective hearing handicap and the effect of the bone-anchored hearing aid. *Otol Neurotol.* 2006;27(6):809-814.
59. Takatsu K. Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;215(2):121-133.
60. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Human B Cell Differentiation. *The Journal of Immunology.* 2007;179(3):1634-1647. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1634
61. Yarchoan M, Ho WJ, Mohan A, et al. Effects of B cell-activating factor on tumor immunity. *JCI Insight.* 2020;5(10). doi:10.1172/JCI.INSIGHT.136417
62. Yiwen Z, Shilin G, Yingshi C, et al. Efficient generation of antigen-specific CTLs by the BAFF-activated human B Lymphocytes as APCs: a novel approach for immunotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(47):77732-77748.
63. Jiang W, Lederman MM, Harding C V., Rodriguez B, Mohner RJ, Sieg SF. TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur J Immunol.* 2007;37(8):2205-2213. doi:10.1002/eji.200636984
64. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naïve B cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(4):810-816.
65. Chen X, Jensen PE. Cutting edge: primary B lymphocytes preferentially expand allogeneic FoxP3⁺ CD4 T cells. *J Immunol.* 2007;179(4):2046-2050.
66. Zhong X, Gao W, Degauque N, et al. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(9):2400-2404.
67. Chien CH, Chiang BL. Regulatory T cells induced by B cells: A novel subpopulation of regulatory T cells. *J Biomed Sci.* 2017;24(1). doi:10.1186/s12929-017-0391-3
68. Tlaskalová-Hogenová H, Mandel L, Stávková R, et al. Autoimmunity: from physiology to pathology. Natural antibodies, mucosal immunity and development of B cell repertoire. *Folia Biol (Praha).* 1992;38(3-4):202-215.

69. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*. 2005;23(1):7-18.
70. Vigna AFG, Godoy LC, Rogerio de Almeida S, Mariano M, Lopes JD. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro. *Immunol Lett*. 2002;83(1):61-66.
71. Zimecki M, Kapp JA. Presentation of antigen by B cell subsets. II. The role of CD5 B cells in the presentation of antigen to antigen-specific T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1994;42(5-6):349-353.
72. Margry B, Wieland WH, van Kooten Peter J and van Eden W, Broere F. Peritoneal cavity B-1a cells promote peripheral CD4⁺ T-cell activation. *Eur J Immunol*. 2013;43(9):2317-2326.
73. Sung N, Byeon HJ, Garcia MDS, et al. Deficiency in memory B cell compartment in a patient with infertility and recurrent pregnancy losses. *J Reprod Immunol*. 2016;118:70-75.
74. Muzzio DO, Ziegler KB, Ehrhardt J, Zygmunt M, Jensen F. Marginal zone B cells emerge as a critical component of pregnancy well-being. *Reproduction*. 2016;151(1):29-37. doi:10.1530/REP-15-0274
75. Muzzio DO, Soldati R, Rolle L, Zygmunt M, Zenclussen AC, Jensen F. B-1a B cells regulate T cell differentiation associated with pregnancy disturbances. *Front Immunol*. 2014;5(JAN). doi:10.3389/fimmu.2014.00006
76. Jensen F, Wallukat G, Herse F, et al. Pregnancy/Preeclampsia CD19 CD5 Cells as Indicators of Preeclampsia. Published online 2012. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA
77. Taylor RP, Lindorfer MA. Drug Insight: The mechanism of action of rituximab in autoimmune disease - The immune complex decoy hypothesis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007;3(2):86-95. doi:10.1038/ncprheum0424
78. Das G, Damotte V, Gelfand JM, et al. Rituximab before and during pregnancy. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2018;5(3):e453. doi:10.1212/nxi.0000000000000453
79. Chakravarty EF, Murray ER, Kelman A, Farmer P. Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab. *Blood*. 2011;117(5):1499-1506. doi:10.1182/blood-2010-07-295444
80. Busse M, Campe KNJ, Nowak D, et al. IL-10 producing B cells rescue mouse fetuses from inflammation-driven fetal death and are able to modulate T cell immune responses. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-45860-2
81. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, et al. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1997;37(5):368-377. doi:10.1111/j.1600-0897.1997.tb00246.x
82. Medina KL, Kincade PW. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5382-5386.

83. Solders M, Lundell AC, Gorchs L, Gidlöf S, Tiblad E, Kaipe H. Mature naïve B cells are retained in the placental intervillous blood and positively associate with specific chemokines in full-term healthy pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2019;82(3). doi:10.1111/aji.13154
84. Bhat NM, Mithala A, Bieber MM, Herzenberg LA, Teng NNH. *Human CD5⁺ B Lymphocytes (B-1 Cells) Decrease in Peripheral Blood during Pregnancy*. Vol 28.; 1995.
85. Kövér Á, Lampé R, Szabó K, Tarr T, Papp G. A Comprehensive Investigation into the Distribution of Circulating B Cell Subsets in the Third Trimester of Pregnancy. *J Clin Med*. 2022;11(11). doi:10.3390/jcm11113006
86. Ziegler KB, Muzzio DO, Matzner F, et al. Human pregnancy is accompanied by modifications in B cell development and immunoglobulin profile. *J Reprod Immunol*. 2018;129:40-47. doi:10.1016/j.jri.2018.07.003
87. Muzzio D, Zygmunt M, Jensen F. The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5(APR). doi:10.3389/fendo.2014.00039
88. Lima J, Cambridge G, Vilas-Boas A, Martins C, Borrego LM, Leandro M. Serum markers of B-cell activation in pregnancy during late gestation, delivery, and the postpartum period. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2019;81(3). doi:10.1111/aji.13090
89. Margni RA, Paz CB, Cordal ME. *IMMUNOCHEMICAL BEHAVIOUR OF SHEEP NON-PRECIPTATING ANTIBODIES ISOLATED BY IMMUNOADSORPTION*. Vol 13. Pergamon Press; 1976.
90. Malan Borel I, Gentile T, Angelucci J, del Carmen Guala M, Binaghi RA, Margni RA. *IgG Asymmetric Molecules with Antipaternal Activity Isolated from Sera and Placenta of Pregnant Human*. Vol 20.; 1991.
91. Zenclussen AC, Gentile T, Kortebani G, Mazzolli A, Margni R. Asymmetric antibodies and pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2001;45(5):289-294. doi:10.1111/j.8755-8920.2001.450504.x
92. Barrientos G, Fuchs D, Schröcksnadel K, et al. Low levels of serum asymmetric antibodies as a marker of threatened pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2009;79(2):201-210. doi:10.1016/j.jri.2008.11.002
93. Grygiel-Górniak B, Mazurkiewicz Ł. Positive antiphospholipid antibodies: observation or treatment? *J Thromb Thrombolysis*. 2023;56(2):301-314.
94. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Anunciación-Llunell A, Marques-Soares J, Pardos-Gea J, Miró-Mur F. Pathogenesis, Diagnosis and Management of Obstetric Antiphospholipid Syndrome: A Comprehensive Review. *J Clin Med*. 2022;11(3). doi:10.3390/jcm11030675
95. Youinou P, Renaudineau Y. The antiphospholipid syndrome as a model for B cell-induced autoimmune diseases. In: *Thrombosis Research*. Vol 114. ; 2004:363-369. doi:10.1016/j.thromres.2004.06.019
96. Erez O, Romero R, Espinoza J, et al. The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second

- trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2008;21(5):279-287. doi:10.1080/14767050802034545
97. Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY, Armstrong DM, Wang W. Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(1):255-259. doi:10.1016/j.ajog.2005.12.049
 98. Katz SI, Parker D, Turk JL. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*. 1974;251(5475):550-551.
 99. Neta R, Salvin SB. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J Immunol*. 1974;113(6):1716-1725.
 100. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway Jr CA. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med*. 1996;184(6):2271-2278.
 101. Michaud D, Steward CR, Mirlekar Bhalchandra and Pylayeva-Gupta Y. Regulatory B cells in cancer. *Immunol Rev*. 2021;299(1):74-92.
 102. Horikawa M, Minard-Colin V, Matsushita T, Tedder TF. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4268-4280.
 103. Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol*. 2015;27(10):521-530.
 104. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):654-665.
 105. van der Vlugt LEPM, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhan A and Janssen Bonas M, et al. CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(4):517-528.
 106. Shen P, Fillatreau S. Suppressive functions of B cells in infectious diseases. *Int Immunol*. 2015;27(10):513-519.
 107. Nouël A, Simon Q, Jamin Christophe and Pers JO, Hillion S. Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Front Immunol*. 2014;5:11.
 108. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(7):1575-1585.
 109. Fettke F, Schumacher A, Canellada A, et al. Maternal and fetal mechanisms of B cell regulation during pregnancy: Human chorionic gonadotropin stimulates B cells to produce IL-10 while alpha-fetoprotein drives them into apoptosis. *Front Immunol*. 2016;7(DEC). doi:10.3389/fimmu.2016.00495

110. Tedder TF. B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset. *The Journal of Immunology*. 2015;194(4):1395-1401. doi:10.4049/jimmunol.1401329
111. Lighaam LC, Unger PPA, Vredevoogd DW, et al. In vitro-induced human IL-10+ B cells do not show a subset-defining marker signature and plastically co-express IL-10 with pro-inflammatory cytokines. *Front Immunol*. 2018;9(SEP). doi:10.3389/fimmu.2018.01913
112. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B Cells (B10 Cells) and Regulatory T Cells Have Independent Roles in Controlling Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Initiation and Late-Phase Immunopathogenesis. *The Journal of Immunology*. 2010;185(4):2240-2252. doi:10.4049/jimmunol.1001307
113. Slawek A, Lorek D, Kedzierska AE, et al. Peripheral blood subpopulations of Bregs producing IL-35 in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2023;89(3):e13675.
114. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-140. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009
115. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med*. 2013;5(173):173ra23.
116. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-Antigen Presentation by CD1d + B Cells Is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells. *Immunity*. 2012;36(3):477-490. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.008
117. Das A, Ellis G, Pallant C, et al. IL-10–Producing Regulatory B Cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *The Journal of Immunology*. 2012;189(8):3925-3935. doi:10.4049/jimmunol.1103139
118. Van De Veen W, Stanic B, Yaman G, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(4):1204-1212. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.014
119. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016
120. Shalapour S, Font-Burgada J, Di Caro G, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*. 2015;521(7550):94-98. doi:10.1038/nature14395
121. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, et al. Interleukin 21-induced granzyme b-expressing b cells infiltrate tumors and regulate t cells. *Cancer Res*. 2013;73(8):2468-2479. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3450

122. Xu L, Liu X, Liu H, et al. Impairment of granzyme B-producing regulatory B cells correlates with exacerbated rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2017;8(JUN). doi:10.3389/fimmu.2017.00768
123. Zhang M, Zheng X, Zhang J, et al. CD19 +CD1d +CD5 + B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. *Cell Immunol.* 2012;274(1-2):89-97. doi:10.1016/j.cellimm.2012.01.007
124. Saze Z, Schuler PJ, Hong CS, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood.* 2013;122(1):9-18. doi:10.1182/blood-2013-02-482406
125. Chesneau M, Mai H Le, Danger R, et al. Efficient Expansion of Human Granzyme B–Expressing B Cells with Potent Regulatory Properties. *The Journal of Immunology.* 2020;205(9):2391-2401. doi:10.4049/jimmunol.2000335
126. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Published online 2011. doi:10.1182/blood-2010-07
127. Horikawa M, Weimer ET, DiLillo DJ, et al. Regulatory B Cell (B10 Cell) Expansion during *Listeria* Infection Governs Innate and Cellular Immune Responses in Mice . *The Journal of Immunology.* 2013;190(3):1158-1168. doi:10.4049/jimmunol.1201427
128. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity.* 2008;28(5):639-650. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.017
129. Yang M, Deng J, Liu Y, et al. IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. *American Journal of Pathology.* 2012;180(6):2375-2385. doi:10.1016/j.ajpath.2012.03.010
130. Bankoti R, Gupta K, Levchenko A, Stäger S. Marginal Zone B Cells Regulate Antigen-Specific T Cell Responses during Infection. *The Journal of Immunology.* 2012;188(8):3961-3971. doi:10.4049/jimmunol.1102880
131. Miles K, Heaney J, Sibinska Z, et al. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(3):887-892. doi:10.1073/pnas.1109173109
132. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, et al. *Novel Suppressive Function of Transitional 2 B Cells in Experimental Arthritis 1 The Journal of Immunology.;* 2007. www.jimmunol.org
133. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota–driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat Med.* 2014;20(11):1334-1339. doi:10.1038/nm.3680
134. Ding Q, Yeung M, Camirand G, et al. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2011;121(9):3645-3656. doi:10.1172/JCI46274

135. Xiao S, Brooks CR, Zhu C, et al. Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(30):12105-12110. doi:10.1073/pnas.1120914109
136. Xiao S, Brooks CR, Sobel RA, Kuchroo VK. Tim-1 Is Essential for Induction and Maintenance of IL-10 in Regulatory B Cells and Their Regulation of Tissue Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2015;194(4):1602-1608. doi:10.4049/jimmunol.1402632
137. Lundy SK, Fox DA. Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5⁺ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4). doi:10.1186/ar2795
138. Lundy SK, Lerman SP, Boros DL. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL⁺ T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun*. 2001;69(1):271-280. doi:10.1128/IAI.69.1.271-280.2001
139. Bodogai M, Moritoh K, Lee-Chang C, et al. Immunosuppressive and prometastatic functions of myeloid-derived suppressive cells rely upon education from tumor-associated B cells. *Cancer Res*. 2015;75(17):3456-3465. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3077
140. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*. 2011;71(10):3505-3515. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4316
141. Lee-Chang C, Bodogai M, Martin-Montalvo A, et al. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Resveratrol-Mediated Inactivation of Tumor-Evoked Regulatory B Cells. *The Journal of Immunology*. 2013;191(8):4141-4151. doi:10.4049/jimmunol.1300606
142. Wang RX, Yu CR, Dambuzza IM, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014;20(6):633-641. doi:10.1038/nm.3554
143. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-569. doi:10.1038/nature06306
144. Egwuagu CE, Yu CR. Interleukin 35-Producing B Cells (i35-Breg): A New Mediator of Regulatory B-Cell Functions in CNS Autoimmune Diseases. *Crit Rev Immunol*. 2015;35(1):49-57.
145. Rich RF, Cook WJ, Green WR. Spontaneous in vivo retrovirus-infected T and B cells, but not dendritic cells, mediate antigen-specific Fas ligand/Fas-dependent apoptosis of anti-retroviral CTL. *Virology*. 2006;346(2):287-300. doi:10.1016/j.virol.2005.10.009
146. Liu J, Zhan W, Kim CJ, et al. IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0089236

147. Hu HT, Ai X, Lu M, Song Z, Li H. Characterization of intratumoral and circulating IL-10-producing B cells in gastric cancer. *Exp Cell Res.* 2019;384(2). doi:10.1016/j.yexcr.2019.111652
148. Kessel A, Haj T, Peri R, et al. Human CD19⁺CD25^{high} B regulatory cells suppress proliferation of CD4⁺ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev.* 2012;11(9):670-677. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.018
149. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity.* 2002;16(2):219-230. doi:https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00274-1
150. Yoshizaki A, Miyagaki T, Dilillo DJ, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012;491(7423):264-268. doi:10.1038/nature11501
151. Rafei M, Hsieh J, Zehntner S, et al. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med.* 2009;15(9):1038-1045. doi:10.1038/nm.2003
152. Yang M, Sun L, Wang S, et al. Cutting Edge: Novel Function of B Cell-Activating Factor in the Induction of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *The Journal of Immunology.* 2010;184(7):3321-3325. doi:10.4049/jimmunol.0902551
153. Saulep-Easton D, Vincent FB, Quah PS, et al. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells. *Leukemia.* 2016;30(1):163-172. doi:10.1038/leu.2015.174
154. Hua C, Audo R, Yermenko N, et al. A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells. *J Autoimmun.* 2016;73:64-72. doi:10.1016/j.jaut.2016.06.002
155. Fehres CM, Van Uden NO, Yermenko NG, et al. April induces a novel subset of iga⁺regulatory b cells that suppress inflammation via expression of IL-10 and PD-L1. *Front Immunol.* 2019;10(JUN). doi:10.3389/fimmu.2019.01368
156. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Control B Cell Regulatory Function through Interleukin-10 Production. *Immunity.* 2011;34(5):703-714. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.016
157. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3(10):944-950. doi:10.1038/ni833
158. Zhang J, Wan M, Ren J, et al. Positive selection of B10 cells is determined by BCR specificity and signaling strength. *Cell Immunol.* 2016;304-305:27-34.
159. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *The Journal of Immunology.* 2009;182(12):7459-7472. doi:10.4049/jimmunol.0900270

160. Van Der Vlugt LEPM, Haeberlein S, De Graaf W, Martha TED, Smits HH. Toll-like receptor ligation for the induction of regulatory B cells. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1190:127-141. doi:10.1007/978-1-4939-1161-5_10
161. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, et al. TLR-Activated B Cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2008;180(7):4763-4773. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4763
162. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;197(4):489-501. doi:10.1084/jem.20021293
163. Yates MA, Li Y, Chlebeck P, Proctor T, Vandenbark AA, Offner H. Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2010;220(1-2):136-139. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.01.013
164. Bodhankar S, Vandenbark AA, Offner H. Oestrogen treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis requires 17 β -oestradiol-receptor-positive B cells that up-regulate PD-1 on CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunology*. 2012;137(4):282-293. doi:10.1111/imm.12013
165. Zhang J, Lapato A, Bodhankar S, Vandenbark AA, Offner H. Treatment with IL-10 producing B cells in combination with E2 ameliorates EAE severity and decreases CNS inflammation in B cell-deficient mice. *Metab Brain Dis*. 2015;30(5):1117-1127. doi:10.1007/s11011-015-9661-5
166. Zhang J, Benedek G, Bodhankar S, Lapato A, Vandenbark AA, Offner H. IL-10 producing B cells partially restore E2-mediated protection against EAE in PD-L1 deficient mice. *J Neuroimmunol*. 2015;285:129-136. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.06.002
167. Busse M, Campe KNJ, Redlich A, et al. Regulatory B Cells Are Decreased and Impaired in Their Function in Peripheral Maternal Blood in Pre-term Birth. *Front Immunol*. 2020;11(March). doi:10.3389/fimmu.2020.00386
168. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5. doi:10.1189/jlb.0306164
169. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol*. 2015;6(AUG):1-11. doi:10.3389/fimmu.2015.00422
170. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*. 2010;14(11):2592-2603. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x
171. Janeway CA, Medzhitov R, Preston-Hurlburt P. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-397. doi:10.1038/41131
172. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. *The Journal of Immunology*. 2014;169(2):1136-1136. doi:10.4049/jimmunol.169.2.1136

173. Applequist SE. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol.* 2002;14(9):1065-1074. doi:10.1093/intimm/dxf069
174. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J Exp Med.* 2002;194(6):863-870. doi:10.1084/jem.194.6.863
175. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology.* 2002;168(9):4531-4537. doi:10.4049/jimmunol.168.9.4531
176. Kabelitz D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(1):39-45. doi:10.1016/j.coi.2006.11.007
177. Hallman M, Rämet M, Ezekowitz RA. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res.* 2001;50(3):315-321.
178. Applequist SE, Wallin RPA, Ljunggren HG. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol.* 2002;14(9):1065-1074.
179. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, et al. Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Immunol.* 2007;74(1-2):53-60. doi:10.1016/j.jri.2006.11.004
180. Young SL, Lyddon TD, Jorgenson RL, Misfeldt ML. Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am J Reprod Immunol.* 2004;52(1):67-73.
181. Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, et al. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Human Reproduction.* 2007;22(2):586-593. doi:10.1093/humrep/del388
182. Soboll G, Shen L, Wira CR. Expression of Toll-like receptors (TLR) and responsiveness to TLR agonists by polarized mouse uterine epithelial cells in culture. *Biol Reprod.* 2006;75(1):131-139. doi:10.1095/biolreprod.106.050690
183. Klaffenbach D, Rascher W, Röllinghoff M, Dötsch J, Meißner U, Schnare M. Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell lines. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2005;53(2):77-84. doi:10.1111/j.1600-0897.2004.00247.x
184. Patni S, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA. Expression and activity of toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. *Biol Reprod.* 2009;80(2):243-248. doi:10.1095/biolreprod.108.069252
185. Krikun G, Lockwood CJ, Abrahams VM, Mor G, Paidas M, Guller S. Expression of Toll-like receptors in the human decidua. *Histol Histopathol.* 2007;22(8):847-854.
186. Kang X, Zhang X, Liu Z, et al. Excessive TLR9 signaling contributes to the pathogenesis of spontaneous abortion through impairment of Treg cell survival

- by activation of Caspase 8/3. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(2):285-292. doi:10.1016/j.intimp.2015.11.004
187. Canavan TP, Simhan HN. Innate immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol.* 2007;74(1-2):46-52. doi:10.1016/j.jri.2006.10.004
 188. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 Is Localized in the Endoplasmic Reticulum Prior to Stimulation. *The Journal of Immunology.* 2004;173(2):1179-1183. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1179
 189. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, et al. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.* 2004;72(12):7202-7211. doi:10.1128/IAI.72.12.7202-7211.2004
 190. Guerrier T, Pochard P, Lahiri A, Youinou P, Pers JO, Jamin C. TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response. *J Autoimmun.* 2014;51:23-29. doi:10.1016/j.jaut.2014.02.005
 191. Miyake K, Onji M. Endocytosis-free DNA sensing by cell surface TLR9 in neutrophils: Rapid defense with autoimmune risks. *Eur J Immunol.* 2013;43(8):2006-2009. doi:10.1002/eji.201343882
 192. Lam LKM, Murphy S, Kokkinaki D, et al. DNA binding to TLR9 expressed by red blood cells promotes innate immune activation and anemia. *Sci Transl Med.* 2021;13(616). doi:10.1126/SCITRANSLMED.ABJ1008
 193. Hotz MJ, Qing D, Shashaty MGS, et al. Red blood cells homeostatically bind mitochondrial DNA through TLR9 to maintain quiescence and to prevent lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197(4):470-480. doi:10.1164/rccm.201706-1161OC
 194. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:709-760. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
 195. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol.* 2006;7(2):131-137. doi:10.1038/ni1303
 196. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol.* 2006;7(1):49-56. doi:10.1038/ni1280
 197. Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(5). doi:10.1101/cshperspect.a019133
 198. Cornélie S, Hoebeke J, Schacht AM, et al. Direct Evidence that Toll-like Receptor 9 (TLR9) Functionally Binds Plasmid DNA by Specific Cytosine-phosphate-guanine Motif Recognition. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(15):15124-15129. doi:10.1074/jbc.M313406200
 199. Tripathi A, Bartosh A, Whitehead C, Pillai A. Activation of cell-free mtDNA-TLR9 signaling mediates chronic stress-induced social behavior deficits. *Mol Psychiatry.* Published online August 1, 2023. doi:10.1038/s41380-023-02189-7

200. Scharfe-nugent A, Corr SC, Carpenter SB, et al. TLR9 Provokes Inflammation in Response to Fetal DNA: Mechanism for Fetal Loss in Preterm Birth and Preeclampsia. Published online 2019. doi:10.4049/jimmunol.1103454
201. Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. *Brief Definitive Report Immune Cell Activation by Bacterial CpG-DNA through Myeloid Differentiation Marker 88 and Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (TRAF)6*. Vol 192.; 2000. <http://www.jem.org/cgi/content/full/192/4/595>
202. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511. doi:10.1038/nri1391
203. Honda K, Yanai H, Mizutani T, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15416-15421.
204. Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive Elements in Mammalian Telomeres Suppress Bacterial DNA-Induced Immune Activation. *The Journal of Immunology*. 2003;171(3):1393-1400. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1393
205. Stunz LL, Lenert P, Peckham D, et al. Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1212-1222. doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1212::AID-IMMU1212>3.0.CO;2-D
206. Fehri E, Ennaifer E, Bel Haj Rhouma R, Ardhaoui M, Boubaker S. TLR9 and Glioma: Friends or Foes? *Cells*. 2023;12(1). doi:10.3390/cells12010152
207. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):816-825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850
208. Agrawal S, Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J Clin Immunol*. 2011;31(1):89-98. doi:10.1007/s10875-010-9456-8
209. Hanten JA, Vasilakos JP, Riter CL, et al. Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol*. 2008;9. doi:10.1186/1471-2172-9-39
210. Jahrsdörfer B, Hartmann G, Racila E, et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol*. 2001;69(1):81-88.
211. Poeck H, Wagner M, Battiany J, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood*. 2004;103(8):3058-3064. doi:10.1182/blood-2003-08-2972
212. Eckl-Dorna J, Batista FD. BCR-mediated uptake of antigen linked to TLR9 ligand stimulates B-cell proliferation and antigen-specific plasma cell formation. *Blood*. 2009;113(17):3969-3977. doi:10.1182/blood-2008-10-185421

213. Jiang W, Lederman MM, Harding C V., Rodriguez B, Mohner RJ, Sieg SF. TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur J Immunol.* 2007;37(8):2205-2213. doi:10.1002/eji.200636984
214. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: Inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood.* 2003;102(3):956-963. doi:10.1182/blood-2002-11-3355
215. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for toll-like receptors in acquired immunity: Up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood.* 2003;101(11):4500-4504. doi:10.1182/blood-2002-11-3569
216. Richard K, Pierce SK, Song W. The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. *J Immunol.* 2008;181(3):1746-1752.
217. Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):282-294. doi:10.1038/nri3190
218. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564-569. doi:10.1038/nature06116
219. Conrad C, Meller S, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells in the skin: to sense or not to sense nucleic acids. *Semin Immunol.* 2009;21(3):101-109.
220. Zhang Z, Meng P, Han Y, et al. Mitochondrial DNA-LL-37 complex promotes atherosclerosis by escaping from autophagic recognition. *Immunity.* 2015;43(6):1137-1147.
221. Hurtado P, Au Peh C. LL-37 Promotes Rapid Sensing of CpG Oligodeoxynucleotides by B Lymphocytes and Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2010;184(3):1425-1435. doi:10.4049/jimmunol.0902305
222. Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(40):16270-16275.
223. Lu W, Cui C, Wang Y, et al. CpG ODN as an adjuvant arouses the vigor of B cells by relieving the negative regulation of surface TLR9 to enhance the antibody response to vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105(10):4213-4224.
224. Colleoni F, Lattuada D, Garretto A, et al. Maternal blood mitochondrial DNA content during normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(4):365.e1-365.e6. doi:10.1016/j.ajog.2010.05.027
225. Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, et al. Pre-Analytical Conditions in Non-Invasive Prenatal Testing of Cell-Free Fetal RHD. *PLoS One.* 2013;8(10). doi:10.1371/journal.pone.0076990
226. Phillippe M. Cell-free Fetal DNA — A Trigger for Parturition. *New England Journal of Medicine.* 2014;370(26):2534-2536. doi:10.1056/nejmcibr1404324

227. Goldfarb IT, Adeli S, Berk T, Phillippe M. Fetal and Placental DNA Stimulation of TLR9: A Mechanism Possibly Contributing to the Pro-inflammatory Events During Parturition. *Reproductive Sciences*. 2018;25(5):788-796. doi:10.1177/1933719117728798
228. Marschalek J, Wohlrab P, Ott J, et al. Maternal serum mitochondrial DNA (mtDNA) levels are elevated in preeclampsia – A matched case-control study. *Pregnancy Hypertens*. 2018;14:195-199. doi:10.1016/j.preghy.2018.10.003
229. Qiu C, Hevner K, Enquobahrie DA, Williams MA. A case-control study of maternal blood mitochondrial DNA copy number and preeclampsia risk. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2012;3(3):237-244.
230. Williamson RD, McCarthy FP, Kenny LC, McCarthy CM. Activation of a TLR9 mediated innate immune response in preeclampsia. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-42551-w
231. Ozeki A, Tani K, Takahashi H, et al. Preeclamptic patient-derived circulating cell-free DNA activates the production of inflammatory cytokines via toll-like receptor 9 signalling in the human placenta. *J Hypertens*. 2019;37(12):2452-2460. doi:10.1097/HJH.0000000000002208
232. León-Martínez D, Lynn T, Abrahams VM. Cell-free fetal DNA impairs trophoblast migration in a TLR9-dependent manner and can be reversed by hydroxychloroquine. *J Reprod Immunol*. 2023;157. doi:10.1016/j.jri.2023.103945
233. Cushen SC, Ricci CA, Bradshaw Jessica L and Silzer T, et al. Reduced maternal circulating cell-free mitochondrial DNA is associated with the development of preeclampsia. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(2):e021726.
234. Deer E, Herrock O, Campbell N, et al. The role of immune cells and mediators in preeclampsia. *Nat Rev Nephrol*. 2023;19(4):257-270. doi:10.1038/s41581-022-00670-0
235. Williamson RD, McCarthy FP, Kenny LC, McCarthy CM. Activation of a TLR9 mediated innate immune response in preeclampsia. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-42551-w
236. He B, Yang X, Li Y, et al. TLR9 (Toll-like receptor 9) agonist suppresses angiogenesis by differentially regulating VEGFA (vascular endothelial growth factor A) and sFLT1 (soluble vascular endothelial growth factor receptor 1) in preeclampsia. *Hypertension*. 2018;71(4):671-680.
237. Pineda A, Verdin-Terán SL, Camacho A, Moreno-Fierros L. Expression of Toll-like Receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 Is Increased in Placentas from Patients with Preeclampsia. *Arch Med Res*. 2011;42(5):382-391. doi:10.1016/j.arcmed.2011.08.003
238. Panda B, Panda A, Ueda I, et al. Dendritic cells in the circulation of women with preeclampsia demonstrate a pro-inflammatory bias secondary to dysregulation of TLR receptors. *J Reprod Immunol*. 2012;94(2):210-215. doi:10.1016/j.jri.2012.01.008

239. Tang H, Li H, Li D, Peng J, Zhang X, Yang W. The Gut Microbiota of Pregnant Rats Alleviates Fetal Growth Restriction by Inhibiting the TLR9/MyD88 Pathway. *J Microbiol Biotechnol.* 2023;33(9):1213-1227. doi:10.4014/jmb.2304.04020
240. Yin A, Ng EHY, Zhang X, He Y, Wu J, Leung KY. Correlation of maternal plasma total cell-free DNA and fetal DNA levels with short term outcome of first-trimester vaginal bleeding. *Human Reproduction.* 2007;22(6):1736-1743. doi:10.1093/humrep/dem058
241. Lim JH, Kim MH, Han YJ, et al. Cell-Free Fetal DNA and Cell-Free Total DNA Levels in Spontaneous Abortion with Fetal Chromosomal Aneuploidy. *PLoS One.* 2013;8(2). doi:10.1371/journal.pone.0056787
242. Basatvat S, Russell JM, Saare M, Thurston LM, Salumets A, Fazeli A. Potential innate immunity-related markers of endometrial receptivity and recurrent implantation failure (RIF). *Reprod Biol.* 2021;21(4). doi:10.1016/j.repbio.2021.100569
243. Wang Q, Sun Y, Fan R, et al. Role of inflammatory factors in the etiology and treatment of recurrent implantation failure. *Reprod Biol.* 2022;22(4). doi:10.1016/j.repbio.2022.100698
244. Lorek D, Kedzierska AE, Slawek A, Chelmonska-Soyta A. Expression of Toll-like receptors and costimulatory molecules in splenic B cells in a normal and abortion-prone murine pregnancy model. *American Journal of Reproductive Immunology.* Published online August 27, 2019. doi:10.1111/aji.13148
245. Gendron RL, Baines MG. Morphometric analysis of the histology of spontaneous fetal resorption in a murine pregnancy. *Placenta.* 1989;10(3):309-318.
246. Barnes MG, Bdhngsley KA, De Fougérolles AR, et al. *Evaluation of the Role of Exogenous Pathogens on the Incidence of Embryo Loss during Early Pregnancy in Mice.* Vol 26.; 1994.
247. Zenclussen AC, Blois S, Stumpo R, et al. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. *Cytokine.* 2003;24(4):150-160.
248. Gendron RL, Baines MG. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol.* 1988;113(2):261-267.
249. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol.* 2005;166(3):811-822.
250. Thuere C, Zenclussen ML, Schumacher A, et al. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2007;58(6):514-523. doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00538.x
251. Zenclussen ML, Thuere C, Ahmad N, et al. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2010;63(3):200-208. doi:10.1111/j.1600-0897.2009.00793.x

252. Clark DA, Fernandez J, Banwatt D. Prevention of spontaneous abortion in the CBA × DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-β and local recruitment of CD4⁺ 8⁺ FOXP3⁺ cells. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008;59(6):525-534. doi:10.1111/j.1600-0897.2008.00582.x
253. Clark DA, Chaput A, Tutton D. Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VII. Spontaneous abortion of allogeneic CBA/J x DBA/2 fetuses in the uterus of CBA/J mice correlates with deficient non-T suppressor cell activity. *J Immunol*. 1986;136(5):1668-1675.
254. Clark DA, McDermott MR, Szewczuk MR. Impairment of host-versus-graft reaction in pregnant mice. II. Selective suppression of cytotoxic T-cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy. *Cell Immunol*. 1980;52(1):106-118.
255. Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, et al. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 2007;110(5):1137-1145. doi:10.1097/01.AOG.0000284625.10175.31
256. Clark DA, Rahmati M, Gohner C, Bensussan A, Markert UR, Chaouat G. Seminal plasma peptides may determine maternal immune response that alters success or failure of pregnancy in the abortion-prone CBAxDBA/2 model. *J Reprod Immunol*. 2013;99(1-2):46-53. doi:10.1016/j.jri.2013.03.006
257. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R and Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol*. 1995;154(9):4261-4268.
258. Clark DA, Fernandes J, Banwatt D. Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4⁺8⁺ FOXP3⁺ cells. *Am J Reprod Immunol*. 2008;59(6):525-534.
259. Li W, Li B, Fan W, et al. CTLA4Ig gene transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and inducing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Reprod Immunol*. 2009;80(1-2):1-11.
260. Bonney EA, Brown SA. To drive or be driven: The path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. *Reproduction*. 2014;147(5). doi:10.1530/REP-13-0583
261. Bakhshalizadeh S, Rabiee F, Shirazi Reza and Ghaedi K, Amidi F, Nasr-Esfahani MH. Assessment of PGC1α-FNDC5 Axis in Granulosa Cells of PCOS Mouse Model. *J Reprod Infertil*. 2018;19(2):89-94.
262. Thaxton JE, Romero R, Sharma S. TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes. *J Immunol*. 2009;183(2):1144-1154. doi:10.4049/jimmunol.0900788
263. Atarashi N, Morishita M, Matsuda S. Activation of innate immune receptor TLR9 by mitochondrial DNA plays essential roles in the chemical long-term depression of hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 2024;300(3). doi:10.1016/j.jbc.2024.105744

264. Yamazoe M, Sasano T, Ihara K, et al. Sparsely methylated mitochondrial cell free DNA released from cardiomyocytes contributes to systemic inflammatory response accompanied by atrial fibrillation. *Sci Rep.* 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-85204-7
265. Costa TJ, Potje SR, Fraga-Silva TFC, et al. Mitochondrial DNA and TLR9 activation contribute to SARS-CoV-2-induced endothelial cell damage. *Vascul Pharmacol.* 2022;142. doi:10.1016/j.vph.2021.106946
266. Ménard O, Gafa V, Kapel N, Rodriguez B, Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ. Characterization of immunostimulatory CpG-rich sequences from different Bifidobacterium species. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2846-2855. doi:10.1128/AEM.01714-09
267. Wu B, Ni H, Li J, et al. The Impact of Circulating Mitochondrial DNA on Cardiomyocyte Apoptosis and Myocardial Injury after TLR4 Activation in Experimental Autoimmune Myocarditis. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;42(2):713-718. doi:10.1159/000477889
268. Li H, Sun H, Xu Y, Xing G, Wang X. Curcumin plays a protective role against septic acute kidney injury by regulating the TLR9 signaling pathway. *Transl Androl Urol.* 2021;10(5):2103-2112. doi:10.21037/tau-21-385
269. Lenz M, Kiss A, Haider P, et al. Short-term toll-like receptor 9 inhibition leads to left ventricular wall thinning after myocardial infarction. *ESC Heart Fail.* 2023;10(4):2375-2385. doi:10.1002/ehf2.14403
270. Pang SC, Janzen-Pang J, Tse MY, Croy BA, Tse D. Implant Site Dissections. In: *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy.* Elsevier; 2014:21-42.
271. Zhou H, Zhan F, Zhang H, et al. The proportion of CD19+CD24hiCD27+ regulatory B cells predicts the occurrence of acute allograft rejection in liver transplantation. *Ann Transl Med.* 2019;7(18):465.
272. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. Accessed January 28, 2024. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
273. Romualdi D, Ata B, Bhattacharya S, et al. Evidence-based guideline: unexplained infertility. *Human Reproduction.* 2023;38(10):1881-1890. doi:10.1093/humrep/dead150
274. Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion Summary, Number 781. *Obstetrics & Gynecology.* 2019;133(6). https://journals.lww.com/greenjournal/fulltext/2019/06000/infertility_workup_for_the_women_s_health.44.aspx
275. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012;98(5):1103-1111.
276. Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open.* 2018;2018(2). doi:10.1093/hropen/hoy004
277. Rai R, Regan L. *Recurrent Miscarriage.* Vol 368.; 2006. www.thelancet.com

278. Ford HB, Schust DJ. *Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy*. Vol 2.; 2009.
279. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med*. 2013;11(1). doi:10.1186/1741-7015-11-154
280. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management. *Lancet*. 1990;336(8717):728-733.
281. Cimadomo D, De Los Santos MJ, Griesinger G, et al. ESHRE good practice recommendations on recurrent implantation failure. *Hum Reprod Open*. 2023;2023(3). doi:10.1093/hropen/hoad023
282. Somigliana E, Vigano P, Busnelli A, Paffoni A, Vegetti W, Vercellini P. Repeated implantation failure at the crossroad between statistics, clinics and over-diagnosis. *Reprod Biomed Online*. 2018;36(1):32-38. doi:10.1016/j.rbmo.2017.09.012
283. Busnelli A, Reschini M, Cardellicchio L, Vegetti W, Somigliana E, Vercellini P. How common is real repeated implantation failure? An indirect estimate of the prevalence. *Reprod Biomed Online*. 2020;40(1):91-97. doi:https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.10.014
284. Brazdova A, Senechal H, Peltre G, Poncet P. Immune Aspects of Female Infertility. *Int J Fertil Steril*. 2016;10(1):1-10.
285. Leimert KB, Xu W, Princ MM, Chemtob S, Olson DM. Inflammatory Amplification: A Central Tenet of Uterine Transition for Labor. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11. doi:10.3389/fcimb.2021.660983
286. Shima T, Inada K, Nakashima A, et al. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2015;108:72-82. doi:10.1016/j.jri.2015.02.005
287. Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ, Branson KM, Ahlström AC, Care AS. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod*. 2009;80(5):1036-1045.
288. Robertson SA, Prins JR, Sharkey DJ, Moldenhauer LM. Seminal Fluid and the Generation of Regulatory T Cells for Embryo Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;69(4):315-330. doi:10.1111/aji.12107
289. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004;5(3):266-271. doi:10.1038/ni1037
290. Zhao J xian, Zeng Y ying, Liu Y. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell pool during pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2007;75(2):71-81. doi:10.1016/j.jri.2007.06.052
291. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam Roma and Richarts L, Zhu E, de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing

- CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 2009;183(11):7023-7030.
292. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, et al. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(1):139-145.
 293. Yang H, Qiu L, Chen G, Ye Z, Lü C, Lin Q. Proportional change of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril.* 2008;89(3):656-661.
 294. Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(5):301-308.
 295. Shima T, Nakashima A, Yasuda I, et al. Uterine CD11c⁺ cells induce the development of paternal antigen-specific Tregs via seminal plasma priming. *J Reprod Immunol.* 2020;141(103165):103165.
 296. Fang WN, Shi M, Meng CY, Li Dan-Dan and Peng JP. The balance between conventional DCs and plasmacytoid DCs is pivotal for immunological tolerance during pregnancy in the mouse. *Sci Rep.* 2016;6:26984.
 297. Sauss K, Ehrentraut S, Zenclussen AC, Schumacher A. The pregnancy hormone human chorionic gonadotropin differentially regulates plasmacytoid and myeloid blood dendritic cell subsets. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79(4):e12837.
 298. Wei R, Lai N, Zhao L, et al. Dendritic cells in pregnancy and pregnancy-associated diseases. *Biomed Pharmacother.* 2021;133(110921):110921.
 299. Blois SM, Soto CDA, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Lineage, Maturity, and Phenotype of Uterine Murine Dendritic Cells Throughout Gestation Indicate a Protective Role in Maintaining Pregnancy. *Biol Reprod.* 2004;70(4):1018-1023. doi:10.1095/biolreprod.103.022640
 300. Jin LP, Zhou YH, Wang MY, Zhu XY, Li DJ. Blockade of CD80 and CD86 at the time of implantation inhibits maternal rejection to the allogeneic fetus in abortion-prone matings. *J Reprod Immunol.* 2005;65(2):133-146. doi:10.1016/j.jri.2004.08.009
 301. Zhu XY, Zhou YH, Wang MY, Jin LP, Yuan MM, Li DJ. Blockade of CD86 Signaling Facilitates a Th2 Bias at the Maternal-Fetal Interface and Expands Peripheral CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells to Rescue Abortion-Prone Fetuses1. *Biol Reprod.* 2005;72(2):338-345. doi:10.1095/biolreprod.104.034108
 302. Krutzik SR, Tan B, Li H, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005;11(6):653-660.
 303. Hemmi H, Akira S. TLR signalling and the function of dendritic cells. In: *Chemical Immunology and Allergy.* KARGER; 2005:120-135.
 304. Glass MC, Glass DR, Oliveria JP, et al. Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets. *Cell Rep.* 2022;39(3). doi:10.1016/j.celrep.2022.110728

305. Jiang W, Lederman MM, Mohner RJ, et al. Impaired Naive and Memory B-Cell Responsiveness to TLR9 Stimulation in Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol*. 2008;82(16):7837-7845. doi:10.1128/jvi.00660-08
306. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000;95(3):999-1006.
307. Lenert P, Brummel R, Field EH, Ashman RF. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J Clin Immunol*. 2005;25(1):29-40. doi:10.1007/s10875-005-0355-6
308. Sun Y, Qin X, Shan B, et al. Differential effects of the CpG-Toll-like receptor 9 axis on pregnancy outcome in nonobese diabetic mice and wild-type controls. *Fertil Steril*. 2013;99(6):1759-1767.
309. Maxwell AJ, You Y, Aldo PB, Zhang Y, Ding J, Mor G. The role of the immune system during pregnancy: General concepts. In: *Reproductive Immunology*. Elsevier; 2021:1-21.
310. Geldenhuys J, Rossouw TM, Lombaard HA, Ehlers MM, Kock MM. Disruption in the regulation of immune responses in the placental subtype of preeclampsia. *Front Immunol*. 2018;9:1659.
311. Robertson SA, Care AS, Moldenhauer LM. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(10):4224-4235. doi:10.1172/JCI122182
312. Lind NA, Rael VE, Pestal K, Liu B, Barton GM. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(4):224-235.
313. Zannetti C, Parroche P, Panaye M, et al. TLR9 transcriptional regulation in response to double-stranded DNA viruses. *J Immunol*. 2014;193(7):3398-3408.
314. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007;178(5):3186-3197.
315. van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(3):330-337.
316. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998;16(1):111-135.
317. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009;229(1):152-172.
318. Klaus SJ, Pinchuk LM, Ochs HD, et al. Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. *J Immunol*. 1994;152(12):5643-5652.
319. Johnson-L  ger C, Christensen J, Klaus GG. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *Int Immunol*. 1998;10(8):1083-1091.

320. Vandenborre K, Van Gool SW, Kasran A, Ceuppens J L and Boogaerts MA, Vandenberghe P. Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. *Immunology*. 1999;98(3):413-421.
321. Halliday N, Williams C, Kennedy A, et al. CD86 is a selective CD28 ligand supporting FoxP3⁺ regulatory T cell homeostasis in the presence of high levels of CTLA-4. *Front Immunol*. 2020;11:600000.
322. Zheremyan EA, Ustiugova AS, Uvarova Aksinya N and Karamushka NM, et al. Differentially activated B cells develop regulatory phenotype and show varying immunosuppressive features: a comparative study. *Front Immunol*. 2023;14:1178445.
323. Maghrebi O, Belghith M, Jeridi C, et al. B cells specific CpG induces high IL-10 and IL-6 expression in vitro in neuro-behçet's disease. *Cells*. 2022;11(8):1306.
324. Chan HY, Moldenhauer LM, Groome HM, Schjenken JE, Robertson SA. Toll-like receptor-4 null mutation causes fetal loss and fetal growth restriction associated with impaired maternal immune tolerance in mice. *Sci Rep*. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-95213-1
325. Schjenken JE, Glynn DJ, Sharkey DJ, Robertson SA. TLR4 signaling is a major mediator of the female tract response to seminal fluid in mice. *Biol Reprod*. 2015;93(3). doi:10.1095/biolreprod.114.125740
326. Benner M, Ferwerda G, Joosten I, van der Molen RG. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Hum Reprod Update*. 2018;24(4):393-415. doi:10.1093/humupd/dmy012
327. Inversetti A, Zambella E, Guarano A, Dell'Avanzo M, Di Simone N. Endometrial Microbiota and Immune Tolerance in Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3). doi:10.3390/ijms24032995
328. Vojtech L, Zhang M, Davé V, et al. Extracellular vesicles in human semen modulate antigen-presenting cell function and decrease downstream antiviral T cell responses. *PLoS One*. 2019;14(10). doi:10.1371/journal.pone.0223901
329. Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Calvete JJ, Peña Vega FJ, Roca J. Seminal plasma: Relevant for fertility? *Int J Mol Sci*. 2021;22(9). doi:10.3390/ijms22094368
330. Shen Q, Wu X, Chen J, et al. Immune Regulation of Seminal Plasma on the Endometrial Microenvironment: Physiological and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci*. 2023;24(19). doi:10.3390/ijms241914639
331. Goldfarb IT, Adeli S, Berk T, Phillippe M. Fetal and Placental DNA Stimulation of TLR9: A Mechanism Possibly Contributing to the Pro-inflammatory Events During Parturition. *Reprod Sci*. 2018;25(5):788-796. doi:10.1177/1933719117728798
332. León-Martínez D, Lynn T, Abrahams VM. Cell-free fetal DNA impairs trophoblast migration in a TLR9-dependent manner and can be reversed by hydroxychloroquine. *J Reprod Immunol*. 2023;157(103945):103945.

333. Calleja-Agius J, Jauniaux E, Pizzey AR, Muttukrishna S. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. *Hum Reprod.* 2012;27(2):349-357.
334. Paradisi R, Porcu E, Venturoli S, Maldini-Casadei M, Boni P. Maternal serum levels of pro-inflammatory cytokines in missed and threatened abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50(4):302-308.
335. Soykan Sert Z, Bülbül R. Can the systemic immune-inflammation index be a useful marker for the prediction of a missed abortion in the first trimester of pregnancy? *Dubai Med J.* Published online December 2022:1-6.
336. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med.* 1999;190(1):75-89.
337. Miwa N, Hayakawa S, Miyazaki S, et al. IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon- γ increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod.* 2006;11(12):865-870. doi:10.1093/molehr/gah246
338. Bachy V, Williams DJ, Ibrahim MAA. Altered dendritic cell function in normal pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2008;78(1):11-21. doi:10.1016/j.jri.2007.09.004
339. Jin LP, Fan DX, Zhang T, Guo PF, Li DJ. The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2011;66(4):270-278. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.00997.x
340. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol.* 2023;14:1161067.
341. Nova-Lamperti E, Fanelli G, Becker PD, et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4⁺ T-cell responses. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep20044