

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Tamara M. Kovačević

**UTICAJ IMUNOGLOBULINA SA  
SPECIFIČNOŠĆU ZNAČAJNOM ZA  
ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM NA  
EKSPRESIJU KARAKTERISTIČNIH  
PROTEINA I INVAZIVNOST  
EKSTRAVILUSNOG TROFOBLASTA  
ČOVEKA *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2013

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Тамара М. Ковачевић

**УТИЦАЈ ИМУНОГЛОБУЛИНА СА  
СПЕЦИФИЧНОШЋУ ЗНАЧАЈНОМ ЗА  
АНТИФОСФОЛИПИДНИ СИНДРОМ НА  
ЕКСПРЕСИЈУ КАРАКТЕРИСТИЧНИХ  
ПРОТЕИНА И ИНВАЗИВНОСТ  
ЕКСТРАВИЛУСНОГ ТРОФОБЛАСТА  
ЧОВЕКА *in vitro***

докторска дисертација

Београд, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tamara M. Kovačević

**THE EFFECT OF IMMUNOGLOBULINS  
WITH SPECIFICITY SIGNIFICANT FOR  
ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME ON  
EXPRESSION OF CHARACTERISTIC  
PROTEINS AND INVASIVENESS OF  
HUMAN EXTRAVILLOUS  
TROPHOBLAST *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

## **KOMISIJA**

**dr Ljiljana Vićovac Panić**, mentor

naučni savetnik Instituta za primenu nuklearne energije - INEP Univerziteta u Beogradu

**dr Milena Kataranovski**, mentor

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**dr Ljiljana Radojčić**, član

vanredni profesor Medicinskog fakulteta-VMA Univerziteta odbrane u Beogradu

**dr Irena Živković**, član

naučni saradnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume „TORLAK“

## ZAHVALNICA

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Ljiljani Vićovac Panić, zato što me je uvela u svet reproduktivne biologije i nauke uopšte. Zahvaljujem joj se na velikom naučnom i stručnom znanju kojim me je usmeravala u naučnom radu, kao i na svakodnevnom poverenju, podršci i razumevanju.*

*Mentoru prof. dr Mileni Kataranovski, dugujem veliku zahvalnost na korisnim savetima i sugestijama, kao i na inspirativnim predavanjima na osnovnim studijama.*

*Zahvaljujem se prof. dr Ljiljani Radojčić na korisnim savetima i sugestijama, kao i na dugogodišnjoj saradnji na projektima realizovanim u Odeljenju za biologiju reprodukcije, Instituta INEP.*

*Zahvaljujem se dr Ireni Živković, na naučnoj saradnji i brojnim korisnim savetima u vezi sa izradom ove doktorske disertacije.*

*Takođe želim da izrazim svoju zahvalnost dr Ljiljani Dimitrijević, rukovodiocu Odseka za istraživanje i razvoj Instituta „Torlak“, na MAb 26 antitelu koje je korišćeno u eksperimentalnom radu u ovoj doktorskoj disertaciji.*

*Zahvaljujem se dr Sonji Pavlović, dr Nataši Tošić i kolegama iz laboratorije 01 Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na gostoprimstvu i eksperimentalnoj pomoći u PCR metodologiji, kao i na velikom znanju koje nesebično dele sa studentima.*

*Milici, Ivani, Žani, Danici i Nikoli, hvala na pomoći i podršci prilikom izrade ove doktorske disertacije. Njima, kao i drugim kolegama Instituta INEP, se zahvaljujem na divnoj radnoj atmosferi.*

*Zahvaljujem se Jeleni, Ici, Sanji, Ivani, Ivani M., Kristini, Ani i Milici uz koje je sve bilo lakše i lepše.*

*Posebnu zahvalnost dugujem roditeljima, bratu i Zakiju koji su uvek tu za mene. Hvala vam na bezuslovnoj ljubavi, razumevanju i optimizmu.*

## REZIME

Antifosfolipidni sindrom (APS) je autoimunsko oboljenje koje klinički karakteriše ponavljana pojava tromboze i/ili poremećaji u trudnoći, a serološki prisustvo antifosfolipidnih antitela (aPL). Prisustvo aPL predstavlja najčešći stečeni faktor rizika za gubitak trudnoće i komplikacije u trudnoći. Smatra se da je glavni antigen u APS  $\beta_2$ -glikoprotein I ( $\beta_2$ GPI), evolutivno konzerviran protein, koji je po sekvenci i konformaciji sličan velikom broju proteina mikrobskog porekla. Do nedavno se smatralo da su tromboza i inflamacija u placenti najznačajniji mehanizmi kojima aPL ostvaruju patološki uticaj na tok i ishod trudnoće, ali novija saznanja ukazuju da aPL antitela direktno utiču na proces placentacije.

U ovom radu je ispitivan uticaj imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom na ekstravilusni trofoblast čoveka *in vitro*. Studija je obuhvatila ispitivanje efekata poliklonskih aPL koja su prečišćena iz seruma pacijenata sa APS i monoklonskog antitela 26 (MAb 26) prema tetanus toksoidu, koje poseduje i specifičnost prema  $\beta_2$ GPI. Time je omogućeno bolje razumevanje uloge heterogene populacije aPL koja je prisutna u serumu pacijenata, kao i antitela jasno definisane specifičnosti prema  $\beta_2$ GPI u procesima koji dovode do defektne placentacije.

Ispitivanjem *in vitro* uticaja imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za APS na invazivnost ekstravilusnog trofoblasta čoveka, testom ćelijske invazije u Matrigel, pokazano je da aPL+ IgG i MAb 26 smanjuju invazivnost trofoblasta. Uočeni efekat nije bio posledica smanjene vijabilnosti i proliferacije ćelija, niti povećane apoptoze. Oba ispitivana antitela su uticala na ekspresiju karakterističnih proteina koji imaju ulogu u ćelijskoj invazivnosti. Efekat aPL+ IgG na trofoblastnu invaziju je posredovan inhibitornim delovanjem na matriksnu metaloproteinazu (MMP)-9, integrinske subjedinice  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  i sekretovani galektin-1, dok MAb 26 svoje efekte ostvaruje inhibitornim delovanjem na MMP-2 i -9,  $\alpha_1$  subjedinicu integrina i galektin-1.

Vezivanje aPL+ IgG i MAb 26 za ekstravilusnu trofoblastnu ćelijsku liniju HTR-8/SVneo, kao i vezivanje MAb 26 za citotrofoblast (CT) izolovan iz placentе prvog trimestra, je potvrđeno imunocitohemijskom analizom. Ispitivana antitela se vezuju za ćelije trofoblasta i u odsustvu egzogenog  $\beta_2$ GPI i drugih faktora prisutnih u fetalnom telećem serumu, ukazujući na ekspresiju endogenog  $\beta_2$ GPI ili još uvek

nedefinisanog receptora koji bi mogao da direktno vezuje antitela. Iz literature je poznata internalizacija aPL u pojedine ćelijske tipove (endotelne ćelije, makrofage, sinciotrofoblast), što predstavlja nov koncept na osnovu koga bi aPL mogla ostvariti patološki efekat. Analiza HTR-8/SVneo ćelija nakon inkubacije sa aPL+ IgG i MAb 26 je pokazala lokalizaciju antitela unutar ćelija. Broj ćelija kod kojih se uočava intracelularna lokalizacija imunoglobulina, kao i intenzitet bojenja, u direktnoj je korelaciji sa dužinom trajanja inkubacije. Internalizacija MAb 26 u HTR-8/SVneo ćelije je aktivan proces koji zavisi od temperature na kojoj se inkubacija odvija, što ukazuje na endocitozu kao mogući mehanizam internalizacije antitela. Sa druge strane, odsustvo internalizacije imunoglobulina koji su korišćeni kao kontrola (aPL- IgG i mIgG) ukazuje da proces internalizacije verovatno nije posredovan Fc receptorom. Nije uočena zavisnost od tipa ekstravilusnih trofoblastnih ćelija za internalizaciju MAb 26. Ispitivanje lokalizacije MAb 26 u odnosu na odeljke unutar ćelije, primenom odgovarajućih markera, je potvrdilo unutarćelijsko prisustvo MAb 26. Nakon 2 h najveća blizina u detektovanim signalima kod dvojnog bojenja je uočena za MAb 26 i kaveolin-1, kao i klatrin, što ukazuje na lokalizaciju MAb 26 neposredno uz ćelijsku membranu.

Dobijeni rezultati predstavljaju napredak u razumevanju mehanizama i molekula uključenih u patološke promene placente pod delovanjem aPL. Pored toga, biološki efekat izazvan korišćenim anti- $\beta_2$ GPI antitelom, obzirom na način njegovog nastanka posredstvom molekulske mimikrije, otvara nove pravce u istraživanju autoimunosti.

**Ključne reči:** antifosfolipidna antitela, anti- $\beta_2$ -glikoprotein I antitela,  $\beta_2$ -glikoprotein I, antifosfolipidni sindrom, placenta, molekulska mimikrija, izolovani citotrofoblast, HTR-8/SVneo, ćelijska invazija, internalizacija.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biologija reprodukcije

**UDK broj:** 618.36:[616-092:616-097] (043.3)

## ABSTRACT

Antiphospholipid antibody syndrome (APS) is an autoimmune multisystemic disorder clinically characterized by recurrent thrombosis and pregnancy morbidity, and presence of antiphospholipid antibodies (aPL) in sera of affected individuals. Presence of aPL is the most common acquired risk factor for pregnancy loss and pregnancy-related complications. Main antigen in APS is  $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI), an evolutionarily conserved protein, which shows similarity in sequence and conformation with a number of microbial proteins. Until recently, thrombosis and inflammation were thought to be the main aPL related mechanisms leading to complications in pregnancy. More recent findings, however, indicate that aPL can exert direct effects of on placentation.

This research was conducted to investigate the effects of immunoglobulins with specificity significant for APS on human extravillous trophoblast *in vitro*. The study included polyclonal aPL derived from APS patients (aPL+ IgG) and monoclonal antibody 26 (MAb 26) raised to tetanus toxoid with additional  $\beta_2$ GPI specificity, originating from conformational similarity between tetanus toxoid and  $\beta_2$ GPI.

Effects of immunoglobulins with specificity important for APS on human extravillous trophoblast invasion *in vitro* were investigated using Matrigel invasion assay. The test showed that both aPL+ IgG and MAb 26 induce a decrease in trophoblast invasiveness, which did not result from a change in cell viability, proliferation, or apoptosis. Both antibodies, however, did affect the expression of characteristic proteins that are known to act as mediators of cell invasion. The aPL+ IgG induced decrease in trophoblast invasiveness was accompanied by reduction in matrix metalloproteinase (MMP)-9, integrin subunits  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  and  $\beta_1$ , and in levels of secreted galectin-1. Similarly, the inhibitory effect of MAb 26 on trophoblast invasion was accompanied by a decrease in MMP-2 and -9, integrin subunit  $\alpha_1$ , and galectin-1 expression.

Immunocytochemistry revealed binding of both aPL+ IgG and MAb 26 to extravillous trophoblast cells. The observed binding was persistent in the absence of exogenous  $\beta_2$ GPI and other factors derived from fetal calf serum used for cell culture. That implies expression of endogenous  $\beta_2$ GPI, or putative receptor(s) that can bind aPL



directly. Internalization of aPL in to various cell types (endothelial cells, macrophages, syncytiotrophoblast) has been reported, and represents a novel mechanism of aPL induced effects. Analysis of both types of trophoblast cells following incubation with aPL+ IgG and MAb 26 revealed intracellular localization of the antibodies in some of the cells. Number of cells with intracellular localization of the antibodies, as well as the staining intensity, positively correlated with the duration of incubation. MAb 26 internalization into HTR-8/SVneo cell was active and temperature dependent process indicating involvement of endocytosis. The absence of significant internalization of immunoglobulins used as control (aPL- IgG or mIgG) implies that the process was not Fc receptor mediated. No cell type specific difference was observed in the internalization of MAb 26. Further analysis of MAb 26 cell localization, using confocal microscopy and specific markers of cell compartments, confirmed the intracellular presence of MAb 26. After 2 h of exposure the highest proximity of the signal to the MAb 26 was determined for caveolin-1 and clathrin coated vesicles, indicating that MAb 26 localizes near inner side of cell membrane.

The original results presented in this study contribute to the understanding of the mechanisms and molecules that may be involved in defective placentation induced by aPL. In addition, the effectiveness of anti- $\beta_2$ GPI antibody used, likely derived through molecular mimicry, opens new avenues in research of autoimmunity.

**Key words:** antiphospholipid antibodies, anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies,  $\beta_2$ -glycoprotein I, antiphospholipid syndrome, placenta, molecular mimicry, isolated cytotrophoblast, HTR-8/SVneo, cell invasion, internalization.

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Biology of reproduction

**UDC number:** 618.36:[616-092:616-097] (043.3)

## SKRAĆENICE

- ABC - avidin biotin peroksidazni kompleks
- aCL - antikardiolipinska antitela
- APĆ - antigen prezentujuće ćelije
- aPL - antifosfolipidna antitela
- aPL+ IgG - imunoglobulini izolovani iz seruma pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom
- aPL- IgG - imunoglobulini izolovani iz seruma zdravih davalaca krvi, neimuni IgG
- APS - antifosfolipidni sindrom
- BeWo - horiokarcinomska ćelijska linija BeWo
- BSA - goveđi serumski albumin
- CCP - proteini koji učestvuju u kontroli komplementa
- CELISA - imunoenzimski test na ćelijama
- CK - citokeratin
- CMV - citomegalovirus
- cPLA - citosolna fosfolipaza A2
- CT - citotrofoblast
- DAB - 3, 3' diamino benzidin tetrahidrohlorid
- DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol
- DEPC - dietilpirokarbonat
- DMEM/F12 - Dulbecco-va modifikacija Eagle-ovog medijuma sa Ham-ovom hranljivom mešavinom
- EGF - epidermalni faktor rasta
- EVT - ekstravilusni trofoblast
- FCS - fetalni teleći serum
- Gal - galektin
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodonik peroksid
- HB-EGF - heparin-vezujući epidermalnom faktoru rasta-slični faktor rasta
- HBV - virus hepatitisa B
- hCG - humani horionski gonadotropin
- HCV - virus hepatitisa C

HGF - faktor rasta hepatocita  
HIV - virus humane imunodeficijencije  
HLA - humani leukocitni antigen  
HRP - peroksidaza iz rena  
HPL - humani placentni laktogen  
HTR-8/SVneo - humana ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija  
ICAM-1 - intraćelijski adhezioni molekul-1  
Ig - imunoglobulin  
IGF - insulinu-sličan faktor rasta  
IL - interleukin  
IRAK - kinaza aktivirana receptorom za interleukin-1  
iRNK - informaciona ribonuklinska kiselina  
JAR - horiokarcinomska ćelijska linija JAr  
Jeg3 - horiokarcinomska ćelijska linija Jeg3  
LA - lupus koagulans antitela  
LBPA - lizobisfosfatidna kiselina  
LPS - lipopolisaharid  
MAb 26 - anti-tetanus toksoid antitelo 26 sa specifičnošću prema beta-2-glikoproteinu I  
MAPK - mitogen-aktivirana protein kinaza  
MHC - glavni kompleks tkivne kompatibilnosti  
mIgG - mišji imunoglobulin G, neimuni IgG  
MMP - matriksna metaloproteinaza  
MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromid  
MyD88 - faktor mijeloidne diferencijacije 88  
NFκB - nuklearni faktor κB  
PAGE - poliakrilamidna gel elektroforeza  
PBS - fosfatni pufer  
PCR - lančana reakcija polimeraze  
PP - ponavljani pobačaji  
RPMI 1640 - medijum za gajenje HTR-8/SVneo ćelija  
RT-PCR - lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije  
RQ-PCR - PCR u realnom vremenu

SDS- natrijum-dodecil-sulfat  
SLE - sistemski lupus eritematosus  
ST - sinciotrofoblast  
STAT - signalni transducer i aktivator transkripcije  
TF - tkivni faktor  
TGF - transformišući faktor rasta  
TIMP - tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza  
TLR - Toll-slični receptori  
TNF - faktor nekroze tumora  
TTd - tetanus toksoid  
VCAM-1 - vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1  
VCM - vanćelijski matriks  
VT - vilusni trofoblast  
VZV - varičela zoster virus  
 $\beta_2$ GPI - beta-2-glikoprotein I

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Autoimunost</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Narušavanje tolerancije i nastanak autoimunskih oboljenja .....	3
1.1.2. Uloga genetskih i sredinskih faktora u nastanku autoimunskih oboljenja ....	4
<b>1.2. Antifosfolipidni sindrom</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. Istorijat, klinički i dijagnostički parametri .....	7
1.2.2. Antifosfolipidna antitela .....	10
1.2.2.1. Prirodna antifosfolipidna antitela .....	10
1.2.2.2. Patološka antifosfolipidna antitela .....	11
1.2.2.3. Beta-2-glikoprotein I: struktura, funkcija i interakcija sa antifosfolipidnim antitelima .....	15
1.2.3. Uloga genetskih i sredinskih faktora u nastanku APS .....	18
1.2.3.1. Značaj molekularne mimikrija u nastanku APS .....	19
1.2.4. Uloga aPL u patogenezi APS .....	21
1.2.4.1. Vaskularna tromboza .....	21
1.2.4.2. Reproktivni neuspeh .....	23
1.2.4.2.1. Tromboza i inflamacija kao mehanizmi reproduktivnog neuspeha u APS .....	23
1.2.4.2.2. Defektna placentacija .....	25
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>34</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>37</b>

<b>3.1. Imunoglobulini sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom</b>	<b>38</b>
3.1.1. Izolovanje imunoglobulina G iz seruma metodom natrijum sulfatne precipitacije	38
3.1.2. Anti-tetanus toksoid mišje monoklonsko antitelo 26 (MAb 26) sa specifičnošću prema beta-2-glikoproteinu I	38
<b>3.2. Tkivo</b>	<b>39</b>
<b>3.3. Kultura ćelija</b>	<b>40</b>
3.3.1. Kultura i izolovanje citotrofoblasta prvog trimestra	40
3.3.2. Ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo	41
<b>3.4. Antitela</b>	<b>41</b>
<b>3.5. Imunocitohemija</b>	<b>44</b>
3.5.1. Vezivanje imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom za ćelije trofoblasta čoveka, <i>in vitro</i>	44
3.5.2. Ispitivanje uticaja imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom na ekspresiju markera proliferacije i apoptoze u ćelijama trofoblasta čoveka, <i>in vitro</i>	45
3.5.2.1. Tretmani ćelija	45
3.5.2.2. Imunocitohemijsko bojenje ćelija	45
<b>3.6. SDS - poliakrilamidna elektroforeza (SDS PAGE) i Western blot</b>	<b>46</b>
3.6.1. Tretmani ćelija i priprema ćelijskih lizata	46
3.6.2. SDS PAGE i Western blot	47
<b>3.7. Zimografsko određivanje aktivnosti enzima</b>	<b>48</b>
3.7.1. Tretmani ćelija	48
3.7.2. Zimografija	48

<b>3.8. Analiza ekspresije iRNK .....</b>	<b>49</b>
3.8.1. Tretmani ćelija .....	49
3.8.2. Izolovanje RNK i sinteza komplementarne DNK .....	49
3.8.3. PCR analiza u realnom vremenu (RQ-PCR) .....	50
<b>3.9. Detekcija i kvantitacija ćelija (MTT test) .....</b>	<b>51</b>
3.9.1. Tretmani ćelija .....	51
3.9.2. MTT test .....	51
<b>3.10. Test ćelijske invazije <i>in vitro</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>3.11. Lokalizacija imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom u <i>in vitro</i> interakciji sa ćelijama trofoblata. ....</b>	<b>53</b>
3.11.1. Vremenska zavisnost vezivanja .....	53
3.11.2. Temperaturna zavisnost vezivanja .....	54
3.11.3. Ispitivanje internalizacije imunoglobulina Western blot metodom. ....	54
3.11.4. Protočna citofluorimetrija .....	55
3.11.5. Ispitivanje internalizacije primenom imunoglobulina obeleženih jodom 125 .....	56
3.11.5.1. Radioaktivno obeležavanje MAb 26 i mIgG jodom 125 .....	56
3.11.5.2. Tretmani ćelija i merenje radioaktivnosti na ćelijama nakon tretmana .....	56
<b>3.12. Statistička analiza .....</b>	<b>57</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>58</b>

<b>4.1. Uticaj imunoglobulina prečišćenih iz seruma pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (aPL+ IgG) na ekstravilusni trofoblast čoveka, <i>in vitro</i> .....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Vezivanje aPL+ IgG za HTR-8/SVneo ćelije .....	59
4.1.2. Uticaj aPL+ IgG na na invaziju trofoblasta, <i>in vitro</i> .....	60
4.1.3. Uticaj aPL+ IgG na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu HTR-8/SVneo ćelija .....	61
4.1.4. Uticaj imunoglobulina prečišćenih iz seruma pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (aPL+ IgG) na proteine invazivnog trofoblasta....	65
4.1.4.1. Uticaj aPL+ IgG na nivoe matriksinih metaloproteinaza-2 i -9 .....	65
4.1.4.2. Uticaj aPL+ IgG ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha_1$ , $\alpha_5$ i $\beta_1$ .....	66
4.1.4.3. Uticaj aPL+ IgG na ekspresiju galektina-1 .....	67
<b>4.2. Uticaj <math>\beta_2</math>-glikoprotein I specifičnog antitela MAb 26 na ekstravilusni trofoblast čoveka, <i>in vitro</i> .....</b>	<b>69</b>
4.2.1. Vezivanje MAb 26 za izolovani citotrofoblast i HTR-8/SVneo ćelije .....	69
4.2.2. Uticaj MAb 26 na invaziju trofoblasta, <i>in vitro</i> .....	71
4.2.2. Uticaj MAb 26 na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu HTR-8/SVneo ćelija .....	72
4.2.4. Uticaj MAb 26 na proteine invazivnog trofoblasta .....	75
4.2.4.1. Uticaj MAb 26 na nivoe matriksinih metaloproteinaza-2 i -9 .....	75
4.2.4.2. Uticaj MAb 26 na ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha_1$ , $\alpha_5$ i $\beta_1$ .....	76
4.2.4.3. Uticaj MAb 26 na ekspresiju galektina-1 .....	78
<b>4.3. Lokalizacija imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom u <i>in vitro</i> interakciji sa ćelijama trofoblasta .....</b>	<b>79</b>



4.3.1. Detekcija aPL+ IgG na HTR-8/SVneo ćelijama nakon inkubacije .....	79
4.3.2. Detekcija MAb 26 na HTR-8/SVneo ćelijama nakon inkubacije.....	82
4.3.3. Ispitivanje uticaja temperature na ćelijsku lokalizaciju MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama .....	89
4.3.4. Ispitivanje ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama na osnovu detekcije markera intracelularnih organela .....	90
4.3.5. Procena internalizacije - broj ćelija kod kojih se uočava intracelularna lokalizacija MAb 26 .....	92
4.3.6. Detekcija MAb 26 na ćelijama izolovanog citotrofoblasta nakon inkubacije .....	96
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>98</b>
<b>5.1. Uticaj imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom na ekstravilusni trofoblast čoveka <i>in vitro</i> .....</b>	<b>99</b>
<b>5.2. Lokalizacija imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom u <i>in vitro</i> interakciji sa ćelijama trofoblasta .....</b>	<b>108</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>115</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>118</b>
<b>PRILOG</b>	

# UVOD

## 1.1. Autoimunost

Imunski sistem se sastoji od ćelija i molekula uključenih u odbranu organizma od stanih supstanci, prvenstveno mikroorganizama. Sposoban je da prepozna i pokrene odgovor na ogroman broj raznovrsnih stranih antigena, uz održavanje tolerancije prema sopstvenim antigenima. Razlikovanje imunogena (uglavnom antigeni mikroskog porekla) od tolerogena (sopstveni antigeni) zavisi od prirode antigen-specifičnog limfocita, prirode antigena i načina na koji je prezentovan imunskom sistemu (Janeway, 1992). Neophodno je razlikovati pojam autoimunskog oboljenja od autoreaktivnosti i autoimunosti. Određeni bazalni nivo autoreaktivnosti je uvek prisutan i ima fiziološki značaj za normalno funkcionisanje imunskog sistema (Dighiero i sar., 1999), dok autoimunska oboljenja nastaju nakon narušavanja tolerancije i pokretanja imunskog odgovora prema sopstvenim antigenima, što dovodi do oštećenja tkiva.

Prvi korak u uspostavljanju tolerancije je negativna selekcija T ćelija koja se odvija u timusu (centralna tolerancija), kada nezreli T limfociti koji sa visokim aviditetom prepoznaju sopstvene antigene bivaju eliminisani u procesu koji se označava kao klonska delecija (Kappler i sar., 1987; Sha i sar., 1988; Starr i sar., 2003). Međutim, jedan broj autoreaktivnih T ćelija ipak preživljava selekciju i dospeva u perifernu cirkulaciju (Semana i sar., 1999; Bouneaud i sar., 2000). Na perifernom nivou tolerancija se najčešće ostvaruje ignorisanjem sopstvenih antigena (Alferink i sar., 1998; Kurts i sar., 1998). Ukoliko dođe do prepoznavanja (auto)antigena, bez odgovarajućeg nivoa kostimulatora eksprimiranih na antigen-prezentujućim ćelijama, tolerancija se održava putem funkcionalne inaktivacije (anergije) T limfocita (Jenkins i sar., 1987), putem izmene repertoara receptora za citokine i hemokine (Charles i sar., 1999; Walker i Abbas, 2002) ili putem smrti zrelih T ćelija (Watanabe-Fukunaga i sar., 1992; Strasser i Pellegrini, 2004). Važnu ulogu u održavanju periferne tolerancije imaju i regulatorne T ćelije. One nastaju mehanizmom tzv. klonske diverzije do koje dolazi kada su osim sopstvenih u timusu prikazani i strani antigeni (Itoh i sar., 1999; Jordan i sar., 2001), a imaju ulogu u suprimiranju imunskog odgovora produkovanjem anti-inflamatornih citokina, modulisanjem aktivacije i funkcije dendritičnih ćelija i direktnom interakcijom sa autoreaktivnim limfocitima (Shevach, 2009).

Tolerancija na nivou B ćelija i produkcije antitela obezbeđuje odsustvo imunskog odgovora prema lipidima, polisaharidima i nukleinskim kiselinama. Uspostavljanje centralne tolerancije B ćelija se odvija u kostnoj srži kroz umiranje (Nossal i Beverley, 1975) ili promenu repertoara autoreaktivnih B ćelija (Gay i sar., 1993; Tiegs i sar., 1993). Periferna tolerancija zrelih B limfocita se ostvaruje putem anergije, nakon izlaganja viskim koncentracijama sopstvenog antigena u perifernom limfnom tkivu (Nossal i Pike 1980; Goodnow i sar., 1988; Cambier i sar., 2007). Tolerantnost B ćelija prema proteinima se ostvaruje zahvaljujući regulatornoj ulozi T pomoćničkih ćelija i prisustvu inhibitornih receptora koji, nakon što dođe do prepoznavanja autoantigena, pokreću signalnu kaskadu koja rezultira smanjenim pragom odgovora B ćelija (Abbas, 2012).

### **1.1.1. Narušavanje tolerancije i nastanak autoimunskih oboljenja**

Narušavanje tolerancije prema sopstvenim antigenima je preduslov za nastanak autoimunskih bolesti. Ove bolesti su uglavnom heterogene i multifaktorske, a klinički se ispoljavaju znatno kasnije od započinjanja autoimunskih reakcija. Pripadaju poremećajima imunskog sistema koji se označavaju kao bolesti preosetljivosti i koje nastaju kao posledica odgovora imunskog sistema na sopstvene antigene ili nekontrolisanog odgovora na strane antigene (Abbas i sar., 2012).

Antitela doprinose razvoju autoimunskih bolesti direktno ili u formi imunokompleksa. Ukoliko su usmerena prema ćelijskim ili tkivnim antigenima, imunski odgovor se ispoljava na mestu lokalizacije antigena. Patološki efekti imunskih kompleksa zavise od mesta depozicije i odlika su sistemskih imunskih oboljenja. Do oštećenja tkiva dolazi usled opsonizacije i fagocitoze sopstvenih ćelija, aktivacije sistema komplementa i zapaljenske reakcije nakon depozicije antitela (Davidson i Diamond, 2001). Osim toga, vezivanje antitela za normalne ćelijske receptore ili druge proteine može ometati njihovu fiziološku funkciju (Takasu i sar., 1997; Merrill i sar., 1999; Salemin i sar., 2000; Balasa i sar., 2000).

T limfociti dovode do oštećenja tkiva izazivanjem kasne hipersenzitivnosti i direktnim ubijanjem ćelija (O'Garra i sar., 1997; Thomas i Kay, 2000). Većina

autoimunskih oboljenja nastaju kao posledica udruženih efekata antitelima i T-ćelijama posredovane autoimunosti (Abbas i sar., 2012).

### 1.1.2. Uloga genetskih i sredinskih faktora u nastanku autoimunskih oboljenja

Autoimunske bolesti, izuzimajući reumatoidni artritis i autoimuni tireoiditis, su pojedinačno retke, ali posmatrano u celini pogađaju približno 5 procenata populacije u zapadnim zemljama (Sinha i sar., 1990; Jacobson i sar., 1997). Većina autoimunskih bolesti ima multigenetsku osnovu. Ona je zasnovana na genskim polimorfizmima koji se javljaju i u zdravoj populaciji, ali u odgovarajućem genetičkom miljeu, tj. u kombinaciji sa polimorfizmima u drugim genima, daju abnormalni fenotip. Polimorfizmi u pojedinim genima, kao što su geni koji kodiraju za glavni kompleks histokompatibilnosti (MHC molekule), su veći nosioci rizika u poređenju sa drugim genima (Klein i Sato, 2000). U većini slučajeva genski lokus nosi rizik za više od jednog oboljenja. Genetska predispozicija predstavlja rezultat neravnoteže protektivnih gena i gena koji su nosioci rizika, što se ispoljava različitom osetljivošću organa i dostupnošću autoantigena (Encinas i Kuchroo, 2000).

Uz genetsku predispoziciju, u nastanku autoimunskih poremećaja bitnu ulogu imaju okidači poreklom iz spoljašnje ili unutrašnje sredine: infektivni agensi, gubitak regulatornih ćelija, hormonalni status jedinke i vakcinacija (Noseworthy i sar., 2000; Dahlquist, 1998; Lahita, 1999).

Mikrobski agensi imaju potencijal da dovedu do narušavanja tolerancije putem molekulske mimikrije, poliklonske aktivacije, širenjem epitopa ili oslobađanjem prethodno preuzetih antigena (**Slika 1**) (Oldstone i sar., 1991; Ohashi i sar., 1991; Lehmann i sar., 1992; Behar i Porcelli, 1995; Horwitz i sar., 1998). Molekulska mimikrija se, uz poliklonsku aktivaciju, smatra jednim od osnovnih mehanizama nastanka autoimunskih bolesti. U njenoj osnovi je unakrsna reaktivnost antitela koja nastaje kao posledica sličnosti (na nivou sekvence ili konformacije) antigena mikrobskog porekla i autoantigena (Wucherpfennig i Strominger, 1995; Roudier i sar., 1996). Neki od primera autoimunskih oboljenja koja u osnovi narušavanja tolerancije imaju molekulsku mimikriju su navedeni u **Tabeli I**. Kod pomenutih mehanizama se ističe održavanje imunskog odgovora prema sopstvenim antigenima, najverovatnije

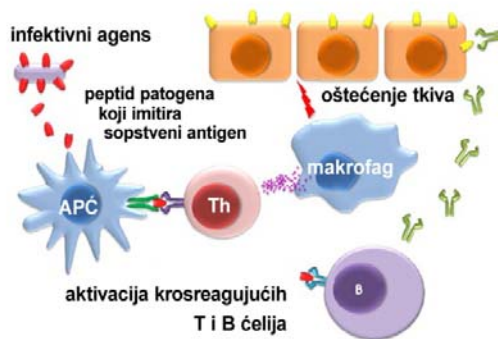
putem poliklonske aktivacije, tj. antigen-nespecifične stimulacije ćelija imunskog sistema (Albert i Inman, 1999).

**Tabela I. Primeri autoimunskih oboljenja koja u osnovi narušavanja tolerancije prema sopstvenim antigenima imaju molekulsku mimikriju**

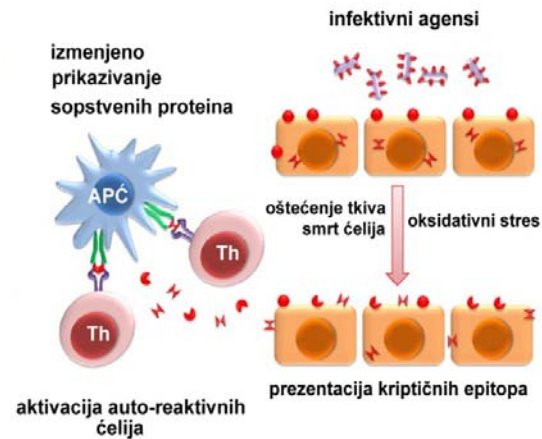
<i>Oboljenje</i>	<i>Imunogen</i>	<i>Autoantigen</i>	<i>Referenca</i>
<b>Guillain-Barre-ov sindrom</b>	lipopolisaharid <i>Camphylobacter jejuni</i>	gangliozyd	Yuki, 1999
<b>Dijabetes melitus tip I</b>	peptidi poreklom od Coxsackie virusa P2-C	dekarboksilaza glutaminske kiseline	Kukreja i Maclaren, 2000
<b>Multipla skleroza</b>	peptidi poreklom od Epstain- Barr virusa, virusa influence tipa A i humanog papiloma virusa	mijelin bazni protein	Wucherpfennig i Strominger, 1995

Pored infektivnih aganesa, i neinfektivni agensi se mogu ponašati poput haptena i inicirati autoimunski odgovor (Arndt i sar., 1999). Razvoju autoimunskih oboljenja doprinose i poremećaji u imunskom sistemu, kao što su disregulacija idiotipske mreže (Jerne, 1984) i poremećaji u apoptozi limfocita (Emlen i sar., 1994).

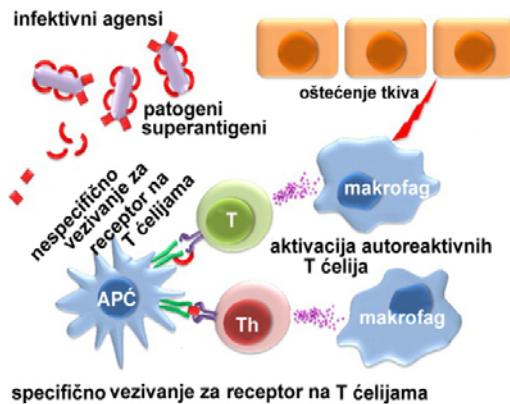
### A Molekularna mimikrija



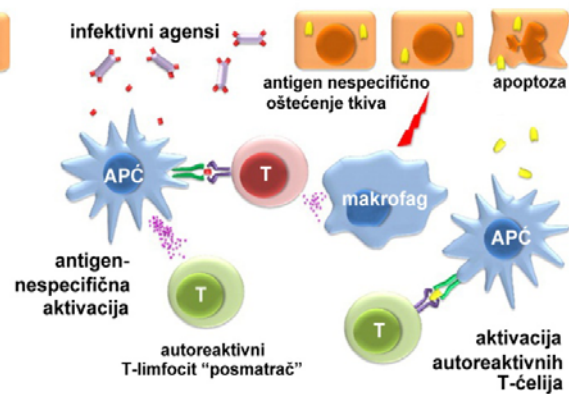
### B Promene u proteinu, kriptični antigeni



### C Superantigeni



### D Efekat "posmatrača"



**Slika 1. Uloga infektivnih agenasa u nastanku autoimunosti:** **A.** Značaj sličnosti u strukturi i/ili funkciji između proteina mikroskog porekla i sopstvenih antigena u narušavanju tolerance T i B-ćelija; **B.** Infektivni agensi mogu dovesti do oštećenja tkiva što rezultira „širenjem epitopa“ (*epitope spreading*), kada do tada zaštićeni autoantigeni bivaju preuzeti od strane APC i prezentovani T-limfocitima; **C.** Prisustvo patogenih antigena može rezultirati nastankom superantigena koji stimulišu autoreaktivne T-ćelije; **D.** Prisustvo patogenih antigena može indirektno dovesti do antigen-nespecifične aktivacije autoreaktivnih T-ćelija i posledičnog oštećenja tkiva, na osnovu tzv. „efekta posmatrača“ (*bystander activation*)  
APC-antigen prezentujuća ćelija, Th (*helper T cell*)- pomoćnička T-ćelija (preuzeto, sa izmenama, iz Sfriso i sar., 2010).

Pojava autoimunskih bolesti je dovedena u vezu sa nizom vakcina: protiv tetanusa, difterije, polia, malih boginja, rekombinantne vakcine protiv hepatitisa B, vakcine protiv rubele, zauški i drugih. Veza između vakcinacije i pojave autoimunskih bolesti nije nedvosmisleno utvrđena, ali se pretpostavlja da bi kod pojedinih osoba ulogu u narušavanju tolerancije mogla da ima molekulska mimikrija antigena korišćenog u vakcini. Imunizacija kod podložnih osoba može dovesti do nastanka i depozicije imunskih kompleksa i posledičnog oštećenja tkiva, a ne može se isključiti ni značaj adjuvansa korišćenog pri vakcinaciji, koji bi mogao dovesti do poliklonske aktivacije (Shoenfeld i Aron-Maor, 2000).

## **1.2. Antifosfolipidni sindrom**

### **1.2.1. Istorijat, klinički i dijagnostički parametri**

Antifosfolipidni sindrom (APS) je multisistemsko autoimunska oboljenje koje klinički karakteriše ponavljana pojava tromboze i/ili poremećaji u trudnoći, a serološki prisustvo antifosfolipidnih antitela (aPL). Njegova učestalost u populaciji iznosi oko 1% (Hughes i sar., 1986).

Prvo otkriveno antifosfolipidno antitelo je bilo komplement fiksirajuće antitelo detektovano kod pacijenata sa sifilisom (Wassermann i sar., 1906). Pangborn (1941) je pokazao da je reč o antitelu koje reaguje sa mitohondrijalnim fosfolipidom-kardiolipinom. Masovno korišćenje testa zasnovanog na detekciji antikardiolipinskih antitela (aCL) u dijagnostici sifilisa je ukazalo na postojanje velikog broja pacijenata sa sistemskim lupusom eritematosusom (SLE) koji imaju prisutna antikardiolipinska antitela bez drugih seroloških markera sifilisa (Haserick i Long, 1952). Imunotest na čvrstoj fazi, razvijen 1983. godine, je omogućio osetljiviju i precizniju detekciju aCL kod pacijenata sa SLE i rezultati testiranja su posledično doveli u vezu aCL sa lupus antikoagulans antitelima (LA) i trombozom (Harris i sar., 1983). Početkom devedesetih godina XX veka dve grupe istraživača otkrile su da vezivanje pojedinih aCL za kardiolipin zavisi od prisustva fosfolipid-vezujućeg proteina iz plazme,  $\beta_2$ -glikoproteina I ( $\beta_2$ GPI) (Galli i sar., 1990; McNeil i sar., 1990). To je omogućilo razlikovanje aCL poreklom od pacijenata koji imaju SLE ili APS, kao  $\beta_2$ GPI-zavisnih, od antitela koja se



detektuju kod pacijenata sa sifilisom ili drugim infektivnim bolestima, čije vezivanje za kardiolipin ne zavisi od prisustva  $\beta_2$ GPI kao kofaktora, ili je čak inhibirano u njegovom prisustvu (Hunt i sar., 1992). Takođe su otkrivena autoantitela koja direktno vezuju  $\beta_2$ GPI, u odsustvu fosfolipida (Arvieux i sar., 1991).

Pored vaskularne tromboze i poremećaja u trudnoći, APS obuhvata i tzv. ne-kriterijumske manifestacije koje uključuju komplikacije u trudnoći (preeklampsija, hipertenzija), trombocitopeniju, neurološke manifestacije (horea, epilepsija, migrena, demencija i druge), oboljenja srčanog zalistka i druge kardiološke manifestacije, kožne manifestacije (livedo retikularis, gangrenozni ulceri, ulceri na nogama i sl.) i ubrzan nastanak ateroskleroze (Cervera i sar., 2002; Erkan i Lockshin, 2010).

U okviru antifosfolipidnog sindroma mogu se razlikovati dva podtipa. „Primarni“ APS se definiše kao antifosfolipidni sindrom kod pacijenata kod kojih nije prisutno još neko oboljenje. „Sekundarni“ APS je udružen sa drugim oboljenjima, bilo da su autoimunska ili ne. Zasebnu grupu čini tzv. „katastrofični“ APS, koji karakteriše istovremena pojava trombotičnih epizoda koja zahvata bar tri organska sistema i često ima smrtni ishod (Hughes i sar., 1986).

Prva jedinstvena preporuka za dijagnozu APS je bio Sapiro (*Sapporo*) kriterijum, donet 1998. godine (Wilson i sar., 1999). Revizija postojećih kriterijuma je urađena 2006. godine i donete su nove smernice koje su navedene u **Tabeli II** (Miyakis i sar., 2006).

Antifosfolipidna antitela se detektuju ELISA testovima (za detekciju aCL, anti- $\beta_2$ GPI, anti-protrombin i drugih antitela) i testom produžene koagulacije (LA test) (Fischetti i sar., 2005; Pierangeli i sar., 2007). Pored značaja aPL za dijagnostiku antifosfolipidnog sindroma, važno je da antitela i direktno učestvuju u patogenezi. Još uvek je otvoreno pitanje da li različite podpopulacije aPL imaju drugačije patološke manifestacije i klinički značaj.

**Tabela II: Kriterijumi prema kojima se dijagnostikuje APS (Miyakis i sar., 2006)**

<b>Klinički kriterijumi</b>
<p><b>Vaskularna tromboza</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <math>\geq 1</math> kliničke epizode koja uključuje arterijsku, vensku ili trombozu malih krvnih sudova, u bilo kom tkivu ili organu</li><li>▪ tromboza mora biti histopatološki potvrđena</li><li>▪ tromboza mora biti prisutna bez značajnih dokaza inflamacije u zidu krvnog suda</li></ul> <p><b>Komplikacije u trudnoći</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <math>\geq 1</math> neobjašnjene smrti morfološki normalnog fetusa (utvrđeno prethodnim ultrazvučnim pregledom ili direktnim pregledom fetusa) u ili pre 10-te nedelje gestacije</li><li>▪ <math>\geq 1</math> prevremenog rođenja morfološki normalnog fetusa pre 34-te nedelje gestacije zbog eklampsije, teške preeklampsije ili placentne insuficijencije</li><li>▪ <math>\geq 3</math> neobjašnjena uzastopna pobačaja pre 10-te nedelje gestacije, gde kao uzrok mogu biti isključeni anatomske ili hromozomalni poremećaji majke i oca</li></ul>
<b>Laboratorijski kriterijumi</b>
<p><b>Lupus antikoagulans</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ prisutan u plazmi u <math>\geq 2</math> slučaja međusobno vremenski udaljena bar 12 nedelja, detektovano u skladu sa smernicama Internacionalnog Društva za Trombozu i Hemostazu</li></ul> <p><b>Antikardiolipinska antitela IgG i/ili IgM izotipa</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ prisutna u serumu ili plazmi u srednjem ili visokom titru u više od dva slučaja međusobno vremenski udaljena bar 12 nedelja, mereno standardizovanim ELISA testom</li></ul> <p><b>Anti-<math>\beta_2</math>GPI antitela IgG i/ili IgM izotipa</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ prisutna u visokom titru u serumu ili plazmi u <math>\geq 2</math> slučaja međusobno vremenski udaljena bar 12 nedelja, mereno standardizovanim ELISA testom</li></ul>

Terapija tromboze u APS obuhvata antikoagulantne lekove, varfarin, nefrakcionisani heparin i heparin niske molekulske mase i traje doživotno. Varfarin i aspirin se koriste i kao preventivna terapija kako bi se sprečile tromboembolijske komplikacije kod pacijenata. Kod pacijentkinja sa APS, terapija izbora tokom trudnoće su nefrakcionisani heparin, heparin niske molekulske mase i aspirin (Lim i sar., 2006b).

### **1.2.2. Antifosfolipidna antitela**

Antifosfolipidna antitela su heterogena antitela IgG, IgM i IgA klase. Usmerena su direktno prema anjonskim fosfolipidima i/ili prema fosfolipid/proteinskom kompleksu. Fosfolipidni antigeni su fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidiletanolamin i lizobisfosfatidna kiselina (LBPA) (Schick i sar., 1976; Galve-de Rochemonteix i sar., 2000). Glavni antigen u antifosfolipidnom sindromu je  $\beta_2$ GPI, koji deluje kao neophodni kofaktor za vezivanje fosfolipida i kao nezavisni antigen (Galli i sar., 1990; McNeil i sar., 1990; Gharavi i sar., 1992). Vezivanje antifosfolipidnih antitela za fosfolipide može zavisiti od aneksina V, protrombina i proteina Z, a antitela mogu biti usmerena i direktno prema ovim proteinima. Antifosfolipidna antitela prisutna u cirkulaciji pacijenata su mešavina antitela usmerenih prema  $\beta_2$ GPI, koja zajedno sa antitelima na protrombin čine više od 90% aPL, i fosfolipidne epitope koji su stabilizovani interakcijom sa drugim proteinima (Roubey, 1994).

#### **1.2.2.1. Prirodna antifosfolipidna antitela**

Učestalost ne-patoloških aPL kod zdravih osoba je 4,7% kod mlađih osoba i čak do 52% kod starijih (Durrani i sar., 2002). Javljaju se kao prolazna posledica infekcije (Chamley i sar., 1991) ili mogu biti konstantno prisutna u niskom titru kod pacijenata sa hroničnim infekcijama (HIV, HBV, HCV i dr.), malignitetom i kod pacijenata na hemodijalizi (Greaves i sar., 2000). Prirodna aPL većinom pripadaju IgM izotipu i direktno se vezuju za neutralne i anjonske fosfolipide, bez potrebe za kofaktorom (Greaves i sar., 2000). Na osnovu prisustva aPL (prvenstveno anti- $\beta_2$ GPI) sekretujućih memorijskih B ćelija kod zdravih osoba (Lieby i sar., 2003) pretpostavlja se da bar deo antitela pripada repertoaru prirodnih polireaktivnih antitela prisutnih u cirkulaciji pre

izlaganja antigenu (Merrill i sar., 2006; von Landenberg i sar., 2007). Fiziološku ulogu najverovatnije ostvaruju u urođenom imunskom odgovoru (von Landenberg i sar., 2007) i uklanjanju apoptotskih tela (Abdel-Monem i sar., 2010). Način na koji prirodna aPL mogu doprineti patogenezi APS je otvoreno pitanje. Najviše je dokaza da infekcija doprinosi sazrevanju njihovog afiniteta, dovodeći do otvaranja zaštićenih epitopa na  $\beta_2$ GPI i stimulacije T ćelija (Cheng i Chamley, 2008).

#### 1.2.2.2. Patološka antifosfolipidna antitela

Patološka aPL se izdvajaju po sposobnosti da:

- vezuju negativno naelektrisane fosfolipide u prisustvu serumskih kofaktora
- direktno se vezuju za različite serumske proteine, najčešće  $\beta_2$ GPI i protrombin
- produžavaju vreme fosfolipid zavisne koagulacije u testovima kao što je lupus antikoagulans (LA) test (Miyakis i sar., 2006).

Značaj patoloških aPL za nastanak tromboze i reproduktivni neuspeh je potvrđen u brojnim studijama na životinjama. Pasivni transfer aPL i anti- $\beta_2$ GPI antitela kod miševa dovodi do povećanja tromba, smanjenja fertiliteta, fekunditeta, smanjene težine mladunaca na rođenju i drugih komplikacija koje se sreću u APS (Ziporen i sar., 1997; Radway-Bright i sar., 1999; Pierangeli i sar., 2000; Blank i sar., 2007).

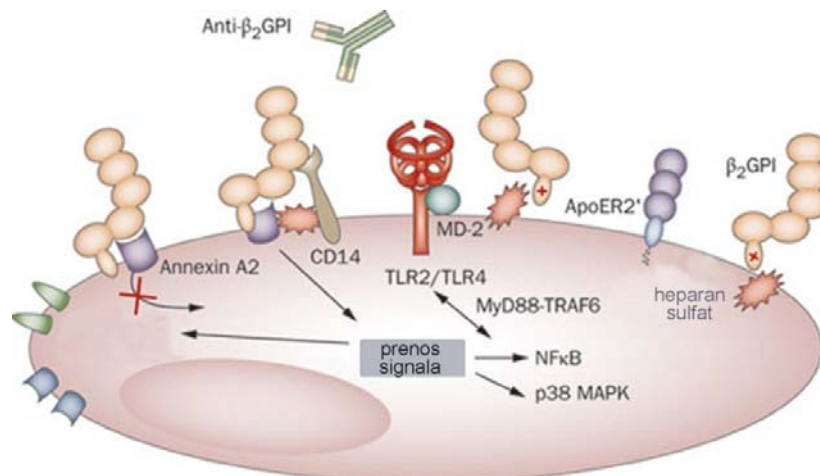
U osnovi patoloških procesa koji su aPL-posredovani je njihova direktna interakcija sa monocitima (Lopez-Pedrerera i sar., 2006), endotelnim ćelijama (Pierangeli i sar., 1999), trombocitima (Vega-Ostertag i sar., 2004), trofoblastom (Mulla i sar., 2010) i endometrijalnim ćelijama (Di Simone i sar., 2010). Kao potencijalni receptori do sada su identifikovani Toll-slični receptori (TLR) 2, 4 i 8 (Satta i sar 2007; Raschi i sar., 2003; Döring i sar., 2010; Alard i sar., 2010), aneksin A2 (Zhang i McCrae, 2005), glikoprotein 1b $\alpha$  (Shi i Sottile, 2006) i LRP8 (ApoER2), član familije receptora za LDL (van Lummel i sar., 2005) (**Slika 2**).

Glikoprotein 1b $\alpha$  i ApoER2 su receptori za aPL na trombocitima. Vezivanje aPL za trombocit zahteva eksternalizaciju anjonskih fosfolipida i vezivanje za dimerizovani  $\beta_2$ GPI (Lutters i sar., 2003). Vezivanje aPL za receptor dovodi do aktivacije p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase*) i dalje fosforilacije cPLA2

(*cytosolic phospholipase A2*). U prenos signala se zatim uključuju i druge MAPK: p44 (ERK-1) i p42 (ERK-2) (Pierangeli i sar., 2004).

Antifosfolipidna antitela se za endotelne ćelije i monocite vezuju preko Toll-sličnih receptora i aneksina A2 (Vega-Ostertag i sar., 2007; Zhang i McCrae, 2005). Aneksin A2 vezuje  $\beta_2$ GPI /anti- $\beta_2$ GPI komplekse na oba ćelijska tipa, što posledično dovodi do aktivacije ćelija i ekspresije prokoagulantnog fenotipa (Zhang i McCrae, 2005). Aneksin A2 nema transmembranski domen i kao koreceptor u transdukciji signala učestvuje TLR4, a dalji prenos signala ide preko MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) (Raschi i sar., 2003). U kompleksu još učestvuju i kalretikulin i nukleolin (Allen i sar., 2012). MyD88 je molekul adapter koji učestvuje u prenosu signala preko TLR i receptora za IL-1, pošto poseduju homologe citoplazmatske domene (TIR domen) uključene u signalnu transdukciju (Raschi i sar., 2003). Uloga TLR je otkrivena zahvaljujući tome što anti- $\beta_2$ GPI antitela aktiviraju IRAK put prenosa signala (*IL-1 receptor-activated kinase*), preko TIR domena TLR (Sorice i sar., 2007). Aktivacija monocita i ekspresija tkivnog faktora do koje dolazi nakon vezivanja aPL za TLR4 je posredovana aktivacijom p38 MAPK i translokacijom nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Raschi i sar., 2003; Vega-Ostertag i sar., 2007).

Uloga TLR2 u vezivanju aPL i prenos signala preko MyD88 je pokazan na fibroblastima (Satta i sar., 2007), endotelnim ćelijama i monocitima (Satta i sar., 2011). Uloga TLR7 i TLR8 u vezivanju aPL je pokazana na monocitima i dendritičnim ćelijama (Hurst i sar., 2009).



**Slika 2. Shematski prikaz najvažnijih receptora za anti- $\beta_2$ GPI antitela i puteva prenosa signala koji se njihovim vezivanjem pokreću (preuzeto iz Meroni i sar., 2011)**

Podaci o membranskim receptorima za aPL na trofoblastu i decidualnim ćelijama, kao i putevima transdukcije signala su oskudni. Aneksin A2 i TLR4 su eksprimirani na membrani trofoblasta i Mulla i saradnici (2009) su pokazali da aPL preko TLR4/MyD88 puta pokreću inflamatorni odgovor u placenti koji dovodi do smanjenog preživljavanja trofoblasta. Ista grupa je pokazala da anti- $\beta_2$ GPI antitela u *in vitro* uslovima smanjuju trofoblastnu migraciju tako što smanjuju sekreciju IL-6 i aktivaciju signalnog transducera i aktivatora transkripcije 3 (STAT3) (Mulla i sar., 2010). Primena antitela koja blokiraju funkciju različitih receptora samo delimično smanjuje vezivanje anti- $\beta_2$ GPI antitela i posledičnu aktivaciju decidualnih ćelija (Borghini i sar., 2007), što ukazuje da više od jednog receptora posreduje u vezivanju anti- $\beta_2$ GPI antitela za decidualne ćelije i trofoblast.

Antifosfolipidna antitela su detektovana u unutarćelijskim organelama pojedinih ćelijskih tipova (Galve-de Rochemonteix i sar., 2000; Kajiwara i sar., 2007; Chen i sar., 2009), što predstavlja nov koncept interakcije aPL sa ciljnim ćelijama i ostvarivanja patološkog efekta. Internalizacija (auto)antitela, međutim, nije nov fenomen. Otkrića da autoantitela prema ribonukleoproteinu prodiru u žive limfocite i reaguju sa antigenima koji se nalaze u nukleusu (Alarcón-Segovia i sar., 1978), opisana je internalizacija brojnih autoantitela u različite životinjske i ćelije čoveka, njihova interakcija sa intracelularnim antigenima i posledično narušavanje ćelijskih funkcija

(Ruiz-Argüelles i sar., 2003). Osim eksperimentalnih *in vitro* dokaza, internalizacija je i klinički potvrđen proces. Imunoglobulinske depozicije unutar nukleusa živih epidermalnih ćelija se uočavaju pregledom biopsija kože pacijenata koji imaju bolest vezivnog tkiva (Golan i sar., 1997). Posledice penetracije autoantitela su najčešće dozna zavisne i mogu biti različite. Internalizacija može biti bez posledica, ali može dovesti i do promena u ekspresiji pojedinih antigena, promena u intracelularom transportu proteina i apoptoze (Alarcón-Segovia i sar., 1995; Portales-Pérez i sar., 1998; Dunoyer-Geindre i sar., 2001). Ćelije verovatno tolerišu internalizovana antitela do određene količine, nakon čega dolazi do patoloških promena (Niu i sar., 2004).

Iako ima neosporan patogenetski potencijal, brojne studije ukazuju da je sposobnost antitela da ulaze u žive ćelije normalan proces. Opšta karakteristika takvih antitela je njihova polireaktivnost, tj. sposobnost da sa niskim afinitetom vezuju različite antigene. Analize familije gena koji kodiraju za VH region pojedinih antitela sa specifičnošću prema dvolančanoj DNK su pokazala da antitela koja imaju sposobnost ulaska u ćelije nastaju ranije tokom života u odnosu na antitela koja tu sposobnost nemaju, kao i da nisu podložna mutacionim i rekombinacionim promenama (Dersimonian i sar., 1987; Mahmoudi i sar., 1997; Mouthon i sar., 1996; Sanz i sar., 1989). Internalizacija antitela u limfocite u većini slučajeva vodi do apoptoze što ukazuje na njihovu ulogu u perifernoj deleciji autoreaktivnih klonova (Alarcón-Segovia i sar., 1979; Alarcón-Segovia i sar., 1996).

Internalizacija je uglavnom aktivan metabolički proces koji zavisi od trajanja i temperature inkubacije i tipa ćelije. U većini slučajeva nije nađen dokaz o uključenosti Fc receptora (Golan i sar., 1993; Ma i sar., 1993; Abedi-Valuggerdi i sar., 1999; Deng i sar., 2000). Mehanizmi kojima antitela prolaze kroz ćelijsku membranu, a zatim i kroz citosol, do antigena u različitim organelama još uvek nisu u potpunosti poznati. Jedno od mogućih objašnjenja je da ćelije ekspimiraju membranske antigene koje antitela mogu prepoznati specifično ili na osnovu ukrštene reaktivnosti (Ruiz-Argüelles i sar., 1998).

Antifosfolipidna antitela su detektovana u kasnim endozomima endotelnih ćelija (Galve-de Rochemonteix i sar., 2000). Pokazano je da  $\beta_2$ GPI internalizuje u endotelne ćelije, sam ili u kompleksu sa anti- $\beta_2$ GPI antitelima. U oba slučaja se detektuje na membrani ćelije i u perinuklearnim vezikulama koje odgovaraju kasnom endozomu

(Dunoyer-Geindre i sar., 2001). Internalizacija aPL u makrofage dovodi do nastanka penastih ćelija koje učestvuju u formiranju aterosklerotskih plaka.  $\beta_2$ GPI može ući u makrofage sam, u kompleksu sa oksidovanim LDL-om ili u kompleksu sa anti- $\beta_2$ GPI antitelima. Podaci o ulasku aPL u trofoblast su oskudni, sa izuzetkom studije Chen i sar. (2009) u kojoj je uočena internalizacija aPL u sinciotrofoblast, bez detaljnijeg objašnjenja samog mehanizma.

### **1.2.2.3. Beta-2-glikoprotein I: struktura, funkcija i interakcija sa antifosfolipidnim antitelima**

$\beta_2$ GPI je otkriven 1961. godine (Schultze i sar.), period njegovog intenzivnog proučavanja počinje otkrićem uloge u patogenezi antifosfolipidnog sindroma (McNeil i sar., 1990; Galli i sar., 1990).  $\beta_2$ GPI najvećim delom nastaje u jetri (Rioche i Massayeff, 1974), ali se sintetise i u placenti (Chamley i sar., 1997). U cirkulaciji je prisutan u koncentraciji 50-500  $\mu\text{g/ml}$  (1-10  $\mu\text{M}$ ) (Rioche i Massayeff, 1974). Nešto viši nivoi  $\beta_2$ GPI su uočeni kod pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (Vlachoyiannopoulos i sar., 1992).

Tačna uloga  $\beta_2$ GPI još uvek nije u potpunosti rasvetljena. Osobe deficijentne u ovom proteinu su zdrave (Haupt i sar., 1968), a mišji model deficijencije za  $\beta_2$ GPI ne pokazuje poseban fenotip (Sheng i sar., 2001; Robertson i sar., 2004). Ipak, ukrštanje miševa deficijentnih za  $\beta_2$ GPI sa normalnim miševima daje manji udeo  $\beta_2$ GPI deficijentnog potomstva nego što bi se to moglo očekivati, što ukazuje na potencijalnu ulogu u embrionalnom razvoju (Robertson i sar., 2004). Na osnovu antikoagulantnog (Nimpf i sar., 1985; Ieko i sar., 1999) i antifibrinolitičkog dejstva (Yasuda i sar., 2004), kao i zbog toga što učestvuje u uklanjanju apoptotičnih ćelija (Price i sar., 1996) smatra se da  $\beta_2$ GPI učestvuje u hemostazi. Uloga  $\beta_2$ GPI u urođenom imunskom odgovoru je nedavno otkrivena, pri čemu je nađeno da  $\beta_2$ GPI uklanjanja LPS i atenuira ćelijski i citokinski odgovor na infekciju Gram negativnim bakterijama (Ađar i sar., 2011).

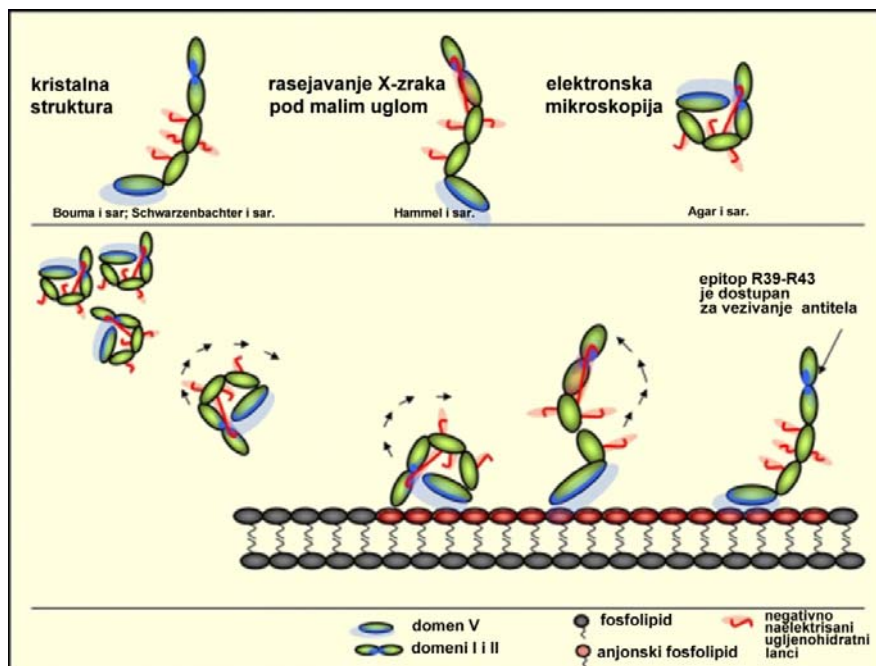
$\beta_2$ GPI pripada familiji proteina koji učestvuju u kontroli komplementa (*complement control proteins*, CCP.) Čine ga 326 aminokiselina organizovanih u pet ponavljajućih domena (CCP, *sushi* domeni). Svaki domen sadrži oko 60 aminokiselina i dve evolutivno konzervirane disulfidne veze. Sekvence prva četiri domena su



konzervirane, dok je peti domen izrođen i sadrži umetak od 25 ak. Domen V određuje afinitet  $\beta_2$ GPI za anjonske fosfolipide i druge negativno naelektrisane molekule i površine (DNK, heparin, oksidovani LDL, endotelne ćelije i dr.) (Lozier i sar., 1984; Kristensen i sar., 1991).  $\beta_2$ GPI čoveka ima 4 mesta N-glikozilacije i jedno mesto O-glikozilacije, u domenima III i IV. Glikani čine oko 20 % mase proteina (Bouma i sar., 1999). Ukupna molekulska masa  $\beta_2$ GPI iznosi oko 50 kDa (Lozier i sar., 1984).

Kristalna struktura  $\beta_2$ GPI pokazuje da se prva četiri domena nalaze u opruženom položaju, dok je peti domen postavljen pod pravim uglom u odnosu na njih (struktura „udice”, odnosno slova J). Fosfolipid vezujuće mesto se nalazi sa donje strane domena V i sastoji se iz 14 pozitivno naelektrisanih aminokiselina i fleksibilne hidrofobne petlje koja može da se umetne u membranu (Schwartzbacher i sar., 1999). Postojanje ove strukture je potvrđeno direktnom vizuelizacijom prečišćenog  $\beta_2$ GPI primenom elektronske mikroskopije (Ađar i sar., 2010). Data studija je pokazala da  $\beta_2$ GPI postoji u dve različite konformacije, u zavisnosti od intrakcije sa anjonskim površinama. U plazmi,  $\beta_2$ GPI je zastupljen kao cirkularni protein, zahvaljujući interakciji domena I i V, što omogućava održavanje tolerogenosti ovog proteina. Nakon kontakta i interakcije sa anjonskim površinama, protein se otvara i zauzima prethodno opisani oblik „udice”. Konformacija u obliku slova S koja je uočena rasejavanjem X zraka pod malim uglom (Hammel i sar., 2002) najverovatnije predstavlja posledicu interakcije  $\beta_2$ GPI i okolne vodene sredine u rastvoru i ne može se detektovati elektronskom mikroskopijom (Ađar i sar., 2010) (**Slika 3**).

Domen I  $\beta_2$ GPI je odgovoran za *in vitro* vezivanje aPL (Iverson i sar., 1998; Ioannou i sar., 2007, 2009). De Laat i de Groot (2011) su pokazali da je dovoljno imunizovati miševe samo domenom I da bi došlo do nastanka patoloških aPL. Finom epitopskom analizom utvrđeno je da kriptični epitop za vezivanje aPL čine pozitivno naelektrisane aminokiseline od glicina na poziciji 40 do argininina 43 (Iverson i sar., 1998; de Laat i sar., 2005; Ioannou i sar., 2007), dve asparaginske kiseline na pozicijama 8 i 9, kao i interlinker sekvenca koja povezuje domene I i II. aPL ne mogu da se vežu za denaturisani  $\beta_2$ GPI, što ukazuje da ta tri regiona zajedno čine konformacioni epitop (Ioannou i sar., 2007).



**Slika 3. Struktura beta-2-glikoproteina I.** Vezivanje  $\beta_2$ GPI za anjonske fosfolipide na membrani ćelije se ostvaruje preko regiona pozitivno naelektrisanih aminokiselina u domenu V, što dovodi do konformacione promene kojom antitelo-vezujući epitop na domenu I postaje dostupan za interakciju. Preuzeto iz de Laat i de Groot (2011).

Na osnovu literaturnih podataka pretpostavljen je sledeći mehanizam interakcije  $\beta_2$ GPI i aPL:  $\beta_2$ GPI cirkuliše u plazmi u zatvorenom obliku koji ima nizak afinitet za anjonske površine. Kada dođe u kontakt sa ćelijama na kojima su (privremeno) izloženi anjonski fosfolipidi, vezuje se za njih što dovodi do konformacione promene, otvaranja proteina i zauzimanja strukture „udice”. Time se do tada zaštićeni epitop u domenu I otkriva i za njega se vezuju antifosfolipidna antitela. Vezivanje antitela dodatno stabilizuje otvoreni oblik  $\beta_2$ GPI. Tako nastali kompleks pokazuje visok afinitet (i do 100 puta veći) za ćelijske receptore i anjonske fosfolipide. Ovaj koncept „otvaranja kriптиčnog epitopa” (Wang i sar., 2000; Merrill i sar., 2001) nije u suprotnosti sa do tada važećim pretpostavkama da  $\beta_2$ GPI mora postići određenu gustinu antigena, prvenstveno kroz dimerizaciju, da bi se aPL vezala za njega (Arnout i sar., 1998; Lutters i sar., 2001). Dimerizacija nije neophodan preduslov, ali s obzirom na to da su aPL antitela niskog aviditeta, sigurno da pozitivno doprinosi vezivanju aPL.

### 1.2.3. Uloga genetskih i sredinskih faktora u nastanku APS

Epidemiološke studije su pokazale da postoje međuetničke varijacije u učestalosti i kliničkim komplikacijama antifosfolipidnog sindroma (Wilson, 2000). U osnovi ovih razlika mogu biti genetski i/ili sredinski faktori koji određuju podložnost pojedinca ili populacije antifosfolipidnom sindromu. U prilog genetske osnove APS idu prikazi povećane incidence aPL kod članova porodice pacijenata sa SLE (Exner i sar., 1980), kao i pojava aPL kod parova jednojajčanih blizanaca (Cevallos i sar., 1994). Na osnovu rezultata segregacione analize urađene na sedam porodica sa visokom učestalošću APS pretpostavljeno je dominantno ili ko-dominantno nasleđivanje (Goel i sar., 1999).

Glavni kandidat geni u većini studija su geni HLA II klase antigena (genski lokus koji ima veliki doprinos u razvoju autoimunosti),  $\beta_2$ -glikoprotein I (glavni proteinski antigen u APS) i geni koji kodiraju proteine uključene u formiranje tromba (najčešći patološki ishod u APS). Za sada najveću korelaciju sa nastankom bolesti pokazuje valin→leucin (247) polimorfizam u petom domenu  $\beta_2$ GPI (Hirose i sar., 1999; Prieto i sar., 2003). Jasna determinacija pojedinačnih genetskih markera je otežana visokom heterogenošću antigena, antitela i samih patoloških mehanizma u antifosfolipidnom sindromu. Do sada urađene studije na životinjama (Gharavi i sar., 1989; Hashimoto i sar., 1992) nisu uspele da izdvoje kandidat gene odgovorne za nastanak APS.

Infekcije su glavni sredinski faktor koji doprinosi patogenezi i toku antifosfolipidnog sindroma (Levy i sar., 2006). Međutim, ne može se isključiti značaj vakcinacija, terapije pojedinim lekovima i prisustva maligniteta. U literaturi su poznati slučajevi razvoja autoimunskih bolesti u periodu od nekoliko nedelja pa do nekoliko godina nakon vakcinacije (Watanabe i Onda, 2001; Molina i Shoenfeld, 2005; Martinuč Porobič i sar., 2005; Dimitrijević i sar., 2012). Lekovi kao što su hloropromazin, amoksicilin, propranolol, kinin, oralni kontraceptivi i drugi su dovedeni u vezu sa pojavom aPL, ali, kao i u slučaju vakcinacija, definitivna potvrda je izostala (Levy i sar., 2006). Prisustvo aPL je primećeno i kod pacijenata sa tumorima, što ima poseban značaj u razvoju tromboze i katastrofičnog APS kod tih pacijenata (Tincani i sar., 2010).

### 1.2.3.1. Značaj molekulske mimikrije u nastanku APS

Infekcije su najučestaliji sredinski okidač APS. Pokazana je jasna veza između infekcije citomegalovirusom (CMV), parvovirusom B19, virusom humane imunodeficijencije (HIV), hepatitis B virusom (HBV), varičela zoster virusom (VZV) i drugima i pojave antifosfolipidnog sindroma (García-Carrasco i sar., 2009).

Važna osobenost autoantitela koja ih razlikuje od antitela dobijenih namernom imunizacijom je sposobnost da prepoznaju ciljni antigen ne samo poreklom iz vrste iz koje i sama potiču, već i iz drugih vrsta. Razmere ove ukrštene reaktivnosti između vrsta zavise od konzerviranosti antigena (Tan, 1991), a  $\beta_2$ GPI je evolutivno visoko konzerviran protein. Homologija  $\beta_2$ GPI čoveka i miša je čak 85%, pri čemu su najviše očuvani disulfidni mostovi u CCP domenima, vezivno mesto za fosfolipide i vezivno mesto koje prepoznaju antifosfolipidna antitela (Ažar i sar., 2011). Zbog evolutivne očuvanosti i sličnosti sa brojnim infektivnim agensima, kao glavni mehanizam gubitka tolerogenosti  $\beta_2$ GPI se nameće molekulska mimikrija.

Imunizacija miševa sintetskim peptidom (GDKV) koji se sastoji iz 15 aminokiselina koje odgovaraju fosfolipid-vezujućem mestu na domenu V  $\beta_2$ GPI izaziva pojavu aPL (Gharavi i sar., 1999a) koja u *in vitro* i *in vivo* modelima pokazuju patološki efekat (Gharavi i sar., 1998). Sličan rezultat je dobijen nakon imunizacije miševa drugim peptidima mikrobskog porekla koji su funkcionalno ili po sekvenci slični PL-vezujućem mestu  $\beta_2$ GPI (Gharavi i sar., 1999b). Korišćeni TIFI i VITT peptidi iz CMV, TADL peptid iz adenovirusa i SGDF poreklom iz *Bacillus subtilis* su bili sposobni da izazovu produkciju aPL i anti- $\beta_2$ GPI antitela u miševima. Antitela nastala nakon imunizacije TIFI peptidom su u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima pokazala patološki efekat karakterističan za APS (Gharavi i sar., 2002, 2004). Dalja ispitivanja su uključivala imunizaciju miševa intaktnim patogenima čiji proteini sadrže heksapeptid (TLRVYK) koji specifično prepoznaju anti- $\beta_2$ GPI antitela. Imunizacija sa *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* i tetanus toxoidom je rezultirala u nastanku anti-TLRVYK i anti- $\beta_2$ GPI specifičnih antitela, čiji je transfer u BALB/c miševima (soj koji nije prirodno sklon autoimunskim bolestima) dovodio do APS-specifičnih manifestacija (Blank i sar., 2002).

Tetanus toksoid (TTd, hemijski derivat tetanus toksina) je po konformaciji sličan interleukinu  $1\alpha$ , a po peptidnoj sekvenci  $\beta_2$ -glikoproteinu I i lamininu (Blank i sar., 2004), što ga se izdvaja kao mogućeg činioca u razvoju autoimunosti. Nađeno je da hiperimunizacija miševa sa TTd dovodi do pojave anti- $\beta_2$ GPI antitela, s tim da količina produkovanih antitela, kao i njihove karakteristike, zavise od predtretmana životinja i od adjuvansa korišćenog prilikom imunizacije (Blank i sar., 2002; Stojanović i sar., 2009; Živković i sar., 2012). Iako postoje podaci da anti- $\beta_2$ GPI antitela koja nastaju kao posledica infekcije ne učestvuju u patogenezi APS (Hunt i sar., 1992), imunizacija miševa peptidnom sekvencom koju dele TTd i treći domen  $\beta_2$ GPI (TLRVYK) dovodi do nastanka anti- $\beta_2$ GPI antitela sa punim patološkim potencijalom (Blank i sar., 2002). Studija u kojoj su analizirana antitela sekretovana od strane hibridoma dobijenih fuzijom splenocita miša hiperimunizovanog sa TTd i ćelija mijeloma (Šeatović i sar., 2004), pokazala je postojanje antitela prema TTd koje ima ukrštenu specifičnost prema  $\beta_2$ GPI (MAb 26) (Inić-Kanada i sar., 2009a). Dalja analiza MAb 26 je potvrdila da ono poseduje brojne karakteristike anti- $\beta_2$ GPI antitela, uključujući vezivanje za  $\beta_2$ GPI izolovan iz seruma čoveka, vezivanje za  $\beta_2$ GPI koji je imobilisan na  $\gamma$  ozračenju plastici ili je u kompleksu sa anjonskim fosfolipidima, vezivanje za ćelije u apoptozi i druge karakteristike. Pasivni transfer ovog antitela u gravidne mišice je dovođio do APS-sličnih patoloških promena (Živković i sar., 2011). *In vivo* efekti na miševima BALB/c soja su uključivali resorpciju fetusa, smanjenje težine fetusa i smanjenje broja živorođenih mladunaca (smanjenje fertiliteta). Efekat je bio nešto drugačiji na C57BL/6 soju gde je prvenstveno uočeno smanjenje fekunditeta, što je verovatno uslovljeno različitim genetičkim poreklom sojeva (Živković i sar., 2011). Hiperimunizacija tetanus toksoidom i administracija MAb 26 su u datim uslovima imali isti *in vivo* efekat, što dodatno potvrđuje značaj molekulske mimikrije TTd i  $\beta_2$ GPI u razvoju APS (Živković i sar., 2011).

Osim strukturne, konformacione ili funkcionalne sličnosti sa  $\beta_2$ GPI koja može biti osnov za narušavanje njegove tolerogenosti (Albert i sar., 1999; Séne i sar., 2009), infektivni agensi mogu delovati kao adjuvansi koji vezivanjem za  $\beta_2$ GPI dovode do promene u njegovoj konformaciji i otkrivanja kriptičnih epitopa (Ađar i sar., 2011).

#### **1.2.4. Uloga aPL u patogenezi APS**

APS se definiše kao jedinstveno oboljenje iako se njegove biološke i kliničke karakteristike drastično razlikuju kod vaskularne tromboze u odnosu na komplikacije u trudnoći. Tromboza se javlja u svim tipovima vaskularnih komplikacija i predstavlja zajednički klinički parametar, ali nema isključivu odgovornost za patološke promene koje se dešavaju u trudnoći, već su opisani dodatni mehanizmi (Giannakopoulos i sar., 2007; Pierangeli i sar., 2008; de Laat i sar., 2008). Uloga aPL u patogenezi APS se ostvaruje kroz sledeće efekte antitela:

- aktivaciju endotelnih ćelija (Meroni i sar., 2000; Pierangeli i sar., 1999, 2001, 2004), trombocita (Nojima i sar., 1999) i monocita (Kornberg i sar., 1994) koja dovodi do prokoagulantnog fenotipa i u osnovi je trombotskih događaja prouzrokovanih ovim antitelima.
- izazivanje nenormalne diferencijacije i proliferacije ćelija i prvenstveno je u osnovi reproduktivnog neuspeha (Di Simone i sar., 2007; D'Ippolito i sar., 2007).
- inflamaciju koja predstavlja vezu između prokoagulantnih događaja i formiranja tromba i koja dovodi do oštećenja tkiva placente (Holers i sar., 2002; Salmon i sar., 2007; Abrahams, 2009). Bitno je naglasiti da efekti aPL posredovani inflamacijom nisu u potpunosti rasvetljeni kod čoveka, s obzirom da, sa izuzetkom nekoliko studija (Shamonki i sar., 2007; Cavazzana i sar., 2007), abortivni materijal pacijentkinja sa APS ne pokazuje izraženu inflamaciju.

##### **1.2.4.1. Vaskularna tromboza**

Kod pacijenata sa APS, opisana je pojava tromboze praktično u svakom krvnom sudu, bez obzira da li je reč o mikrocirkulaciji ili velikim krvnim sudovima (Miyakis i sar., 2006). Kod pacijenata kod kojih su nađena aPL, tromboza se javlja u 30-40% slučajeva. Arterijske tromboze čine oko 30% tromboza u APS i u većini slučajeva dovode do moždanog udara ili prolaznih ishemičnih epizoda u mozgu. Među venskim trombozama najučestalije su tromboze dubokih vena (30%).

Uloga aPL u nastanku tromboze u antifosfolipidnom sindromu je pokazana u *in vitro* i *in vivo* modelima (Palomo i sar., 2009). Najveći broj podataka u *in vivo* model sistemu se odnosi na  $\beta_2$ GPI-zavisna antitela. Zahvaljujući tome što anti- $\beta_2$ GPI antitela čoveka unakrsno reaguju sa antigenima miša, pacova i hrčka (Tincani i sar., 1996), moguće je koristiti životinjski model za njihovo ispitivanje. Podaci iz *in vitro* eksperimenata ukazuju da postoji više mehanizama kojima aPL (prvenstveno anti- $\beta_2$ GPI antitela) dovode do trombogeneze, što je prikazano u **Tabeli III**.

**Tabela III. Trombogenetski efekti aPL** (Meroni i Riboldi, 2001; Meroni i sar., 2011; Willis i Pierangeli, 2011)

<b>1. Narušavanje fluidne faze koagulacije</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ometanjem prirodnih antikoagulanasa: protrombina, <math>\beta_2</math>GPI i faktora XII usled vezivanja antitela koja su specifična za njih, što rezultuje funkcionalnom deficijencijom ovih faktora</li> <li>• ometanjem aktivacije proteina C, čime se narušava glavni fosfolipid-zavisni put antikoagulacije</li> <li>• uklanjanjem aneksina V koji pokriva negativno naelektrisane strukture na membrani endotelnih ćelija što vodi u prokoagulantni ćelijski fenotip</li> <li>• inhibicijom fibrinolitičkog puta aktivacijom trombin inducibilnog inhibitora fibrinolize i povećanjem aktivnosti plazminogen aktivator inhibitora I</li> </ul>
<b>2. Narušavanje koagulacije na ćelijskom nivou</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• perturbacijom ćelijske membrane endotelnih ćelija i indukovanjem proadhezivnog fenotipa koji nastaje kao posledica povećane ekspresije adhezivnih molekula, E-selektina, ICAM-1 (<i>intracellular adhesion molecule-1</i>) i VCAM (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>), kao i stimulisanjem endotelnih ćelija da sintetišu i sekretuju proinflamatorne citokine (interleukin-1<math>\beta</math> i interleukin-6)</li> <li>• indukovanjem ekspresije tkivnog faktora (TF), glavnog inicijatora procesa koagulacije, na membranama monocita</li> <li>• aktivacijom trombocita, koja najverovatnije nije direktna posledica vezivanja aPL, već rezultat aktivacije endotelnih ćelija i monocita antifosfolipidnim antitelima</li> </ul>
<b>3. Aktivacija sistema komplementa</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pretpostavlja se da aktivacija sistema komplementa i prateća sinteza vazoaktivnih medijatora predstavljaju međukorak između aPL indukovane aktivacije endotelnih ćelija i trombocita i same tromboze</li> </ul>

Relativno mala učestalost epizoda tromboze kod pacijenata ukazuje da efekat aPL sam po sebi nije dovoljan da pokrene patološki proces, već je neophodno prisustvo dodatnog stimulanasa, kao što je mehanička, hemijska trauma ili infekcija (*two-hit* hipoteza) (Jankowski i sar., 2003; Park, 2006; Shoenfeld i sar., 2006).

#### **1.2.4.2. Reproductivni neuspeh**

Učestalost antifosfolipidnih antitela u opštoj populaciji trudnica je 1-2%. Nasuprot tome i do 50% žena koja pate od ponavljanih pobačaja imaju aPL (Stephenson, 1996; Kutteh i sar., 1997). Prisustvo aPL predstavlja najčešći stečeni faktor rizika za gubitak trudnoće i komplikacije u trudnoći (Miyakis i sar., 2006). Pre nego što je heparin uveden kao terapija u trudnoći pacijantkinja sa APS, stopa gubitka ploda je iznosila oko 50%, dok danas iznosi manje od 20% (Salmon i sar., 2006). Osim PP, jedna od češćih obstetričkih komplikacija u APS je prevremeni porođaj i javlja se kod 10% žena sa aPL, u poređenju sa 1-2% žena koje su serološki negativne za data antitela. Drugi poremećaji trudnoće kod žena sa prisutnim aPL su preeklampsija (učestalost oko 10%), eklampsija (učestalost oko 4%), intrauterino zaostajanje u rastu, HELLP sindrom i drugi (Cervera, 2008). Opatrny i saradnici (2006) su meta-analizom velikog broja studija pokazali vezu između različitih aPL i gubitka trudnoće kod žena bez prethodno dijagnostikovanih autoimunskih poremećaja. Najveća korelacija je uočena za aCL i LA antitela. Iako je učestalost anti- $\beta_2$ GPI antitela izuzetno visoka kod žena sa ponavljanim neobjašnjenim gubicima trudnoće (Vora i sar., 2008), kao i sa preeklampsijom (Faden i sar., 1997), pojedine studije nisu uspele da pokažu takvu vezu (Nodler i sar., 2009; Mchrani i Petri, 2009).

##### **1.2.4.2.1. Tromboza i inflamacija kao mehanizmi reproduktivnog neuspeha u APS**

Korišćenjem životinjskih *in vivo* modela pokazano je da pasivni transfer aPL u gravidne mišice dovodi do zaostajanja u rastu ili gubitka fetusa (Meroni i sar., 2011). Na osnovu protrombotske prirode oboljenja, pretpostavljeno je da je u osnovi reproduktivnog neuspeha uzrokovanog aPL tromboza uteroplacentalne cirkulacije i



infarkt placente (Harris i sar., 1983; De Wolf i sar., 1980; Out i sar., 1991). Brojne studije su ukazivale da aPL doprinose prokoagulantnom fenotipu u placenti i da dovode do narušavanja organizacije aneksina V na membranama endotelnih ćelija i trofoblasta (Rand i sar., 1994; Rand i sar., 2003; Quinn i sar., 2012). Ova zapažanja, međutim, nisu potvrđena epidemiološkim studijama, niti se tromboza može detektovati u svim histopatološkim uzorcima placenti pacijentkinja sa APS (Out i sar., 1991; Salafia i Cowchock, 1997; Park, 2006).

Pored tromboze i inflamacija je intenzivno proučavana u kontekstu patoloških promena u trudnoći. Eksperimenti na mišjem modelu su pokazali da nakon pasivnog transfera aPL dolazi do depozicije IgG, aktivacije sistema komplementa i sekrecije TF i TNF (*tumor necrosis factor*), koji je proinflamatorni citokin (Holers i sar., 2002; Girardi i sar., 2003; Berman i sar., 2005). Kao potencijalno značajni medijatori inflamacije u trudnoći su se izdvojile komponente sistema komplementa C3 i C5 (Holers i sar., 2002; Girardi i sar., 2003). Miševi deficijentni za C3, kao i za C5, ne pokazuju uobičajeni patološki reproduktivni fenotip nakon pasivnog transfera velikih količina aPL (Girardi i sar., 2003). U svetlu tih rezultata pretpostavljeno je da heparin, kao lek izbora u trudnoći kod pacijentkinja sa APS, ostvaruje protektivni efekat putem inhibicije aktivacije sistema komplementa, pre nego antikoagulantnim dejstvom i sprečavanjem tromboze (Girardi i sar., 2004). Ipak, uloga inflamacije nije potvrđena u kliničkoj praksi, s obzirom na to da primena antiinflamatornih lekova, kao što su kortikosteroidi, nije pokazala značajan protektivni efekat u trudnoći žena sa APS (Ruiz-Iratorza i sar., 2010). Kao i u slučaju placentalne tromboze, histopatološka analiza ne potvrđuje pretpostavljeni značaj inflamacije u reproduktivnom neuspehu u APS (Gerosa i sar., 2009). Iako se pregledom abortivnog materijala povremeno uočava depozicija komplementa (Shamonki i sar., 2007; Cavazzana i sar., 2007), to nije opšte pravilo. Lakasing i sar. (2000) su pokazali da ne postoje razlike u ekspresiji endotelnih adhezionih molekula između placenti zdravih žena i žena obolelih od APS/SLE. Samim tim nije uočena ni aktivacija neutrofila i trombocita, što sve zajedno ukazuje da inflamacija nije mehanizam kojim dolazi do pobačaja u APS.

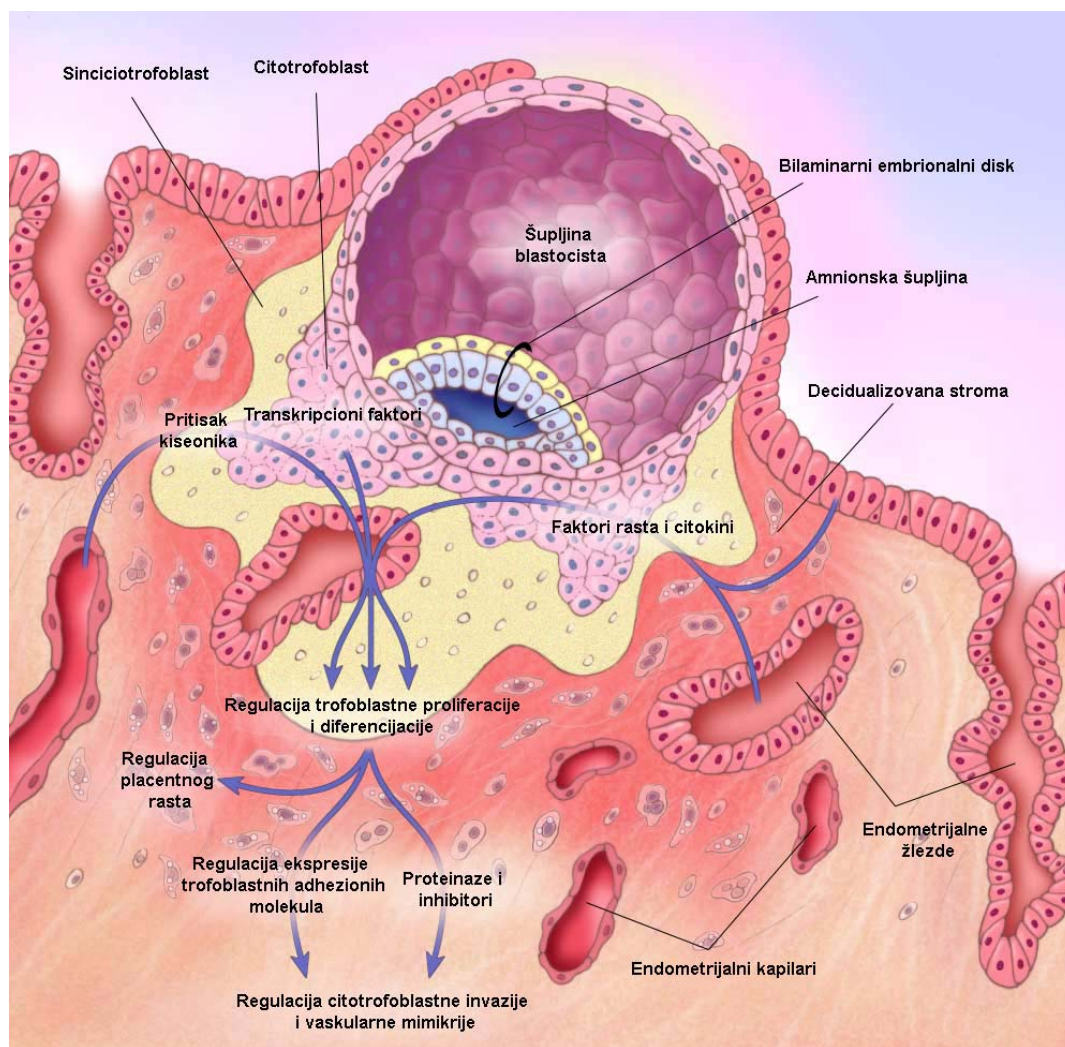
#### 1.2.4.2.2. Defektna placentacija

Defektna placentacija koja se sreće u reproduktivnom neuspehu uzrokovanom APS ukazuje na direktan efekat aPL na deciduu majke i sam trofoblast (Lyden i sar., 1992; Rote i sar., 1998; Di Simone i sar., 1995; Ornoy i sar., 2003). Depozicija  $\beta_2$ GPI, glavnog antigena u APS, je pokazana na vilusnom trofoblastu, *ex vivo* i *in vivo* (McIntyre, 1992; La Rosa i sar., 1994; Agostinis i sar., 2011). U *in vivo* studiji na mišjem modelu, vezivanje fluorescentno obeleženog  $\beta_2$ GPI u odsustvu aPL i infektivnog stimulusa (LPS) je detektovano na trofoblastu i endotelnim ćelijama decidue i uterusa. Vezivanje za endotelne ćelije drugih krvnih sudova je bilo uslovljeno prethodnim tretiranjem miševa LPS-om, što ukazuje na to da su vaskularna tromboza i reproduktivni neuspeh u APS dva nezavisna klinička entiteta (Agostinis i sar., 2011). Osim toga, inverzija membranskih lipida i eksternalizacija anjonskih fosfolipida, do koje u drugim ćelijskim tipovima dolazi samo u toku apoptoze, predstavlja fiziološko stanje trofoblasta tokom diferencijacije (Meroni i sar., 2011).

Placenta je fiziološka zona razmene materija između fetusa i majke. Ona ima metaboličke, endokrine i imunološke funkcije i adekvatna placentacija je neophodna za uspeh trudnoće. Proces placentacije počinje ostvarenjem kontakta između blastociste i epitela uterusa, u prvoj od konsektivnih faza implantacije embriona (Benirschke i Kaufmann, 2000). Povećani titar aPL kod žena sa infertilitetom je doveo do pretpostavke da aPL utiču na ishod trudnoće već na nivou blastociste i procesa implantacije (Balasch i sar., 1996; Radojčić i sar., 2004). Meta analizom više od 100 studija u ovoj oblasti dobijen je podatak da su aPL prisutna kod 22,2% žena sa neplodnošću. Međutim, statistički značajna veza između prisustva aPL i ishoda *in vitro* fertilizacije nije nađena, iako je uspešnost procedure bila nešto niža kod žena sa serološki detektovanim antitelima (Buckingham i Chamley, 2009).

Implantacija je moguća zahvaljujući nizu fizioloških promena u endometrijumu koje joj prethode i koje se označavaju kao decidualizacija. Decidualizacija obuhvata proliferaciju epitelijalnih i stromalnih ćelija endometrijuma, diferencijaciju stromalnih ćelija, pojačanu sekretornu aktivnost endometrijalnih žlezda i promenu u sastavu vanćelijskog matriksa endometrijuma (Aplin i sar., 1988; Lock i King, 1995). Tako izmenjen endometrijum postaje pogodan matriks za pričvršćivanje blastociste.

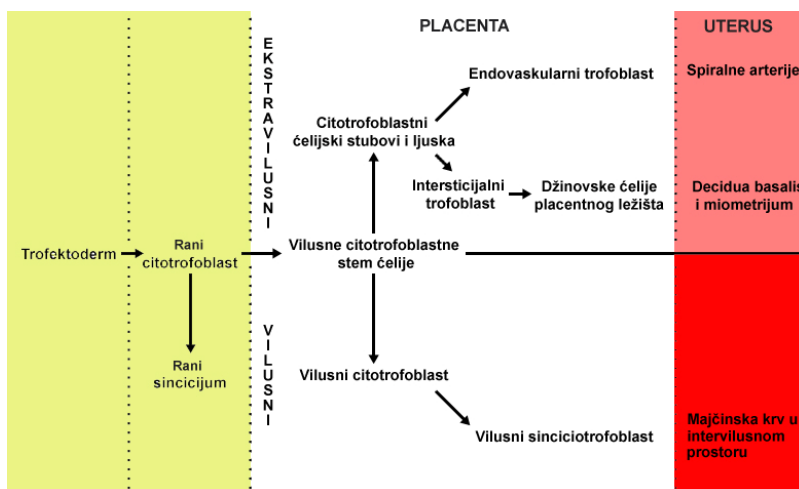
Placentacija je omogućena visoko regulisanom i usklađenom kontrolom endometrijalne vaskulogeneze, angiogeneze, decidualne i trofoblastne funkcije. Decidualne ćelije sintetišu endometrijalne hemokine, citokine i druge aktivne supstance kojima kontrololišu proliferaciju, migraciju i invaziju trofoblasta (Bischof i sar., 2000a,b; Xu i sar., 2002) (Slika 4).



**Slika 4. Implantacija embriona 9-10 dana nakon začeća.** Implantacija embriona i placentacija su visoko regulisani procesi koji zavise od fizioloških promena u endometrijumu (decidualizacije). Pravilno odvijanje ovih procesa je određeno brojnim transkripcionim faktorima, promenama u ekspresiji specifičnih gena, faktorima rasta, hormonima, citokinima kao i nivoom kiseonika i cikličnog AMPa (preuzeto iz Norwitz i sar., 2001).

Antifosfolipidna antitela se vezuju za decidualne ćelije i indukuju proinflamatorni fenotip (Martinez de la Torre i sar., 2007). Decidualni uticaj aPL obuhvata i poremećaje u vaskulogenezi, koji nastaju kao posledica smanjene endometrijalne angiogeneze (Di Simone i sar., 2010) i produkcije eikozanoida i prostangladina, vazoonaktivnih supstanci koje imaju ulogu u regulisanju protoka krvi u placenti (Pierro i sar., 1999).

Ćelije placente su potencijalna mesta vezivanja aPL koja bi na taj način mogla dovesti do narušavanja njihove strukture i/ili funkcije. Dva osnovna ćelijska tipa u placenti su vilusni i ekstravilusni trofoblast. Vilusni trofoblast (VT) je trofoblast uključen u formiranje horionskih resica, izdanaka koji čine glavnu gradivnu i metaboličku jedinicu placente. Preostali trofoblast koji ne ulazi u sastav horionskih resica se označava kao ekstravilusni trofoblast (EVT) (Slika 5).



**Slika 5. Shematski prikaz ćelijskih tipova u placenti.** Preuzeto sa izmenama iz Loke i King, 1995.

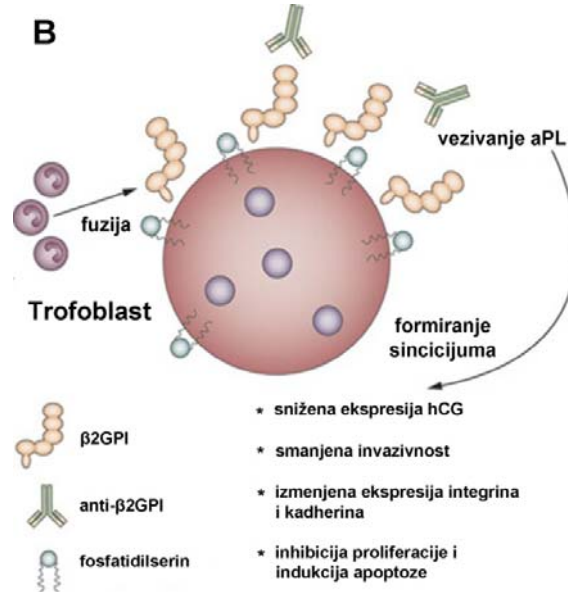
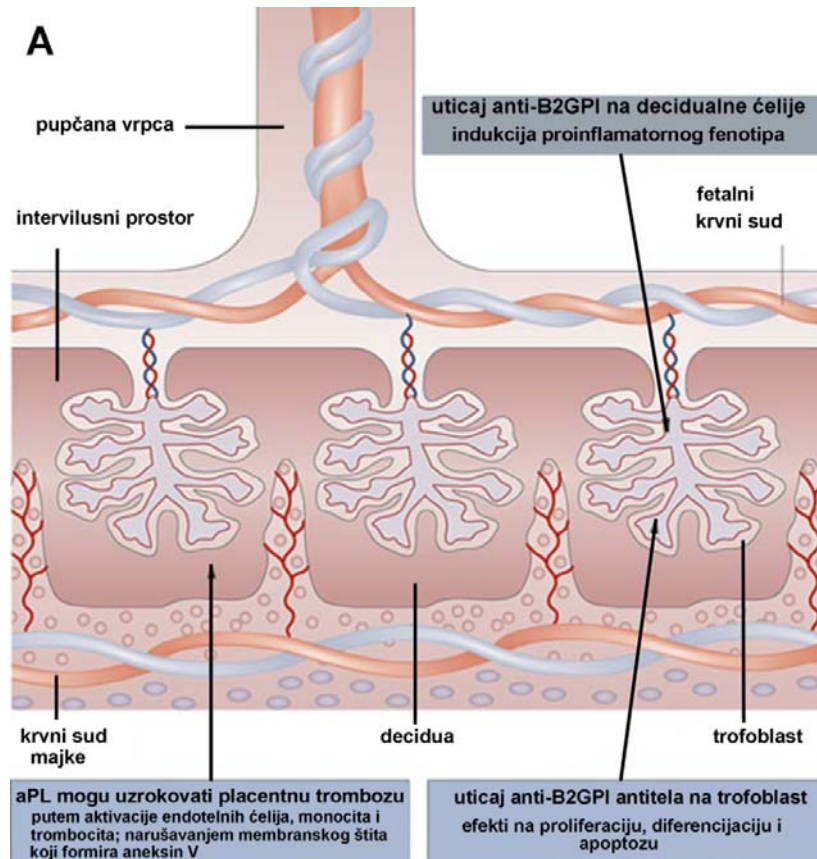
Vilusni trofoblast obuhvata vilusni citotrofoblast i vilusni sinciotrofoblast. Vilusni citotrofoblast (CT) obrazuje sloj koji se sastoji od nediferenciranih, proliferišućih stem ćelija koje leže na bazalnoj lamini. Njihovom diferencijacijom nastaju specijalizovani trofoblastni ćelijski tipovi, vilusni sinciotrofoblast (ST) i ekstravilusni trofoblast (EVT) (Mayhew i sar., 1999). Sinciotrofoblast se nalazi na površini horionske resice gde formira spoljašnji multinuklearni i neproliferišući sloj. Njegova uloga je prvenstveno u razmeni materija između fetusa i majke, kao i

endokrina aktivnost. Dva najznačajnija sekretorna produkta sinciciotrofoblasta su horionski gonadotropni hormon i placentni laktogen, endokrini faktori sa važnom ulogom u održavanju homeostaze u trudnoći (Benirschke i Kaufmann, 2000). Oba ćelijska tipa, CT i ST, su podložna patološkom uticaju aPL. Pod njihovim dejstvom izmenjena je osnovna funkcija CT, a to je proliferacija. Pod uticajem aPL proliferacija je nagla, prerana i dovodi do iscrpljivanja zaliha ovih stem ćelija pre nego što je funkcionalna placenta formirana. To rezultuje preranom i nedovoljnom fuzijom ST i normalan odnos broja CT i ST je time promenjen (Bose i sar., 2006). Proces sincicijalizacije je i direktno ugrožen dejstvom aPL koja dovode do smanjenja interćelijske fuzije (Rote i sar., 1998). Neadekvatna sincicijalizacija za posledicu ima narušavanje drugih procesa kao što su razmena materija i produkcija hormona. Sinteza i sekrecija humanog horionskog gonadotropina (hCG) i humanog placentnog laktogena (HPL), glavnih endokrinih produkata trofoblasta, su pod uticajem aPL smanjene, što je pokazano eksperimentima na vilusnom trofoblastu prvog (Katsuragawa i sar., 1997) i trećeg trimestra (Di Simone i sar., 1995, 1997, 1999, 2000).

Drugi specijalizovani ćelijski tip u placenti je ekstravilusni trofoblast. Nastaje proliferacijom citotrofoblastnih ćelija, koje zatim probijaju sloj sinciciotrofoblasta koji ih pokriva. Time se formiraju trofoblastni ćelijski stubovi koji pričvršćuju vilus za deciduu i formiraju sidreće resice. Citotrofoblastni ćelijski stubovi se šire lateralno i međusobno spajaju. Pojedinačne invazivne trofoblastne ćelije koje se odvajaju od tako nastale citotrofoblastne ljuske se označavaju kao invazivni ekstravilusni trofoblast. Prema položaju, u okviru populacije EVT se mogu razlikovati intersticijalni trofoblast koji vrši invaziju u stromu decidue i deo miometrijuma, i endovaskularni trofoblast, koga čine ćelije koje remodeluju spiralne arterije majke. Invazija oba tipa trofoblasta je značajna za normalnu placentaciju, pošto remodelovanju arterija prethode modifikacije zida krvnog suda koje se ostvaruju zahvaljujući intersticijalnom trofoblastu (Sebire i sar., 2002). Ekstravilusni trofoblast gubi sposobnost deobe nakon što napusti ćelijske stubove i dođe u kontak sa deciduom (Bulmer i sar., 1988). Poslednji stadijum diferencijacije EVT su džinovske ćelije placentnog ležišta koje se uočavaju na granici sa stromom miometrijuma. To su ćelije koje su izgubile sposobnost dalje migracije i invazije i njihov nastanak verovatno predstavlja mehanizam kojim se ograničava dubina invazije majčinog tkiva (Pijnenborg i sar., 1981; Kemp i sar., 2002). EVT sprečava rano

uspostavljanje uteroplacentne cirkulacije tako što obrazuje endovaskularne trofoblastne čepove na otvorima spiralnih arterija uterusa. Daljom diferencijacijom endovaskularnog trofoblasta, i descendentnom migracijom ćelija niz lumen arterije, nastaje intraarterijski trofoblast koji postepeno zamenjuje endotel arterije, i intramuralni trofoblast koji zamenjuje glatke mišićne ćelije arterije, nakon čega dolazi do formiranja fibrinoida (Brosens, 1977; De Wolf i sar., 1980; Zhou i sar., 1997; Kam i sar., 1999). Invazija endovaskularnog trofoblasta i posledična transformacija zida arterija dovode do promena u strukturi i funkciji endometrijalnih arterija majke. Na taj način one postaju neosetljive na vazokonstriktorne agense (Pijnenborg i sar., 1983, 2006), i sposobne za provođenje velike količine krvi neophodne za razvoj fetusa (Loke i King, 1995).

Iz svega navedenog jasno je da su adekvatna trofoblastna diferencijacija i invazija ključni koraci u placentaciji. Narušavanjem trofoblastne invazije direktno je ugrožen opstanak trudnoće (Brosens, 1977; Sebire i sar., 2003). U eksperimentalnim uslovima, kao model sistem za proučavanje EVT uobičajeno se koriste izolovane trofoblastne ćelije placente prvog ili trećeg trimestra (nakon izbornih pobačaja, odnosno nakon porođaja) i imortalizovane trofoblastne ćelijske linije. Proces invazije se najčešće proučava na modelu ćelijske invazije u Matrigel. To je proteinski preparat solubilizovane bazalne membrane koji gelira na sobnoj temperaturi i tako formira sredinu kroz koju migriraju EVT. Uticaj aPL na invaziju EVT je pokazan u nekoliko studija i to je možda i najznačajniji patološki efekat ovih antitela u placenti (Sebire i sar., 2002; Di Simone i sar., 1999, 2000, 2007; Blank i sar., 2007). Inhibitorni efekat poliklonskih antitela prečišćenih iz seruma pacijenata sa APS je pokazan u *in vitro* uslovima na trofoblastu dobijenom iz placente prvog (Di Simone i sar., 2007) i trećeg trimestra (Di Simone i sar., 1999, 2000), kao i imortalizovanim trofoblastnim linijama (Di Simone i sar., 2007). Sličan efekat je dobijen korišćenjem monoklonskih anti- $\beta_2$ GPI antitela (Blank i sar., 2007; Di Simone i sar., 2007). Smanjena invazija endovaskularnog trofoblasta je uočena i histološkim pregledom abortivnog materijala placenti pacijentkinja sa APS (Sebire i sar., 2002). Osim invazivnosti, aPL ometaju i diferencijaciju EVT u džinovske ćelije placentog ležišta (Quenby i sar., 2005). Kratak pregled efekata aPL u trudnoći je dat na **Slici 6**.



**Slika 6. Patološki efekti aPL u placenti.** A. Patološki efekti aPL u trudnoći uključuju placentnu trombozu i direktne efekte na trofoblast i ćelije decidue. B. Detaljniji prikaz uticaja aPL trofoblast (preuzeto iz Meroni i sar., 2011).



Sposobnost invazije je odlika diferenciranog EVT i direktno zavisi od interakcija između ćelija, kao i između ćelija i ekstraćelijskog matriksa. Proces diferencijacije EVT obuhvata promenu u adhezionim molekulima koje ove ćelije ispoljavaju. Ćelije citotrofoblasta dok migriraju sa vrhova resica u deciduu menjaju svoj integrinski repertoar i taj fenomen se naziva "*integrinsko prekopčavanje*" (Damsky i sar., 1992, 1994; Aplin, 1993; Vićovac i sar., 1995). On obuhvata postepenu promenu receptora za bazalnu laminu (integrin  $\alpha_6\beta_4$ ) koje ispoljava vilusni citotrofoblast, receptorima kao što su  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_1\beta_1$  i  $\alpha_v$  integrini (Vićovac i Aplin, 1996; Benirschke i Kaufmann, 2000). Balans između ekspresije  $\alpha_5\beta_1$  i  $\alpha_1\beta_1$  integrina je ključan za regulaciju trofoblastne invazije. Povećana ekspresija  $\alpha_5\beta_1$ , kao i smanjena ekspresija  $\alpha_1\beta_1$ , smanjuju invazivnost (Irving i Lala, 1995). Opisani proces diferencijacije citotrofoblasta u ekstravilusni trofoblast, koji uključuje gubitak sposobnosti deobe i promenu integrinskog fenotipa, se označava kao *epitelno-mezenhimska tranzicija* (Vićovac i Aplin, 1996; Zhou i sar., 1997; Red-Horse i sar., 2004). Uticaj aPL na proces invazije je, između ostalog, uslovljen izmenjenom ekspresijom integrinskih subjedinica što doprinosi ostvarenju patoloških efekata ovih antitela (Di Simone i sar., 2002).

Sa sticanjem invazivnog fenotipa, pored integrina, menja se i ekspresija drugih adhezionih molekula trofoblasta. Ekspresija E-kadherina, koji ima veliku ulogu u uspostavljanju ćelijskih kontakata i ispoljen je u proksimalnim delovima citotrofoblastnih ćelija, se suprimira tokom diferencijacije u ćelijskim stubovima (Floridon i sar., 2000). Istovremeno počinju da se ekspimiraju drugi adhezioni molekuli, kao što su VE-kadherin, trombocitno-endotelni adhezioni molekul-1 i N-CAM (Zhou i sar., 1997; Benirschke i Kaufmann, 2000). Di Simone i saradnici (2000) su pokazali da citotrofoblast koji je u kulturi izložen aPL pokazuje redukovanu ekspresiju VE-kadherina, na nivou iRNK, uz istovremenu povišenu ekspresiju E-kadherina, što upućuje na defektnu diferencijaciju EVT.

Prilikom invazije ekstravilusnog trofoblasta, ove ćelije vrše degradaciju vanćelijskog matriksa, u čemu značajnu ulogu imaju matriksne metaloproteinaze, serin proteaze i katepsini (Moll i Lane, 1990; Vettraino i sar., 1996; Anacker i sar., 2011). Najznačajnije među njima su matriksne metaloproteinaze-2 i -9, čija je aktivnost regulisana autokrino i parakrino, sekrecijom tkivnih inhibitora matriksnih proteinaza (TIMP-1, -2, -3 i -4), od strane decidue i samog trofoblasta (Polette i sar., 1994;



Huppertz i sar., 1998; Anacker i sar., 2011). Pored denaturisanog kolagena (želatina), njihova substratna specifičnost obuhvata još i kolagen tipa I, IV, V, VII i IX, elastin, fibronektin, vitronektin, laminin i dr. Za MMP-2 i -9 je pokazano da posreduju u invaziji izolovanog CT i HTR-8/SVneo ćelija u Matrigel (Librach i sar., 1991), pri čemu u regulaciji njihove sekrecije ključnu ulogu ima sastav vanćelijskog matriksa (Xu i sar., 2001). Matriksne metaloproteinaze se sintetišu kao proenzimi i postaju aktivne u vanćelijskom prostoru. MMP-2 je eksprimirana u EVT, dok MMP-9 eksprimiraju EVT i VT. Sinciciotrofblast ne ekspirira ni jedan od ta dva enzima (Isakaa i sar., 2003). U drugom trimestru ekspresija MMP-2 opada i predominantno je eksprimirana MMP-9 (Staun-Ram i sar., 2004). Dugo se smatralo se da je za proces invazije trofoblasta važnija MMP-2. U prilog te hipoteze je to što je jedan od mehanizama regulisanja dubine trofoblastne invazije kontrola aktivnosti MMP-2 putem specifičnih inhibitora (TIMP-2, TGF- $\beta$ ) koje sintetiše decidua na prelazu u miometrijum (Graham i sar., 1992; Yudate i sar., 1996). Noviji literaturni podaci pak ukazuju da je MMP-2 gotovo nedetektabilna u EVT u lumenu arterija, već da je MMP-9 enzim koji trofoblast predominantno sekretuje tokom transformacije krvnih sudova (Bai i sar., 2005).

Istraživanje urađeno u našoj laboratoriji je pokazalo da osim pomenutih molekula važnu ulogu u procesu trofoblastne invazije ima galektin-1. Blokiranje endogenog gal-1 značajno ograničava proces invazije, dok primena egzogeno dodatog proteina stimuliše invazivnost ćelija. Ispitivanje galektinskog profila izolovanog citotrofoblasta i HTR-8/SVneo imortalizovane ćelijske linije koja odgovara EVT je pokazalo ekspresiju gal-1 i njegov značaj u invaziji datog ćelijskog tipa (Kolundžić i sar., 2011).

Kontrola trofoblastne proliferacije, diferencijacije i invazije se ostvaruje autokrinim i parakrinim mehanizmima i uključuje različite faktore rasta, citokine, hemokine, kao i promene u parcijalnom pritisku kiseonika (Lala i Hamilton, 1996). Nizak nivo kiseonika (hipoksija) promovise proliferaciju citotrofoblasta i sprečava njegovu diferencijaciju u sinciciotrofblast i ekstravilusni trofoblast (Genbačev i sar., 1996, 1997; Lash i sar., 2005). Među faktorima rasta koji promovisu diferencijaciju citotrofoblasta u specijalizovane trofoblastne ćelijske tipove važnu ulogu imaju epidermalni faktor rasta (EGF) i transformišući faktor rasta alfa (TGF- $\alpha$ ) koji sintetišu i decidualne i trofoblastne ćelije (Filla i sar., 1993; Bass i sar., 1994; Maruo i sar., 1995),

dok transformišući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ), koga sintetiše decidua, inhibira proliferaciju i invaziju trofoblasta (Graham i sar., 1992; Irving i Lala, 1995). Značajnu ulogu u kontroli proliferacije i diferencijacije trofoblasta imaju još i heparin-vezujući EGF-u slični faktor rasta (HB-EGF), faktor rasta hepatocita (HGF), insulinu-sličan faktor rasta (IGF), kao i IGF-vezujući proteini (Simon i sar., 2000). Zajedno sa prostagladinima, leukotrijenima i faktorima rasta, ulogu u regulaciji trofoblastne diferencijacije i invazije imaju i citokini, pri čemu se naročito ističu IL-1, IL-6, IL-8 i IL-10 koji stimulišu trofoblastnu invaziju, kao i IL-15 koji je inhibira (Fitzgerald i sar., 2005; Jovanović i Vićovac, 2009; Jovanović i sar., 2010a).

Kao što je opisano, diferencijacija i invazija trofoblasta predstavljaju visoko regulisane procese koji su ključni za uspeh trudnoće. Poremećaji u kontroli ovih procesa dovode do preeklampsije, intrauterinog zaostajanja u rastu, horiokarcinoma i drugih patoloških promena u trudnoći (Benirschke i Kaufmann, 2000), zbog čega istraživanja patoloških efekata aPL na ove procese imaju veliki značaj.

# **CILJ ISTRAŽIVANJA**

Antifosfolipidna antitela (aPL) se trenutno smatraju jednim od najvećih uzroka pobačaja izazvanih imunskim sistemom. Smatra se da je glavni antigen u antifosfolipidnom sindromu (APS)  $\beta_2$ -glikoprotein I ( $\beta_2$ GPI), evolutivno konzerviran protein koji je po sekvenci i konformaciji sličan velikom broju proteina mikrobskog porekla.

Mehanizam patološkog dejstva aPL još nije u potpunosti poznat. Iako postoje podaci da aPL dovode do tromboze i inflamatornih procesa u placenti, glavnim okidačem promena koje vode narušavanju strukture i funkcije placente, i konačno pobačaju, se smatra direktan uticaj aPL na trofoblast.

Danas se zna da ova antitela prvenstveno vezuju fosfolipid-vezujuće proteine kao što su  $\beta_2$ GPI i protrombin i fosfolipid/fosfolipid-vezujući protein komplekse. Podaci o pretpostavljenim receptorima za aPL na ekstravilusnom trofoblastu su oskudni. U nekoliko studija na različitim ćelijskim tipovima (endotelne ćelije, makrofagi, sinciotrofoblast) je pokazana unutarćelijska lokalizacija antitela nakon inkubacije ćelija sa aPL.

Na osnovu gore navedenog postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

**1) Ispitivanje uticaja imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za APS na funkcionalna svojstva ekstravilusnog trofoblasta čoveka *in vitro*.**

Planirano je ispitivanje uticaja:

- a) imunoglobulina izolovanih iz seruma pacijenata sa APS (aPL+ IgG), smeše antitela različitih specifičnosti koja odgovara aPL prisutnim *in vivo*
- b) anti-tetanus toksoid (TTd) monoklonskog antitela 26 (MAb 26) koje pokazuje specifičnost za  $\beta_2$ GPI i nastalo je na osnovu sličnosti u konformaciji između TTd i  $\beta_2$ GPI. Poreklo i specifičnost MAb 26 omogućavaju proučavanje uticaja anti- $\beta_2$ GPI antitela nastalih mehanizmom molekulske mimikrije.

Prema postavljenom cilju biće ispitivan uticaj na:

- invazivnost citotrofoblasta (CT) izolovanog iz placente prvog trimestra i imortalizovane ekstravilusne trofoblastne ćelijske linije HTR-8/SVneo
- vijabilnost, proliferaciju i apoptozu HTR-8/SVneo ćelija
- ekspresiju karakterističnih proteina koji ostvaruju ulogu u procesu ćelijske invazivnosti: matriksnih metaloproteinaza-2 i -9, integrinskih subjedinica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  i galektina-1 na HTR-8/SVneo ćelijama.

**2) Ispitivanje lokalizacije imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom u *in vitro* interakciji sa ćelijama trofoblasta, što će obuhvatiti:**

- ispitivanje lokalizacije aPL+ IgG i MAb 26 na HTR-8/SVneo ćelijama nakon inkubacije
- detaljnije ispitivanje (unutar)ćelijske lokalizacije antitela korišćenjem markera ćelijskih odeljaka
- određivanje broja ćelija kod kojih se nakon inkubacije antitela mogu detektovati na membrani, odnosno unutar ćelije.

# **MATERIJAL I METODE**

### **3.1. Imunoglobulini sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom**

#### **3.1.1. Izolovanje imunoglobulina G iz seruma metodom natrijum sulfatne precipitacije**

Imunoglobulini reaktivni prema fosfolipidima i fosfolipid-vezujućim proteinima (aPL+ IgG) su izolovani iz seruma pacijenata sa dijagnostikovanim antifosfolipidnim sindromom. Serumi su sakupljeni u Institutu za Reumatologiju Kliničkog centra Srbije, u Beogradu. Ukupni IgG je izolovan metodom natrijum sulfatne precipitacije. Ukratko, uz konstantno mešanje, u serum je polako dodavan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, u količini od 180 mg po ml seruma i isoljavanje je trajalo 60 min. Serum je zatim centrifugiran (4000 rpm, 15 min na sobnoj temperaturi), supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 18% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i zatim ponovo centrifugiran pod istim uslovima. Procedura je ponovljena u još jednom ciklusu. Po završetku drugog centrifugiranja, supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 2 ml H<sub>2</sub>O i dijalizovan spram fiziološkog rastvora tokom 24 h, na 4° C. Nakon dijalize, uzorak je centrifugiran na 6000 rpm, 10 min, na sobnoj temperaturi i supernatant koji je sadržao IgG je sačuvan. Spektrofotometrijskom analizom je utvrđeno da je iz 5.45 ml seruma prečišćen ukupni IgG u koncentraciji 57.8 mg/ml. Primenom imunoelektroforeze potvrđeno je da se radi o izolatu visoke čistoće. Tako dobijeni IgG je alikvotiran u malim volumenima u mikrotube obložene sterilnim PBS 0.1% BSA, kako bi se sprečila adsorpcija IgG za plastiku. Tokom eksperimentalnog rada, izbegavano je ponavljano smrzavanje i odmrzavanje uzoraka IgG. Primenom opisane metode, iz seruma zdravih dobrovoljnih davalaca krvi prečišćeni su imunoglobulini (aPL- IgG) čijim je korišćenjem u eksperimentalnom radu obezbeđena adekvatna kontrola.

#### **3.1.2. Anti-tetanus toksoid mišje monoklonsko antitelo 26 (MAb 26) sa specifičnošću prema beta-2-glikoproteinu I**

MAb 26 je antitelo usmereno prema tetanus toksoidu (TTd) koje pokazuje ukrštenu reaktivnost sa beta-2-glikoproteinom I ( $\beta_2$ GPI). Antitelo je proizvedeno u Insitutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”, u odseku za istraživanje i razvoj,

pod rukovodstvom dr Ljiljane Dimitrijević. Hibridomi su napravljeni fuzijom splenocita TTd-hiperimunizovanih miševa sa partnerskim SP/02-sm IL-6 ćelijama mijeloma (Šeatović i sar., 2004). Supernatanti hibridomskih kultura koji su pokazivali reaktivnost prema TTd su u daljem toku njihovog istraživanja testirani na dodatnu specifičnost prema  $\beta_2$ GPI, od kojih je jedino MAb 26 pokazivalo specifičnost prema  $\beta_2$ GPI (Inić-Kanada i sar., 2009a,b). U daljim ispitivanjima utvrđeno je da MAb 26 u Western blotu specifično prepoznaju i vezuju TTd, kao i  $\beta_2$ GPI izolovan iz ljudske plazme. ELISA testovima je pokazano da se MAb 26 vezuju za  $\gamma$  ozračenu plastiku, kao i za  $\beta_2$ GPI (Inić-Kanada i sar.,2009a). Autori su pokazali da do vezivanja dolazi kada je  $\beta_2$ GPI adsorbovan sam ili u kompleksu sa kardiolipinom i/ili drugim anjonskim fosfolipidima. U daljem toku studije, ustanovljeno je da se MAb 26 vezuje za ćelije kod kojih je prisutna inverzija membranskih fosfolipida (splenociti u apoptozi).

Navedene karakteristike MAb 26 su prepoznatljive odlike anti- $\beta_2$ GPI antitela, sa posebnim osvrtom na značaj molekulske mimikrije između TTd i  $\beta_2$ GPI, a koja je u osnovi nastanka MAb 26. Na osnovu navedenih osobina, MAb 26 je u ovoj studiji izabrano za ispitivanje uticaja anti- $\beta_2$ GPI antitela na ćelije trofoblasta čoveka, *in vitro*.

### **3.2. Tkivo**

U ovom radu je korišćeno tkivo placente gestacijske starosti 6-12 nedelja, dobijeno nakon legalnih prekida trudnoće u Ginekološko-akušerskoj klinici Kliničkog centra Srbije. Tkivo je korišćeno za izolovanje citotrofoblastnih ćelija, uz poštovanje etičkih standarda.

### **3.3. Kultura ćelija**

#### **3.3.1. Kultura i izolovanje citotrofoblasta prvog trimestra**

Citotrofoblastne ćelije su izolovane prema proceduri koju su opisali Vićovac i saradnici (2007), sa manjim modifikacijama. Placenta prvog trimestra (gestacijske starosti 6-12 nedelja) dobijena nakon legalnih prekida trudnoće je ispirana sterilnim 0.05 M fosfatnim puferom pH 7.2 (sPBS; Torlak, Beograd, Srbija) koji je sadržao



gentamicin. Tkivo placente je zatim podvrgavano digestiji tripsinom (0.25% tripsin (Torlak, Beograd, Srbija), 0.2 mg/ml DNase (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) i 5mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, USA) u sPBS-u), u 2 ciklusa u trajanju od 25 minuta, na 37 °C. Nakon svakog ciklusa ćelije su filtrirane kroz sito od najlona (40 µm Nylon Bolting Cloth; Lochdew, Warrington, UK), i dejstvo tripsina je bilo blokirano fetalnim telećim serumom (FCS; PAA Laboratories, Linz, Austria). Ćelije koje su na taj način sakupljene su ispirane sPBS-om koji je sadržao 1% BSA i centrifugirane u diskontinualnom gradijentu Percoll-a (GE healthcare, USA), tokom 30 min na 2800 rpm, na 10 °C. Citotrofoblastne ćelije prilikom centrifugiranja u gradijentu Percoll-la formiraju prsten u srednjem sloju Percoll-a. Ćelije unutar prstena su prikupljane, ispirane u sPBS-u sa 0.1% BSA i određivani su broj i vijabilnost ćelija. Step en čistoće izololata procenjivan je na osnovu bojenja ćelija na marker citotrofoblasta, citokeratin-7 (CK-7). U eksperimentima su korišćene kulture izolovanog citotrofoblasta u kojima je bilo > 95% CK-7 pozitivnih ćelija.

Citotrofoblast je kultivisan u vlažnoj atmosferi, 5% CO<sub>2</sub> u vazduhu, na 37 °C u medijumu DMEM/F12 (PAA Laboratories, Linz, Austria) sa 10% FCS i smešom antibiotika/antimikotika (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA), što je predstavljalo kompletan medijum. Izolovani citotrofoblast je korišćen u *in vitro* testu ćelijske invazije i u imunocitohemijskim ispitivanjima vezivanja aPL+ IgG i MAb 26.

### **3.3.2. Ekstravilusna trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo**

Ćelijska linija HTR-8/SVneo je dobijena ljubaznošću dr Charles H. Graham-a (Queen`s University, Kingston, ON, CA). Ova ćelijska linija je dobijena transfekcijom populacije ekstravilusnih ćelija humane placente prvog trimestra trudnoće SV40 T antigenom (Graham i sar., 1993; Irving i sar., 1995). HTR-8/SVneo je proliferativna i invazivna ćelijska linija koja eksprimira markere normalnog ekstravilusnog trofoblasta (King i sar., 2000).

HTR-8/SVneo ćelije su gajene u vlažnoj atmosferi, 5% CO<sub>2</sub> u vazduhu, na 37 °C, u RPMI 1640 medijumu (PAA laboratories, Linz, Austria) koji sadržao 5% FCS-a i smešu antibiotika/antimikotika, što je predstavljalo kompletan medijum. HTR-8/SVneo ćelije su korišćene u *in vitro* testu ćelijske invazije, MTT testu, imunocitohemijskim

ispitivanjima, SDS-PAGE elektroforezi, zimografskoj analizi, analizi lokalizacije imunoglobulina iz tretmana nakon interakcije sa ćelijama i PCR analizi.

### **3.4. Antitela**

U ovome radu su kao primarna korišćena različita antitela koja su prikazana u **Tabeli IV**, zajedno sa tehnikama i razblaženjima u kojima su korišćena. Pregled korišćenih sekundarnih antitela i odgovarajućih tehnika i razblaženja je dat u **Tabeli V**.

**Tabela IV. Pregled korišćenih primarnih antitela.**

<b>Primarno antitelo</b>	<b>Tip antitela</b>	<b>Tehnike/razblaženja</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>anti-citokeratin-7</b> marker trofoblastnih ćelija	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:75	Santa Cruz, CA, USA
<b>anti-Ki67</b> merker ćelijske proliferacije	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:250	Santa Cruz, CA, USA
<b>anti-M30</b> marker apoptoze	mišje monoklonsko	imunocitohemija 1:75	Roche, Germany
<b>anti-kaveolin-1</b> marker kaveola	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:400	Cell Signaling, MA, USA
<b>anti-klatrin</b> marker klatrinom obloženih vezikula	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:50	Cell Signaling, MA, USA
<b>anti-EEA-1</b> marker ranog endozoma	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:200	Cell Signaling, MA, USA
<b>anti-sintaksin-6</b> marker trans-Goldžijevog aparata	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:100	Cell Signaling, MA, USA
<b>anti-APPL-1</b> marker endozomalnih odeljaka uključenih u recikliranje membrana	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:200	Cell Signaling, MA, USA
<b>anti-Rab-5</b> marker ranog endozoma	zečje poliklonsko	imunocitohemija 1:200	Cell Signaling, MA, USA
<b>anti-integrin <math>\alpha_1</math></b>	mišje monoklonsko	Western blot 1:3000	Santa Cruz, CA, USA
<b>anti-integrin <math>\alpha_5</math></b>	zečje poliklonsko	Western blot 1:500	Santa Cruz, CA, USA
<b>anti-integrin <math>\beta_1</math></b>	zečje poliklonsko	Western blot 1:3000	Chemicon, CA, USA
<b>anti-galektin-1</b>	zečje poliklonsko	Western blot 1:1000	R&D, UK
<b>anti-<math>\beta</math>-aktin</b>	zečje poliklonsko	Western blot 1:400	Sigma, CA, USA

**Tabela V. Pregled korišćenih sekundarnih antitela.**

<b>Primarno antitelo</b>	<b>Tip antitela</b>	<b>Tehnike/razblaženja</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>HRP-obeleženi IgG prema IgG miša</b>	konjsko poliklonsko	Western blot 1:2000	Cell Signaling, MA, USA
<b>HRP-obeleženi IgG prema IgG miša</b>	konjsko poliklonsko	Western blot 1:2000	Cell Signaling, MA, USA
<b>Aleksa fluor 488-obeleženi IgG prema IgG miša</b>	pacovsko poliklonsko	imunocitohemija, protočna citofluorimetrija 1:1500	Life technologies, CA, USA
<b>Aleksa fluor 555-obeleženi IgG prema IgG zeca</b>	kozje poliklonsko	imunocitohemija, 1:1500	Life technologies, CA, USA
<b>FITC-obeleženi IgG prema IgG čoveka</b>	ovčije poliklonsko	imunocitohemija 1:1500	INEP, Srbija
<b>Biotinom obeleženi IgG prema IgG miša</b>	konjsko poliklonsko	Western blot 1:750 imunocitohemija 1:200	Molecular Probes, Invitrogen, USA
<b>Biotinom obeleženi IgG prema IgG zeca</b>	kozje poliklonsko	Western blot 1:750	Molecular Probes, Invitrogen, USA
<b>Biotinom obeleženi IgG prema IgG čoveka</b>	kozje poliklonsko	imunocitohemija 1:200	Vector Laboratories, CA, USA

### 3.5. Imunocitohemija

#### 3.5.1. Vezivanje imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom za ćelije trofoblasta čoveka, *in vitro*

Izolovani citotrofoblast placente prvog trimestra je zasejavan na pokrovna stakalca, 80000 ćelija po stakalcetu. Ćelije su gajene u kompletnom medijumu tokom 16 h. HTR-8/SVneo ćelije su zasejavane na pokrovna stakalca i gajene u odgovarajućem kompletnom medijumu do 80% konfluentnosti. Stakalca su zatim ispirana sa sPBS-om, i ćelije su fiksirane ledeno hladnim aceton metanolom (1:1), tokom 10 min. Ukoliko nisu odmah korišćena za imunocitohemiju, stakalca su čuvana na -20 °C. Pokrovna stakalca sa fiksiranim ćelijama su rehidratirana u PBS-u i nespecifično vezivanje je blokirano 1% rastvorom kazeina u PBS-u. Kao primarna antitela, u imunocitohemijskom bojenju korišćena su aPL+ IgG (10 µg/ml) i MAb 26 (5 µg/ml) u 1% kazeinu, preko noći na 4 °C, u vlažnoj komori. Za procenu nespecifičnog vezivanja, pod istim uslovima su korišćena adekvatna neimuna antitela (aPL- IgG i mIgG). Nevezana antitela su ispirana PBS-om, a stakalca su zatim inkubirana sa Alexa-488 obeleženim anti-miš sekundarnim antitelima (**Tabela V**) tokom 1h, na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, HTR-8/SVneo stakalca su montirana rastvorom DAPI-ja (4', 6-diamidino-2-fenilindol, ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagent, Molecular Probes, Invitrogen, USA) u glicerolu, čime su ujedno kontrastirana jedra. Pokrovna stakalca sa izolovanim CT su nakon ponovnog blokiranja 1% kazeinom bojena dvojno, antitelima na marker trofoblasta, CK-7, prema razblaženju navedenom u **Tabeli IV**. Inkubacija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja i inkubiranja sa Alexa-555 obeleženim anti-zec sekundarnim antitelima tokom 1h, na sobnoj temperaturi, stakalca su montirana kako je opisano. Preparati su analizirani Carl Zeiss 510 laserskim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Kako bi se procenilo da li prisustvo egzogenog  $\beta_2$ GPI ili drugih faktora poreklom iz fetalnog telećeg seruma doprinosi vezivanju aPL+ IgG i MAb 26, eksperiment je ponovljen u nešto drugačijim uslovima. Izolovani CT i HTR-8/SVneo ćelije su zasejane na stakalca, kao što je opisano. Citotrofoblastnim ćelijama je dozvoljeno da adheriraju, nakon čega je kompletni medijum zamenjen osnovnim

medijumom. HTR-8/SVneo ćelije su pre prebacivanja u osnovni medijum gajene do 70% konfluentnosti. Ćelije su u osnovnom medijumu gajene 24 h, pri čemu je medijum menjan 2 puta tokom tog perioda, kako bi se osiguralo da je sav  $\beta_2$ GPI poreklom iz FCS-a uklonjen. Ćelije su zatim fiksirane i eksperiment je završen na prethodno opisani način.

### **3.5.2. Ispitivanje uticaja imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom na ekspresiju markera proliferacije i apoptoze u ćelijama trofoblasta čoveka, *in vitro***

#### **3.5.2.1. Tretmani ćelija**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene na pokrovnim stakalcima u kompletnom medijumu. Nakon dostizanja ~ 70% konfluentnosti, medijum je menjan kompletnim medijumom sa odgovarajućim tretmanom:

- sa imunoglobulinima izolovanim iz seruma pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (aPL+ IgG), odnosno sa imunoglobulinima izolovanim iz seruma zdravih osoba (aPL- IgG) u koncentraciji 100  $\mu$ g/ml
- sa MAb 26 ili sa neimunim mišjim imunoglobulinima (mIgG) u koncentraciji 5  $\mu$ g/ml

Nakon 24 h inkubacije, ćelije su ispirane u sPBS-u i fiksirane ledeno hladnim aceton-metanolom (1:1). Ukoliko nisu odmah bojena, stakalca su čuvana na -20 °C.

#### **3.5.2.2. Imunocitohemijsko bojenje ćelija**

Pokrovna stakla sa fiksiranim ćelijama su rehidratirana u PBS-u i aktivnost endogenih peroksidaza je blokirana 2% rastvorom  $H_2O_2$  tokom 15 min. Nespecifično vezivanje je blokirano 1% rastvorom kazeina u PBS-u. Ćelije su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima 1 h na sobnoj temperaturi:

- ćelije koje su tretirane sa aPL+/aPL- IgG su inkubirane sa antitelima prema Ki-67 i M-30 (**Tabela IV**)
- ćelije koje su tretirane sa MAb 26/mIgG su inkubirane sa antitelima prema Ki-67.

Nevezana antitela su isprana PBS-om i ćelije su zatim inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim biotinizovanim sekundarnim antitelima (**Tabela V**). U sledećem koraku ćelije su inkubirane sa ABC reagensom (A- avidin, B- biotinizovana peroksidaza iz rena) tokom 30 min. Bojenje je vizuelizovano rastvorom 3, 3' diaminobenzidina (DAB). Korišćeni su kompleti reagenasa – Vectastain *Elite* ABC kit i DAB kit- supstrat za peroksidazu (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Ćelije su kontrastirane bojenjem hematoksilinom, a zatim dehidratisane u seriji alkohola (70% etanol, 2 x 100% etanol, 2 x ksilol). Trajni preparati su montirani korišćenjem Vectamount smole (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Dobijeni preparati su analizirani svetlosnom mikroskopijom (Reichert-Jung mikroskop, Vienna, Austria sa Leica Digital Camera System, Wetzlar, Nemačka). Uticaj tretmana na ekspresiju Ki-67 i M30 markera je procenjen brojanjem pozitivnih i ukupnih ćelija na uzorku od 3000 ćelija po eksperimentu. Eksperimenti su ponovljeni minimum dva puta, u triplikatu.

### **3.6. SDS - poliakrilamidna elektroforeza (SDS PAGE) i Western blot**

#### **3.6.1. Tretmani ćelija i priprema ćelijskih lizata**

Za pripremu ćelijskih lizata HTR-8/SVneo ćelije su gajene u plastičnim flaskovima u kompletnom medijumu sa odgovarajućim tretmanom (aPL+/aPL- IgG u koncentraciji 100 µg/ml ili MAb 26/mIgG u koncentraciji 5 µg/ml), tokom 24 h. U eksperimentima u kojima je ispitivana ekspresija galektina-1, ćelije su nakon inkubacije sa tretmanom odlepljivane tripsinizacijom (0.25% tripsin 0.02% EDTA, 2 min na 37 °C). Za analizu ekspresije integrinskih subjedinica ćelije su odlepljivane hladnim PBS 0.02% EDTA, kako bi se izbegla mogućnost da tretman tripsinom dovede do izmenjene slike ekspresije integrinskih subjedinica. Za analizu sekrecije gal-1 prikupljani su

kondicionirani medijumi tretiranih ćelija. Ćelije su lizirane u Laemlie-jevom puferu za uzorke (0.125 M Tris-HCl sa 4% SDS, 20% glicerol, 0.1% bromfenol plavo) koji je sadržao inhibitore proteaza (Sigma, St Louis, MO, USA), pri koncentraciji  $6 \times 10^6$  ćelija/ml. Kondicionirani medijumi su redukovani mešanjem sa Laemlie-jevim puferom za uzorke u odnosu 1:3. Uzorci su kuvani 5 min, i centrifugirani na 17000g kako bi se uklonio nerastvorni materijal nakon čega je spektrofotometrijski određivana koncentracija proteina (spektrofotometar Pharmacia Biotech, UK).

### 3.6.2. SDS PAGE i Western blot

Lizati HTR-8/SVneo ćelija su razdvajani u redukujućim uslovima u 7.5% poliakrilamidnom gelu, za analizu integrinskih subjedinica i 15% poliakrilamidnom gelu za analizu gal-1. Elektroforeza je rađena na Mini/PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell sistemu (BioRad Laboratories, CA, SAD), pri uslovima: 150V, 80mA, 12W.

Za prenos proteina na nitroceluloznu membranu (Schleicher & Schuell BioScience GmbH Whatman Group, Dassel, Germany) korišćen je sistem za transfer Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semidry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Nespecifično vezivanje je blokirano 1% kazeinom u PBS-u tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane sa antitelima prema integrinskim subjedinicama  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  i gal-1i  $\beta$ -aktin (kontrola nanete količine proteina), u razblaženjim navedenim u **Tabeli IV**, preko noći na 4 °C, uz konstantno mešanje. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (videti **Tabelu V**), 30 min na sobnoj temperaturi. Ukoliko su korišćena biotinom obeležena sekundarna antitela, membrane su inkubirane sa ABC reagensom, 30 min na sobnoj temperaturi i reakcija je vizualizovana uputrebom DAB reagensa kao hromogena. Kada su korišćena sekundarna antitela obeležena peroksidazom iz rena (*horse radish peroxidase*, HRP), vizualizacija je ostvarivana pomoću ECL susprata za Western blot (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

Intenzitet dobijenih traka je denzitometrijski analiziran ImageMaster TotalLab v2.01 programom (Amersham Biosciences Europe, Orsay, France). Intenziteti pojedinačnih traka su normalizovani spram intenziteta trake za aktin. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.



### **3.7. Zimografsko određivanje aktivnosti enzima**

#### **3.7.1. Tretmani ćelija**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene do konfluentnosti u pločama od 24 mesta u 300 µl kompletnog medijuma. Nakon ispiranja, ćelije su gajene dodatnih 24 h u 200 µl osnovnog medijuma sa odgovarajućim tretmanom (aPL+/aPL- IgG u koncentraciji 100 µg/ml; MAb 26/mIgG u koncentraciji 5 µg/ml). Po isteku inkubacije kondicionirani medijumi su prikupljeni i centrifugirani kako bi se uklonile neadherirane ćelije. Koncentracija proteina je određena pomoću kompleta zasnovanog na detekciji redukovano bakra bihinonskom kiselinom (BCA assay, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

#### **3.7.2. Zimografija**

Aktivnost želatinaza u kondicioniranom medijumu tretiranih HTR-8/SVneo ćelija je određena pomoću SDS PAGE zimografije po prethodno opisanoj proceduri (Lash i sar., 2005). Uzorci su razblaživani puferom za uzorke bez β-merkaptetanola u odnosu 4:1 i razdvajani u 11% gelu koju je sadržao želatin u koncentraciji 1mg/ml, u neredukujućim uslovima. Gelovi su nakon elektroforeze ispirani 2.5% Triton X-100, 2 puta u trajanju od 15 min, kako bi se uklonio SDS, a zatim i u dH<sub>2</sub>O. Nakon inkubacije u reakcionom puferu (50 mM Tris-HCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7) preko noći, gelovi su bojeni CBB-om 30 min i odbojavani u 30% metanolu sa 10% glacijalnom sirćetnom kiselinom. Proteazna aktivnost želatinaza se uočavala kao providna traka u gelu na mestu lokalizacije enzima. Intenzitet enzimske aktivnosti je određivan semikvantitativno, denzitometrijskom analizom zimograma pomoću ImageMaster TotalLab v2.01 programa. Eksperimenti su ponovljeni najmanje 4 puta, u duplikatu ili triplikatu.

### 3.8. Analiza ekspresije iRNK

#### 3.8.1. Tretmani ćelija

HTR-8/SVneo ćelije su gajene u plastičnim flaskovima 24 h u potpunom medijumu sa odgovarajućim tretmanom (aPL+/aPL- IgG u koncentraciji 100 µg/ml; MAb 26/mIgG u koncentraciji 5 µg/ml). Po isteku inkubacije ćelije su odlepljivane tripsinizacijom, centrifugirane (1500 rpm, 5 min, na sobnoj temperaturi), resuspendovane u 1 ml TRireagent reagensa (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA) i inkubirane 5-10 min na sobnoj temperaturi, kako bi se otvorili nukleoproteinski kompleksi. Ćelije su kratkoročno čuvane u TRireagent-u na -20 °C, dugoročno na -80 °C.

#### 3.8.2. Izolovanje RNK i sinteza komplementarne DNK

Ukupna ćelijska RNK je izolovana metodom hloroform-izopropanol precipitacije. Ukratko, na 1ml TRireagenta u kome se nalazilo do  $10^7$  ćelija nalivano je 200 µl hloroforma<sup>♦</sup> i snažno promućkano. Nakon 3-15 min inkubacije na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 rpm/4 °C. Gornja vodena faza bi zatim bila pažljivo pokupljena i prebačena u novu mikrotubu. Kako bi RNK precipitirala, preko pokupljene vodene faze nalivano je 500 µl izopropanola<sup>♦</sup> i tuba je invertovana nekoliko puta kako bi se faze izmešale. Nakon 10-15 min inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani tokom 15 min na 12000 rpm/4 °C. Supernatant je odlivan dekantovanjem, a talog ispiran u 1ml ledeno hladnog 70% etanola<sup>◊</sup>. Uzorci su centrifugirani 10 min na 12000 rpm/4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je bio prosušen kako bi ispario ostatak etanola. Po završenom sušenju, talog je rastvaran u 30 µl vode<sup>◊</sup>, a količina i čistoća RNK su određivane spektrofotometrijski (NanoVue, GE Healthcare, USA).

---

<sup>♦</sup> Čistoća korišćenog hloroforma, etanola i izopropanola (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) je bila odgovarajuća za primenu u molekularnoj biologiji

<sup>◊</sup> Rastvor etanola je pravljn u DEPC (diethylpirokarbonat, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) tretiranoj vodi koja je prethodno autoklavirana. U DEPC-tretiranoj vodi je rastvaran i talog RNK. DEPC se koristi za tretiranje vode kako bi se inaktivirale RNAze prisutne u vodi. Uklanjanje se autoklaviranjem.

Komplementarna DNK je sintetisana iz 2 µg ukupne RNK korišćenjem 0.2 µg nasumičnih heksamernih prajmera, 2.5 µM svakog od nukleotida (dNTP) i 200U RevertAid reverzne transkriptaze (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Uspešnost reverzne transkripcije je proveravana RT-PCR reakcijom za endogenu kontrolu (konstitutivno eksprimiran gen).

### 3.8.3. PCR analiza u realnom vremenu (RQ-PCR)

PCR analiza (*real time* PCR) zasnovana na relativnoj kvantifikaciji je rađena na 7500 Real Time PCR System aparatu (Applied Biosystems, Carlsberg, USA). Reakciona smeša se sastojala od 100 ng komplementarne DNK, 5 µl 2x KAPA™ SYBR®288 FAST qPCR univerzalnog master miksa (Kappa Biosystems, Boston, MA, USA) i specifičnog prajmera (**Tabela VI**) u finalnoj koncentraciji od 0.4 µM. Specifičnost amplifikacije je svaki put potvrđena analizom krive topljenja. GAPDH je korišćen kao endogeni kontrolni gen i preračunavanja su urađena primenom komparativnog  $\Delta\Delta C_t$  metoda (Livak i Schmittgen, 2001). Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

**Tabela VI. Prajmeri korišćeni u RQ-PCR analizi**

Gen	Sekvenca prajmera
Integrin $\alpha_1$	5' GGTCCTACTTTGGCAGTATT 3' AACCTTGTCTGATTGAGAGCA
Integrin $\alpha_5$	5' GGCAGCTATGGCGTCCCCTGTGG 3' GGCATCAGAGGTGGCTGGAGGCTT
Integrin $\beta_1$	5' GTGGTTGCTGGAATTGTTCTTATT 3' TTTTCCCTCATACTTCGGATTGAC
Galektin-1	5' TGCAACAGCAAGGACGGC 3' CACCTCTGCAACACTTCCA
GAPDH	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGT 3' GAAGATGGTGATGGGATTTC

### **3.9. Detekcija i kvantitacija ćelija (MTT test)**

#### **3.9.1. Tretmani ćelija**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene u pločama od 96 mesta,  $2 \times 10^4$  ćelija po bunaru u 100  $\mu$ l kompletnog medijuma. Nakon 24 h ćelije su ispirane i dodavano je 200  $\mu$ l kompletnog medijuma sa odgovarajućim tretmanom (aPL+/aPL- IgG u koncentraciji 100  $\mu$ g/ml; MAb 26/mIgG u koncentraciji 5  $\mu$ g/ml), po bunaru. Kako bi se utvrdilo da li tretman odgovarajućim antitelima pokazuje doznu ili vremensku zavisnost u uticaju na vijabilnost ćelija, urađeni su dodatni eksperimenti. aPL+/aPL- IgG je korišćen u koncentraciji 100, 150, 200  $\mu$ g/ml, dok su MAb 26/mIgG korišćeni u koncentraciji 2.5, 5 i 10  $\mu$ g/ml, tokom 24 ili 48 h.

#### **3.9.2. MTT test**

MTT test (MTT-3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrayolium bromide; Tiazolil plavo, Sigma, St Louis, MO, USA) je korišćen za određivanje broja živih ćelija (Hanisch i sar., 1993). Nakon isteka 24 h inkubacionog perioda i ispiranja ćelija, dodavano je 100  $\mu$ l MTT-a u koncentraciji 1 mg/ml (u PBS 10% FCS), po bunaru. Ćelije su inkubirane sa rastvorom MTT-a tokom 2 h na 37 °C. Po uklanjanju rastvora, u svaki bunar je dodato po 100  $\mu$ l 1-propanola (Chemapol, Prag, Češka). Nakon rastvaranja istaložene boje merena je optička gustina na 540 nm, a broj živih ćelija je očitavan sa standardne prave sa  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  ćelija/bunaru. Eksperiment je ponovljen četiri puta, 12 bunara po tretmanu.

### **3.10. Test ćelijske invazije *in vitro***

Mogući efekat aPL+ IgG i MAb 26 na invaziju citotrofoblasta i HTR-8/SVneo ćelija je ispitivan po metodi koju su opisali Librach i saradnici (1991). Umetci za ćelijsku kulturu veličine pora 8  $\mu$ m (Millipore, MA, SAD) oblagani su sa 10  $\mu$ l Matrigela (5mg/ml, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) u osnovnom DMEM/F12 za izolovani citotrofoblast i osnovnom RPMI 1640 za HTR-8/SVneo ćelije. Matrigel je

ostavljan da gelira 30 min na 37° C. U gornju komoru umetka nanošeno je 200 µl ćelijske suspenzije u kojoj se nalazilo  $2 \times 10^5$  CT ili  $1 \times 10^5$  HTR-8/SVneo ćelija u odgovarajućem kompletnom medijumu sa tretmanom (aPL+ ili aPL- IgG u koncentraciji 100 µg/ml; MAb 26 ili mIgG u koncentraciji 5 µg/ml). Po 500 µl odgovarajućeg kompletnog medijuma sa tretmanom je dodavano u donju komoru. Nakon 24 h medijum je uklanjan, a ćelije ispirane sPBS-om. Gornja površina membrane umetka je nežno brisana pamučnim tupferom, nakon čega su ćelije na donjoj površini membrane fiksirane ledeno hladnim aceton-metanolom (1:1) tokom 10 min. Membrane su skidane skalpelom, a ćelije na njima su bojene imunocitohemijski, monoklonskim antitelom prema citokeratinu-7 (izolovani CT), ili su bojene po Gimzi (HTR-8/SVneo ćelije). Ćelije koje su zauzimale pore ili su se nalazile na donjoj površini membrane su brojane pod svetlosnim mikroskopom, na 50 nepreklapajućih vidnih polja. Eksperimenti u kojima su korišćeni imunoglobulini prečišćeni iz seruma pacijenata sa APS su ponovljeni tri puta u duplikatu, na HTR-8/SVneo ćelijama. Eksperimenti kojima je ispitivan uticaj MAb 26 na ćelijsku invaziju su ponovljeni na izolovanom trofoblastu iz četiri placente u duplikatu, dok su u slučaju HTR-8/SVneo ćelija eksperimenti urađeni 5 puta, u duplikatu (2 eksperimenta) ili triplikatu (3 eksperimenta).

Da bi se utvrdilo da li uticaj aPL+ IgG i MAb 26 zavisi od doze tretmana, izveden je dodatni eksperiment na HTR-8/SVneo ćelijama, korišćenjem 100, 150 i 200 µg/ml aPL+/aPL- IgG i 2.5, 5 i 10 µg/ml MAb 26/mIgG u tretmanu.

Optimalno trajanje testa invazije je određeno kao vreme kada se uočavaju ćelije kako zauzimaju pore i nalaze se sa donje strane membrane, ali nisu prisutne u donjim bunarima.

### **3.11. Lokalizacija imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom u *in vitro* interakciji sa ćelijama trofoblasta**

#### **3.11.1. Vremenska zavisnost vezivanja**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene prema proceduri opisanoj u odeljku 3.5. (Imunocitohemija). Ćelije su inkubirane sa aPL+ ili aPL- IgG tokom 1 h, 2 h, 4 h i 6 h, dok su sa MAb 26/mIgG inkubirane tokom 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h i 6 h, na 37 °C. Po isteku inkubacije ćelije su ispirane 3 puta hladnim PBS-om, kako bi se zaustavio potencijalni proces internalizacije i uklonila nevezana antitela. Ćelije su zatim fiksirane ledeno hladnim acetom-metanolom (1:1). Bojenje je izvođeno prema proceduri opisanoj u 3.5. osim koraka inkubacije sa primarnim antitelom, pošto je u ovom dizajnu eksperimenta primarno antitelo bilo deo tretmana ćelija.

Kada je eksperimentom bila predviđena kvantitativna analiza internalizacije, korišćena su odgovarajuća biotinizirana sekundarna antitela po proceduri opisanoj u 3.5. Obojene ćelije su ispitivane pod svetlosnim mikroskopom i na minimum 15 nepreklapajućih vidnih polja je određen ukupan broj ćelija, kao i broj ćelija kod kojih se mogla detektovati intracelularna lokalizacija antitela korišćenih u tretmanu (pozitivne ćelije). Rezultati su izražavani kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija. Eksperiment je ponovljen tri puta, u duplikatu.

Za potrebe kvalitativne analize internalizacije, antitela korišćena u tretmanu su vizualizovana upotrebom odgovarajućih fluorescentno obeleženih sekundarnih antitela i dalja analiza je izvođena na standardnom laserskom mikroskopu (Carl Zeiss 510, Jena, Germany). Preciznija analiza preparata je ostvarena konfokalnom laserskom mikroskopijom (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany). Ekscitacija fluorofora je postignuta laserskom linijom argonskog lasera na 488 nm ili helijum neonskog lasera na 543 nm. DAPI signal je sniman propuštanjem svetlosti živine lampe kroz ekscitacioni filter za ovu boju.

Detaljnija analiza lokalizacije MAb 26 je ostvarena dvojnim bojenjem HTR-8/SVneo ćelija prema markerima unutarćelijskih odeljaka. Korišćeni su caveolin-1 kao karakteristični protein kaveola, klatrin kao karakteristični protein klatrinom obloženih vezikula, APPL-1 kao marker endozomalnih odeljaka uključenih u recikliranje

membrana, rab-5 koji je prisutan u membrani ranog endozoma, sintaksin-6 koji je lokalizovan u trans-Goldžijevom aparatu i unutar endozoma i EEA-1 za identifikaciju ranog endozoma. Antitela su korišćena u razblaženju navedenom u tabeli IV, prema proceduri koja je opisana u poglavlju 3.5.

### **3.11.2. Temperaturna zavisnost vezivanja**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene na način kako je opisano u prethodnom odeljku, sa manjim izmenama. Kako bi se ispitala energetska zavisnost vezivanja, ćelije su pre dodavanja tretmana temperirane na 4°C tokom 15 min. Odgovarajući tretman (MAb 26/mIgG) u kompletnom medijumu je hlađen i zatim dodavan ćelijama. Inkubacija je trajala 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h ili 6 h, na 4 °C. Po isteku inkubacije ćelije su ispirane 3x hladnim PBS-om i fiksirane ledeno hladnim aceton-metanolom (1:1). Dalji tok bojenja je opisan u odeljcima 3.5. i 3.11.1. Obojene ćelije su ispitivane pod svetlosnim mikroskopom i ukupne ćelije, kao i ćelije kod kojih se mogla detektovati intracelularna lokalizacija antitela (pozitivne ćelije), su brojane na minimum 15 nepreklapajućih vidnih polja. Rezultati su izražavani kao procenat pozitivnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija. Eksperiment je ponovljen tri puta, u duplikatu.

### **3.11.3. Ispitivanje internalizacije imunoglobulina Western blot metodom**

Za pripremu ćelijskih lizata HTR-8/SVneo ćelije su gajene u pločama od 6 mesta u kompletnom medijumu do postizanja 80% konfluentnosti. Nakon toga je dodavan odgovarajući tretman (MAb 26/mIgG u koncentraciji 5 µg/ml) u kompletnom medijumu i ćelije su inkubirane 24 h, na 37 °C. Po isteku inkubacije ćelije su ispirane 3 puta sPBS-om, kako bi se uklonila nevezana antitela i odlepljivane sa podloge primenom jedne od sledećih metoda:

- ćelije su odlepljivane pomoću gumenog skrejpera u sPBS-u sa proteaznim inhibitorom
- ćelije su odlepljivane ledeno hladnim sPBS 0.02% EDTA
- ćelije su ispirane sPBS puferom, pH 2, kako bi se uklonila membranski vezana

antitela, a zatim odlepljivane pomoću gumenog skrejpera u sPBS-u sa proteaznim inhibitorom

- ćelije su odlepljivane tripsinizacijom (0.25% tripsin u sPBS-u sa 0.02% EDTA).

Uzorci su pripremljeni prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.6.1. i elektroforetski razdvojeni u redukujućim uslovima u 10% poliakrilamidnom gelu (prema proceduri u poglavlju 3.6.2.). Komercijalni IgG je korišćen kao kontrola specifičnosti bojenja.

#### **3.11.4. Protočna citofluorimetrija**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene u kompletnom medijumu u pločama od 6 mesta do dostizanja 80% konfluentnosti. Nakon toga je dodavan odgovarajući tretman (MAb 26/mIgG) u kompletnom medijumu i ćelije su inkubirane 15 min i 2 h, na 37 °C. Eksperiment je za svaki tretman i vremensku tačku inkubacije postavljan u duplikatu, a ćelije iz pojedinačnog uzorka su odlepljivane tripsinizacijom ili ledeno hladnim sPBS 0.02% EDTA. Nakon ispiranja u PBS 5% FCS 0.1 % NaN<sub>3</sub> (PBS<sub>2</sub>) jedna polovina ćelija iz istog uzorka (minimum 5x10<sup>5</sup> ćelija) je permeabilizovana kako bi se detektovala antitela iz tretmana ukoliko se nalaze unutar ćelije. Druga polovina ćelija nije permeabilizovana čime je omogućena diskriminacija signala poreklom od membranskih vezanih antitela. U pripremi uzoraka je korišćen komercijalni kit za fiksaciju/permeabilizaciju (Molecular Probes, Invitrogen, USA). Inkubacija sa odgovarajućim Alexa 488 obeleženim sekundarnim antitelima je rađena u 100 µl medijuma za permeabilizaciju tokom 20 min na sobnoj temperaturi, odnosno u 100 µl PBS<sub>2</sub> (nepermeabilizovane ćelije) tokom 30 min na 4 °C. Nakon ispiranja hladnim PBS<sub>2</sub> i PBS 0.1% NaN<sub>3</sub> (PBS<sub>1</sub>) ćelije su fiksirane 4% rastvorom formalina u PBS<sub>1</sub>. Fluorescentni signal na/u ćelijama je analiziran protočnim citofluorimetrom (BD FACScalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).



### **3.11.5. Ispitivanje internalizacije primenom imunoglobulina obeleženih jodom 125**

#### **3.11.5.1. Radioaktivno obeležavanje MAb 26 i mIgG jodom 125**

Obeležavanje antitela je rađeno po metodi Huntera i Greenwooda, pomoću hloramina T kao oksidujućeg sredstva. 25 mikrograma proteina je obeleženo sa 0.5 mCi radioaktivnog izotopa joda. Nakon jednog minuta reakcija je prekidana sa cisteinom i prečišćavanje je rađeno gel filtracijom na Sephadex G75 koloni (15x1cm). Kao pufer za eluirane je upotrebljavan 0.05M fosfatni pufer pH 7.4, sa 0.05% goveđeg albumina.

#### **3.11.5.2. Tretmani ćelija i merenje radioaktivnosti na ćelijama nakon tretmana**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene u pločama od 6 mesta u kompletnom medijumu do postizanja 80% konfluentnosti. Nakon toga je dodavan odgovarajući tretman ( $I^{125}$  obeleženi MAb 26/mIgG) u kompletnom medijumu, tako da je radioaktivnost iznosila 500 000 cpm/ml tretmana. Ćelije su zatim inkubirane 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, ili 24 h, na 37 °C, ili 2 h na 4 °C, nakon čega su ispirane 3 puta sPBS-om kako bi se uklonila nevezana antitela. Ćelije su odlepljivane sa podloge primenom jedne od sledećih metoda:

- ćelije su odlepljivane ledeno hladnim sPBS 0.02% EDTA (kako bi se sačuvala membranski vezana antitela)
- ćelije su ispirane sPBS puferom, pH2, kako bi se uklonila membranski vezana antitela, a zatim odlepljivane tripsinizacijom (0.25% tripsin u sPBS-u sa 0.02% EDTA).

Ćelije su prebacivane u epruvete za merenje i ispirane 2 puta PBS-om. Aktivnost ćelijskog taloga je detektovana  $\gamma$  brojačem (Wizard 1470 Automatic  $\gamma$  counter, PerkinElmer, UK).

### **3.12. Statistička analiza**

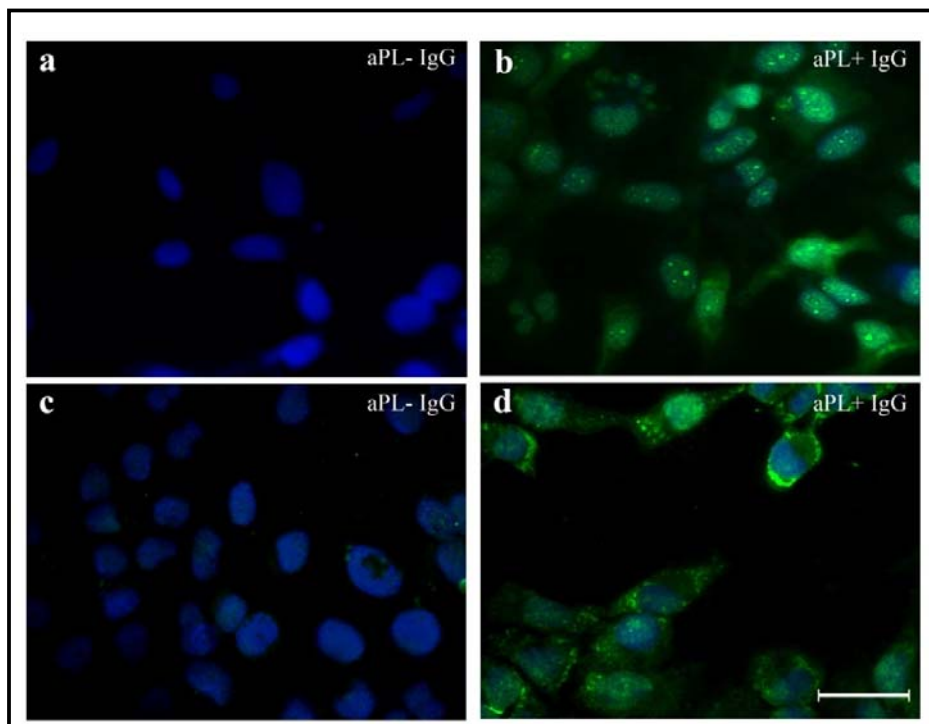
Dobijeni podaci su statistički obrađivani u programu Statistical Software Program Version 5.0 (Primers of Biostatistic, McGraw-Hill Companies Inc., NY, SAD) upotrebom Studentovog t-testa.

# **REZULTATI**

#### **4.1. Uticaj imunoglobulina prečišćenih iz seruma pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (aPL+ IgG) na ekstravilusni trofoblast čoveka, *in vitro***

##### **4.1.1. Vezivanje aPL+ IgG za HTR-8/SVneo ćelije**

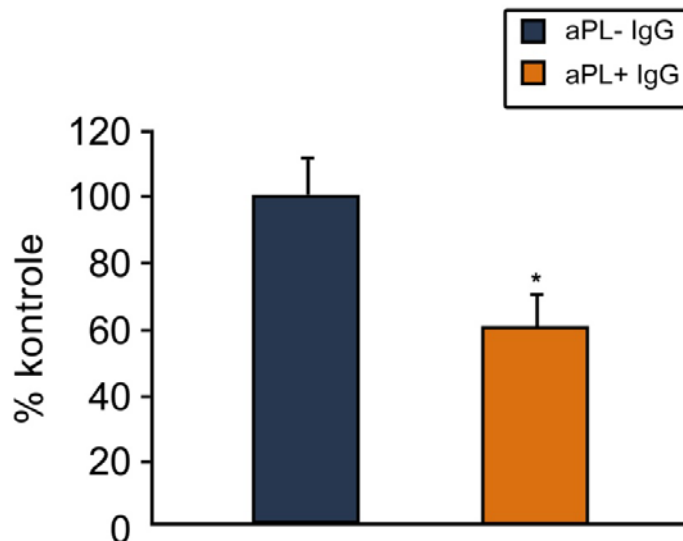
Kako je vezivanje preduslov za delovanje imunoglobulina na ćelije, ispitano je vezivanje imunoglobulina prečišćenih iz seruma pacijenata sa APS za HTR-8/SVneo ćelije, imunocitohemijski. Korišćenje aPL+ IgG kao primarnih antitela u imunocitohemijskoj analizi HTR-8/SVneo ćelija je rezultiralo (predominantno citoplazmatskim) umerenim do intenzivnim bojenjem (**Slika 7b**). Specifičnost uočene reakcije potvrđuje odsustvo fluorescentnog bojenja ćelija kada je primenjeno kontrolno antitelo (prikazano na **Slikama 7a i 7c**). Analizom vezivanja aPL+ IgG za HTR-8/SVneo ćelije kojima je bio nedostupan egzogeni  $\beta_2$ GPI (medijum bez FCS) i drugi faktori prisutni u telećem fetalnom serumu, uočeno je nešto drugačije bojenje. Specifičan fluorescentni signal se (osim u citoplazmi) uočavao i duž membrane, sa fokalnim intenzivnije obojenim mestima, što je prikazano na **Slici 7d**.



**Slika 7. Imunocitohemijska analiza vezivanja aPL+ IgG za HTR-8/SVneo ćelije.** Prikazana je reprezentativna mikrografija vezivanja aPL+ IgG (**7b**, **7d**) i neimunih imunoglobulina, kao kontrole specifičnosti vezivanja (aPL- IgG, **Slike 7a**, **7c**) za HTR-8/SVneo ćelije nakon 24 h kultivacije u kompletnom (**7a** i **7b**) ili osnovnom medijumu (**7c** i **7d**). Marker označava 20  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Uticaj aPL+ IgG na na invaziju trofoblasta, *in vitro*

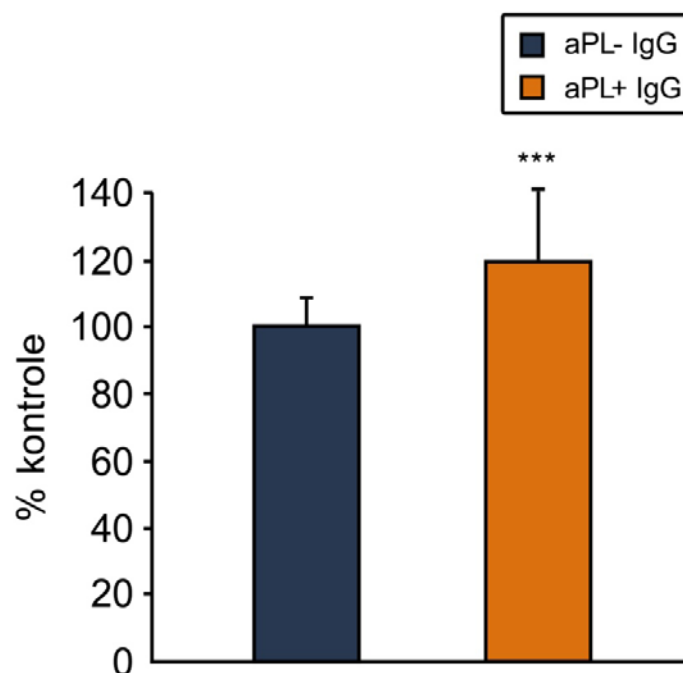
Tretman HTR-8/SVneo ćelija sa 100  $\mu$ g/ml aPL+ IgG tokom 24 h je doveo do smanjenja ćelijske invazije u testu na Matrigelu. Invazija HTR-8/SVneo ćelija je bila redukovana na 60.2% ( $p < 0.05$ ) od kontrolne vrednosti (invazivnost ćelija tretiranih sa aPL- IgG) (**Slika 8**). Ispitivanje dozne zavisnosti uticaja aPL+ IgG korišćenjem 100, 150 i 200  $\mu$ g/ml aPL+/aPL- IgG nije pokazalo statistički značajne razlike u inhibitornom efektu aPL+ IgG na ćelijsku invazivnost (rezultati nisu prikazani).



**Slika 8. Efekat aPL+ IgG (100 µg/ml) na invaziju HTR-8/SVneo ćelija.** Tretman HTR-8/SVneo ćelija aPL+ IgG tokom 24 h je rezultirao smanjenom ćelijskom invazijom u Matrigel, do vrednosti od 60.2% od kontrole koju su činile ćelije tretirane istom koncentracijom aPL- IgG. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora ( $\pm$  S.E.M.) iz tri eksperimenta urađena u duplikatu. Rezultati su prikazani kao procenat od kontrole i značajni su za  $p < 0.05$ , što je označeno sa \*.

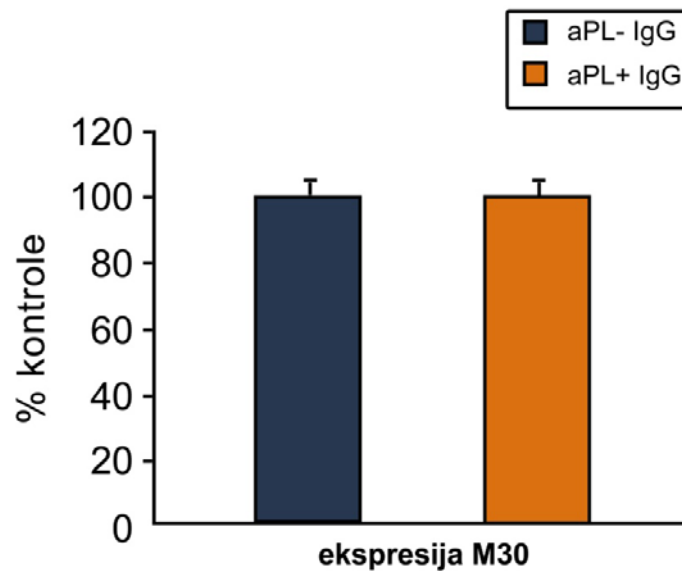
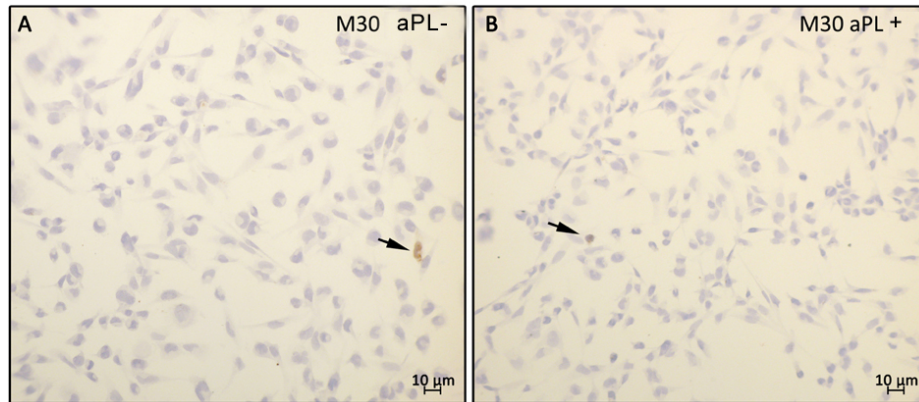
#### 4.1.3. Uticaj aPL+ IgG na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu HTR-8/SVneo ćelija

Izolovani CT ne proliferišu u kulturi na Matrigelu, ali je HTR-8/SVneo ćelijska linija proliferativna. Ćelijska invazija u Matrigel se procenjuje na osnovu broja ćelijama zauzetih pora u odnosu na ukupan broj raspoloživih pora, na šta ima uticaja i ukupan broj prisutnih ćelija. Zbog toga je bilo potrebno ispitati da li tretiranje HTR-8/SVneo ćelija aPL+ IgG utiče na njihovu vijabilnost, proliferaciju i apoptozu, kao parametre koji mogu uticati na uočeni broj invazivnih ćelija. Vijabilnost ćelija je procenjena na osnovu sposobnosti ćelija da redukuju MTT. Rezultati su pokazali da pod dejstvom aPL+ IgG dolazi do blagog, ali statistički značajnog porasta u vijabilnosti ćelija (za 19% u odnosu na kontrolu,  $p < 0.001$ ), nakon 24 h inkubacije sa tretmanom (**Slika 9**).



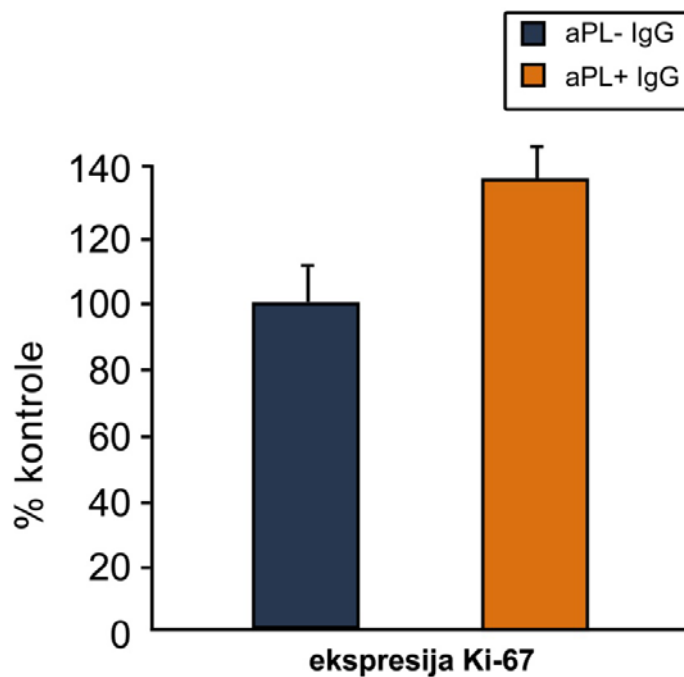
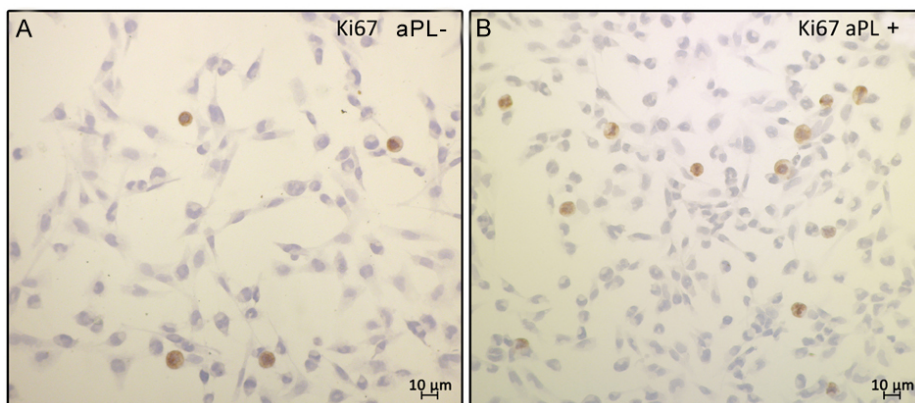
**Slika 9. Uticaj aPL+ IgG na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija.** Tretman ćelija aPL+ IgG (100 µg/ml) tokom 24 h je rezultirao povećanom ćelijskom vijabilnošću od 19%, u odnosu na vrednost dobijenu nakon tretmana kontrolnim antitelima (aPL- IgG), što je utvrđeno MTT testom. Rezultati su izraženi kao procenat od kontrole i prikazana je srednja vrednost iz četiri eksperimenta (n=36) ± S.E.M. Rezultat je statistički značajan za  $p < 0.001$ , što je označeno sa \*\*\*.

Blagi porast vijabilnosti ćelija pod dejstvom tretmana može biti posledica povećane ćelijske proliferacije, smanjene ćelijske apoptoze, ali takođe može predstavljati odraz metaboličkog stanja ćelije. Ćelijska proliferacija je praćena na osnovu ekspresije Ki-67 markera. Tretman aPL+ IgG je indukovao porast u broju Ki-67 pozitivnih ćelija za 38% u odnosu na kontrolu (**Slika 11**). Potencijalni efekat tretmana na apoptozu je procenjen imunocitohemijskim bojenjem HTR-8/SVneo ćelija na M30, fragment citokeratina-18 koji nastaje dejstvom kaspaza u apoptozi. Procenat apoptotičnih ćelija u obe grupe (aPL+ i aPL- IgG tretirane ćelije) je bio manji od 1% ukupnog broja ćelija, što je pokazalo da tretman antitelima ne dovodi do apoptoze (**Slika 10**).



**Slika 10. aPL+ IgG ne utiče na ekspresiju markera apoptoze u HTR-8/SVneo ćelijama.** Tretman aPL+ IgG nije doveo do povećanja u broju ćelija koje ekspimiraju marker apoptoze (M30) (**10B**) u odnosu na ćelije tretirane kontrolnim imunoglobulinima (**10A**). Grafik predstavlja rezultate dobijene brojanjem M30 pozitivnih ćelija u ukupnoj populaciji ćelija koji su izraženi kao procenat od kontrole. Prikazana je srednja vrednost iz tri eksperimenta  $\pm$  S.E.M. Marker na mikrografijama označava 10 $\mu$ m.





**Slika 11. Uticaj aPL+ IgG na ekspresiju markera proliferacije u HTR-8/SVneo ćelijama.** Tretman aPL+ IgG je doveo do povećanja u broju ćelija koje ekspimiraju marker proliferacije (Ki-67) (**11B**) u odnosu na ćelije tretirane kontrolnim imunoglobulinima (**11A**). Primenjeni tretman je doveo do povećanja od 38% u broju ćelija koje ekspimiraju marker proliferacije (Ki-67) u odnosu na kontrolu. Grafik prikazuje srednju vrednost iz tri eksperimenta  $\pm$  S.E.M. Marker na mikrografijama označava 10 $\mu$ m.

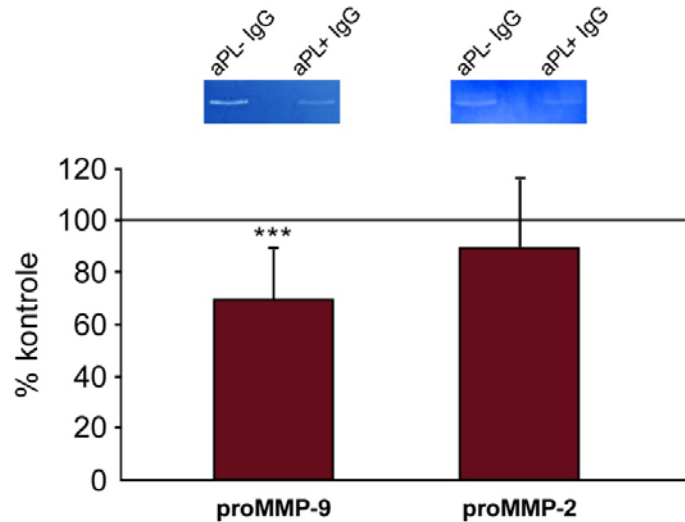
Kada se sagledaju rezultati, može se zaključiti da blag porast u broju živih ćelija predstavlja posledicu povećane ćelijske proliferacije, dok apoptoza ne predstavlja značajan činilac. Rezultati sve tri grupe eksperimenata ukazuju na direktan efekat aPL+ IgG na ćelijsku invaziju, tj. pokazuju da se u osnovi smanjene invazivnosti ne nalazi smanjen broj ćelija usled primenjenog tretmana.

#### **4.1.4. Uticaj imunoglobulina prečišćenih iz seruma pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (aPL+ IgG) na proteine invazivnog trofoblasta**

Trofoblastna invazija je prostorno i vremenski strogo regulisan proces. Prilikom invazije ekstravilusnog trofoblasta ove ćelije vrše degradaciju ekstraćelijskog matriksa, u čemu značajnu ulogu imaju matriksne metaloproteinaze, serin proteaze i katepsini. Najznačajnije među njima su matriksne metaloproteinaze-2 i -9. Pored njih, važnu ulogu imaju i integrinski receptori za komponente vanćelijskog matriksa, integrini  $\alpha_1\beta_1$  i  $\alpha_5\beta_1$ , kao i galektin-1.

##### **4.1.4.1. Uticaj aPL+ IgG na nivoe matriksinih metaloproteinaza-2 i -9**

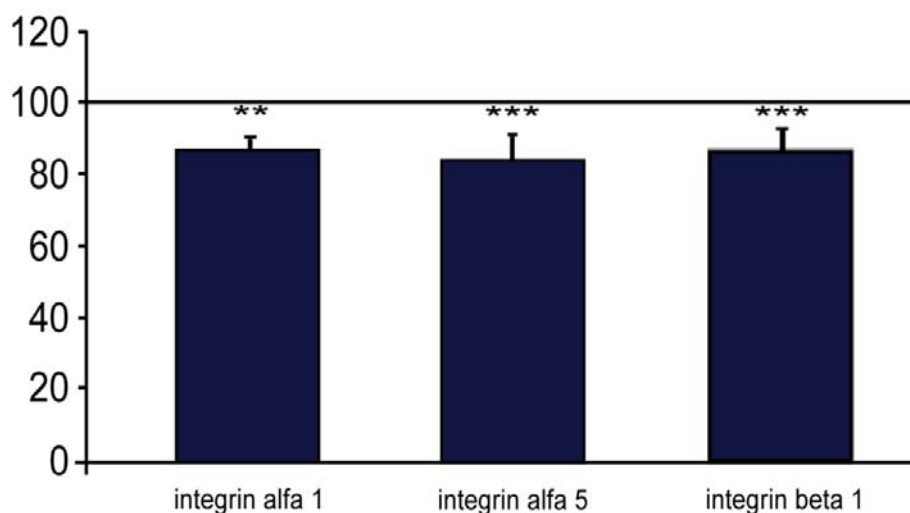
Uticaj aPL+ IgG na nivo metaloproteinaza sekretovanih od strane HTR-8SVneo ćelija je ispitivan enzimatskim testom razgradnje želatina u gelu (želatinska zimografija). Ovom analizom bilo je moguće detektovati enzimatsku aktivnost na molekulskim masama koje odgovaraju proformama MMP-2 i MMP-9. Aktivnost enzima koja se uočava kao prosvetljena traka na gelu obojenim Komazi plavim je denzitometrijski semikvantifikovana. U pojedinim eksperimentima su se mogle uočiti dodatne trake koje po molekulskoj masi odgovaraju MMP-2 i MMP-9, ali one nisu bile pogodne za denzitometrijsku analizu. Tretman aPL+ IgG doveo je do smanjene sekrecije proMMP-9, do 69.3% vrednosti utvrđene za ćelije koje su bile izložene kontrolnim antitelima (aPL- IgG). Smanjenje koje je uočeno kada je analizirana sekrecija proMMP-2 (88.9% od kontrolne vrednosti), nije bilo statistički značajno (**Slika 12**).



**Slika 12. Uticaj aPL+ IgG na sekreciju proformi MMP-2 i -9.** Tretman ćelija aPL+ IgG (100 µg/ml) tokom 24 h je doveo do smanjenja sekrecije proMMP-9 na 69.3% što je bilo statistički značajno za  $p < 0.001$ , obeleženo sa \*\*\*. Sekrecija proMMP-2 nije bila značajno promenjena pod dejstvom tretmana i iznosila je 88.9% od odgovarajućih vrednosti dobijenih u kontroli. Reprezentativni zimogram od četiri eksperimenta je prikazan iznad odgovarajućeg stuba na grafiku. Rezultati predstavljaju srednju vrednost intenziteta dobijenih denzitometrijskom analizom  $\pm$  S.E.M. i prikazani su kao procenat kontrole.

#### 4.1.4.2. Uticaj aPL+ IgG ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha_1$ , $\alpha_5$ i $\beta_1$

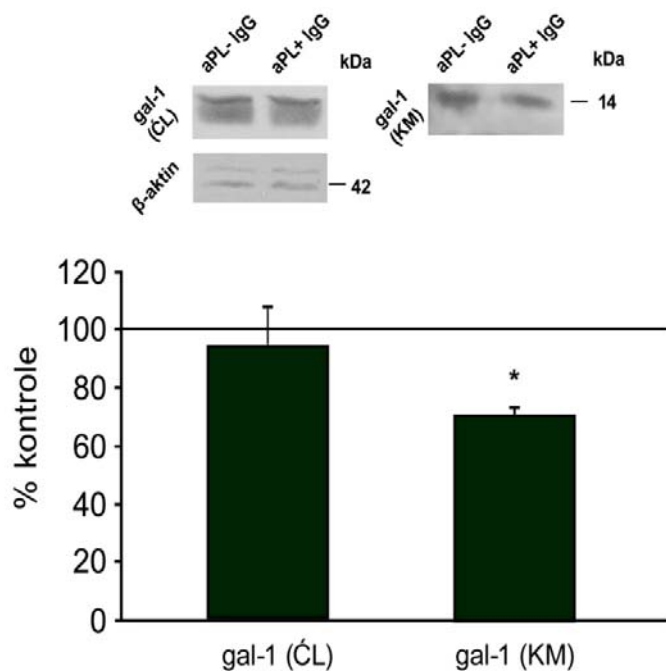
Uticaj aPL+ IgG na ekspresiju integrinskih subjedinica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  ispitivan je kvantitativno, imunoenzimskim testom na ćelijama (CELISA). Rezultati dobijeni nakon 48 h inkubacije pokazuju da aPL+ IgG statistički značajno smanjuje ekspresiju  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  subjedinica integrina na 86.6% ( $p < 0.01$ ), 83.9% ( $p < 0.001$ ) i 86.8% ( $p < 0.001$ ) od vrednosti koje su utvrđene za ćelije tretirane neimunim imunoglobulinima (**Slika 13**). Slični rezultati, mada statistički neznačajni, su dobijeni i nakon 24 h inkubacije sa antitelima (nije prikazano).



**Slika 13. Uticaj aPL+ IgG na ekspresiju integrinskih subjedinica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$ .** Tretman ćelija aPL+ IgG (100  $\mu\text{g/ml}$ ) tokom 48 h je doveo do smanjenja ekspresije  $\alpha_1$  integrinske subjedinice na 86.6% od kontrole, statistički značajno za  $p < 0.01$  (obeleženo sa \*\*);  $\alpha_5$  subjedinice na 83.9% od kontrole, statistički značajno za  $p < 0.001$  (\*\*\*) ; kao i  $\beta_1$  subjedinice na 86.8%, takođe statistički značajno za  $p < 0.001$  (\*\*\*) . Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti ekspresije integrinskih subjedinica nakon tretmana aPL+ IgG iz četiri eksperimenta u CELISA testu ( $n=12$ ) i izražene su kao procenat od kontrole  $\pm$  S.E.M.

#### 4.1.4.3. Uticaj aPL+ IgG na ekspresiju galektina-1

Efekat aPL+ IgG na ekspresiju galektina-1 na nivou informacione RNK je ispitan RQ-PCR metodom, dok je za ispitivanje ekspresije na proteinskom nivou korišćena Western blot analiza. Kako galektin-1 ima značaj za proces invazije i kao membranski vezan i kao sekretovan protein, uticaj aPL+ IgG na ekspresiju gal-1 je ispitan Western blot analizom lizata tretiranih HTR-8/SVneo ćelija i njihovih kondicioniranih medijuma. Tretman aPL+ IgG nije doveo do promene u ekspresiji galektina-1 na nivou iRNK. Blago smanjenje gal-1 u ćelijskim lizatima (93% od kontrole) nije bilo statistički značajno. Nivo sekretovanog gal-1 je pod uticajem aPL+ IgG smanjen na vrednost od 80% od kontrole ( $p < 0.05$ ) (Slika 14).

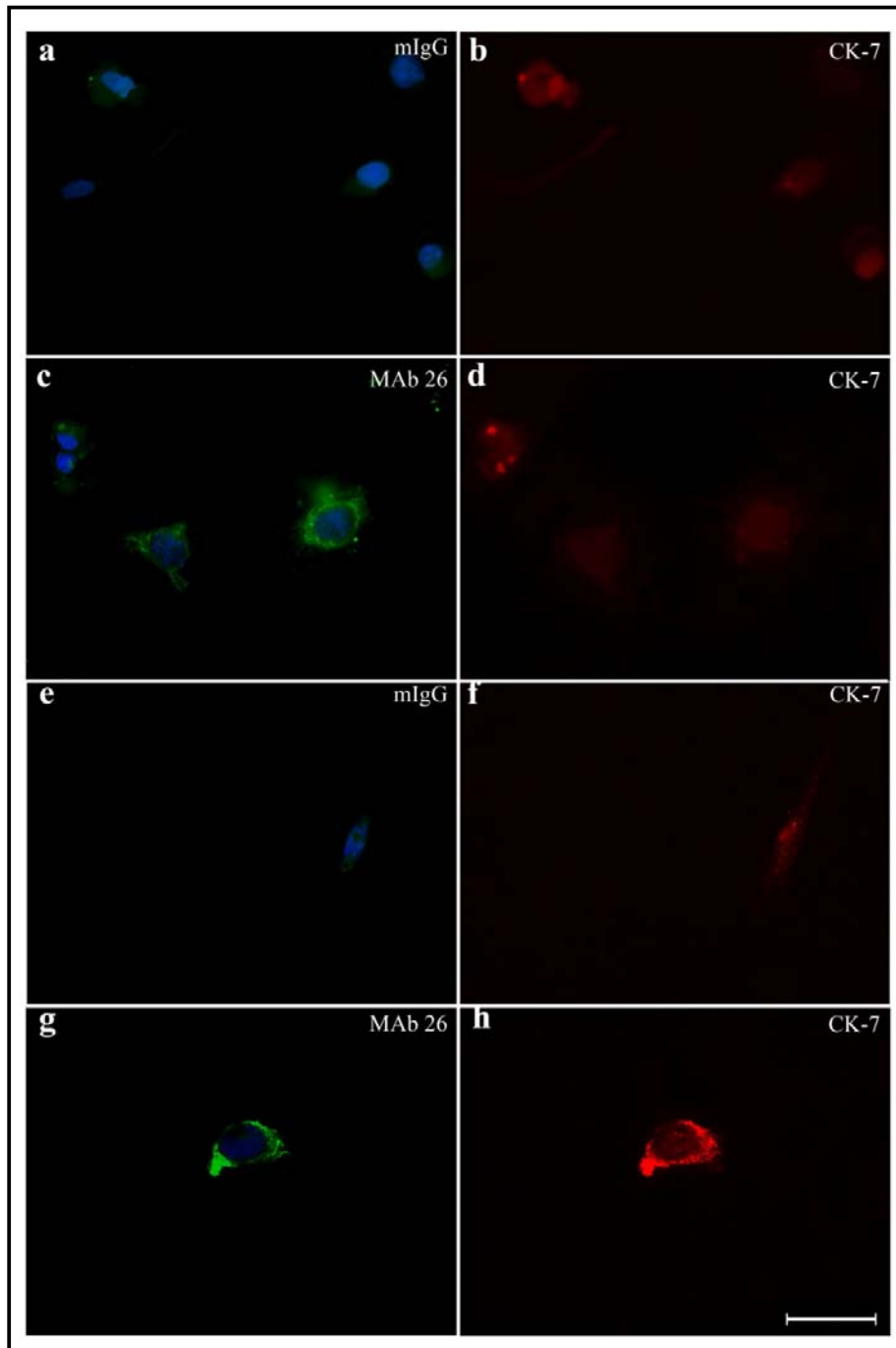


**Slika 14. Uticaj aPL+ IgG na ekspresiju galektina-1 u ćelijskim lizatima (ČL) i kondicioniranom medijumu (KM) tretiranih HTR-8/SVneo ćelija.** Rezultati predstavljaju srednju vrednost intenziteta traka u Western blotu dobijenih denzitometrijskom analizom i normalizovanih na aktin ( $\pm$  S.E.M.) i prikazani su kao procenat kontrole. Tretman ćelija aPL+ IgG (100  $\mu$ g/ml) tokom 24 h nije doveo do promene u količini gal-1 u ukupnim ćelijskim lizatima, dok je nivo sekretovanog gal-1 samanjen na 80% od kontrole (statistički značajno za  $p < 0.05$ , na grafiku označeno sa \*). Reprezentativne membrane iz jednog od tri eksperimenta su prikazane iznad odgovarajućih stubova na grafiku.

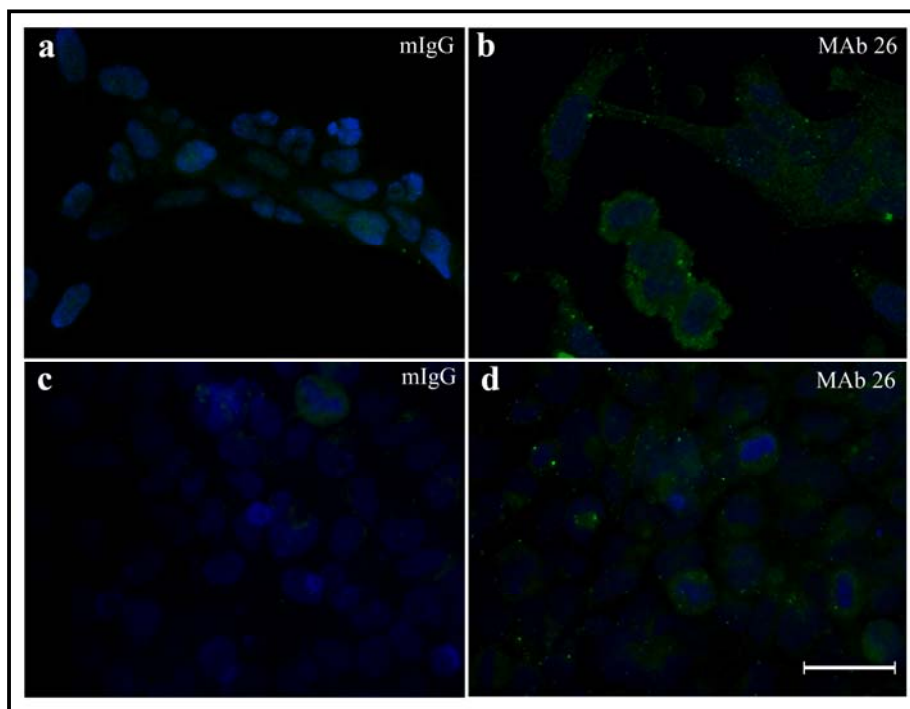
## 4.2. Uticaj $\beta_2$ -glikoprotein I specifičnog antitela MAb 26 na ekstravilusni trofoblast čoveka, *in vitro*

### 4.2.1. Vezivanje MAb 26 za izolovani citotrofoblast i HTR-8/SVneo ćelije

Kao prvi korak u ispitivanju uticaja MAb 26 na ćelije trofoblasta analizirano je njihovo vezivanje za izolovani CT i HTR-8/SVneo ćelije *in vitro*. Imunocitohemijском analizom je pokazano da se MAb 26 vezuju za izolovani CT i HTR-8/SVneo ćelije (Slike 15c, 15g, 16b i 16d). Primena neimunog mišjeg IgG (mIgG) umesto MAb 26 je služila kao kontrola specifičnosti bojenja, koje je i potvrđeno odsustvom florescencije na datim preparatima (Slike 15a, 15e, 16a i 16c). Vezivanje MAb 26 za trofoblastne ćelije gajene u kompletnom medijumu (Slike 15a-15d; 16a i 16b) može biti rezultat vezivanja za endogeni  $\beta_2$ GPI, ali i adherirani  $\beta_2$ GPI poreklom iz telećeg seruma. Kako bi se procenio udeo endogenog  $\beta_2$ GPI u vezivanju MAb 26, eksperiment je ponovljen na ćelijama koje su 24 h pre fiksiranja gajene u osnovnom medijumu, tj. bez telećeg seruma (Slike 15e-15h; 16c i 16d).



**Slika 15. Imunocitohemijska analiza vezivanja MAb 26 za izolovani CT.** Prikazane su reprezentativne mikrografije vezivanja MAb 26 za ćelije gajene u potpunom (15a-15d) ili osnovnom medijumu (15e-15h) kako bi se procenio značaj  $\beta_2$ GPI i drugih faktora poreklom iz FCS-a za vezivanje MAb 26 (15c i 15h). mIgG je korišćen kao adekvatna kontrola nespecifičnog vezivanja (15b i 15f). Dvojno bojenje istih ćelija izolovanog CT na citokeratin-7 je prikazano na Slikama 15b, 15d, 15f i 15h. Jedra su obojena DAPI-jem (plavo). Marker označava 20  $\mu$ m.

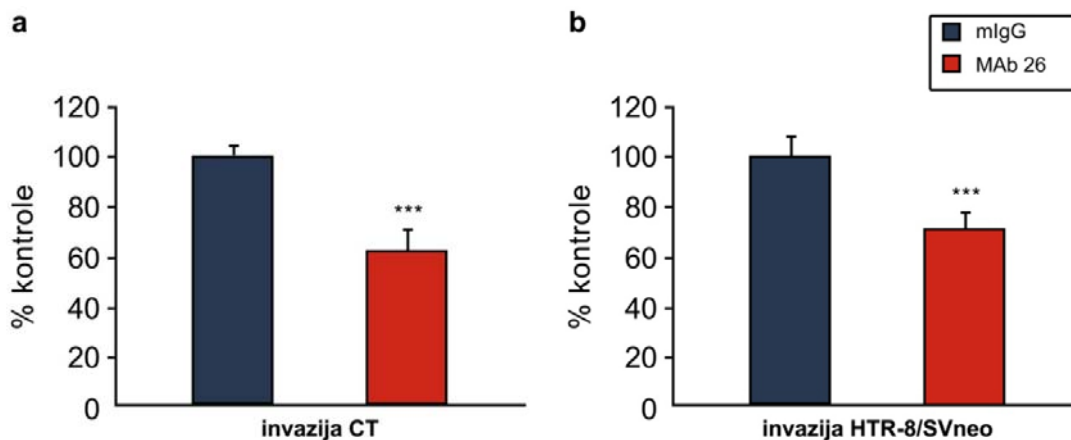


**Slika 16. Imunocitohemijska analiza vezivanja MAb 26 za HTR-8/SVneo ćelije.** Prikazane su reprezentativne mikrografije vezivanja MAb 26 za ćelije gajene u potpunom (**16a i 16b**) ili osnovnom medijumu (**16c i 16d**) kako bi se procenio značaj  $\beta_2$ GPI i drugih faktora poreklom iz FCS-a za vezivanje MAb 26 (**16b, 16d**). mIgG je korišćen kao adekvatna kontrola nespecifičnog vezivanja (**16a, 16c**). Jedra su obojena DAPI-jem (plavo). Marker označava 20  $\mu$ m.

#### 4.2.2. Uticaj MAb 26 na invaziju trofoblasta, *in vitro*

Uticaj MAb 26 na ćelijsku invaziju je ispitan u *in vitro* modelu invazije u Matrigel. Rezultati su pokazali da tretman MAb 26 (5 $\mu$ g/ml) statistički značajno ( $p < 0.001$ ) inhibira invaziju izolovanog citotrofoblasta na vrednost od 67.9 % kontrole (**Slika 17a**). Pri istim eksperimentalnim uslovima MAb 26 (5 $\mu$ g/ml) je značajno ( $p < 0.001$ ) smanjivao invaziju i HTR-8/SVneo ćelija do 71.4% od kontrolne vrednosti (**Slika 17b**). Ispitivanjem dozne zavisnosti primenom 2.5, 5 i 10  $\mu$ g/ml MAb 26/mIgG u tretmanu nije uočena statistički značajna razlika u inhibitornom efektu MAb 26 na invaziju HTR-8/SVneo ćelija (rezultati nisu prikazani).

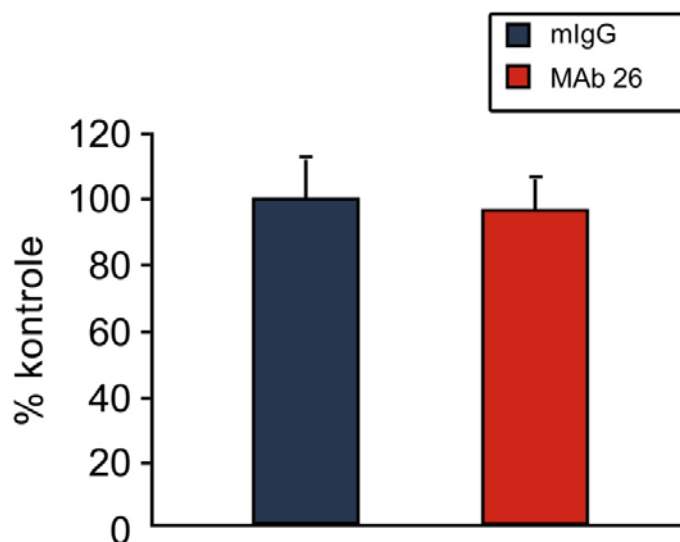




**Slika 17. Uticaj MAb 26 na invaziju izolovanog CT (a) i HTR-8/SVneo ćelija (b).** Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost broja zauzetih pora  $\pm$  S.E.M. i izražene su kao procenat od kontrole, n=3 za izolovani CT, n=4 za HTR-8/SVneo ćelije. Statistički značajne razlike između kontrole i tretmana za  $p < 0.001$  su označene sa \*\*\*.

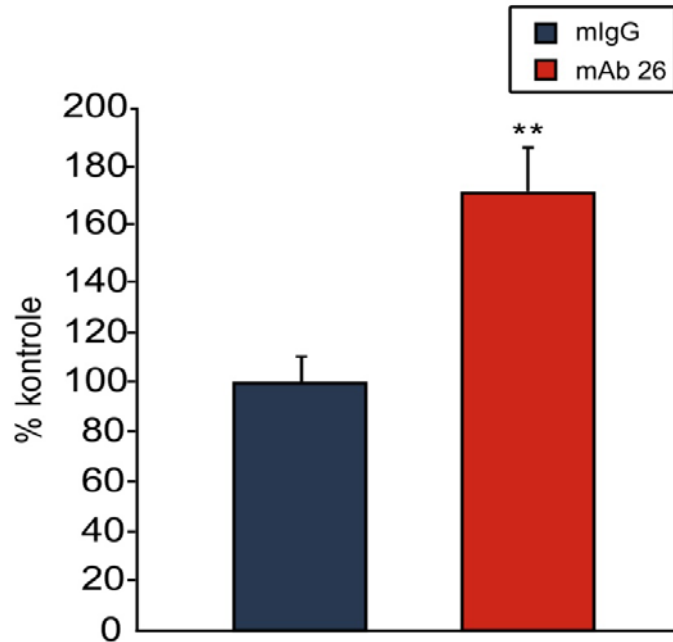
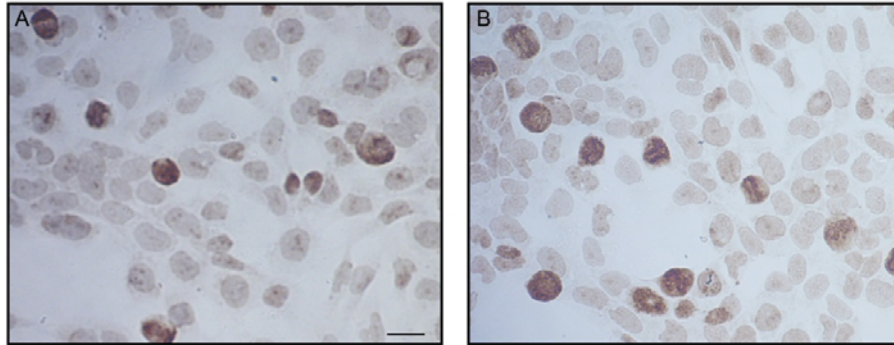
#### 4.2.2. Uticaj MAb 26 na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu HTR-8/SVneo ćelija

Tretman ćelija MAb 26 je doveo do smanjene invazije izolovanog CT i HTR-8/SVneo ćelija. Stoga je bilo potrebno ispitati njihov efekat na vijabilnost, proliferaciju i apoptozu HTR-8/SVneo ćelija, kako bi se utvrdilo da li je neki od tih parametara odgovoran za uočeno smanjenje ćelijske invazije. Vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija pod uticajem MAb 26 je analizirana u MTT testu. Rezultati su pokazali da tretman antitelima ne utiče značajno na vijabilnost ćelija (**Slika 18**). Pri tome nisu uočene dozna (2.5, 5 i 10  $\mu\text{g/ml}$ ) ni vremenska (24, 48 h) zavisnost tretmana (rezultati nisu prikazani).



**Slika 18. MAb 26 ne utiče na vijabilnost HTR-8/SVneo ćelija.** Tretman ćelija MAb 26 (5 µg/ml) tokom 24 h nije doveo do promene u ćelijskoj vijabilnosti, što je utvrđeno MTT testom. Rezultati su izraženi kao procenat od kontrole i prikazana je srednja vrednost za četiri eksperimenta (n=36) ± S.E.M.

Kako je redukcija MTT-a u zasnovana na metaboličkoj aktivnosti mitohondrija, nije moglo biti isključeno da odsustvo efekta MAb 26 na vijabilnost ćelija predstavlja odraz njihove metaboličke aktivnosti, a ne broja ćelija. Zbog toga je uticaj MAb 26 na proliferaciju HTR-8/SVneo ćelija, ispitan imunocitohemijski, na osnovu ekspresije Ki-67 markera ćelijske proliferacije. Ekspresija Ki-67 markera je evaluirana nakon 24 h inkubacije sa mIgG ili MAb 26 (**Slika 19A i 19B**). Procenat Ki-67 pozitivnih ćelija u MAb 26 tretiranim kulturama je izražen kao procenat od kontrole (mIgG tretirane kulture) i iznosio je 179% ( $p < 0.01$ ) (**Slika 19**).



**Slika 19. Uticaj MAb 26 na ekspresiju markera proliferacije u kulturi HTR-8/SVneo ćelija.** Dobijene vrednosti prikazane na grafiku predstavljaju srednju vrednost broja Ki-67 pozitivnih ćelija iz tri eksperimenta ( $\pm$  SEM), izraženo kao procenat od kontrole. Tretman HTR-8/SVneo ćelija MAb 26 je doveo do povećanja u broju Ki-67 pozitivnih ćelija za 79 % u odnosu na kontrolu, što je bilo statistički značajno za  $p < 0.01$  i na grafiku je obeleženo sa \*\*. Iznad grafika je prikazana reprezentativna mikrografija ekspresije Ki-67 u kulturi HTR-8/SVneo ćelija tretiranih sa mIgG (A) ili MAb 26 (B). Marker na mikrografijama označava 20 $\mu$ m.

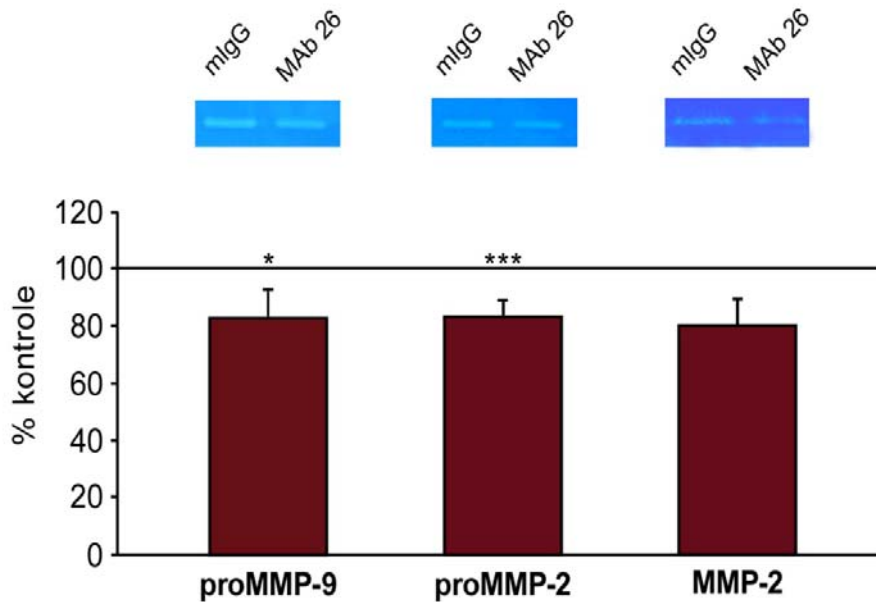
Iako se nivo apoptoze u ćelijskim kulturama rutinski procenjuje na osnovu ekspresije M30 markera, to u ovom eksperimentalnom radu nije bilo moguće. Antitela korišćena u tretmanu ćelija su, kao i anti-M30 antitelo, mišja monoklonska antitela te stoga diskriminacija između njih u imunocitohemijskom bojenju nije moguća. Iz tog razloga apoptoza je procenjena na osnovu sposobnosti živih ćelija da ne zadržavaju vitalnu boju. U ovom eksperimentu korišćeno je bojenje vitalnom bojom Tripan plavo. Nije uočena značajna razlika u broju nevijabilnih ćelija između kultura tretiranih sa MAb 26 i kultura tretiranih kontrolnim mišjim IgG-om. Broj nevijabilnih ćelija je u obe grupe ćelija bio manji od 0.5% (rezultati nisu prikazani).

#### **4.2.4. Uticaj MAb 26 na proteine invazivnog trofoblasta**

Kako su rezultati *in vitro* testa ćelijske invazije u Matrigel pokazali značajan inhibitorni uticaj MAb 26, bilo je neophodno ispitati mehanizme tog efekata. U daljem radu je ispitan uticaj MAb 26 na molekule značajne za proces trofoblastne invazije: matriksne metaloproteinaze-2 i -9, integrine  $\alpha_5\beta_1$  i  $\alpha_1\beta_1$ , i galektin-1.

##### **4.2.4.1. Uticaj MAb 26 na nivoe matriksnih metaloproteinaza-2 i -9**

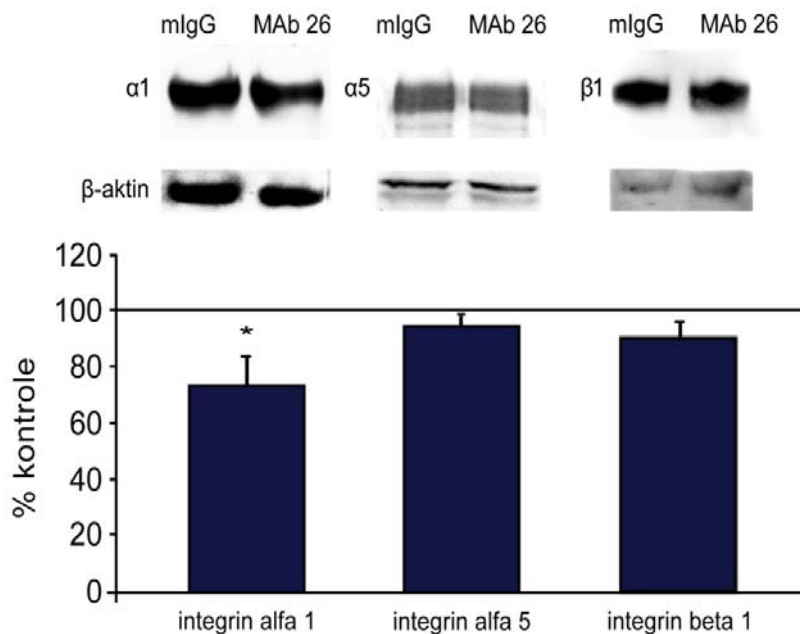
Efekat MAb 26 na aktivnost MMP-2 i MMP-9 u kondicioniranim medijumima HTR-8/SVneo ćelija je ispitan metodom želatinske zimografije. Densitometrijska analiza dobijenih zimograma je pokazala da MAb 26 značajno ( $p < 0.05$ ) smanjuje želatinoznu aktivnost proMMP-9 na 83.7% kontrole, proMMP-2 na 84.2% kontrole ( $p < 0.001$ ), dok smanjenje MMP-2 na 81% kontrole nije bilo statistički značajno (**Slika 20**). Svetla traka koja prema molekulskoj masi odgovara metaloproteinazi-9 i koja je bila uočljiva u pojedinim zimogramima nije bila pogodna za densitometrijsku analizu.



**Slika 20. Uticaj MAb 26 na sekreciju matriksnih metaloproteinaza-2 i -9.** Tretman ćelija MAb 26 (5 µg/ml) tokom 24 h je doveo do smanjenja sekrecije proMMP-9 na 83.7% (statistički značajno za  $p < 0.05$ , što je obeleženo sa \*), proMMP-2 na 84.2% od kontrole (značajno za  $p < 0.001$ , \*\*\*), dok uočeno smanjenje u sekreciji MMP-2 (na 81% od kontrolne vrednosti) nije bilo statistički značajno. Rezultati predstavljaju srednju vrednost intenziteta dobijenih denzitometrijskom analizom  $\pm$  S.E.M. i prikazani su kao procenat kontrole. Reprezentativni zimogram iz jednog od 5 eksperimenata je prikazan iznad odgovarajućih stubova na grafiku.

#### 4.2.4.2. Uticaj MAb 26 na ekspresiju integrinskih subjedinica $\alpha_1$ , $\alpha_5$ i $\beta_1$

Uticaj MAb 26 na proteinsku ekspresiju integrinskih subjedinica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  ispitan je Western blot analizom lizata HTR-8/SVneo tretiranih ćelija. Intenziteti traka dobijenih za pojedinačne integrine su normalizovani u odnosu na intenzitet trake za  $\beta$ -aktin. Na taj način je bilo moguće semikvantifikovati uticaj MAb 26 na ekspresiju integrinskih subjedinica i utvrđeno je da tretman antitelima značajno smanjuje ekspresiju  $\alpha_1$  subjedinice ( $p < 0.05$ ) na 73.5% kontrole, dok uočena blaga inhibicija ekspresije subjedinica  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  (na 95%, odnosno 90% kontrole) nije bila statistički značajna (Slika 21). Uticaj MAb 26 na ekspresiju integrinskih subjedinica je ispitan i na nivou iRNK, RQ-PCR metodom i rezultati su navedeni u Tabeli VII.



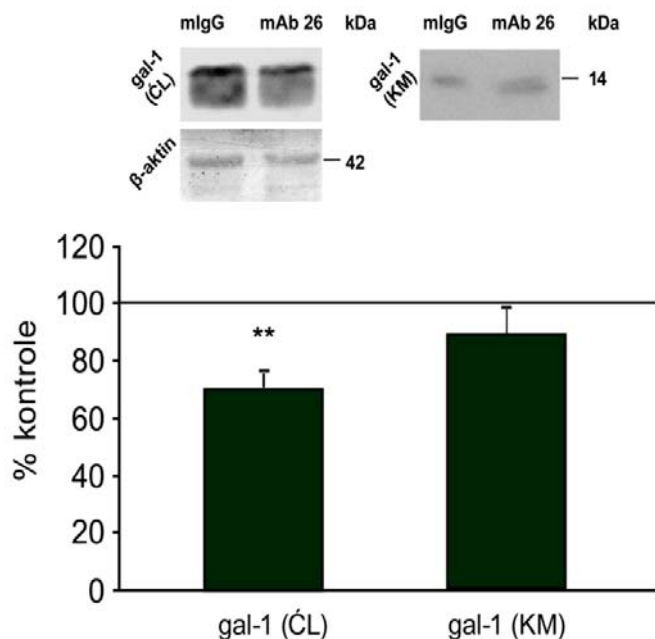
**Slika 21. Uticaj MAb 26 na ekspresiju integrinskih subjedinica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  na proteinskom nivou.** Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost intenziteta traka u Western blotu koje su dobijene denzitometrijskom analizom i normalizovane na aktin ( $\pm$  S.E.M.) Rezultati su prikazani kao procenat od kontrole. Tretman ćelija MAb 26 (5  $\mu$ g/ml) tokom 24 h je doveo do smanjenja ekspresije integrinske subjedinice  $\alpha_1$  na 73.5% od kontrole, statistički značajno za  $p < 0.05$  (obeleženo sa \*); dok uočeno smanjenje ekspresije subjedinica  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  nije imalo statističku značajnost. Reprezentativne membrane iz jednog od tri eksperimenta su prikazane iznad odgovarajućih stubova na grafiku.

**Tabela VII. Uticaj MAb 26 na ekspresiju integrinskih subjedinica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  na nivou iRNK.** Rezultati dobijeni RQ-PCR analizom ekspresije gena koji kodiraju integrinske subjedinice su normalizovani na ekspresiju konstitutivno eksprimiranog gena koji je služio kao endogena kontrola (GAPDH) i prikazane kao procenat kontrole.

Gen	Promena u ekspresiji gena (% kontrole)
Integrin $\alpha_1$	134
Integrin $\alpha_5$	115
Integrin $\beta_1$	128

#### 4.2.4.3. Uticaj MAb 26 na ekspresiju galektina-1

Efekat MAb 26 na ekspresiju galektina-1 na nivou informacione RNK je ispitan RQ-PCR metodom, dok je za ispitivanje ekspresije na proteinskom nivou korišćena Western blot analiza. Ekspresija iRNK za gal-1 je bila smanjena u MAb 26 tretiranim HTR-8/SVneo ćelijama u odnosu na mIgG tretirane ćelije (na 83% kontrole), što je utvrđeno  $\Delta\Delta C_t$  metodom. Ekspresija gal-1 proteina u lizatima ćelija tretiranih MAb 26 je bila smanjena na 70.7% kontrolne vrednosti ( $p < 0.01$ ), dok je nivo gal-1 u kondicioniranom medijumu MAb 26 tretiranih ćelija bio snižen na 88.2% vrednosti detektovane u kondicioniranom medijumu ćelija tretiranih kontrolnim antitelom (mIgG) (Slika 22).



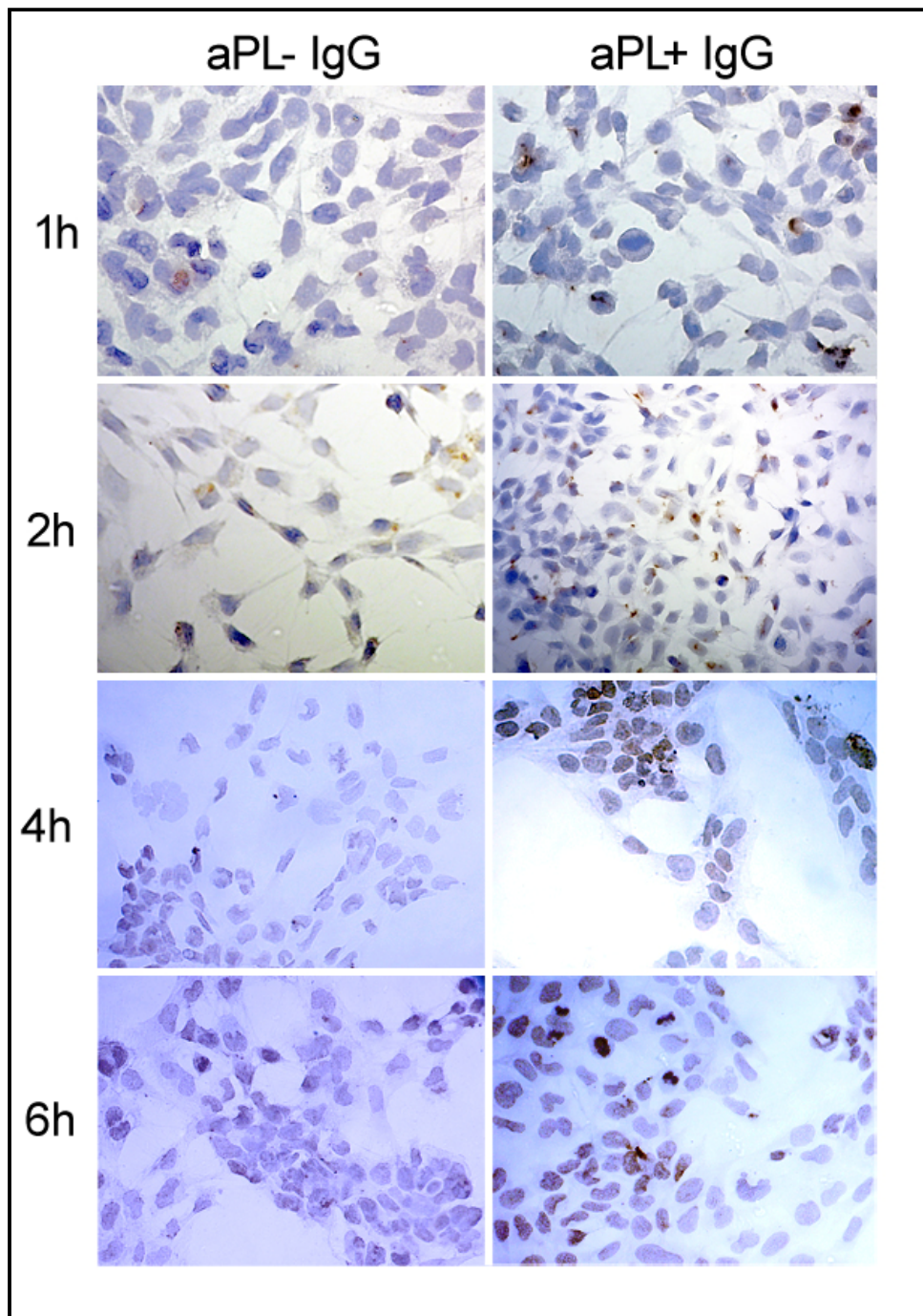
**Slika 22. Uticaj MAb 26 na ekspresiju galektina-1 u ćelijskim lizatima (ČL) i kondicioniranom medijumu (KM) tretiranih HTR-8/SVneo ćelija.** Rezultati predstavljaju srednju vrednost intenziteta traka u Western blotu, posle denzitometrijske analize i normalizovanja na aktin ( $\pm$  S.E.M.) i prikazani su kao procenat kontrole. Tretman ćelija MAb 26 (5  $\mu$ g/ml) tokom 24 h je doveo do smanjenja ekspresije gal-1 u ukupnim ćelijskim lizatima na 70.7% od kontrole, statistički značajno za  $p < 0.01$  (obeleženo sa \*\*), dok uočeno smanjenje u količini sekretovanog gal-1 nije bilo statistički značajno. Reprezentativne membrane iz jednog od četiri eksperimenta su prikazane iznad odgovarajućih stubova na grafiku.

### **4.3. Lokalizacija imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom u *in vitro* interakciji sa ćelijama trofoblata**

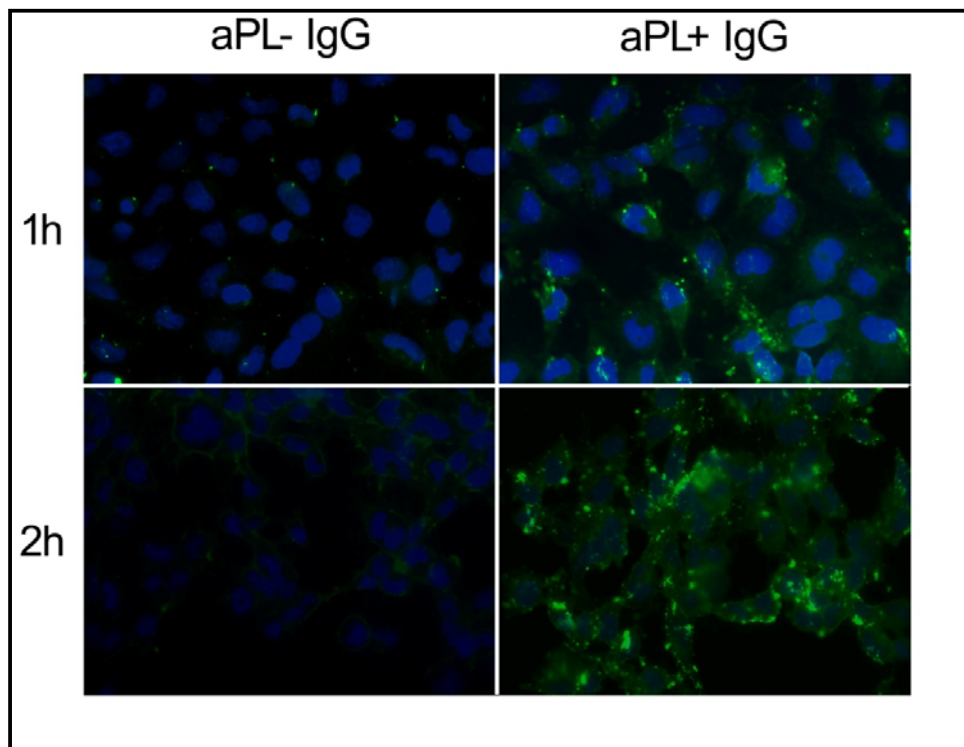
#### **4.3.1. Detekcija aPL+ IgG na HTR-8/SVneo ćelijama nakon inkubacije**

HTR-8/SVneo ćelije su gajene u kompletnom medijumu sa 100 µg/ml odgovarajućeg imunoglobulina (aPL+ IgG ili aPL- IgG) tokom 1 h, 2 h, 4 h i 6 h. Nakon inkubacije lokalizacija IgG je detektovana imunocitohemijski, primenom biotinom obeleženog sekundarnog antitela, anti-humani IgG (**Slika 23**). aPL+ IgG je već nakon 1 h inkubacije bio detektabilan unutar ćelija, pri čemu se broj intracelularno pozitivnih ćelija povećavao sa trajanjem inkubacije. Primena aPL- IgG je rezultirala malim brojem intracelularno pozitivnih ćelija, i taj broj se nije menjao sa dužinom trajanja inkubacije. Specifičnost bojene reakcije je proverena i upotrebom fluorescentno obeleženog anti-humani IgG sekundarnog antitela, pri čemu su za analizu izabrane vremenske tačke 1 i 2 h inkubacije sa IgG (**Slika 24**). Primena fluorescentno obeleženog sekundarnog antitela je obezbedila jasniji signal, na osnovu koga je uočeno da je vezivanje imunoglobulina koji ne poseduju specifičnost karakterističnu za APS prvenstveno membransko, dok su imunoglobulini prečišćeni iz seruma pacijenata sa APS detektovani pretežno unutar ćelije.





**Slika 23. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije aPL+ IgG nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama primenom biotinom obeleženog sekundarnog antitela.** Reprezentativne mikrografije kojima je prikazana ćelijska lokalizacija aPL+ IgG nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama u trajanju od 1 h, 2 h, 4 h ili 6 h su prikazane na desnom panelu slike. Odgovarajuće mikrografije koje prikazuju lokalizaciju aPL- IgG u istim eksperimentalnim uslovima su prikazane na panelu levo, za svaku vremensku tačku.

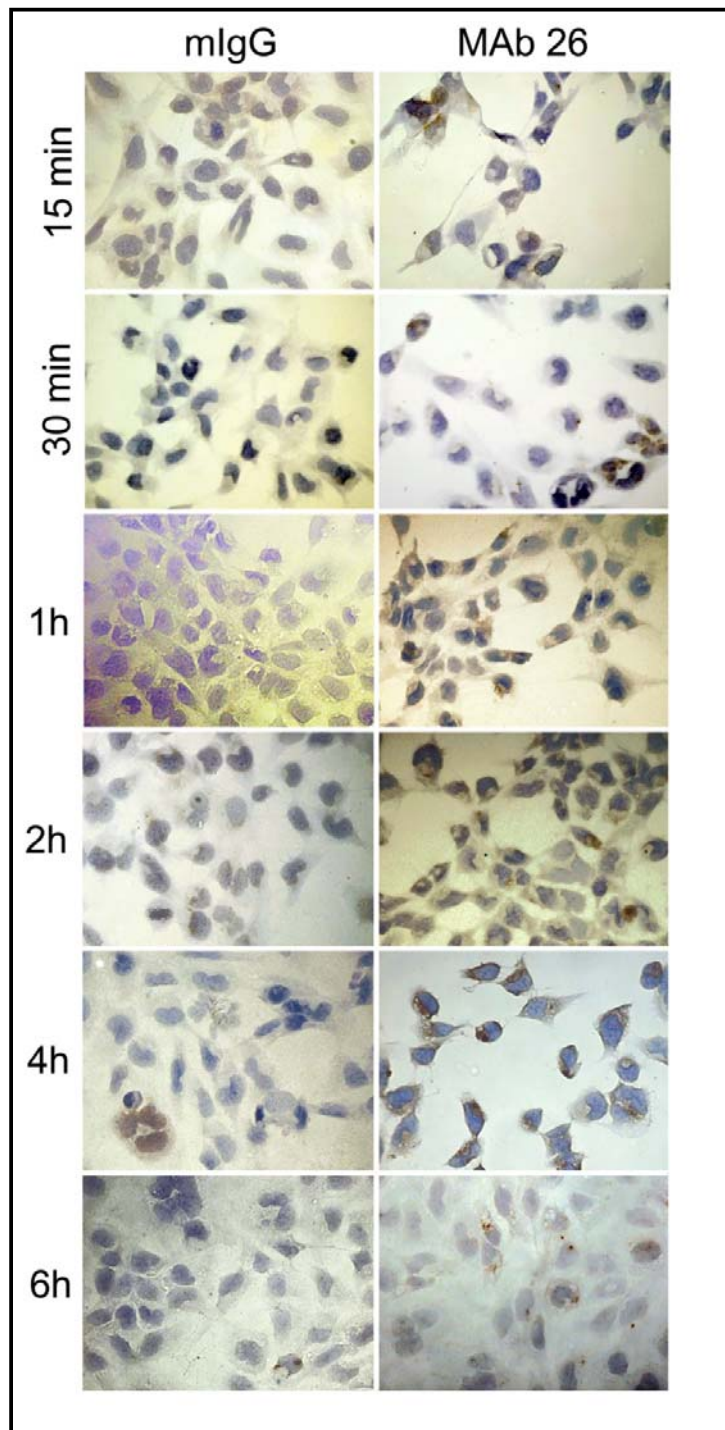


**Slika 24. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije aPL+ IgG nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama primenom sekundarnog antitela obeleženog FITC-om.** Reprezentativne mikrografije kojima je prikazana ćelijska lokalizacija aPL+ IgG nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama u trajanju od 1 h i 2 h su prikazane na desnom panelu slike. Odgovarajuće mikrografije koje prikazuju lokalizaciju aPL- IgG u istim eksperimentalnim uslovima su prikazane na panelu levo, za svaku vremensku tačku.

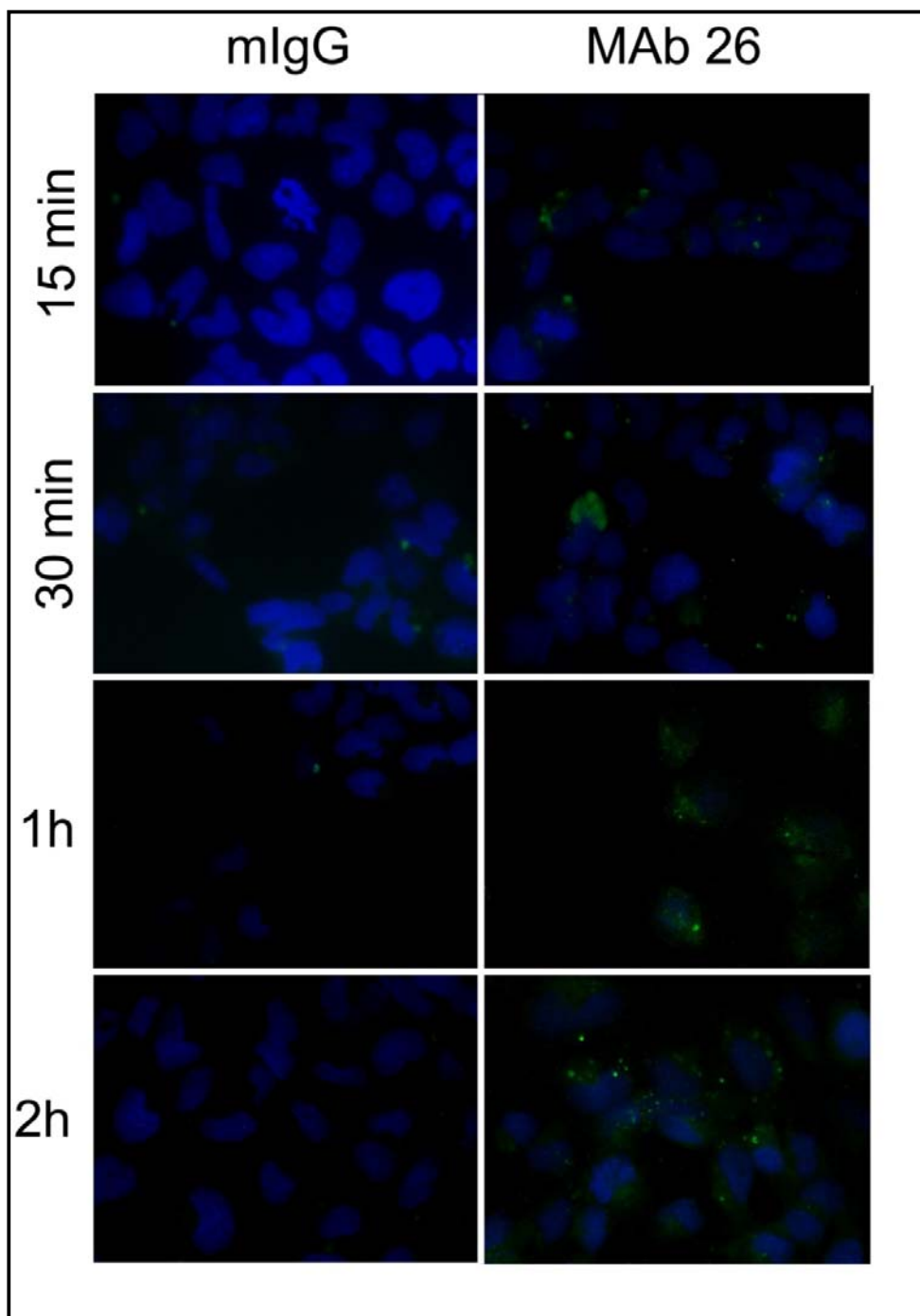
Imunoglobulini izolovani iz seruma zdravih osoba čine smešu IgG različitih specifičnosti i mogu uključivati antitela koja imaju sposobnost internalizacije u žive ćelije. Takođe i korišćeni aPL+ IgG predstavlja poliklonsku smešu IgG koji su značajni u APS, ali udeo imunoglobulina sa specifičnošću za pojedine fosfolipide i/ili  $\beta_2$ GPI u aPL smeši nije poznat. Zbog svega navedenog odlučili smo se da u detaljnijem ispitivanju ovog procesa koristimo samo MAb 26, monoklonsko antitelo definisane specifičnosti.

#### 4.3.2. Detekcija MAb 26 na HTR-8/SVneo ćelijama nakon inkubacije

Ćelijska lokalizacija MAb 26 i odgovarajućeg kontrolnog imunoglobulina (mIgG) je analizirana imunocitohemijski, nakon 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h i 6 h inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama, pri koncentraciji od 5  $\mu\text{g/ml}$  (**Slika 25**). Korišćenjem biotinom-obeležnog sekundarnog antitela prema imunoglobulinima miša pokazana je intracelularna lokalizacija MAb 26 u jednom broju ćelija, već nakon 15 min inkubacije. Ćelije kod kojih je bilo moguće detektovati vezani mIgG su se uočavale samo sporadično i njihov broj nije bio u korelaciji sa dužinom trajanja inkubacije. Broj pozitivnih ćelija, kao i intenzitet bojenja, su se povećavali sa povećanjem dužine trajanja inkubacije sa antitelima. Aleksa 488-obeleženo sekundarno antitelo prema imunoglobulinima miša je korišćeno da bi se preciznije ispitala uočena ćelijska lokalizacija imunoglobulina. Na osnovu prethodnog dela ispitivanja, kao informativne vremenske tačke odabrane su 15 min, 30 min, 1 h i 2 h inkubacije sa antitelima (**Slika 26**).



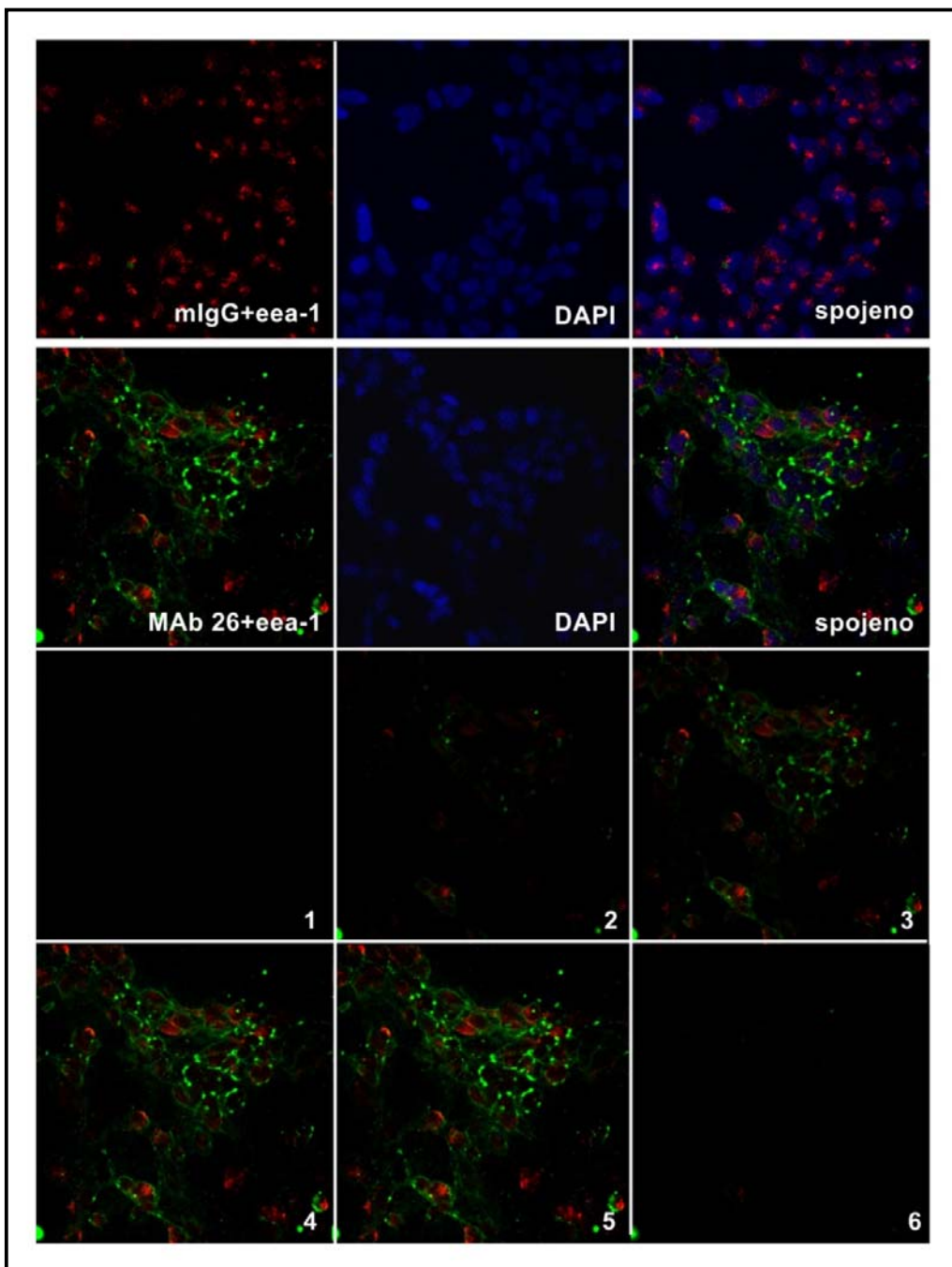
**Slika 25. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama primenom biotinom obeleženog sekundarnog antitela. Reprezentativne mikrografije kojima je prikazana ćelijska lokalizacija MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama u trajanju od 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h ili 6 h su prikazane na desnom panelu slike. Odgovarajuće mikrografije koje prikazuju lokalizaciju mIgG u istim eksperimentalnim uslovima su prikazane na panelu levo.**



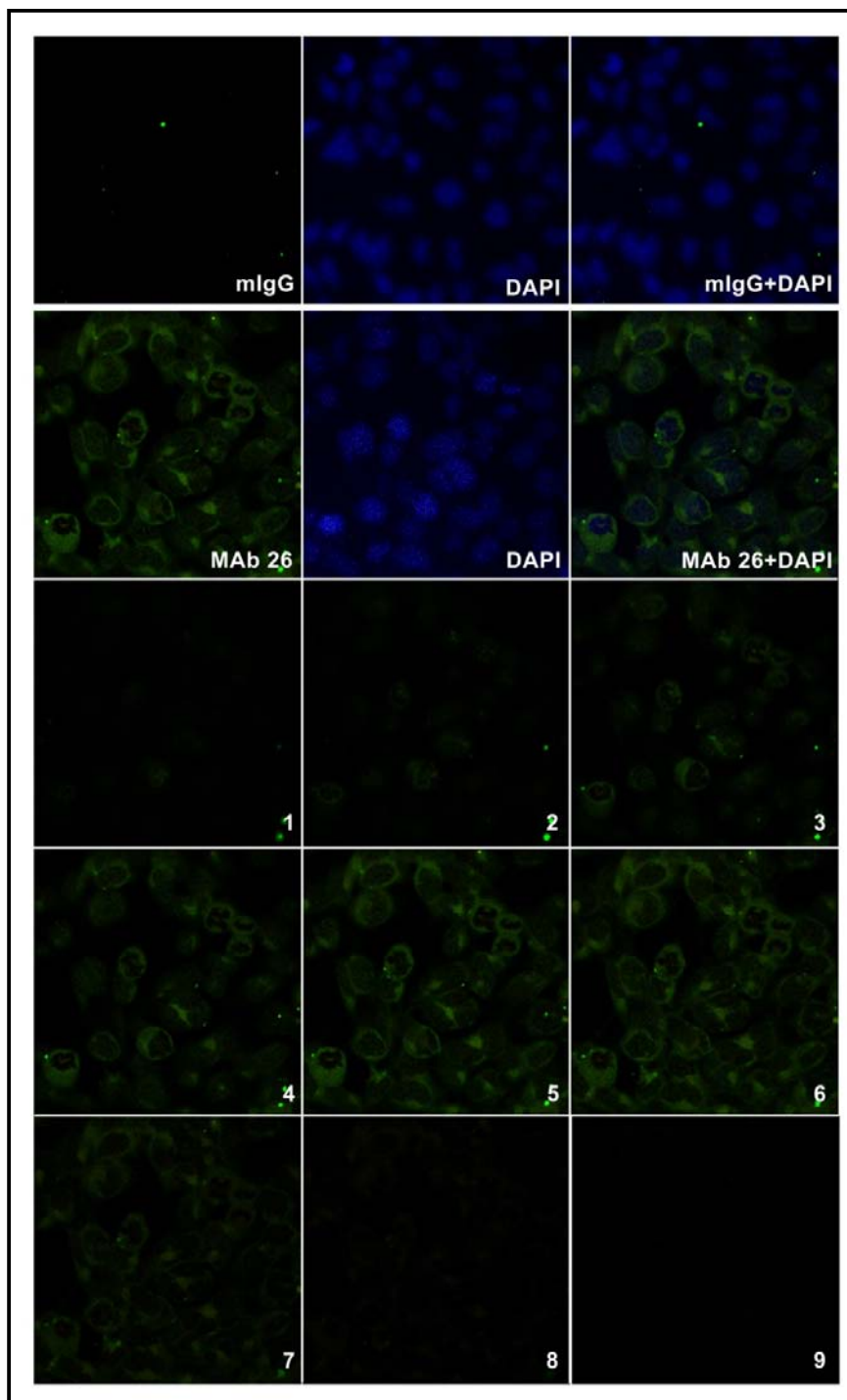
**Slika 26. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama primenom Aleksa 488-obeležnog sekundarnog antitela.** Reprerentativne mikrografije kojima je prikazana ćelijska lokalizacija MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama u trajanju od 15 min, 30min, 1 h i 2 h su prikazane na desnom panelu slike. Odgovarajuće mikrografije koje prikazuju lokalizaciju mIgG kao kontrolnog antitela u istim eksperimentalnim uslovima su prikazane na panelu levo.

Zbog pokazane veće osetljivosti i jasnije detekcije signala, u daljim imunocitohemijskim ispitivanjima su korišćena odgovarajuća fluorescentno obeležena sekundarna antitela. Preciznija analiza preparata HTR-8/SVneo ćelija koje su bile inkubirane sa MAb 26, odnosno sa mIgG, tokom 2 h (**Slika 27**) i 24 h (**Slika 28**) je urađena primenom konfokalne mikroskopije. Ispitivana antitela su detektovana optičkim presecima duž Z ose ćelije, čime je ostvaren jasniji uvid o mestu lokalizacije antitela. Primena neimunog mišjeg IgG je rezultirala potpunim odsustvom bojenja što je potvrdilo specifičnost dobijenih rezultata. Kako bi se preciznije lokalizovala fluorofora specifična za MAb 26, HTR-8/SVneo ćelije koje su tokom 2 h bile inkubirane sa MAb 26, odnosno sa mIgG, su bojene dodatno i prema endogeno eksprimiranom proteinu EEA-1, koji je ujedno i marker ranog endozoma.





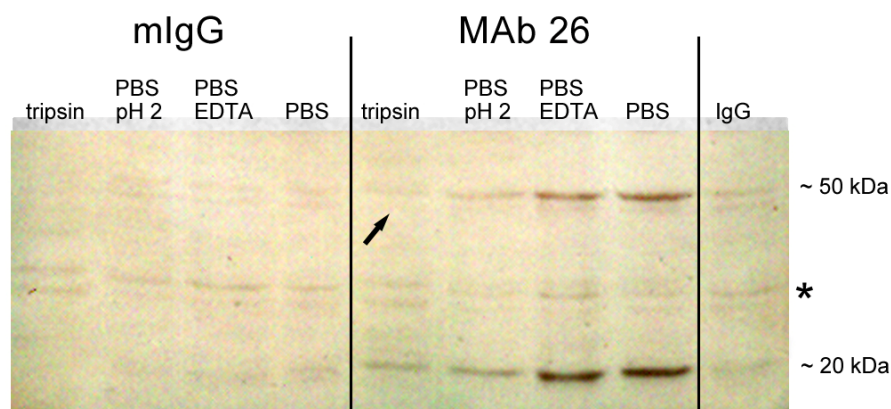
**Slika 27. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon 2 h inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama, primenom konfokalne mikroskopije.** Mikrografije prikazuju ćelijsku lokalizaciju MAb 26 i mIgG, kao kontrole nespecifičnog vezivanja, nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama u trajanju od 2 h (zelena boja). Ćelije su dvojno bojene prema markeru ranog endozoma EEA-1 (crvena boja). Preparati su analizirani konfokalnim mikroskopom. Oznake 1-6 predstavljaju optičke rezove duž Z-ose ćelija inkubiranih sa MAb 26.



**Slika 28. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon 24 h inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama, primenom konfokalne mikroskopije.** Mikrografije prikazuju ćelijsku lokalizaciju MAb 26 i mIgG, kao kontrole nespecifičnog vezivanja, nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama u trajanju od 24 h (zeleno fluorescencija). Preparati su analizirani konfokalnim mikroskopom. Oznake 1-9 predstavljaju optičke rezove istog vidnog polja duž Z-ose ćelija inkubiranih sa MAb 26.



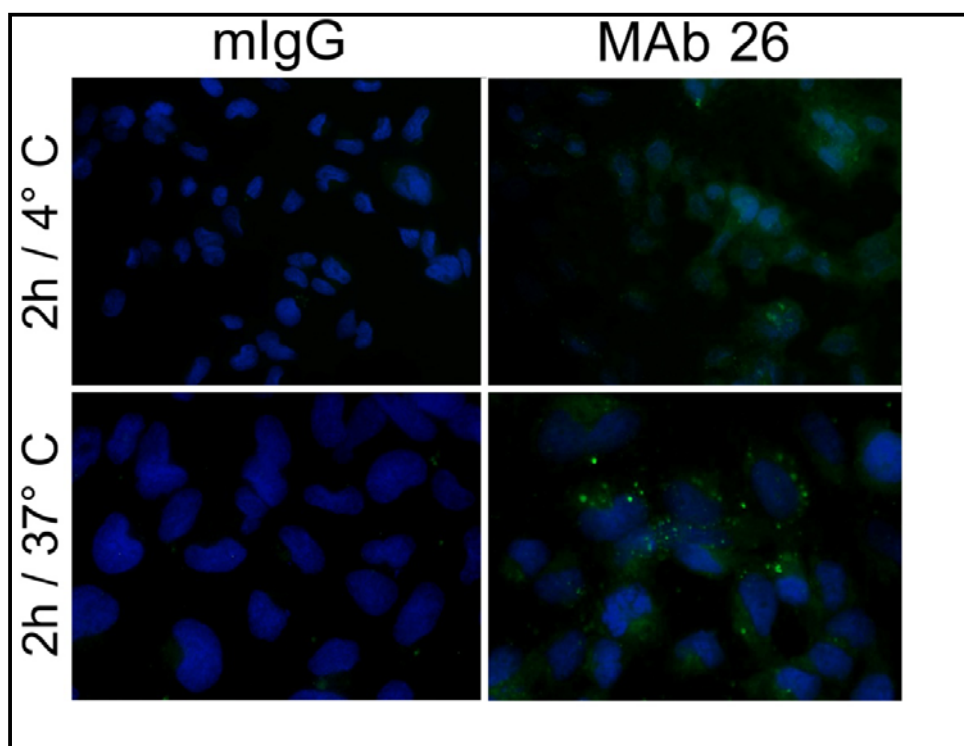
Unutarćelijska lokalizacija MAb 26 je pokazana i Western blot analizom lizata ćelija, nakon 24 h inkubacije sa MAb 26/mIgG, korišćenjem biotinom-obeleženog sekundarnog antitela prema imunoglobulinima miša. U lizatima tretiranih ćelija koje su bile odlepljene mehanički ili primenom hladnog PBS 0.02% EDTA, detektovane su trake koje odgovaraju teškom i lakom lancu MAb 26 i mIgG, što je utvrđeno poređenjem sa IgG koji je korišćen kao marker. Trake dobijene analizom lizata mIgG tretiranih ćelija su bile znatno slabijeg intenziteta. Ispiranje ćelija puferom niske pH i tretman tripsinom, radi uklanjanja membranski vezanih antitela, rezultirao je odsustvom detekcije mIgG u odgovarajućim ćelijskim lizatima, dok je MAb 26 bilo moguće detektovati, sa slabijim intenzitom dobijenih traka (**Slika 29**).



**Slika 29. Detekcija unutarćelijske lokalizacije MAb 26 primenom Western blot metode.** U lizatima tretiranih ćelija koje su bile odlepljene mehanički i primenom hladnog PBS 0.02% EDTA, detektovane su trake koje odgovaraju teškom i lakom lancu MAb 26 i mIgG, što je utvrđeno poređenjem sa elektroforetskim profilom izolovanog IgG koji je korišćen kao marker. Nakon uklanjanja membranski vezanih antitela (ispiranjem ćelija puferom niske pH i tretiranjem tripsinom) moguće je detektovati samo trake koje odgovaraju teškom i lakom lancu MAb 26. \* označava trake koje se javljaju usled nespecifičnog vezivanja sekundarnog antitela za membranu.

### 4.3.3. Ispitivanje uticaja temperature na ćelijsku lokalizaciju MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama

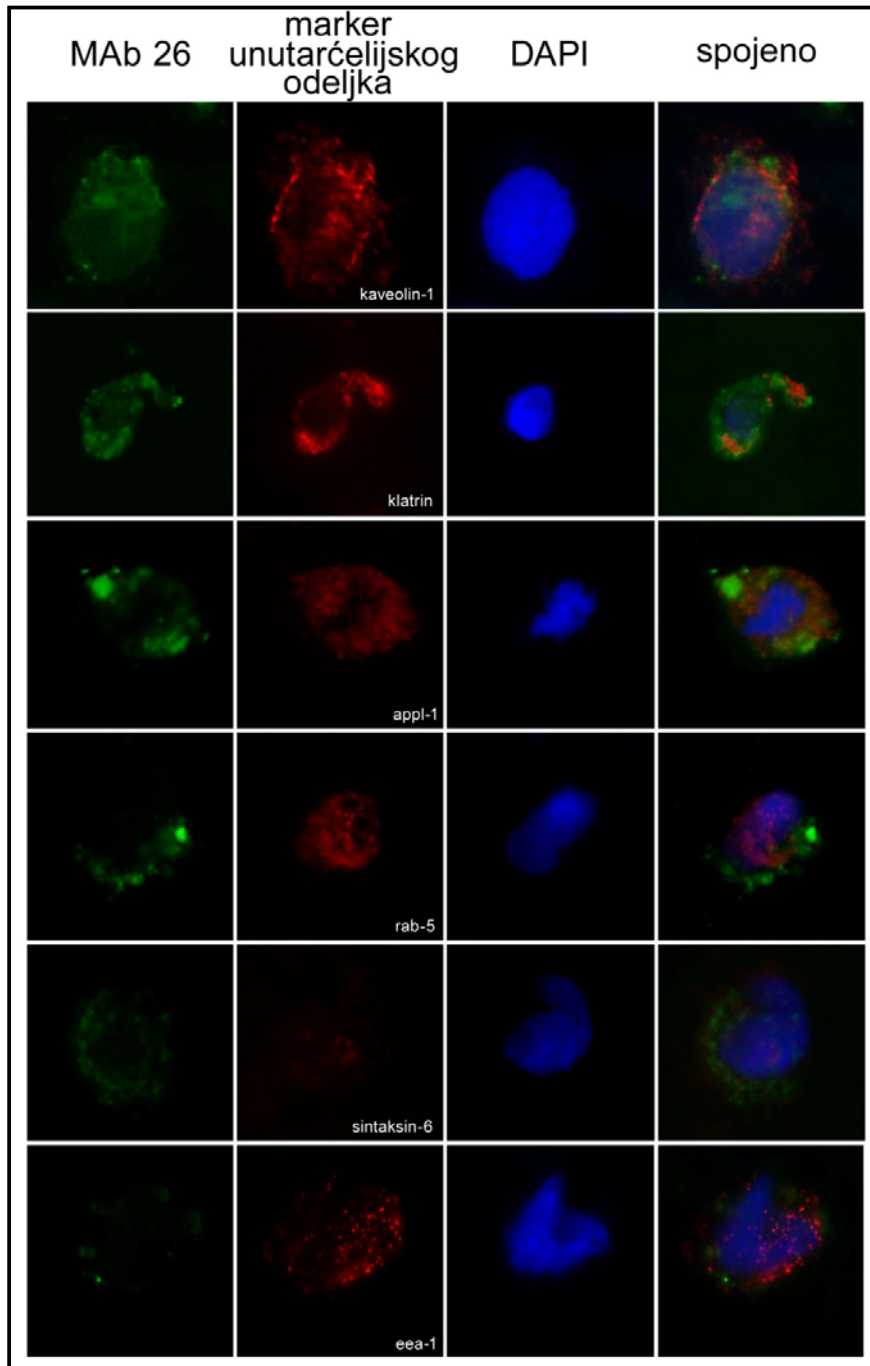
Vezivanje antitela za ćeliju i moguća posledična internalizacija antitela su procesi koji zavise od temperature. Iz tog razloga je ispitana lokalizacija MAb 26 nakon 2 h inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama koja se odvijala na 4° ili 37° C (Slika 30). U preparatima ćelija koje su inkubirane sa MAb 26 na 4° C je bio detektovan manji broj MAb 26-pozitivnih ćelija, kao i manji intenzitet ostvarenog bojenja.



**Slika 30. Imunocitohemijska analiza uticaja temperature inkubacije MAb 26 sa HTR-8/SVneo ćelijama na ćelijsku lokalizaciju antitela nakon inkubacije.** Reprezentativne mikrografije kojima je prikazana ćelijska lokalizacija MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama na temperaturi od 4° ili 37° C i u trajnju od 2 h su prikazane na desnom panelu slike. Odgovarajuće mikrografije koje prikazuju lokalizaciju mIgG kao kontrolnog antitela u istim eksperimentalnim uslovima su prikazane na panelu levo.

#### **4.3.4. Ispitivanje ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama na osnovu detekcije markera intracelularnih organela**

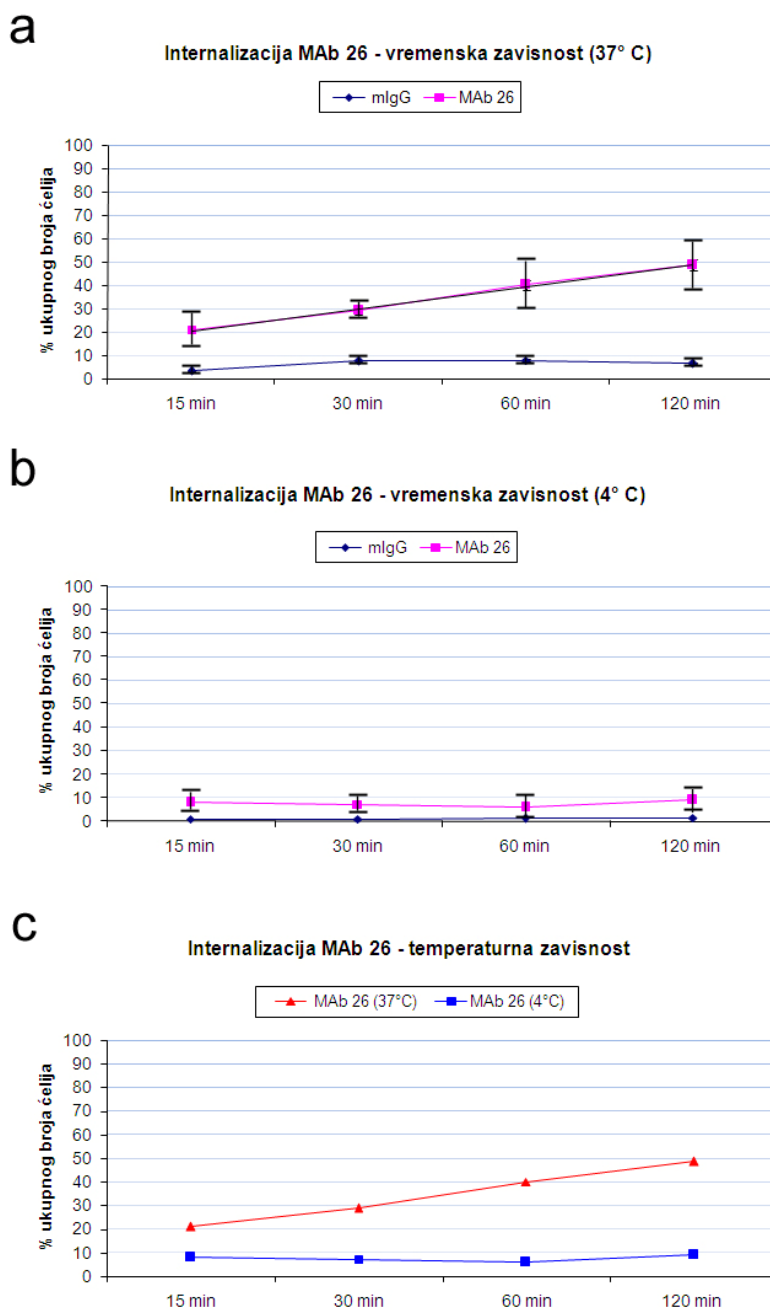
U jednom broju HTR-8/SVneo ćelija nakon inkubacije sa MAb 26 je bilo moguće detektovati ova antitela unutar ćelije (**Slike 25, 26, 27 i 28**). Sa ciljem detaljnijeg ispitivanja uočene lokalizacije antitela, vršeno je dvojno imunocitohemijsko bojenje ćelija na markere unutarćelijskih odeljaka (**Slika 31**). Korišćeni su kaveolin-1 kao karakteristični protein kaveola, klatrin kao karakteristični protein klatrinom obloženih vezikula, APPL-1 kao marker endozomalnih odeljaka uključenih u recikliranje membrana, rab-5 koji je prisutan u membrani ranog endozoma, sintaksin-6 koji je lokalizovan u trans-Goldžijevom aparatu i unutar endozoma i EEA-1 za identifikaciju ranog endozoma (**Slika 31**, crvena fluorescenca). Primenom dvojnog bojenja u svrhu određivanja pojedinih unutarćelijskih odeljaka uočava se da je lokalizacija MAb 26 nakon 2 h inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama (na 37°C) zaista citoplazmatska (**Slika 31**, zelena fluorescenca). Korišćena metoda nije dovoljno precizna da bi se govorilo o stvarnoj kolokalizaciji sa nekim od korišćenih markera, ali najveća blizina u uočenom bojenju je detektovana za kaveolin-1 i klatrin što ukazuje da je citoplazmatsko bojenje uočeno za MAb 26 lokalizovano uz ćelijsku membranu.



**Slika 31. Imunocitohemijska detekcija unutarćelijske lokalizacije MAb 26 nakon 2 h inkubacije sa HTR-8/SVneo ćelijama poređenjem sa lokalizacijom markera unutarćelijskih odeljaka.** Na slici su prikazane reprezentativne mikrografije dvojnog bojenja ćelija kako bi se detektovali MAb 26 (zelena fluorescenca) i odgovarajući marker unutarćelijskog odeljka (crvena fluorescenca). U horizontalnim redovima redosled mikrografija je sledeći: MAb 26; odgovarajući marker; jedro ćelije kontrastirano DAPI bojom i slika nastala preklapanjem prethodne tri.

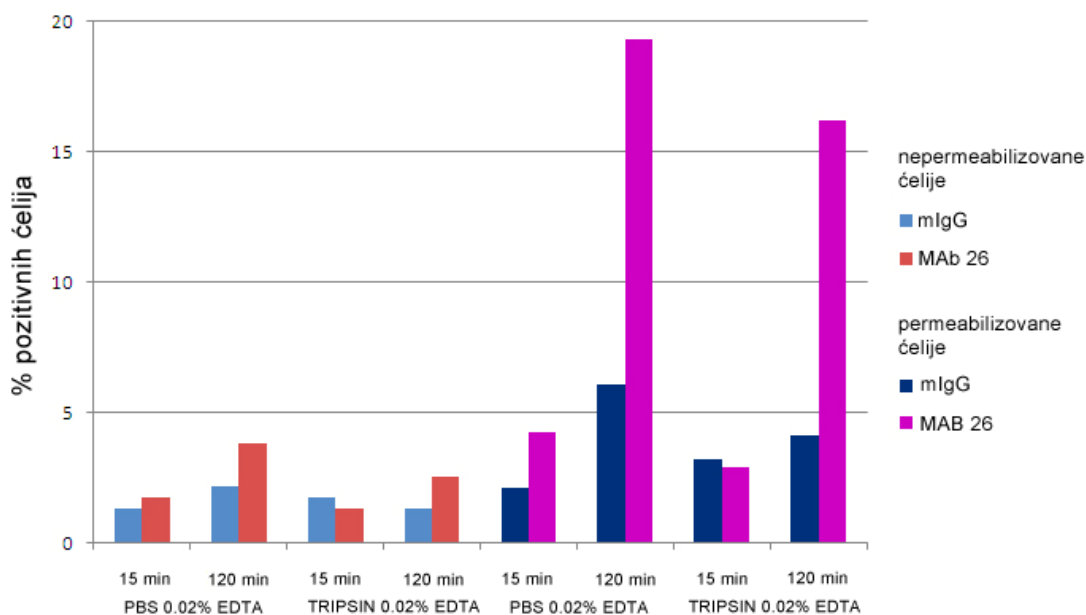
#### **4.3.5. Procena internalizacije - broj ćelija kod kojih se uočava intracelularna lokalizacija MAb 26**

Internalizacija antitela je kvantitativno određivana brojanjem ćelija kod kojih je utvrđena intracelularna lokalizacija MAb 26 (nakon inkubacije sa antitelima u trajanju od 15min, 30 min, 1 h i 2 h). U tri nezavisna eksperimenta, urađena u duplikatu, dobijeni su rezultati koji su ukazivali da do internalizacije MAb 26 dolazi već nakon 15 min inkubacije, kao i da je ovaj proces vremenski (**Slika 32a**) i temperaturno zavisian (**Slika 32b i 32c**). Broj ćelija kod kojih je bilo moguće detektovati MAb 26 u citoplazmi, za dato trajanje i temperaturu inkubacije, se razlikovao između pojedinačnih eksperimenata i kretao se između 24% i 65% ukupnog broja ćelija. Trend zavisnosti internalizacije od dužine trajanja i temperature inkubacije, kao i odsustvo značajne internalizacije mIgG, je bio prisutan u svim pojedinačnim eksperimentima.



**Slika 32. Procena internalizacije određivanjem broja ćelija kod kojih se uočava intracelularna lokalizacija MAb 26.** Broj ćelija kod kojih se uočavala intracelularna lokalizacija antitela je zavisio od dužine trajanja inkubacije sa antitelima (31a) i od temperature inkubacije (31b). Poređenjem broja ćelija kod kojih se uočava internalizacija MAb 26 nakon inkubacije na 37° i 4° C (31c) jasno se uočava značaj temperature za proces internalizacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost dobijena iz tri eksperimenta ± S.E.M. (osim za mlgG, Slika 31b, gde su S.E.M.<2 i nisu ucrtane na grafiku).

Procena internalizacije MAb 26 u HTR-8/SVneo ćelije nakon inkubacije u trajanju od 15 min ili 2 h, je vršena i primenom metode protočne citofluorimetrije. Dobijeni rezultati su pokazali nizak broj ćelija kod kojih se detektuju membranski vezani MAb 26 ili mIgG (ćelije koje u eksperimentalnoj proceduri nisu bile permeabilizovane). Pri tome je pokazano da na prisustvo membranski vezanih antitela utiče način na koji su ćelije nakon tretmana odlepljene od plastične podloge na kojoj su gajene. Za razliku od PBS 0.02% EDTA, primena tripsina je dovela do uklanjanja membranski vezanih antitela. Značajno veći broj MAb 26-pozitivnih ćelija se uočavao kada su ćelije u pripremi za analizu bile permeabilizovane, čime su antitela koja se nalaze unutar ćelije postala dostupna za vezivanje sekundarnih antitela. Procenat mIgG pozitivnih ćelija je i u ovakvim eksperimentalnim uslovima bio nizak, pri čemu je vrednost prosečne fluorescence mIgG tretiranih ćelija bila u nivou fluorescence nebojenih ćelija. Kao i u slučaju određivanja internalizacije direktnim brojanjem, i primenom protočne citofluorimetrije je uočeno variranje u broju ćelija kod kojih je MAb 26 detektovan intracelularno između različitih eksperimenata i iznosilo je 7-18% ćelija nakon 2 h inkubacije. Rezultati jednog od tri eksperimenata u kojima je očitavanje rađeno na 10000 ćelija su prikazani na **Slici 33**.



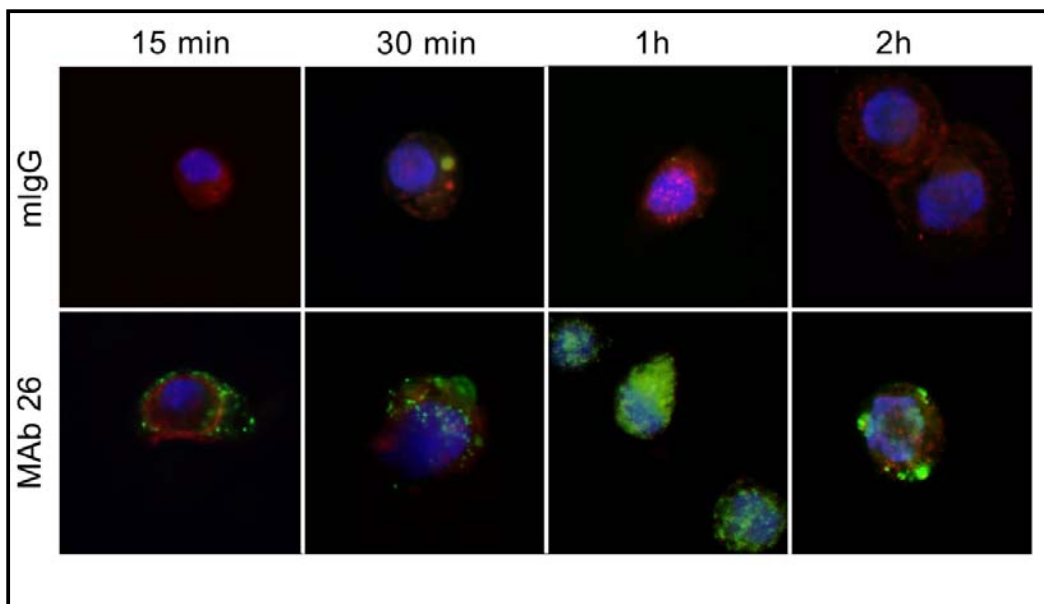
**Slika 33. Procena internalizacije MAb 26 u HTR-8/SVneo ćelije metodom protočne citofluorimetrije.** Rezultati prikazuju procenat pozitivnih ćelija u uslovima kada su ćelije podignute sa podloge tretmanom PBS 0.02% EDTA ili tripsin 0.02% EDTA. Pre bojenja Alexa 488-obeženim sekundarnim antitelom ćelije su bile podeljene u dve grupe, od kojih je jedna podvrgnuta permeabilizaciji. Rezultati analize su pokazali mali udeo ćelija sa membranski vezanim MAb 26 (nepermeabilizovane ćelije), dok se većina detektovanog MAb 26 nalazila unutar ćelije i mogla biti detektovana tek nakon permeabilizacije. Takođe se uočava da primena tripsina dovodi do uklanjanja membranski vezanih antitela. Grafik predstavlja rezultate eksperimenta u kome je analizirano 10000 ćelija.

Za procenu količine internalizovanih antitela korišćeni su imunoglobulini radioaktivno obeleženi jodom 125. Nakon inkubacije sa  $I^{125}$ MAb 26, nivo radioaktivnosti asocirane sa ćelijama je meren  $\gamma$  brojačem. Detektovana aktivnost je bila suviše niska da bi količina internalizovanih antitela mogla biti precizno određena na osnovu tog podatka (rezultati nisu prikazani).

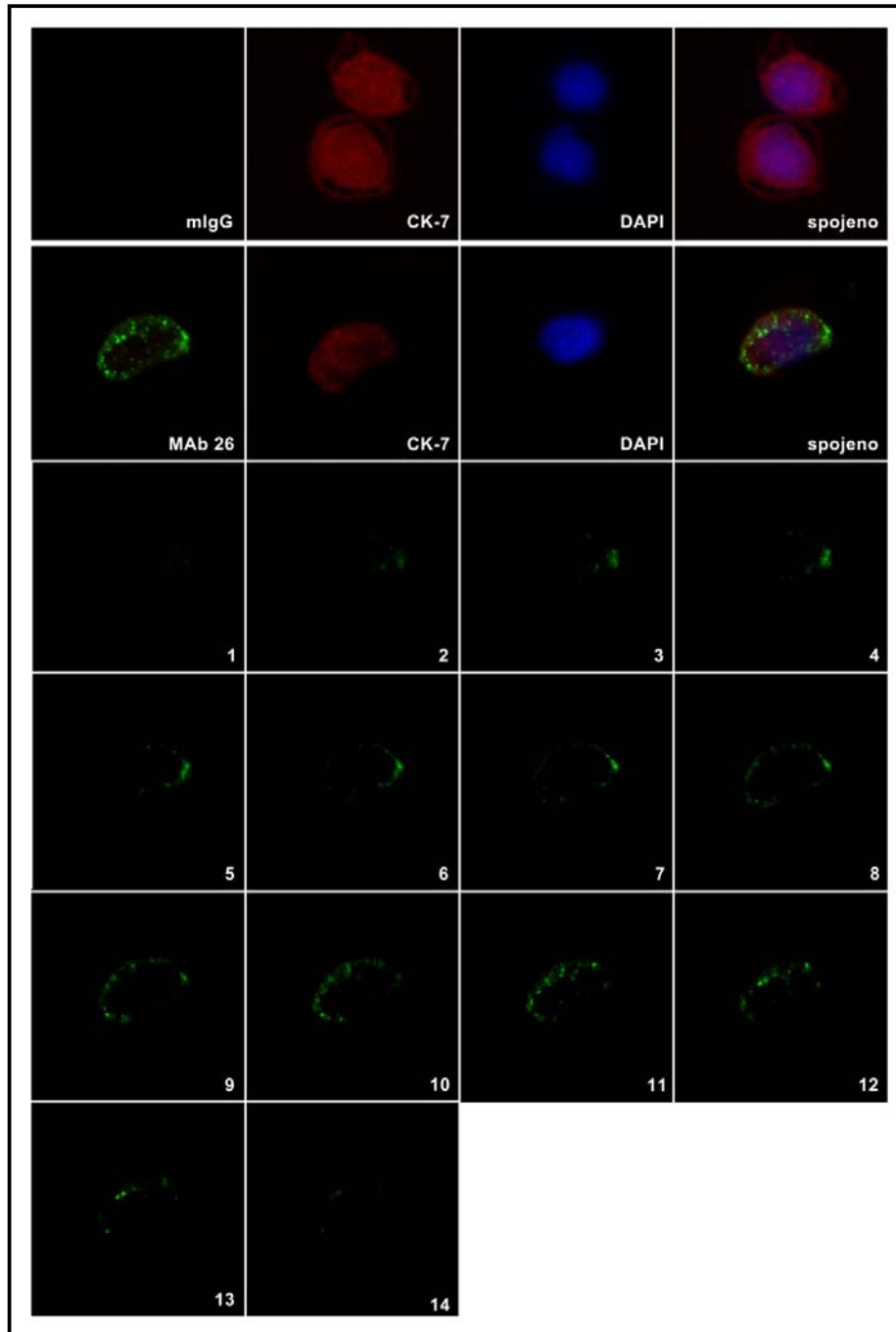


#### 4.3.6. Detekcija MAb 26 na ćelijama izolovanog citotrofoblasta nakon inkubacije

Kako bi se ispitalo da li je lokalizacija MAb 26 unutar HTR-8/SVneo ćelija koja se uočava nakon inkubacije određena specifičnostima HTR8/SVneo kao imortalizovane ćelijske linije, lokalizacija MAb 26, kao i kontrolnog imunoglobulina (mIgG), je analizirana nakon 15 min, 30 min, 1 h i 2 h inkubacije i sa ćelijama izolovanog CT (Slika 34). Već nakon 15 min tretmana su se uočavale ćelije kod kojih je bilo moguće detektovati MAb 26, većinom intracelularno. Nakon 60 min ćelije na/u kojima je bilo moguće detektovati MAb 26 su bile izrazito obojene što je onemogućavalo diskriminaciju između membranski vezanih antitela i onih koja se nalaze u ćeliji. Zbog toga je preciznija analiza imunocitohemijskog bojenja ćelija izolovanog CT urađena primenom konfokalnog mikroskopa nakon inkubacije sa antitelima od 15 min (Slika 35).



**Slika 34. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon inkubacije sa ćelijama izolovanog CT.** Reprezentativne mikrografije kojima je prikazana ćelijska lokalizacija MAb 26 (zelena fluorescencija) nakon inkubacije sa izolovanim CT u trajanju od 15 min, 30 min, 1 h i 2 h su prikazane na donjem panelu slike. Ćelije su dvojnobojene na marker citotrofoblastnih ćelija, citokeratin-7 (crvena fluorescencija). Jedra su obojena DAPI-jem (plavo). Odgovarajuće mikrografije koje prikazuju lokalizaciju mIgG kao kontrolnog antitela u istim eksperimentalnim uslovima su prikazane na panelu iznad.



**Slika 35. Imunocitohemijska analiza ćelijske lokalizacije MAb 26 nakon 15 min inkubacije sa ćelijama izolovanog CT, primenom konfokalne mikroskopije.** Mikrografije prikazuju ćelijsku lokalizaciju MAb 26 i mIgG (zelena fluorescenca), kao kontrole nespecifičnog vezivanja, nakon inkubacije sa izolovanim CT u trajanju od 15 min. Citokeratin-7 je korišćen u dvojnem bojenju kao marker trofoblasta (crvena fluorescenca). Preparati su analizirani konfokalnim mikroskopom. Oznake 1-14 predstavljaju optičke rezove istog vidnog polja duž Z-ose ćelija inkubiranih sa MAb 26.

# **DISKUSIJA**

### **5.1. Uticaj imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom na ekstravilusni trofoblast čoveka *in vitro***

Antifosfolipidni sindrom je sistemsko autoimunska oboljenje koje se klinički manifestuje ponavljanim događajima tromboembolije i gubitkom ili poremećajima trudnoće (Hughes i sar., 1986). Serološki se potvrđuje prisustvom antifosfolipidnih antitela, u srednjem i visokom titru, tokom dužeg vremenskog perioda (Myakis i sar., 2006). Ponavljani pobačaji (PP) se javljaju kod približno 1% žena. Poremećaji imunskog sistema, prvenstveno autoimunske faktori, su u osnovi velikog broja takvih pobačaja. Učestalost aPL kod žena sa PP iznosi 15-40% (Rote i sar., 1998; Levine i sar., 2002). Većina pobačaja se dešava u prvom trimestru, pre desete nedelje gestacije (Biggioggero i Meroni, 2009). Učestalost ponavljanih pobačaja kod žena koje boluju od APS iznosi 53%, a verovatnoća gubitka trudnoće se povećava sa brojem prethodnih pobačaja (Giron-Gonzalez i sar., 2004).

Antifosfolipidna antitela čini heterogena grupa antitela za koja se prvobitno smatralo da su usmerena isključivo prema anjonskim fosfolipidima (Schick i sar., 1976). Danas se zna da aPL prvenstveno vezuju fosfolipid-vezujuće proteine kao što su  $\beta_2$ GPI i protrombin, zatim i fosfolipid/fosfolipid-vezujući protein komplekse (Roubey i sar., 1994). Sinteza  $\beta_2$ GPI se najvećim delom odvija u jetri (Rioche i Massayeff, 1974), ali se ovaj protein sintetiše i u placenti, u sinciciotrofoblastu i ekstravilusnom trofoblastu (Chamley i sar., 1997). Transformisane horiokarcinomske ćelijske linije, JAr, Jeg3 i BeWo takođe ekspimiraju  $\beta_2$ GPI (Chamley i sar., 1997). Zbog toga što je  $\beta_2$ GPI evolutivno konzerviran protein, anti- $\beta_2$ GPI antitela u značajnoj meri reaguju sa  $\beta_2$ GPI poreklom iz različitih vrsta (Tincani i sar., 1996).

Imunoglobulini izolovani iz seruma pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (aPL+ IgG) su u ovoj studiji izabrani kao smeša aPL koja odgovara aPL prisutnim *in vivo*. U radu su korišćeni ukupni IgG iz seruma pacijenata koji su tokom dužeg vremenskog perioda imali visok titar antifosfolipidnih antitela. Koncentracija od 100  $\mu$ g/ml koja je korišćena u eksperimentima odgovara vrednosti koja je najčešće prisutna u serumu pacijenata. Kako bi uticaj ovih antitela bio ispitan na adekvatan način, iz seruma zdravih dobrovoljnih davaoca krvi, na identičan način, su izolovani imunoglobulini koji su korišćeni kao kontrolni tretman (aPL- IgG).

Ispitivanje uticaja aPL sa jasno definisanom antigenskom specifičnošću omogućava detaljnije ispitivanje efekata koje ostvaruju na trofoblastu. Patološki značaj anti- $\beta_2$ GPI antitela u trudnoći nije dovoljno rasvetljen, iako se  $\beta_2$ GPI smatra najvažnijim antigenom u APS. Na osnovu sličnosti u sekvenci/konformaciji  $\beta_2$ GPI i brojnih patogena, molekulska mimikrija se smatra jednim od mehanizma kojim nastaju patološka anti- $\beta_2$ GPI antitela. Na osnovu navedenih podataka koncipiran je dalji tok istraživanja kojim je ispitivan uticaj  $\beta_2$ GPI-specifičnog mišjeg monoklonskog antitela 26 (MAb 26), dobijenog fuzijom splenocita miševa koji su prethodno hiperimunizovani tetanus toksoidom, i partnerskih ćelija mijeloma (Šeatović i sar., 2004; Inić-Kanada i sar., 2009a,b). Autori su pokazali da dobijeni imunoglobulini pokazuju specifičnost kako za TTd, tako i za  $\beta_2$ GPI, kao i da karakteristike MAb 26 odgovaraju drugim anti- $\beta_2$ GPI antitelima, što je potvrđeno *in vitro* i *in vivo* eksperimentima (Inić-Kanada i sar., 2009a), (opisano u poglavljima 1.2.3.1. i 3.1.2.). Pokazano je da aplikovanje MAb 26 miševima *in vivo* ima isti efekat kao hiperimunizacija tetanus toksoidom, što potvrđuje značaj molekulske mimikrije TTd i  $\beta_2$ GPI (Živković i sar., 2011). Poreklo i specifičnost MAb 26 ga čine potencijalno izuzetno značajnim za ispitivanje uticaja aPL na trofoblast čoveka *in vitro*. Koncentracija MAb 26 koja je korišćena u eksperimentima je izabrana oslanjajući se na podatke iz mišjeg modela (Inić-Kanada i sar., 2009a) i na podatke iz literature, na osnovu kojih se zna da primena visokih koncentracija anti- $\beta_2$ GPI antitela dovodi do apoptoze trofoblastnih ćelija (Chamley i sar., 1998). Upotrebom doze od 5  $\mu$ g/ml želeli smo da ispitamo efekte koja ova antitela mogu imati na trofoblastne ćelije, bez izazivanja opsežnih fizioloških posledica kao što je apoptoza.

Kao model sistem za ispitivanje uticaja aPL tokom placentacije se najčešće koriste kulture izolovanog trofoblasta placentae, obično prvog ili trećeg trimestra, i kulture imortalizovanih trofoblastnih ćelijskih linija. U ovom radu su korišćene citotrofoblastne ćelije izolovane iz placenti prvog trimestra trudnoće i trofoblastna ćelijska linija HTR-8/SVneo. Izolovani citotrofoblast u primarnoj kulturi pokazuje karakteristike invazivnog ekstravilusnog trofoblasta, uključujući odsustvo proliferacije. Takvo ograničenje je prevaziđeno korišćenjem imortalizovane trofoblastne ćelijske linije HTR-8/SVneo koja je dobijena transfekcijom ekstravilusnog trofoblasta prvog trimestra trudnoće SV40 T antigenom (Graham i sar., 1993).

Vezivanje aPL+ IgG za imortalizovane HTR-8/SVneo ćelije je utvrđeno imunocitohemijski. Korišćena koncentracija antitela od 10 µg/ml je omogućila procenu da li se aPL+ IgG vezuju za ćelije u dozi koja je višestruko niža od prisutne u serumu pacijenata, uz istovremeno održavanje niske nespecifičnosti bojenja. Korišćenje neimunih humanih IgG kao kontrolnih antitela je rezultiralo blagim difuznim bojenjem, što je i očekivano s obzirom na to da ukupni IgG zdravih davalaca krvi predstavlja heterogenu smešu IgG koja, iako ne pokazuje specifičnost značajnu za antifosfolipidni sindrom, može vezivati određene antigene ili receptore na ćelijama. Gajenje HTR-8/SVneo ćelija u osnovnom medijumu, bez  $\beta_2$ GPI i drugih faktora prisutnih u FCS, je rezultiralo smanjenim vezivanjem aPL+ IgG i drugačijim izgledom bojenja, koje je bilo lokalizovano na pojedinim regionima membrane.

MAB 26 se vezuje za oba tipa trofoblastnih ćelija, pri čemu je intenzitet bojenja izraženiji na izolovanom trofoblastu prvog trimestra. Uočeno vezivanje je bilo nezavisno od prisustva egzogenog  $\beta_2$ GPI, s tim da je intenzitet bojenja bio značajno veći na ćelijama koje su gajene u kompletnom medijumu. Kako izolovani CT ekspresira  $\beta_2$ GPI (Chamley i sar., 1997), može se smatrati da se vezivanje MAB 26 odvija direktno i preko adheriranog  $\beta_2$ GPI. Sa druge strane postoje podaci o ekspresiji  $\beta_2$ GPI i na HTR-8/SVneo ćelijama, što je utvrđeno na osnovu vezivanja anti- $\beta_2$ GPI antitela za ove ćelije (Mulla i sar., 2010). Veći nivo vezivanja aPL+ IgG i MAB 26 za HTR-8/SVneo ćelije koje su gajene u kompletnom medijumu ukazuje na značaj egzogenog  $\beta_2$ GPI, ali kako je bojenje prisutno i na ćelijama gajenim u osnovnom medijumu, bez seruma, to potvrđuje ulogu endogenog  $\beta_2$ GPI, ne isključujući potencijalni doprinos nekog receptora koji bi takođe učestvovao u vezivanju.

Na osnovu citohemije uočava se razlika u bojenju trofoblastnih ćelija gajenih u osnovnom medijumu zavisna od tipa antitela koja su korišćena. Ćelije koje su bojene sa aPL+ IgG pokazuju pretežno membransko bojenje, dok bojenje ćelija sa MAB 26 rezultira citoplazmatskom i perinukleusnom lokalizacijom fluorescence, što ukazuje na mogućnost da se poliklonska antitela poreklom iz seruma pacijenata sa APS vezuju za različita mesta na ćelijama, najverovatnije za membranske anjonske fosfolipide.

U literaturi se nalaze podaci o vezivanju IgG iz seruma pacijenata sa APS, kao i o vezivanju anti- $\beta_2$ GPI antitela, za primarni trofoblast u periodu diferencijacije citotrofoblasta u sinciotrofoblast (72 h ćelijske kulture) (Caruso i sar., 1999; Di

Simone i sar., 2000, 2005). Slično rezultatima koji su dobijeni u ovom radu, i u studiji Di Simone i saradnika (2000, 2005) je nađeno da je vezivanje aPL veće za trofoblast koji je gajen u kompletnom medijumu, što ukazuje na malu količinu endogeno eksprimiranog  $\beta_2$ GPI.

Kako je fokus ispitivanja u ovome radu bio na ekstravilusnom trofoblastu, izolovani CT je pre bojenja gajen u kulturi svega 16 h, čime je izbegnuta njegova diferencijacija u sincicijum. Time smo pokazali visok nivo vezivanja anti- $\beta_2$ GPI antitela za izolovani CT čak i pre otpočinjanja procesa sincicijalizacije. Osim toga, u drugim studijama je u ispitivanjima korišćen izolovani CT placente trećeg trimestra trudnoće. Iako invazivan i često korišćen kao model sistem, CT placente trećeg trimestra ne odgovara u potpunosti visokoinvazivnom EV trofoblastu prvog trimestra. Ta razlika bi mogla biti posebno značajna u kontekstu antifosfolipidnog sindroma pošto se najveći patološki efekat aPL u trudnoći ostvaruje pre 10-te nedelje gestacije, te stoga vezivanje MAb 26 za izolovani CT koje je uočeno u ovom radu predstavlja značajnu polaznu osnovu za ispitivanje patoloških efekata anti- $\beta_2$ GPI antitela u prvom trimestru trudnoće.

Rezultati koji pokazuju vezivanje ispitivanih imunoglobulina su bili osnova za dalje ispitivanje uticaja aPL na funkcionalna svojstva ekstravilusnog trofoblasta čoveka *in vitro*. U testu ćelijske invazije u Matrigel, aPL+ IgG su doveli do značajne inhibicije invazije HTR-8/SVneo ćelija. U istraživanju naše laboratorije koje je prethodilo ovoj studiji (Jovanović i sar., 2010b), pokazano je da aPL+ IgG snažno inhibiraju invaziju izolovanog citotrofoblasta, pri čemu je taj efekat bio izraženiji u odnosu na HTR-8/SVneo ćelije. Moguće objašnjenje dobijenih razlika leži u specifičnim osobinama samih ćelijskih linija, kao i u različitoj zastupljenosti antigenih komponenti. Tretman ćelija MAb 26 je takođe izazvao smanjenje u ćelijskoj invaziji izolovanog CT i HTR-8/SVneo ćelija, u približnoj meri. Dobijeni efekat je bio nešto manji od onog koji je uočen nakon tretmana ćelija aPL+ IgG (71.4% u odnosu na 60.2% od kontrole, za HTR-8/SVneo ćelije), što se može objasniti razlikama u antigenim specifičnostima poliklonskih aPL i monoklonskog anti- $\beta_2$ GPI antitela. Sem toga, na nekoliko ćelijskih linija je pokazano da ekspresija  $\beta_2$ GPI zavisi od faze ćelijskog ciklusa i opada sa postizanjem konfluentnosti (Averna i sar., 2004; Higashimoto i sar., 2007). Imajući to u vidu može se pretpostaviti da dostupnost  $\beta_2$ GPI kao glavnog antigena utiče na konačni efekat tretmana.

Inhibicija ćelijske invazije pod dejstvom aPL je, u sličnom procentu, detektovana i na izolovanom CT trećeg trimestra (Di Simone i sar., 1999). Studijom Di Simone i saradnika (2000) je potvrđeno da smanjenje invazije predstavlja posledicu vezivanja aPL za  $\beta_2$ GPI, bilo direktno, preko endogeno eksprimiranog proteina, kao i posredno, preko adheriranog  $\beta_2$ GPI poreklom iz telećeg seruma koji je dodat u medijum. Inhibicija invazije pod dejstvom anti- $\beta_2$ GPI antitela je opisana i na JAR horiokarcinomskoj ćelijskoj liniji (Blank i sar., 2007). Primenom specifičnih inhibitornih peptida, u toj studiji je definisano da je smanjenje invazije uslovljeno funkcionalnom očuvanošću Fab fragmenta antitela. Osim toga, neutralizacija anti- $\beta_2$ GPI antitela primenom anti-idiotipskih antitela je dovela do normalizacije ćelijske invazije, čime su autori definitivno potvrdili da inhibicija invazije predstavlja posledicu delovanja anti- $\beta_2$ GPI antitela (Blank i sar., 2007). Osim anti- $\beta_2$ GPI antitela i druga monoklonska antifosfolipidna antitela, kao što je antifosfatidilserin antitelo, dovode do smanjene invazije izolovanog CT prvog trimestra (Katsurawa i sar., 1997).

Pored podataka zasnovanih na *in vitro* modelima, u literaturi se mogu naći studije kojima je potvrđena patološka uloga aPL u trofoblastnoj invaziji u *in situ* i *in vivo* ispitivanjima. Defektna kolonizacija krvnog suda endovaskularnim trofoblastom je tako detektovana histopatološki, u preparatima placente prvog trimestra kod pobačaja uzrokovanih APS (Sebire i sar., 2002). Obzirom da je cilj normalnog remodelovanja krvnih sudova uterusa smanjenje otpora protoku krvi i povećanje volumena krvi, Doppler nalazi povećanog otpora krvi kroz arterije uterusa pacijentkinja sa APS u trudnoći ukazuju na nepotpunu ćelijsku invaziju i neadekvatno remodelovanje spiralnih arterija (Vencat-Raman i sar., 2001).

Za razliku od izolovanog CT, HTR-8/SVneo ćelije proliferišu u kulturi i bilo je neophodno ispitati da li uočene promene u ćelijskoj invazivnosti odražavaju smanjen broj ćelija, pod dejstvom tretmana. U ovoj studiji je pokazano da pod dejstvom aPL+ IgG dolazi do blage, ali statistički značajne stimulacije ćelijskog preživljavanja, dok takav efekat nije uočen nakon tretmana ćelija MAb 26. Dalja analiza koja je obuhvatila praćenje markera proliferacije (Ki-67) i apoptoze (M30) je pokazala da i aPL+ IgG i MAb 26 dovode do povećane proliferacije ćelija, pri čemu je veći efekat ostvaren primenom MAb 26, bez uočenih efekata na apoptozu. Ovi podaci su donekle u suprotnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju na inhibitorni efekat anti- $\beta_2$ GPI



antitela na proliferaciju (Chamley i sar., 1998). S obzirom na to da su u pomenutoj studiji korišćene horiokarcinomske linije JAr i BeWo, smatramo da naši rezultati nisu u potpunosti uporedivi. HTR-8/SVneo ćelijska linija, osim što je model koji u *in vitro* uslovima odgovara EVT, poseduje i karakteristike stem ćelija (Takao i sar., 2011; Weber i sar., 2013). Iz tog ugla posmatrano, HTR-8/SVneo ćelije više odgovaraju proliferativnim citotrofoblastnim stem ćelijama i pogodniji su model za prikazano ispitivanje. Studija na HTR-8/SVneo ćelijama (Mulla i sar., 2009) je pokazala da tretman anti- $\beta_2$ GPI antitelima indukuje apoptozu trofoblastnih ćelija tek pri koncentracijama većim od 40  $\mu$ g/ml i trajanju inkubacije dužem od 48 h, dok pri koncentracijama antitela nižim od 10  $\mu$ g/ml dolazi do stimulacije ćelijske proliferacije, što je u potpunosti u skladu sa prikazanim uticajem MAb 26 na proliferaciju HTR-8/SVneo ćelija. Bose i saradnici (2006) su, poređenjem histopatoloških preparata normalnih placenti i placenti žena sa APS, uočili razlike u citotrofoblastnoj proliferaciji *in situ*. Praćenjem odnosa broja jedara citotrofoblasta i sinciotrofoblasta (*CT:ST odnos*) u placentama različite starosti, autori su zaključili da pod dejstvom aPL dolazi do prerane proliferacije i abnormalne diferencijacije citotrofoblasta, što je u skladu sa, u ovom radu, uočenom proliferacijom pod uticajem aPL iz seruma pacijenata.

Kako je pokazano da pod dejstvom oba tretmana dolazi do povećane proliferacije HTR-8/SVneo ćelija, dok broj ćelija u apoptozi ostaje nepromenjen, jasno je da smanjenje invazije ne predstavlja odraz manjeg broja invazivnih ćelija. Štaviše, povećana proliferacija tretiranih ćelija ukazuje na veću inhibiciju ćelijske invazije pod dejstvom tretmana, od one koja je uočena u testu invazije u Matrigel.

Tokom invazije u zid uterusa, trofoblastne ćelije se ponašaju slično kancerskim ćelijama i na sličan način ostvaruju izbegavanje imunskog odgovora (Murray i Lessey, 1999). Međutim, za razliku od tumorske, trofoblastna invazija je vremenski i prostorno strogo regulisan proces. Proces ćelijske invazije je omogućen velikim brojem pojedinačnih činilaca i obuhvata adheziju za vanćelijski matriks i razgradnju komponenti VĆM dejstvom matriksnih metaloproteinaza. Ranije je navedeno da se šema ekspresije specifičnih adhezionih molekula drastično menja tokom normalne diferencijacije citotrofoblasta u invazivni fenotip, što dovodi do promena u interakcijama između ćelija i ćelija sa VĆM (Zhou i sar., 1997). U novijim istraživanjima otkriveno je i da gal-1 ima značajnu ulogu u invaziji trofoblasta

(Kolundžić i sar., 2011). Stoga je u daljem toku istraživanja ispitivano da li je smanjena invazivnost trofoblasta pod dejstvom aPL+ IgG i MAb 26 posledica izmenjene ekspresije matriksnih metaloproteinaza-2 i -9, integrinskih receptora za komponente VĆM, i to subjedinica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$ , kao i gal-1, kao karakterističnih medijatora ćelijske invazivnosti.

Iz literature je poznato da aPL smanjuju nivo proMMP-2 i MMP-2 u kondicioniranim medijumima endotelnih ćelija (Di Simone i sar., 2010). Tretman HTR-8/SVneo ćelija aPL+IgG je u ovoj studiji rezultirao značajnim smanjenjem sekretovane proMMP-9, dok uočeno smanjenje u sekreciji proMMP-2 nije bilo statistički značajno, što je utvrđeno denzitometrijskom analizom zimograma kondicioniranih medijuma. Tretman ćelija MAb 26 je doveo do značajnog smanjenja nivoa sekretovanih proMMP-9 i proMMP2, kao i do smanjenje sekrecije MMP-2 koja nije bila statistički značajna. Inhibitorni efekat aPL+ IgG na sekreciju MMP je bio izraženiji na proMMP-9, dok je efekat MAb 26 na oba enzima bio ujednačen.

Zimografija je elektroforetski metod tokom koga usled odvijanja proteina dolazi do otkrivanja katalitičkog domena i aktivacije proformi enzima. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da aPL+ IgG i MAb 26 utiču na želatinaze tako što dovode do smanjene sekrecije proforme enzima, što, nakon aktivacije u VĆM, posledično dovodi do manje količine proteolitički aktivnog enzima. Za sada ostaje otvoreno pitanje da li se efekat postiže na nivou ekspresije gena ili se inhibicija ostvaruje posttranskripciono. Sporadično uočavanje aktivnih formi enzima nije neuobičajeno, obzirom da aktivacija proenzima zavisi od sastava VĆM. Važno je napomenuti da su prikazani rezultati dobijeni u kulturi ćelija na plastici, dok bi profil sekretovanih matriksnih proteaza svakako bio drugačiji da su ćelije gajene na Matrigelu, kolagenu ili sličnoj trodimenzionalnoj podlozi.

Integrini su izuzetno važna grupa molekula koji, osim što omogućavaju kontakt ćelije sa drugim ćelijama i VĆM, učestvuju i u tkivnoj homeostazi kroz regulaciju ćelijskog preživljavanja, proliferacije, diferencijacije i migracije (Hynes, 2002). Di Simone i saradnici (2002) su pokazali da izolovane citotrofoblastne ćelije trećeg trimestra trudnoće inkubirane sa aPL pokazuju povećan nivo integrina  $\alpha_5$ , dok je nivo integrina  $\alpha_1$  bio smanjen, što je ukazalo da bi pod dejstvom tretmana moglo doći do veće ekspresije integrina  $\alpha_5\beta_1$ , receptora za fibronektin, i smanjene invazivnosti ćelija *in*

*vitro*. Najveći efekat aPL u toj studiji je uočen posle 72 h ćelijske kulture, kada već dolazi do sincicijalizacije i odstupanja od ekstravilusnog puta diferencijacije. U našem radu, tretman ćelija aPL+ IgG je rezultirao nižom ekspresijom sve tri ispitivane integrinske subjedinice, dok je tretman ćelija MAb 26 doveo do značajnog smanjenja proteinske ekspresije  $\alpha_1$  integrinske subjedinice, i blagog smanjenja  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  subjedinica, koje nije bilo statistički značajno. Nasuprot tome, RQ-PCR analiza je pokazala da nakon 24 h inkubacije sa MAb 26 dolazi do veoma blage stimulacije ekspresije iRNK za sve tri subjedinice. Iako na prvi pogled ovi rezultati deluju kontradiktorno, iz literature je poznato da ekspresija integrinskih subjedinica nije uvek koordinisana na transkripcionom i translacionom nivou (Delcommenne i Streuli, 1995; Schwanhäusser i sar., 2011). Integrini kao receptori za komponentne ćelijskog matriksa ostvaruju i kinaznu aktivnost, preko integrin-vezane kinaze kao glavnog unutarćelijskog liganda. Osim složene funkcije, integrine odlikuje i kompleksnost strukture (Hynes, 2002). Zbog toga regulacija njihove ekspresije isključivo putem *de novo* sinteze predstavlja energetski zahtevan proces za ćeliju. Umesto toga, funkcija integrina kao receptora za komponente VCM je barem delimično regulisana njihovom dostupnošću na ćelijskoj membrani, kroz cikluse endo- i egzocitoze (Bretscher, 1989,1992; Raub i Kuentzel, 1989; Tong i sar., 2005; Shi i Sottile, 2008). Osim razlika u ekspresiji na iRNK i proteinskom nivou, opisanim mehanizmom kontrole raspoloživosti integrinskih subjedinica se može objasniti potpuno odsustvo efekta primenjenih tretmana na nivou odgovarajuće iRNK, i relativno blaga inhibicija na proteinskom nivou. Western blot analiza urađena na ukupnim ćelijskim lizatima, kao i CELISA test, omogućavaju detekciju integrina, ali ne i diskriminaciju između membranski vezanih i samim tim funkcionalno dostupnih, i proteina koji se nalaze unutar ćelije i ne učestvuju u procesima adhezije/invazije. Uočeno značajno smanjenje u nivou  $\alpha_1$  subjedinice bez smanjenja transkripcije u ćelijama inkubiranim sa MAb 26 ukazuje da bi pod dejstvom tretmana moglo doći do degradacije date subjedinice. Kako je integrin  $\alpha_1\beta_1$  (receptor za laminin i kolagen) ključan u procesu invazije trofoblata, smanjenje dostupne  $\alpha_1$  subjedinice doprinosi umanjenoj invazivnosti ćelija.

Do sada nije ispitivana moguća veza između APS i galektina. Međutim, galektini se dovode u vezu sa brojnim patološkim stanjima u trudnoći, kao što su preeklampsija, rani gubitak trudnoće i maligne bolesti trofoblata (Božić i sar., 2004;

Jeschke i sar., 2004, 2007). Galektin-1 (gal-1) je  $\beta$ -galaktozid vezujući lektin koji je uključen u adheziju, migraciju i proliferaciju velikog broja ćelija, a zajedno sa gal-3 i-8 je eksprimiran u invazivnom trofoblastu prvog trimestra (Vićovac i sar., 1998; Kolundžić i sar., 2011). Studija Kolundžića i saradnika (2011) je pokazala značajnu ulogu gal-1 u procesu trofoblastne invazije, koja se ostvaruje kako njegovim lektinskim, tako i protein-protein interakcijama. Funkcionalna inaktivacija gal-1 primenom neutrališućih antitela, kao i inhibitornog šećera – laktoze, inhibira proces invazije u Matrigel. Obzirom da gal-1 svoju funkciju ostvaruje kao membranski vezan protein, ali i kao sekretovani faktor koji može autokrino i parakrino modulirati ćelijsku funkciju, uticaj imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za APS je ispitan na nivou mRNA, ukupnog i sekretovanog gal-1. Pod uticajem aPL+ IgG dolazi do značajnog smanjenja u nivou sekretovanog gal-1, dok MAb 26 smanjuje količinu ovog proteina u ukupnom ćelijskom lizatu i kondicioniranom medijumu.

Posmatrajući efekte dobijene nakon tretiranja ćelija aPL+ IgG i MAb 26 kao celinu, uočava se da poliklonska antifosfolipidna antitela, kao i  $\beta_2$ GPI-specifično monoklonsko antitelo nastalo zahvaljujući konformacionoj mimikriji  $\beta_2$ GPI i TTD, ostvaruju sličan inhibitorni efekat na invaziju ekstravilusnog trofoblasta čoveka, *in vitro*. Inhibicija invazije najverovatnije predstavlja sinergistički efekat ostvaren uticajem imunoglobulina kojima su ćelije tretirane na pojedinačne medijatore invazije, pre nego dominantan doprinos jednog od ključnih proteina. Pri tome poliklonska antifosfolipidna antitela svoj ukupni efekat ostvaruju preko promena u ekspresiji proMMP-9, sve tri ispitivane integrinske subjedinice i sekretovanog gal-1, dok su glavni molekuli koji su izmenjeni nakon tretmana monoklonskim anti- $\beta_2$ GPI antitelom, MMP-2 i -9;  $\alpha_1$  subjedinica integrina i ukupni gal-1.

Dobijeni rezultati ističu kompleksnost mreže interakcija različitih medijatora trofoblastne invazije. Poznato je da neutralizacija funkcije galektina-1 dovodi do funkcionalne inaktivacije integrina  $\beta_1$  u glatkim mišićnim ćelijama vena (Moiseeva i sar., 2003). Sa druge strane, inaktivacija integrina  $\beta_1$  uslovljava promene u funkcijama koje ostvaruje galektin-1 u modelu neuronalnog progenitora (Sakaguchi i sar., 2010). Integrinski receptori su funkcionalni samo u formi heterodimera koji se sastoje od alfa i beta subjedinice, i stoga se deficit subjedinice  $\alpha_1$  može odraziti na funkcionalnu dostupnost subjedinice  $\beta_1$ , i posredno delovati na gal-1. Obrnuto, manja količina gal-1

može rezultirati smanjenom dostupnošću  $\beta_1$  integrinske subjedinice, što rezultira manjom dostupnošću funkcionalnih receptora za komponente vanćelijskog matriksa, fibronektin, laminin i kolagen, što sve zajedno određuje ćelijsku adheziju/invaziju. Preostala dva člana familije galektina za koje je pokazano da su eksprimirana u HTR-8/SVneo ćelijama, gal-3 i -8 (Kolundžić i sar., 2011) takođe vezuju  $\beta_1$  integrinsku subjedinicu (Carcamo i sar., 2006; Furtak i sar., 2001), a gal-3 učestvuje i u njenom intracelularnom recikliranju (Furtak i sar., 2001). Situacija je utoliko složenija kada se uzme u obzir da je na endotelnim ćelijama pokazano da  $\beta_2$ GPI inteeaguje sa integrinom  $\alpha_5\beta_1$ , posredstvom gelsolina i fibronektina, kao i da je njegova ekspresija smanjena na ćelijama kojima je integrin  $\alpha_5\beta_1$  inaktiviran primenom neutrališućeg antitela (Bohgaki i sar., 2011). Gal-1 reguliše ćelijsku invaziju i preko uticaja na ekspresiju matriksnih metaloproteinaza. Wu i saradnici (2009) su pokazali da utišavanje gal-1 dovodi do smanjene invazivnosti ćelija karcinoma usne duplje, posredstvom smanjene ekspresije i aktivnosti MMP-2 i MMP-9.

Analiza dobijenih rezultata ističe kompleksnost uočenih promena na nivou trofoblastnih ćelija izloženih dejstvu imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za APS. Način dobijanja MAb 26, s jedne strane, i uočeni biološki efekti na trofoblast sa druge, otvaraju novo poglavlje za ispitivanje značaja molekulske mimikrije, u ovom slučaju između TTd i  $\beta_2$ GPI, u patogenezi APS u trudnoći.

## **5.2. Lokalizacija imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za antifosfolipidni sindrom u *in vitro* interakciji sa ćelijama trofoblasta**

Podaci o pretpostavljenim receptorima za aPL na ekstravilusnom trofoblastu, kao i putevima transdukcije signala su oskudni. Primena antitela koja blokiraju funkciju različitih receptora samo delimično smanjuje vezivanje anti- $\beta_2$ GPI antitela i posledičnu aktivaciju decidualnih ćelija (Borghi i sar., 2007), što ukazuje da više od jednog receptora posreduje u vezivanju anti- $\beta_2$ GPI antitela za decidualne ćelije i trofoblast. U nekoliko studija na različitim ćelijskim tipovima (endotelne ćelije, makrofagi, sinciotrofoblast) je pokazana unutarćelijska lokalizacija antitela nakon inkubacije ćelija sa aPL (Galve-de Rochemonteix i sar., 2000; Kajiwara i sar., 2007; Chen i sar., 2009). Sa izuzetkom studije Chen i sar. (2009) kojom je opisana internalizacija aPL u

sinciciotrofoblast, ćelijska lokalizacija antifosfolipidnih antitela nakon inkubacije sa trofoblastnim ćelijama nije poznata.

S obzirom da smo u prethodnom delu istraživanja utvrdili da tretman trofoblastnih ćelija antitelima koja pokazuju specifičnost značajnu za APS smanjuje ćelijsku invazivnost delimično i kroz efekte ostvarene na karakterističnim proteinima uključenim u invaziju, bilo je potrebno ispitati lokalizaciju imunoglobulina tokom inkubacije sa ćelijama trofoblasta.

HTR-8/SVneo ćelijska linija je korišćena kao model za ispitivanje lokalizacije aPL+/aPL- IgG nakon interakcije sa ćelijama. S obzirom da su ti IgG prečišćeni iz seruma čoveka, njihova detekcija na ćelijama izolovanog CT primenom sekundarnog antitela prema humanom IgG nije bila moguća. Razlog je nepostojanje načina kojim bi se u eksperimentu razlikovali IgG poreklom iz tretmana od IgG prisutnih na izolovanom CT, a do čijeg vezivanja je došlo fiziološkim putem *in vivo*. Imunocitohemijskom analizom HTR-8/SVneo ćelija ustanovljeno je da se nakon 1h inkubacije sa aPL+ IgG mogu uočiti ćelije kod kojih se antitela detektuju intracelularno. Broj takvih ćelija, kao i intenzitet bojenja, se povećavao sa trajanjem inkubacije. Inkubacija ćelija sa aPL- IgG je rezultirala značajno manjim brojem pozitivnih ćelija čije je bojenje bilo relativno slabo i difuzno, što je i očekivano, s obzirom na to da aPL- IgG predstavljaju smešu imunoglobulina različitih specifičnosti.

Zbog ograničenja u primeni aPL+ IgG koja proističu iz njihove poliklonske specifičnosti, eksperimenti kojima je u više detalja ispitivana lokalizacija imunoglobulina prilikom inkubacije sa ćelijama su urađeni koristeći MAb 26. Njegova jasno definisana specifičnost, kao i činjenica da kontrolni imunoglobulini ne poseduju specifičnost za antigene prisutne na/u ćelijama, su omogućili precizniju analizu lokalizacije antitela. Iz literaturnih podataka može se zaključiti da brzina i stepen internalizacije antitela ne zavise od aviditeta antitela, ali zavise od tipa ćelije i stanja u kome se nalazi (ćelijski ciklus, aktivacija i sl.). (Golan i sar., 1993; Zack i sar., 1996; Abedi-Valugerdi i sar., 1999). U određenom broju studija je primenjen eksperimentalni koncept koji uključuje visoke koncentracije imunoglobulina (veće od 50 mg/ml) i duge periode inkubacije (duže od 18h) (Lim i sar., 2006a). Za razliku od toga, koncentracija antitela korišćena u našoj studiji je bila značajno niža (5 µg/ml) i pokazala se dovoljnom

da dovede do patoloških promena u procesu ćelijske invazivnosti, bez izazivanja uočljivih promena kao što je apoptoza.

Ispitivanjem lokalizacije MAb 26 u *in vitro* interakciji sa HTR-8/SVneo ćelijama, uočeno je da dolazi do internalizacije ovog antitela, kao i da broj ćelija kod kojih se MAb 26 detektuje intracelularno pozitivno korelira sa dužinom trajanja inkubacije. Upotreba mIgG kao kontrole nespecifičnog vezivanja antitela kao i imunocitohemijske analize u kojima je vizuelizacija signala bila zasnovana na različitim načima detekcije sekundarnog antitela, doprineli su potvrdi specifičnosti uočenog bojenja na MAb 26. Konačna potvrda je dobijena nakon što su preparati analizirani laserskim skenirajućim konfokalnim mikroskopom, čime je ostvarena precizna detekcija fluorescentnog signala u ravni ćelije. Time su se van fokusa našli potencijalni artefakti poreklom od nespecifičnog vezivanja sekundarnog antitela. Detekcija MAb 26/mIgG duž Z-ose ćelije je definitivno potvrdila prisustvo MAb 26 u ćeliji, kao i na membrani, uz odsustvo bojenja na mIgG. Western blot analizom ćelijskih lizata MAb 26 tretiranih HTR-8/SVneo ćelija detektovana je intracelularna lokalizacija teškog i lakog lanca imunoglobulina, što nije bio slučaj sa ćelijskim lizatima mIgG tretiranih ćelija.

Kako bi se preciznije odredila lokalizacija antitela unutar ćelije, tretirane ćelije su bojene dvojno na MAb 26 i markere ćelijskih organela i vezikula. Na taj način su praćeni kaveolin-1 i klatrin koji su markeri vezikula uz ćelijsku membranu. Rani endozomi ćelija su identifikovani bojenjem na EEA-1, Rab-5 i APPL-1, dok je trans-Glodžijev aparat vizualizovan bojenjem na sintaksin-6. Posle 2 h inkubacije, najveća bilskost praćenih signala je uočena za MAb 26 i kaveolin-1, kao i klatrin, što ukazuje na lokalizaciju MAb 26 neposredno uz ćelijsku membranu. Kako metoda dvojnog bojenja nije dovoljno precizna, ne može se tvrditi da je u pitanju kolokalizacija. Za razliku od studije Kajiwara i saradnika (2007) u kojoj su anti- $\beta_2$ GPI antitela detektovana u ranom endozomu makrofaga, MAb 26 nije uočen u neposrednoj blizini EEA-1 i Rab-5 koji su direktni markeri endozoma, ali jeste u blizini APPL-1, proteina koji karakteriše endozomalne vezikule uključene u recikliranje membrana. Potencijalna kolokalizacija MAb 26 sa determinantama kasnog endozoma, lizozoma i mitohondrija nije ispitivana u ovoj studiji, ali se u literaturi sreću podaci da antitela prema lizobisfosfatnoj kiselini, fosfolipidu koji je strukturno sličan kardiolipinu, mogu biti detektovana u kasnom

endozomu i lizozomu endotelnih ćelija čoveka nakon 20 h inkubacije (Galve-de Rochemonteix i sar., 2000; Dunoyer-Geindre i sar., 2001).

Mehanizmi internalizacije antitela još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni, ali kao mogući se izdvajaju ekspresija membranskih antigena koja antitela prepoznaju direktno ili na osnovu ukrštene reaktivnosti, nakon čega dolazi do njihove endocitoze. Nekoliko takvih surogat antigena je identifikovano i tu spadaju kalretikulin, miozin I i Ig domeni (Yanase i sar., 1997; Seddiki i sar., 2001). Kao potencijalni endocitotski receptor za aPL na trofoblastu se navodi megalin, što je utvrđeno na osnovu internalizacije aPL u BeWo ćelijsku liniju koja eksprimira ovaj receptor, dok do internalizacije u JAr i Jeg3 ćelije koje ne ekspimiraju megalin nije došlo (Chamley i sar., 2009, Viall i sar., 2010). Drugi potencijalni mehanizam može biti internalizacija putem vezikula asociраних sa klatrinom (Goldstein i sar., 1979), dok pretpostavljno učešće Fc receptora nije definitivno potvrđeno (Golan i sar., 1993; Ma i sar., 1993; Abedi-Valugerdi i sar., 1999; Deng i sar., 2000). Kao što je ovim radom prikazano, inkubacija HTR-8/SVneo ćelija sa MAb 26/mIgG na temperaturi od 4 °C dovodi do značajnog smanjenja u broju ćelija kod kojih je moguće detektovati internalizaciju MAb 26. Takav rezultat ukazuje da se radi o metabolički aktivnom procesu koji zavisi od energije, što odgovara unosu antitela putem endocitoze. Sinciciotrofoblast, kao specijalizovani tip ćelija za prenos materija između fetusa i majke, eksprimira receptor za imunoglobuline (FcγIII) (Ellinger i sar., 1999), ali, prema našem saznanju, u literaturi nema podataka o ekspresiji Fc receptora na ekstravilusnom trofoblastu placente prvog trimestra i HTR-8/SVneo ćelijskoj liniji. Odsustvo vezivanja izotipske kontrole takođe ukazuje da uočena internalizacija MAb 26 najverovatnije nije posredovana Fc receptorom.

Kvantitativna analiza internalizacije MAb 26 je zasnovana na određivanju udela ćelija u kojima se MAb 26 detektuje intracelularno, u ukupnoj populaciji tretiranih ćelija. Ispitivanje je vršeno brojanjem ćelija posle imunocitohemijskog bojenja, a zatim za odabrane vremenske tačke (15 min i 2h inkubacije sa antitelima) potvrđeno metodom protočne citofluorimetrije. Proces internalizacije je zavisio od dužine inkubacije sa tretmanom i temperature na kojoj se inkubacija odvijala, što je predstavljalo zajedničku karakteristiku svih pojedinačnih eksperimenata i primenjenih metoda kvantitacije. Procenat pozitivnih ćelija je međutim varirao između eksperimenata, u opsegu i do  $\pm 15\%$  za 2 h inkubacije sa antitelima, što je potvrđeno primenom protočne



citofluorimetrije. Na osnovu podataka u literaturi koji ukazuju na to da stepen internalizacije antitela zavisi od faze ćelijskog ciklusa i gustine ćelija u populaciji (Golan i sar., 1993; Lim i sar., 2006a), može se pretpostaviti da razlike u broju ćelija kod kojih je došlo do internalizacije MAb 26 donekle odražavaju stanje same ćelije.

U pripremi ćelija za analizu protočnom citofluorimetrijom, deo ćelija iz istog uzorka je analiziran direktno, bez permeabilizacije, što je omogućilo detekciju samo membranski asociranog MAb 26. Drugi deo ćelija je podvrgnut permeabilizaciji čime su i intracelularno prisutna antitela postala dostupna. Analizom 10000 ćelija po eksperimentu nedvosmisleno je pokazana internalizacija MAb 26. Istovremeno je ustanovljeno da je, nakon 2 h inkubacije, procenat ćelija sa membranski vezanim MAb 26 mali. Slična distribucija je opisana u studiji Golana i saradnika (1993) u kojoj je ispitivana internalizacija autoantitela poreklom iz seruma pacijenata sa SLE u ćelije epitelnog porekla, gde je takođe uočen mali udeo ćelija kod kojih su antitela detektovana na membrani u odnosu na intracelularnu lokalizaciju antitela.

Način na koji su ćelije odlepljene sa plastične podloge na kojoj su gajene takođe utiče na odnos membranski/intracelularno detektovanih antitela. Tretman tripsinom nakon inkubacije ćelija sa antitelima uklanja membranski vezana antitela, dok su antitela unutar ćelije zaštićena (Foon i Morgan, 1985; Xiao i sar., 2008; Yoshikawa i sar., 2013). Ispitivanje internalizacije MAb 26 protočnom citofluorimetrijom i Western blotom je potvrdilo da primena trispina dovodi do bar delimičnog uklanjanja membranski vezanog MAb 26.

Jedna od prvih zamerki kada je proces internalizacije antitela opisan se odnosila na primenu polarnih agenasa kao što je aceton za fiksiranje ćelija, što bi moglo dovesti do translokacije membranski vezanih antitela u unutrašnjost ćelije (Kramers i sar., 1996). Korišćenje više metoda za određivanje broja pozitivnih ćelija, tj. internalizovanog MAb 26, u ovoj studiji je omogućilo da se značajno poveća verodostojnost uočenog fenomena. Već na osnovu eksperimentalne postavke koja je u ovome radu uključivala mIgG kao kontrolu nespecifičnog vezivanja moglo se pretpostaviti da aceton-metanol kao fiksativ ne utiče na rezultat internalizacije, jer bi u suprotnom došlo do istovetne translokacije i kontrolnih imunoglobulina. Dodatna potvrda je dobijena detekcijom internalizacije i protočnom citofluorimetrijom, gde se u pripremi ćelija za analizu kao fiksativ koristi formaldehid, čija je sposobnost fiksiranja

ćelija zasnovana na hemijskom umrežavanju proteina. Razlike u primenjenim fiksativima ujedno objašnjavaju niži broj pozitivnih ćelija detektovan protočnom citofluorimetrijom, što je podatak koji je opisan u studiji Abedi-Valugardi i saradnika (1999).

U literaturi postoje podaci koji ukazuju na različitu internalizaciju antitela u transformisane u odnosu na primarne ćelije istog tipa (Golan i sar., 1993; Abedi-Valugardi i sar., 1999). Prikazani rezultati ovog rada ukazuju da to nije slučaj sa MAb 26 čija je internalizacija pokazana i za izolovani CT u primarnoj kulturi i za HTR-8/SVneo ćelije. Imunocitohemijska analiza CT ćelija tretiranih MAb 26 na temperaturi koja dozvoljava internalizaciju (37° C) je pokazala da do internalizacije u pojedine ćelije dolazi već nakon 15 min. Fluorescentni signal koji se detektovao na/u ćeliji je nakon 30 min bio suviše jak da bi se sa preciznošću govorilo o lokalizaciji antitela, zbog čega je analiza konfokalnom skenirajućom laserskom mikroskopijom izvedena samo na preparatu ćelija koje su sa antitelima inkubirane tokom 15 min, čim je i potvrđeno prisustvo MAb 26 unutar ćelije.

Do skoro se smatralo da autoantitela koja su usmerena prema intracelularnim antigenima imaju samo dijagnostički značaj i da ne doprinose patogenezi oboljenja, osim u smislu oštećenja tkiva usled depozicije imunskih kompleksa (Abbas i sar., 1997). Danas je poznato da veliki broj autoantitela ima sposobnost penetracije u različite ćelije čime mogu dovesti do narušavanja ćelijske strukture i funkcije, mada su poznati i primeri kada internalizacija antitela ne izaziva nikakav fiziološki efekat (Ruiz-Argülles i sar., 2003). Sposobnost da internalizuju u samo određene ćelijske tipove ili ćelije u određenoj fazi ciklusa ili aktivacije, može predstavljati mehanizam selektivnog ostvarivanja patoloških efekata antitela (Ruiz-Argüelles i sar., 1998). Za pojedine unutarćelijske kompartmente u kojima su detektovana internalizovana antitela, poput endozoma i kaveola, je pokazano ne samo da sadrže brojne molekule uključene u transdukciju signala, već i da dovode do aktivacije signalnih puteva, što doprinosi razumevanju kako antitela ostvaruju patološke efekte nakon internalizacije (Shaul i Anderson, 1998; Miaczynska i sar., 2004).

Podaci iz dostupne literature ukazuju da internalizacija aPL u neke ćelijske tipove (endotel, makrofage) dovodi do patofizioloških efekata (Dunoyer-Geindre i sar., 2001). Antifosfolipidna antitela detektovana u kasnim endozomima endotelnih ćelija

(Dunoyer-Geindre i sar., 2001), kolokalizuju sa LBPA i posledično dovode do ometanja intracelularnog sortiranja proteina (Galve-de Rochemonteix i sar., 2000). Internalizacija aPL u makrofage dovodi do ekspresije tzv. lešinar (*scavenger*) receptora: Fc $\gamma$ RI i CD36 i nastanka penastih ćelija koje učestvuju u formiranju aterosklerotskih plaka (Kajiwara i sar., 2007). Za razliku od toga, mehanizam i patofiziološki značaj internalizacije anti- $\beta_2$ GPI antitela u sinciciotrofoblast (Chen i sar., 2009) nisu poznati.

Ovom studijom je pokazano da imunoglobulini sa specifičnošću značajnom za APS u uslovima *in vitro* moduliraju funkcionalna svojstva humanog trofoblasta, dovodeći do inhibicije ćelijske invazije. Prikazani rezultati ukazuju na neke od medijatora ovog efekta, koji uključuju integrine, MMP-2 i -9 i gal-1. Citohemijskim ispitivanjem tretiranih ćelija uočena je internalizacija imunoglobulina sa specifičnošću značajnom za APS u ćelije ekstravilusnog trofoblasta *in vitro*, što otvara prostor za dalje ispitivanje mogućih mehanizama kojima se ostvaruju efekti na funkciju trofoblasta.

# ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- 1) aPL+ IgG i MAb 26 se vezuju za ekstravilusnu trofoblastnu ćelijsku liniju HTR-8/SVneo, model sistem za normalni invazivni trofoblast. Takođe je utvrđeno vezivanje MAb 26 za citotrofoblast izolovan iz placente prvog trimestra. Ispitivana antitela se vezuju i u odsustvu egzogenog  $\beta_2$ GPI i drugih faktora prisutnih u fetalnom telećem serumu. To može ukazati na ekspresiju endogenog  $\beta_2$ GPI ili na prisustvo receptora koji bi direktno vezivao antitela, što predstavlja osnov za dalja istraživanja.
- 2) aPL+ IgG i MAb 26 značajno smanjuju invazivnost ekstravilusnog trofoblasta čoveka *in vitro*.
  - Uočeno smanjenje trofoblastne invazivnosti nije posledica smanjene vijabilnosti i proliferacije ćelija, niti povećane apoptoze.
  - aPL+ IgG ostvaruju efekat na trofoblastnu invaziju inhibitornim delovanjem na proteine značajne u procesu ćelijske invazije: MMP-9, integrinske subjedinice  $\alpha_1$ ,  $\alpha_5$  i  $\beta_1$  i sekretovani galektin-1.
  - MAb 26 ostvaruje efekat na trofoblastnu invaziju inhibitornim delovanjem na MMP-2 i -9,  $\alpha_1$  subjedinicu integrina i galektin-1.
- 3) Molekulska mimikrija, kao mehanizam kojim su nastala antitela prema  $\beta_2$ GPI koja su korišćena u eksperimentalnom radu, predstavlja važan činilac u patofiziologiji antifosfolipidnog sindroma u trudnoći.
- 4) aPL+ IgG i MAb 26 se nakon inkubacije sa ćelijama trofoblasta detektuju unutar jednog broja ćelija.
  - Broj ćelija kod kojih se uočava intracelularna lokalizacija imunoglobulina, kao i intenzitet bojenja, pozitivno koreliraju sa dužinom trajanja inkubacije.

- Internalizacija MAb 26 u HTR-8/SVneo ćelije je aktivan proces koji zavisi od temperature na kojoj se odvija inkubacija, što ukazuje na endocitozu kao mogući mehanizam internalizacije antitela.
- Nije detektovana značajna internalizacija imunoglobulina koji su korišćeni kao kontrola (aPL- IgG i mIgG), što ukazuje da proces internalizacije verovatno nije posredovan Fc receptorom.
- Ispitivanje lokalizacije MAb 26 u odnosu na odeljke unutar ćelije, primenom odgovarajućih markera, je potvrdilo sposobnost internalizacije MAb 26. Najveća blizina u detektovanim signalima nakon 2 h je uočena za MAb 26 i kaveolin-1, kao i klatrin, što ukazuje na lokalizaciju MAb 26 neposredno uz ćelijsku membranu.
- Internalizacija MAb 26 u ćelije trofoblasta ne zavisi od tipa ćelija ekstravilusnog trofoblasta i uočena je i u primarnoj kulturi izolovanog CT i imortalizovanoj ćelijskoj liniji ekstravilusnog trofoblasta.

Dobijeni rezultati predstavljaju napredak u razumevanju mehanizama i molekula uključenih u patološke promene placente pod delovanjem aPL. Pored toga, biološki efekat izazvan korišćenim anti- $\beta_2$ GPI antitelima, obzirom na način njihovog nastanka posredstvom molekulske mimikrije, otvara nove pravce u istraživanju autoimunosti.

# LITERATURA

- **Abbas AK, Lichtman AH, Jordan SP.** Cellular and molecular immunology. 7<sup>th</sup> edition. WB Saunders, Philadelphia. 2012.
- **Abbas AK, Lichtman AH, Jordan SP.** Cellular and molecular immunology. 3<sup>th</sup> edition. WB Saunders, Philadelphia. 1997.
- **Abdel-Monem H, Dasgupta SK, Le A, Prakasam A, Thiagarajan P.** Phagocytosis of platelet microvesicles and beta2- glycoprotein I. *Thromb Haemost* 2010; 104:335-341.
- **Abedi-Valugerdi M, Hu H, Möller G.** Mercury-induced anti-nucleoar autoantibodies can transgress the mebrane of living cells *in vivo* and *in vitro*. *International Immunology* 1999; 11:605-615.
- **Abrahams VM.** Mechanisms of antiphospholipid antibody- associated pregnancy complications. *Thromb Res* 2009; 124: 521-525.
- **Ağar C, de Groot PG, Marquart JA, Meijers JC.** Evolutionary conservation of the lipopolysaccharide binding site of beta-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 2011; 106:1069-1075.
- **Ağar C, van Os GM, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, Derksen RH, et al.** Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116:1336-1343.
- **Agostinis C, Biffi S, Garrovo C, Durigutto P, Lorenzon A, Bek A, Bulla R, et al.** In vivo distribution of  $\beta$ 2 glycoprotein I under various pathophysiologic conditions. *Blood* 2011; 118:4231-4238.
- **Alarcón-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Argüelles A, Richaud-Patin Y, Pérez Romano B.** Penetration of anti-DNA antibodies into mononuclear cells causes apoptosis. *Arthritis Rheum* 1995; 3: S179
- **Alarcón-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Argüelles A.** The penetration of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. *J Autoimmun* 1996; 9:295-300.
- **Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles A, Fishbein E.** Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 1978; 271:67-68.
- **Alarcón-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Llorente L.** Antibody penetration into living cells II. Anti-ribonucleoprotein IgG penetrates into Tg lymphocytes causing their deletion and the abrogation of suppressor function. *J Immunol* 1979; 122:1855.
- **Alard JE, Gaillard F, Daridon C, Shoenfeld Y, Jamin C, Youinou P.** TLR2 is one of the endothelial receptors for beta 2-glycoprotein I. *J Immunol* 2010; 185:1550-1557.



- **Albert LJ, Inman RD.** Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med* 1999; 341:2068-2074.
- **Alferink J, Tafuri A, Vestweber D, Hallmann R, Hämmerling GJ, Arnold B.** Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 1998; 282:1338-1341.
- **Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, Willard B, Zhang J, McCrae KR.** A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies. *Blood* 2012; 119:884-893.
- **Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R, Kämmerer U.** Human decidua and invasive trophoblast are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 2011;17: 637-652.
- **Aplin JD.** Expression of integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* 1993; 14:203-215.
- **Aplin JD, Charlton AK, Ayad S.** An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *Cell Tissue Res* 1988; 253:231-40.
- **Arndt PA, Leger RM, Garratty G.** Serology of antibodies to second and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion* 1999; 39:1239-1246.
- **Arnout J, Wittevrongel C, Vanrusselt M, Hoylaerts M, Vermeylen J.** Beta2-glycoprotein I dependent lupus anticoagulants form stable bivalent antibody beta2-glycoprotein I complexes on phospholipid surfaces. *Thromb Haemost* 1998; 79:79-86.
- **Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG.** Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using beta 2-glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods* 1991; 143:223-229.
- **Averna M, Paravizzini G, Marino G, Emmanuele G, Cefalù AB, Magroc G, Bartoloni G, et al.** *Intern J Biochem Cell Biol* 2004; 36:1297-1305.
- **Bai XS, Wang YL, Qin L, Xiao ZJ, Herva R, Piao SY.** Dynamic expression of matrix metalloproteinase (MMP-2, -9 and -14) and tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reproduction* 2005; 129:103e13.
- **Balasa B, Sarvetnick N.** Is pathogenic humoral autoimmunity a Th1 response? Lessons from (for) myasthenia gravis. *Immunol Today* 2000; 21:19-23.
- **Balasz J, Creus M, Fabregues F, Reverter JC, Carmona F, Tassies D.** Antiphospholipid antibodies and human reproductive failure. *Hum Reprod* 1996; 11:2310-2315.

- **Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardway D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ.** Human cytotrophoblast invasion is up regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 1994; 164:550-561.
- **Behar SM, Porcelli SA.** Mechanisms of autoimmune disease induction: the role of the immune response to microbial pathogens. *Arthritis Rheum* 1995; 38:458-476.
- **Benirschke K, Kaufmann P.** (2000) Pathology of the human placenta. *Springer-Verlag New York Inc.*
- **Berman J, Girardi G, Salmon JE.** TNF-alpha is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *J Immunol* 2005; 174:485-490.
- **Biggioggero M, Meroni PL.** The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimm Rev* 2010; 9:A299-304.
- **Bischof P, Meisser A, Campana A.** Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 2000a; 55:65-71.
- **Bischof P, Meisser A, Campana A.** Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion-a review. *Placenta* 2000b; 21:s55-s60
- **Blank M, Krause I, Fridkin M, Keller N, Kopolovic J, Goldberg I, Tobar A, Schoenfeld Y.** Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2002; 109:797-804.
- **Blank M, Eisenstein M, Ascherson RA, Cervera R, Schoenfeld Y.** The infectious origin of the antiphospholipid syndrome. In *Infection and Autoimmunity*, Y Schoenfeld, N Rose (eds). Amsterdam, Elsevier, 2004, pp 473-490.
- **Blank M, Anafi L, Zandman-Goddard G, Krause I, Goldman S, Shalev E, Cervera R, et al.** The efficacy of specific IVIG anti-idiotypic antibodies in antiphospholipid syndrome (APS): trophoblast invasiveness and APS animal model. *Internal Immunol* 2007; 19:857-865.
- **Bohgaki M, Matsumoto M, Atsumi T, Kondo T, Yasuda S, Horita T, Nakayama KI, et al.** Plasma gelsolin facilitates interaction between  $\beta 2$  glycoprotein I and  $\alpha 5\beta 1$  integrin. *J Cell Mol Med* 2011; 15:141-151.
- **Borghesi MO, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Chen P, Pierangeli SS, Meroni P.** Effects of a toll-like receptor antagonist and anti-annexin A2 antibodies on binding and activation of decidual cells by anti-beta2glycoprotein I antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 2:35.

- **Bose P, Kadzrov M., Goldin R, Hahn S, Backos M, Regan L, Huppertz B.** Aberrations of early trophoblast differentiation predispose to pregnancy failure: Lessons from antiphospholipid syndrome. *Placenta* 2006; 27:869-875.
- **Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, Derksen RH, et al.** Adhesion mechanism of human beta(2)- glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18:5166-5174.
- **Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P.** Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 2000; 13:829-840.
- **Božić M, Petronijević M, Milenković S, Atanacković J, Lazić J, Vićovac L.** Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta* 2004; 25: 797-802.
- **Bretscher MS.** Circulating integrins: alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 4 and Mac-1, but not alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1 or LFA-1. *EMBO J* 1992; 11:405-410.
- **Bretscher MS.** Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells. *EMBO J* 1989; 8:1341-1348.
- **Brosens IA.** Fetal growth retardation and the arteries of the placental bed. *Br J Obstet Gynaecol* 1977; 84:656-663.
- **Buckingham KL, Chamley LW.** A critical assessment of the role of antiphospholipid antibodies in infertility. *J Repr Immunol* 2009; 80:132-145.
- **Bulmer JN, Morrison L, Johnson PM.** Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations. *J Reprod Immunol* 1988; 14:291-302.
- **Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ.** B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 2007; 7:633-643.
- **Carcamo C, Pardo E, Oyanadel C, Bravo-Zehnder M, Bull P, Caceres M, Martinez J, et al.** Galectin-8 binds specific  $\beta$ 1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* 2006; 312:374-386.
- **Caruso A, De Carolis S, Di Simone N.** Antiphospholipid antibodies in obstetrics: new complexities and sites of action. *Hum. Reprod Update* 1999; 5:267-276.
- **Cavazzana I, Manuela N, Irene C, Barbara A, Sara S, Orietta BM, Angela T, et al.** Complement activation in anti-phospholipid syndrome: a clue for an inflammatory process? *J Autoimmun* 2007; 28:160-164.

- **Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, et al.** Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1, 000 patients. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1019-1027.
- **Cervera R.** Lessons from the “Euro-phospholipid” project. *Autoimmun Rev* 2008; 7:174-178.
- **Cevallos R, Darnige L, Arvieux J, Veyssier P, Gruel Y.** Antiphospholipid and anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in monozygotic twin sisters. *J Rheumatol* 1994; 21:1970-1971.
- **Chamley L, Viall C, Stone P, Chen Q.** The internalization of antiphospholipid antibodies into trophoblast correlates with the expression of megalin. *Reprod Fertil Devel* 2009; 21:127.
- **Chamley LW, Duncalf AM, Mitchell MD, Johnson PM.** Action of anticardiolipin and antibodies to beta-2-glycoprotein-I on trophoblast proliferation as a mechanism for fetal death. *Lancet* 1998; 352:1037-1038.
- **Chamley LW, Allen JL, Johnson PM.** Synthesis of  $\beta$ 2-Glycoprotein 1 by the Human Placenta. *Placenta* 1997; 18:403-410.
- **Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS.** Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies. *Thromb Res* 1991; 61:291-299.
- **Charles PC, Weber KS, Cipriani B, Brosnan CF.** Cytokine, chemokine and chemokine receptor mRNA expression in different strains of normal mice: implications for establishment of a TH1/TH2 bias. *J Neuroimmunol* 1999; 100:64-73.
- **Chen Q, Viall C, Kang Y, Liu B, Stone P, Chamley L.** Anti-phospholipid antibodies increase non-apoptotic trophoblast shedding: a contribution to the pathogenesis of pre-eclampsia in affected women? *Placenta* 2009; 30:767-773.
- **Cheng HM, Chamley L.** Cryptic natural autoantibodies and co-potentiators *Autoimmun Rev* 2008; 7:431-434.
- **D'Ippolito S, Di Simone N, Di Nicuolo F, Castellani R, Caruso A.** Antiphospholipid antibodies: effects on trophoblast and endothelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:150-158.
- **Dahlquist G.** The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr Suppl* 1998; 425:5-10.
- **Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ.** Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester

cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* 1992; 89:210-222.

- **Davidson A, Diamond B.** Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345:340-350.
- **De Laat B, de Groot PG.** Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 2011; 13:70-76.
- **De Laat B, Mertens K, de Groot PG.** Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies—from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4:192-199.
- **De Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG.** IgG antibodies that recognize epitope Gly40- Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*. 2005; 105:1540-1545.
- **Delcommenne M, Streuli CH.** Control of integrin expression by extracellular matrix. *J Biol Chem* 1995; 270:26794-267801.
- **De Wolf F, De Wolf Peteers C, Brosens I, Robertson WB.** The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *Am J Obst Gynecol* 1980; 137:58-70.
- **Deng SX, Hanson E, Sanz I.** In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *International Immunology* 2000; 12:415-423.
- **Dersimonian H, Schwartz RS, Barret KJ, Stollar BD.** Relationship of human variable region heavy chain germline genes to genes encoding anti-DNA autoantibodies. *J Immunol* 1987; 139:2496-2501.
- **Dimitrijević L, Živković I, Stojanović M, Petrušić V, Živančević-Simonović S.** Vaccine model of antiphospholipid syndrome induced by tetanus vaccine. *Lupus* 2012; 21:195-202.
- **Di Simone N, Caliandro D, Castellani R, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A.** Low molecular weight heparin restores in vitro trophoblast invasiveness and differentiation in presence of immunoglobulin G fractions obtained from patients with antiphospholipid syndrome. *Hum Reprod* 1999; 14:489-495.
- **Di Simone N, Castellani R, Caliandro D, Caruso A.** Antiphospholipid antibodies regulate the expression of trophoblast cell adhesion molecules. *Fert Ster* 2002; 77:257-344.
- **Di Simone N, De Carolis S, Lanzone A, Ronsisvalle E, Giannice R, Caruso A.** In vitro effect of antiphospholipid-antibody containing sera on basal and gonadotrophin releasing hormone-dependent human chorionic gonadotrophin release by cultured trophoblast cells. *Placenta* 1995; 16:75-83.

- **Di Simone N, Di Nicuolo F, D'Ippolito S, Castellani R, Tersigni C, Caruso A, et al.** Antiphospholipid antibodies affect human endometrial angiogenesis. *Biol Reprod* 2010; 83:212-219.
- **Di Simone N, Ferrazzani S, Castellani R, De Carolis S, Mancuso S, Caruso A.** Heparin and lowdose aspirin restore placental human chorionic gonadotrophin secretion abolished by antiphospholipid antibody-containing sera. *Hum Reprod* 1997; 12:2061-2065.
- **Di Simone N, Luigi MP, Marco D, Fiorella DN, Silvia D, Clara DM, Alessandro C.** Pregnancies complicated with antiphospholipid syndrome: the pathogenic mechanism of antiphospholipid antibodies: a review of the literature. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108:505-514.
- **Di Simone N, Raschi E, Testoni C, Castellani R, D'Asta M, Shi T, Krilis SA, et al.** Pathogenic role of anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in antiphospholipid associated fetal loss: characterisation of beta 2-glycoprotein I binding to trophoblast cells and functional effects of anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in vitro. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:462-746.
- **Di Simone N, Meroni PL, Del Papa N, Raschi E, Caliandro D, De Carolis S, Khamashta MA, et al.** Antiphospholipid antibodies affect trophoblast secretion and invasiveness by binding directly and trough adhered  $\beta$ 2-glycoprotein I. *Arthr Rheum* 2000; 43:140-150.
- **Dighiero G, Rose NR.** Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* 1999; 20:423-428.
- **Döring Y, Hurst J, Lorenz M, Prinz N, Clemens N, Drechsler MD, Bauer S, et al.** Human antiphospholipid antibodies induce TNFalpha in monocytes via toll-like receptor 8. *Immunobiology* 2010; 215:230-241.
- **Dunoyer-Geindre S, Kruithof EK, Galve-de Rochemonteix B, Rosnoblet C, Gruenberg J, Reber G, et al.** Localization of b2-glycoprotein 1 in late endosomes of human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2001; 85:903e7.
- **Durrani OM, Gordon C, Murray PI.** Primary anti-phospholipid antibody syndrome (APS): current concepts. *Surv Opthamol* 2002; 47:215-238.
- **Ellinger I, Schwab M, Stefanescu A, Hunziker A, Fuchs R.** IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta. *Eur J Immunol* 1999; 29:733-744.
- **Emlen W, Niebur J, Kadera R.** Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994; 152:3685-3692.

- **Encinas JA, Kuchroo VK.** Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:691-697.
- **Erkan D, Lockshin MD.** Non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010; 19:424-427.
- **Exner T, Barber S, Kronenberg H, Rickard KA.** Familial association of the lupus anticoagulant. *Br J Haematol* 1980; 45: 89-96.
- **Faden D, Tincani A, Tanzi P, Spatola L, Lojacono A, Tarantini M, et al.** Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies in general obstetric population: preliminary results on the prevalence and correlation with pregnancy outcome. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies are associated with some obstetrical complications, mainly preeclampsia-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 73:37-42.
- **Filla M, Zhang C, Kaul K.** A potential transforming growth factor alpha / epidermal growth factor receptor autocrine circuit in placental cytotrophoblasts. *Cell Growth Diff* 1993; 4:387-393.
- **Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, Bossi F, et al.** Thrombus formation induced by antibodies to  $\beta$ 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* 2005; 106:2340–2346.
- **Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann T, Markert UR.** Immunology of gametes and embryo implantation. *Chem Immunol Allergy* 2005; 88:181-199.
- **Floridon C, Nelson O, Holund B, Sunde L, Westergaard J, Thomsen S, Teisner B.** Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblast during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:943-950.
- **Foon KA, Morgan AC** (1985). *Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer*. Kluwer Academic Publishers Group. pp9-19
- **Furtak V, Hatcher F, Ochieng J.** Galectin-3 Mediates the Endocytosis of b-1 Integrins by Breast Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 289:845-850.
- **Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, Barbui T, et al.** Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335:1544-1547.
- **Galve-de Rochemonteix B, Kobayashi T, Rosnoblet C, Lindsay M, Parton RG, Reber G, de Maistre E, et al.** Interaction of anti-phospholipid antibodies with late endosomes of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:563-574.

- **García-Carrasco M, Galarza-Maldonado C, Mendoza-Pinto C, Escarcega RO, Cervera R.** Infections and the antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36:104-108.
- **Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M.** Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 1993; 177:999-1008.
- **Genbačev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ.** Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/ invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 1996; 97:540-550.
- **Genbačev O, Zhou Y, Ludllo J, Fisher SJ.** Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997; 277: 1669-1672.
- **Gerosa M, De Angelis V, Trespidi L, Acaia B, Cetin I, et al.** Complement involvement in antiphospholipid-mediated placental damage: prospective study in APS pregnant women. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:210.
- **Gharavi AE, Mellors RC, Elkong KB.** IgG anti-cardiolipin antibodies in murine lupus. *Clin Exp Immunol* 1989; 78:233-238.
- **Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu XW, Espinola RG, Harris EN.** GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. *J Immunol* 1999a; 163:2922-2927.
- **Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, et al.** Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheum* 2002; 46:545-552.
- **Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Harris EN.** Thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies do not depend on their binding to beta2 glycoprotein 1 (beta2GP1) alone. *Lupus* 1998; 7:341-346.
- **Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, Elkong KB.** Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with beta 2 glycoprotein I (apolipoprotein H). *J Clin Invest* 1992; 90:1105-1109.
- **Gharavi AE, Vega-Ostertag M, Espinola RG, Liu X, Cole L, Cox NT, Romagnoli P, et al.** Intrauterine fetal death in mice caused by cytomegalovirus-derived peptide induced aPL antibodies. *Lupus* 2004; 13:17-23.
- **Gharavi EE, Chaimovich H, Cucurull E, Celli CM, Tang H, Wilson WA, Gharavi AE.** Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with synthetic viral and bacterial peptides. *Lupus* 1999b; 8:449-455.
- **Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis SA.** Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007; 109:422-430.



- **Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, Hollmann TJ, et al.** Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003; 112:1644-1654.
- **Girardi G, Redecha P, Salmon JE.** Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 2004; 10:1222-1226.
- **Giron-Gonzalez JA, Garcia del Rio E, Rodriguez C, Rodriguez-Martorell J, Serrano A.** Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals. *J Rheumatol* 2004; 31:1560-1567.
- **Goel N, Ortel TL, Bali D, Anderson JP, Gourley IS, Smith H, Morris CA, et al.** Familial antiphospholipid antibody syndrome: criteria for disease and evidence for autosomal dominant inheritance. *Arthritis Rheum* 1999; 42:318-327.
- **Golan TD, Gharavi AE, Elkou KB.** Penetration of autoantibodies into living epithelial cells. *J Invest Dermatol* 1993; 100:316.
- **Golan TD, Sigal D, Sabo E, Shemuel Z, Guedj D, Weinberger A.** The penetrating potential of autoantibodies into live cells in vitro coincides with the in vivo staining of epidermal nuclei. *Lupus* 1997; 6:18-26.
- **Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS.** Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1979; 279:679-685.
- **Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, Pritchard-Briscoe H, et al.** Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988; 334:676-682.
- **Graham CH, Hawley TS, Hawley RC, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK.** Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res* 1993; 206:204-211.
- **Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK.** Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod* 1992; 46:561-572.
- **Greaves M, Cohen H, Machin SH, Mackie I.** Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109:704-715.
- **Hammel M, Schwarzenbacher R, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R.** Mechanisms of the interaction of beta(2)-glycoprotein I with negatively charged phospholipids membranes. *Biochemistry*. 2001; 40:14173-14181.
- **Hanisch FG, Dressen F, Uhlenbruck G.** Quantitative micro-adhesion assay on polystyrene matrices. In *Lectins and Glycobiology*, HJ Gabius, S Gabius (eds). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1993, pp 411-417.

- **Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR.** Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2:1211-1214.
- **Haserick JR, Long R.** Systemic lupus erythematosus preceded by false-positive serologic tests for syphilis: presentation of five cases. *Ann Intern Med* 1952; 37:559-565.
- **Hashimoto Y, Kawamura M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yoshida S, Matsuura E, et al.** Anticardiolipin antibodies in NZW 9 BXSB F1 mice. A model of antiphospholipid syndrome. *J Immunol* 1992; 149:1063-1068.
- **Haupt H, Schwick HG, Störiko K.** On a hereditary beta-2-glycoprotein I deficiency. *Humangenetik* 1968; 5:291-293.
- **Higashimoto M, Homma Y, Umetsu M, Konno Y, Ono K, Yoshimoto N, Momma T, et al.** Circadian rhythm of apoprotein H (b2-glycoprotein-1) in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360:418-422.
- **Hirose N, Williams R, Alberts AR, Furie RA, Chartash EK, Jain RI, Sison C, et al.** A role for the polymorphism at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in the generation of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1655-1661.
- **Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, Espinola R, et al.** Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med* 2002; 195:211-220.
- **Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N.** Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998; 4:781-785.
- **Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE.** The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13:486-489.
- **Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA.** A phospholipid- beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992; 1:75-81.
- **Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P.** Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases, their substrats, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in human placenta. *Cell Tissue Res* 1998; 291:133-148.

- **Hurst J, Prinz N, Lorenz M, Bauer S, Chapman J, Lackner KJ, von Landenberg P.** TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1beta and caspase-1 in monocytes and dendritic cells. *Immunobiology* 2009; 214:683-691.
- **Hynes RO.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-687.
- **Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A.** Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum* 2007; 56:280-290.
- **Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, Giles I, Papalardo E, Vargas G, Shilagard T, et al.** In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemos* 2009; 7:833-842.
- **Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K, Koike T.** Beta2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum* 1999; 42:167-174.
- **Inić-Kanada A, Stojanović M, Živković I, Kosec D, Mičić M, Petrušić V, Živančević-Simonović S, Dimitrijević L.** Murine monoclonal antibody 26 raised against tetanus toxoid cross-reacts with beta2-glycoprotein I: its characteristics and role in molecular mimicry. *Am J Reprod Immunol* 2009a; 61:39-51.
- **Inić-Kanada A, Stojanović M, Živković I, Petrušić V, Dimitrijević Lj.** The monoclonal antibody 26 raised against tetanus toxoid also recognizes tetanus toxin and beta(2)-glycoprotein I - its binding properties in vitro and potential applications. *J Serb Chem Soc* 2009b; 3:245-257.
- **Irving JA, Lala PK.** Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: Regulation by TGFβ, IGF-II and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 1995; 217:419-427.
- **Irving JA, Lysiak JJ, Graham CH, Hearn S, Han VK, Lala PK.** Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus explants and propagated in culture. *Placenta* 1995; 16:413-433.
- **Isakaa K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, et al.** Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 2003; 24:53-64.
- **Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S.** Thymus and autoimmunity: Production of CD25+CD4+ naturally anergic and

suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162:5317-5326.

- **Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM.** Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15542-5546.
- **Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM.** Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84:223-243.
- **Janeway CA. Jr.** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 1992; 13:11-16.
- **Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermeylen J, Hoylaerts MF, Arnout J.** Thrombogenicity of  $\beta$ 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood* 2003; 101:157-162.
- **Jenkins MK, Schwartz RH.** Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1987; 165:302-319.
- **Jerne NK.** Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev* 1984; 79:5-24.
- **Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H.** Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in norma, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta* 2007; 28:1165-1173.
- **Jeschke U, Reimer T, Bergemann C, Wiest I, Schulze S, Friese K, Walzel H.** Binding of galectin-1 (gal-1) on trophoblast cells and inhibition of hormone production of trophoblast tumor cells *in vitro* by gal-1. *Histochem Cell Biol* 2004; 121:501-508.
- **Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ.** Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2:301-306.
- **Jovanović M, Stefanoska I, Radojčić L, Vićovac L.** Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins  $\alpha$ 5 and  $\beta$ 1. *Reproduction* 2010a; 139: 789-798.
- **Jovanović M, Vićovac L.** Interleukin-6 stimulates cell migration invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta* 2009; 20:320-328.

- **Jovanović M, Božić M, Kovačević T, Radojčić L, Petronijević M, Vićovac L.** Effects of anti-phospholipid antibodies on a human trophoblast cell line (HTR-8/SVneo). *Acta Histochem* 2010b; 112:34-41.
- **Kajiwara T, Yasuda T, Matsuura E.** Intracellular trafficking of b2-glycoprotein I complexes with lipid vesicles in macrophages: Implications on the development of antiphospholipid syndrome. *J Autoimm* 2007; 29:164-173.
- **Kam EPY, Gardner L, Loke LW, King A.** The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Repr* 1999; 14:2131-2138.
- **Kappler JW, Roehm N, Murrack P.** T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49:273-280.
- **Katsuragawa H, Kanzaki H, Inoue T, Hirano T, Mori T, Rote NS.** Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits *in vitro* human trophoblastic hormone production and invasion. *Biol Reprod* 1997; 56:50-58.
- **Kemp B, Kertschanska S, Kadroy M, Rath W, Kaufmann P, Huppertz B.** Invasive Depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem Cell Biol* 2002; 117:401-414.
- **King A, Thomas L, Bischof P.** Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines - a workshop report. *Placenta* 2000; 21:S113-119.
- **Klein J, Sato A.** The HLA system. *N Engl J Med* 2000; 343:782-786.
- **Kolundžić N, Bojić-Trbojević Ž, Kovačević T, Stefanoska I, Kadoya T, Vićovac L.** Galectin-1 is part of human trophoblast invasion machinery--a functional study in vitro. *PLoS One* 2011; 6:e28514
- **Kornberg A, Blank M, Kaufman S, Shoenfeld Y.** Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 153:1328-1332.
- **Kramers K, van Bruggen MC, Rijke-Schilder TP, Dijkman HB, Hylkema M N, Croes HJ, Fransen JA, et al.** In vivo ANA is a fixation artifact: nucleosome-complexed antinucleosome autoantibodies bind to the cell surface and are internalized. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:946.
- **Kristensen T, Schousboe I, Boel E, Mulvihill EM, Hansen RR, Moller KB, Moller NP, Sottrup-Jensen L.** Molecular cloning and mammalian expression of human beta 2-glycoprotein I cDNA. *FEBS Lett* 1991; 289:183-186.
- **Kukreja A, Maclaren NK.** Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell Moll Life Sci* 2000; 57:534-541.

- **Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR.** Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 1998; 188:409-414.
- **Kutteh WK, Yetman DL, Chantilis SJ, Crain J.** Effect of antiphospholipid antibodies in women undergoing in-vitro fertilization: role of heparin and aspirin. *Human Reproduction* 1997; 12:1171-1175.
- **La Rosa L, Meroni PL, Tincani A, Balestrieri G, Faden D, Lojacono A, Morassi L, et al.** Beta 2 glycoprotein I and placental anticoagulant protein I in placentae from patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1994; 21:1684-1693.
- **Lahita RG.** The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11:352-356.
- **Lakasing L, Campa JS, Parmar K, Poston R, Hunt BJ, Poston L.** Normal expression of cell adhesion molecules in placentae from woman with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Placenta* 2000; 21:142-149.
- **Lala PK, Hamilton GS.** Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta* 1996;17:545-555.
- **Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC.** Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod* 2005; 73:374-381.
- **Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE.** Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992; 358:155-157.
- **Levine JS, Branch DW, Rauch, J.** The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346:752-763.
- **Levy Y, Almog O, Gorshtein A, Shoenfeld Y.** The environment and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2006; 15:784-790.
- **Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, et al.** 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 113:437-449.
- **Lieby P, Soley A, Knapp AM, Cerutti M, Freyssinet JM, Pasquali JL, Martin T.** Memory B cells producing somatically mutated antiphospholipid antibodies are present in healthy individuals. *Blood* 2003; 102:2459-2465.
- **Lim P, Zouali M.** Pathogenic autoantibodies: emerging insights into tissue injury. *Immunology letters* 2006a; 103:17-26.

- **Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW.** Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006b; 295:1050-1057.
- **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- **Loke YW, King A.** Human Implantation: Cell Biology and Immunology. Cambridge: Cambridge University press, 1995.
- **Lopez-Pedrerera C, Buendia P, Cuadrado MJ, Siendones E, Aguirre MA, Barbarroja N, et al.** Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NFkappaB/Rel proteins via the p38 mitogenactivated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* 2006; 54:301-311.
- **Lozier J, Takahashi N, Putnam FW.** Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:3640-3664.
- **Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG.** Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 20. *J Biol Chem* 2003; 278:33831-33838.
- **Lutters BC, Meijers JC, Derksen RH, Arnout J, de Groot PG.** Dimers of beta 2-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I antibody complexes. *J Biol Chem* 2001; 276:3060-3067.
- **Lyden TW, Vogt E, Ng AK, Johnson PM, Rote NS.** Monoclonal-antiphospholipid antibody reactivity against human placental trophoblast. *J Reprod Immunol* 1992; 22:1-14.
- **Ma J, King N, Chen SL, Penny R, Breit SN.** Antibody penetration of viable human cells. II. Anti-RPN antibodies binding to RPN antigen expressed on cell surface, which may mediate the antibody internalization. *Clin Exp Immunol* 1993; 93:396-404.
- **Mahmoudi M, Edwards JY, Bell DA, Cairns E.** V region gene analysis of human IgM hybridoma monoclonal anti- Sm antibodies. *Lupus* 1997; 6:578-589.
- **Martinez de la Torre Y, Buracchi C, Borroni EM, Dupor J, Bonecchi R, Nebuloni M, et al.** Protection against inflammation- and autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:2319-2324.
- **Martinuĉ Porobiĉ J, Avcin T, Bozic B, Kuhar M, Ćučnik S, Źupanĉiĉ M, Prosenec K, et al.** Antiphospholipid antibodies following vaccination with recombinant hepatitis B vaccine. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:377-380.

- **Maruo T, Matsuo H, Otani T, Mochizuki M.** Role of epidermal growth factor (EGF) and its receptors in the development of the human placenta. *Reprod Fertil Devel* 1995; 7:1465-1470.
- **Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ.** Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta* 1999; 20:407-422.
- **Mchrani T, Petri M.** Epidemiology of the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, editor. *Handbook of systemic autoimmune diseases*, vol. 10. Amsterdam: Elsevier; 2009. p. 13-34.
- **McIntyre JA.** Immune recognition at the maternal-fetal interface: overview. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28:127-131.
- **McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA.** Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: b2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120-4124.
- **Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F.** Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7:330-339.
- **Meroni PL, Raschi E, Camera M, Testoni C, Nicoletti F, Tincani A, Khamashta MA, et al.** Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15:237-240.
- **Meroni PL, Riboldi P.** Pathogenic mechanisms mediating antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13:377-382.
- **Merrill JT, Zhang HW, Shen C, Butman BT, Jeffries EP, Lahita RG, Myones BL.** Enhancement of protein S anticoagulant function by beta2-glycoprotein I, a major target antigen of antiphospholipid antibodies: beta2-glycoprotein I interferes with binding of protein S to its plasma inhibitor, C4b-binding protein. *Thromb Haemost* 1999; 81:748-757.
- **Merrill JT.** Do antiphospholipid antibodies develop for a purpose? *Curr Rheumatol Rep* 2006; 8:109-113.
- **Merrill JT.** What causes the antiphospholipid syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3:293-300.
- **Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M.** Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:400-406.



- **Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHW, et al.** International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
- **Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, Samani NJ.** Galectin-1 interacts with b-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:1010-1016.
- **Molina V, Shoenfeld Y.** Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity* 2005; 38:235-245.
- **Moll UM, Lane BL.** Proteolytic activity of first trimester human placenta: localization of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast. *Histochemistry* 1990; 94:555-560.
- **Mouthon L, Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD.** The self-reactive antibody repertoire of normal serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand J Immunol* 1996; 44:243-251.
- **Mulla MJ, Brosens JJ, Chamley LW, Giles I, Pericleous C, Rahman A, Joyce SK, et al.** Antiphospholipid antibodies induce a pro-inflammatory response in first trimester trophoblast via the TLR4/MyD88 pathway. *Am J Reprod Immunol* 2009; 62:96-111.
- **Mulla MJ, Myrtolli K, Brosens JJ, Chamley LW, Kwak-Kim JY, Paidas MJ, Abrahams VM.** Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:339-348.
- **Murray MJ, Lessey BA.** Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17:275-290.
- **Niu H, Leung DTM, Ma CH, Tam FCH, Lim PL.** A hybridoma which produces an antibody to telomerase in culture fails to grow as mouse ascities. *Clin Invest Med* 2004; 27:172D.
- **Nimpf J, Wurm H, Kostner GM.** Interaction of b2 glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon ADP induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54:397-401.
- **Nodler J, Moolamalla SR, Ledger EM, Nuwayhid BS, Mulla ZD.** Elevated antiphospholipid antibody titers and adverse pregnancy outcomes: analysis of a population-based hospital dataset. *BMC Pregnancy Childbirth* 2009; 16:9-11.
- **Nojima J, Suehisa E, Kuratsune H, Machii T, Koike T, Kitani T, Kanakura Y, Amino N.** Platelet activation induced by combined effects of anticardiolipin and lupus anticoagulant IgG antibodies in patients with systemic lupus erythematosus- possible

association with thrombotic and thrombocytopenic complications. *Thromb Haemost* 1999; 81:436-441.

- **Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ.** Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345:1400-1408.
- **Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG.** Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343:938-952.
- **Nossal GJ, Pike BL.** Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:1602-1606 .
- **Nossal GJV, Beverley LP.** Evidence for the clonal abortion theory of B lymphocyte tolerance. *J Exp Med* 1975; 141:904-917.
- **O'Garra A, Steinman L, Gijbels K.** CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:872-883.
- **Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, et al.** Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991; 65:305-317.
- **Oldstone MBA, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H.** Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 1991; 65:319-331.
- **Opatrny L, David M, Kahn SR, Shrier I, Rey E.** Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis. *J Rheumatol* 2006; 33:2214-2221.
- **Ornoy A, Yacobi S, Matalon ST, Blank M, Blummenfeld Z, Miller RK, Shoenfeld Y.** The effects of antiphospholipid antibodies obtained from women with SLE/APS and associated pregnancy loss on rat embryos and placental explants in culture. *Lupus* 2003; 12:573-578.
- **Out HJ, Kooijman CD, Bruinse HW, Derksen RH.** Histopathological findings in placentae from patients with intra-uterine fetal death and anti-phospholipid antibodies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 41:179-186.
- **Palomo I, Segovia F, Ortega C, Pierangeli S.** Antiphospholipid syndrome: a comprehensive review of a complex and multisystemic disease. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27:668-677.
- **Pangborn MC.** A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 48:484-486.

- **Park AL**, in *Hughes' Syndrome* (ed. Khamashta, M. A.) Ch. 28 Placental pathology in antiphospholipid syndrome, 362-374 (Springer-Verlag, London, 2006).
- **Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN**. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Circulation* 1999; 99:1997-2002.
- **Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN**. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *Circ Res* 2001; 88:245-250.
- **Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN**. Experimental thrombosis and antiphospholipid antibodies: new insights. *J Autoimmun* 2000; 15:241-247.
- **Pierangeli SS, Vega-Ostertag M, Harris EN**. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Res* 2004; 114:467-476.
- **Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, Palomo I, et al**. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34:236-250.
- **Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, Liu X, Romay-Penabad Z, De Micheli V, Galli M, et al**. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: *in vivo* studies. *Ann. Rheum Dis* 2007; 66:1327-1333.
- **Pierro E, Cirino G, Bucci MR, Lazzarin N, Andreani CL, Mancuso S, Lanzone A, Navarra P**. Antiphospholipid antibodies inhibit prostaglandin release by decidual cells of early pregnancy: possible involvement of extracellular secretory phospholipase A2. *Fertil Steril* 1999; 71:342-346.
- **Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I**. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 1983; 4:397-414.
- **Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G**. Trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 1981; 2:71-92.
- **Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M**. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006, 27: 939-958.
- **Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenat C, Maquoi E; Volders L, Schnapps JP, et al**. Expression of gelatinase A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest* 1994; 71:838-846.

- **Portales-Pérez D, Alarcón-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Argüelles A, Abud-Mendoza C, Baranda L, et al.** Penetrating anti-DNA monoclonal antibodies induce activation of human peripheral blood mononuclear cells. *J Autoimmun* 1998; 11: 563-571.
- **Price BE, Rauch J, Shia MA, Walsh MT, Lieberthal W, Gilligan HM, O'Laughlin T, et al.** Anti-phospholipid autoantibodies bind to apoptotic, but not viable, thymocytes in a beta 2-glycoprotein I-dependent manner. *J Immunol* 1996; 157:2201-2208.
- **Prieto GA, Cabral AR, Zapata-Zuñiga M, Simón AJ, Villa AR, Alarcón-Segovia D, Cabiedes J.** Valine/ valine genotype at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48:471-474.
- **Quinn AS, Wu XX, Rand JH, Taatjes DJ.** Insights into the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome provided by atomic force microscopy. *Micron* 2012; 43:851-862.
- **Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, Whitley G, Chamley L, Vince G.** Antiphospholipid antibodies prevent extravillous trophoblast differentiation. *Ferti Steril* 2005; 83:691-698.
- **Radojčić L, Marjanović S, Vićovac L, Kataronovski M.** Anticardiolipin antibodies in women with unexplained infertility. *Physiol Res* 2004; 53:91-96.
- **Radway-Bright EL, Inanc M, Isenberg DA.** Animal models of the antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38:591-601.
- **Rand JH, Wu XX, Guller S, Gil J, Guha A, Scher J, Lockwood CJ.** Reduction of annexin-V (placental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:1566-1572.
- **Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Chen PP, McCrae KR, Bovill EG, Taatjes DJ.** Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: evidence from atomic force microscopy and functional assay. *Am J Pathol* 2003; 163:1193-1200.
- **Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A, Meroni PL.** Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood* 2003; 101:3495-3500.
- **Raub TJ, Kuentzel SL.** Kinetic and morphological evidence for integrin traffic endocytosis of mammalian cell integrin receptors by using an anti-fibronectin receptor beta subunit monoclonal antibody. *Exp Cell Res* 1989; 184:407-426.

- **Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ.** Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the fetomaternal interface. *J Clin Invest* 2004; 114:744-754.
- **Rioche MM, Massayeff RR.** Synthesis of plasma beta-2-glycoprotein I by human hepatoma cells in tissue culture. *Biomedicine* 1974; 21:420-423.
- **Robertson SA, Roberts CT, van Beijering E, Pensa K, Sheng Y, Shi T, Krilis SA.** Effect of beta2-glycoprotein I null mutation on reproductive outcome and antiphospholipid antibody-mediated pregnancy pathology in mice. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:409-416.
- **Rote NS, Vogt E, DeVere G, Obringer AR, Ng AK.** The role of placental trophoblast in the pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:125-136.
- **Roubey R.A.** Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulans and other phospholipid antibodies. *Blood* 1994; 89:2854-2867.
- **Roudier C, Auger I, Roudier J.** Molecular mimicry reflected through database screening: serendipity or survival strategy? *Immunol Today* 1996; 17:357-358.
- **Ruiz-Argüelles A, Alarcón-Segovia D.** Penetration of autoantibodies into living cells. In pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies update: clinical immunology: Conrad K.; Humbel R.L.; Meurer M.; Shoenfeld Y. and Tan E.M. Eds. Pabst Science Publishers. Lengerich 1998, pp. 46-56.
- **Ruiz-Argüelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Alarcón-Segovia D.** Antibody penetration into living cells: pathogenic, preventive and immuno-therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2003; 9:1881-1887.
- **Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA.** Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376:1498-1509.
- **Sakaguchi M, Imaizumi Y, Shingo T, Tada H, Hayama K, Yamada O, Morishita T, et al.** Regulation of adult neural progenitor cells by Galectin-1/beta1 Integrin interaction. *J Neurochem* 2010; 113:1516-1524.
- **Salafia CM, Cowchock FS.** Placental pathology and antiphospholipid antibodies: a descriptive study. *Am J Perinatol* 1997; 14:435-441.
- **Salemink I, Blezer R, Willems GM, Galli M, Bevers E, Lindhout T.** Antibodies to beta2-glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2000; 84:653-656.

- **Salmon JE, Girardi G, Lockshin MD.** The antiphospholipid syndrome as a disorder initiated by inflammation: implications for the therapy of pregnant patients. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2006; 3:140-147.
- **Salmon JE, Girardi G, Theodore E.** Woodward Award: antiphospholipid syndrome revisited: a disorder initiated by inflammation. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007; 118:99-114.
- **Sanz I, Dang H, Takei M, Talal N, Capra JD.** VH sequence of human anti Sm autoantibody. Evidence that autoantibodies can be unmutated copies of germline genes. *J Immunol* 1989; 142:883-887.
- **Satta N, Dunoyer-Geindre S, Reber G, Fish RJ, Boehlen F, Kruithof EK, de Moerloose P.** The role of TLR2 in the inflammatory activation of mouse fibroblasts by human antiphospholipid antibodies. *Blood* 2007; 109:1507-1514.
- **Satta N, Kruithof EKO, Fickentscher C, Dunoyer-Geindre S, Boehlen F, Reber G, Burger D, de Moerloose F.** Toll-like receptor 2 mediates the activation of human monocytes and endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Blood* 2011; 117:5523-5531.
- **Shaul PW, Anderson RG.** Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol.* 1998; 275:L843-51.
- **Schick PK, Kurica KB, Chacko GK.** Localization of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* 1976; 57:1221-1226.
- **Schultze HE, Heide K, Haupt H.** Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares  $\beta$ 2-Globulin des Humanserums. *Naturwissenschaften* 1961; 48:719.
- **Schwartzbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, et al.** Crystal structure of human  $\beta$ 2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J* 1999; 18:6228-6231.
- **Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M.** Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011; 473:337-342.
- **Sebire NJ, Backos M, El Gaddal S, Goldin RD, Regan L.** Placental pathology, antiphospholipid antibodies, and pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients. *Obstet Gynecol* 2003; 101:258-263.
- **Sebire NJ, Fox H, Backos M, Rai R, Paterson C, Regan L.** Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Hum Reprod* 2002; 17:1067-1071.

- **Seddiki N, Nato F, Lafaye P, Amoura Z, Piette JC, Mazie JC.** Calreticulin, a potential cell surface receptor involved in cell penetration of anti-DNA antibodies. *J Immunol* 2001; 166:6423-6429.
- **Semana G, Gausling R, Jackson RA, Hafler DA.** T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J Autoimmun* 1999; 12:259-267.
- **Séne D, Piette JC, Cacoub P.** Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and viral infections. *Rev Med Int* 2009; 30:135-141.
- **Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, Bassetto F, Doria A.** Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *JLeuk Biol* 2010; 87:385.
- **Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY.** Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988; 336:73-76.
- **Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN.** Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196:167.e1-5
- **Sheng Y, Reddel SW, Herzog H, Wang YX, Brighton T, France MP, Robertson SA, Krilis SA.** Impaired thrombin generation in beta 2-glycoprotein I null mice. *J Biol Chem* 2001; 276:13817-1321.
- **Shevach EM.** Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell mediated suppression. *Immunity* 2009; 30:636-645.
- **Shi F, Sottile J.** Caveolin-1-dependent  $\beta$ 1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J Cell Sci* 2008; 15:2360-2371.
- **Shoenfeld Y, Blank M, Cervera R, Font J, Raschi E, Meroni PL.** Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:2-6.
- **Shoenfeld Y, Aron-Maor A.** Vaccination and Autoimmunity ‘Vaccinosis’: A Dangerous Liaison? *J Autoimmun* 2000; 14:1-10.
- **Simon C, Martin JC, Pellicer A.** Paracrine regulators of implantation. *Baillier Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14:815-826.
- **Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO.** Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 1990; 248:1380-1388.
- **Sorice M, Longo A, Capozzi A, Garofalo T, Misasi R, Alessandri C, Conti F, et al.** Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor  $\alpha$  and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthr Rheum* 2007; 56: 2687-2697.

- **Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA.** Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:139-176.
- **Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E.** Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:59e72.
- **Stephenson MD.** Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 1996; 66:24-29.
- **Sthoeger ZM, Mozes E, Tartakovsky B.** Anti-cardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6464-6467.
- **Stojanović M, Živković I, Inić-Kanada A, Petrušić V, Dimitrijević L.** The context of tetanus toxoid application influences the outcome of antigen-specific and self-directed humoral immune response. *Microbiol Immunol* 2009; 53:89-100.
- **Strasser A, Pellegrini M.** T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol* 2004; 25:610-615.
- **Seatović S, Inić-Kanada A, Stojanović M, Živković I, Jankov RM, Dimitrijević L.** Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for determination of tetanus toxoid concentration. *J Immunoassay Immunochem* 2004; 25:31-44.
- **Takasu N, Oshiro C, Akamine H, Komiya I, Nagata A, Sato Y, Yoshimura H, Ito K.** Thyroid-stimulating antibody and TSH-binding inhibitor immunoglobulin in 277 Graves' patients and in 686 normal subjects. *J Endocrinol Invest* 1997; 20:452-461.
- **Takao T, Asanoma K, Kato K, Fukushima K, Tsunematsu R, Hirakawa T, Matsumura S, et al.** Isolation and characterization of human trophoblast side-population (SP) cells in primary villous cytotrophoblasts and HTR-8/SVneo cell line. *PLoS One* 2011; 6:e21990
- **Tan EM.** Autoantibodies in in pathology and cell biology. *Cell* 1991; 67:841-842.
- **Thomas HE, Kay TW.** Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16:251-61.
- **Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D.** Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993; 177:1009-1020.
- **Tincani A, Spatola L, Prati E, Allegri F, Ferremi P, Cattaneo R, et al.** The anti-b2-glycoprotein I activity in human antiphospholipid syndrome sera is due to monoreactive



low-affinity autoantibodies directed to epitopes located on native  $\beta_2$ -glycoprotein I and preserved during species evolution. *J Immunol* 1996; 157:5732-5738.

- **Tincani A, Taraborelli M, Cattaneo R.** Antiphospholipid antibodies and malignancies. *Autoimmun Rev* 2010; 9:200-202.
- **Tong Q, Vassilieva EV, Ivanov AI, Wang Z, Brown GT, Parkos CA, Nusrat A.** Interferon- $\gamma$  inhibits T84 epithelial cell migration by redirecting transcytosis of  $\beta_1$  integrin from the migrating leading edge. *J Immunol* 2005; 175:4030-4038.
- **Van Lummel M, Pennings MT, Derksen RH, Urbanus RT, Lutters BC, Kaldenhoven N, de Groot PG.** The binding site in  $\beta_2$ -glycoprotein I for ApoER2' on platelets is located in domain V. *J Biol Chem* 2005; 280:36729-36736.
- **Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS.** Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2911-2919.
- **Vega-Ostertag ME, Ferrara DE, Romay-Penabad Z, Liu X, Taylor WR, Colden-Stanfield M, Pierangeli SS.** Role of p38 mitogen-activated protein kinase in antiphospholipid antibody-mediated thrombosis and endothelial cell activation. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1828-1834.
- **Vencat-Raman N, Backos M, Teoh TG, Lo WT, Regan L.** Uterine artery Doppler in predicting pregnancy outcome in women with antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol* 2001; 98:235-242.
- **Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC.** Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta* 1996; 17:557-563.
- **Viall CA, Chamley LW, Chen Q.** Trophoblast antiphospholipid antibody internalisation by a  $\beta_2$  glycoprotein I- anionic phospholipid- megalin complex. *Reproduction, Fertility and Development* 2010; 22:3.4
- **Vićovac L, Aplin JD.** Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat* 1996; 156:202-216.
- **Vićovac L, Božić M, Bojić-Trbojević Ž, Golubović S.** Carcinoembryonic antigen and related molecules in normal and transformed trophoblast. *Placenta* 2007; 28:85-96.
- **Vićovac L, Janković M, Čuperlović M.** Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Repr* 1998; 13:730-735.
- **Vićovac L, Jones CJP, Aplin JD.** Trophoblast differentiation during anchoring villus formation in a coculture model of the human implantation site in vitro. *Placenta* 1995; 16:41-56.

- **Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA, Hunt JE, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM.** Patients with anticardiolipin antibodies with and without antiphospholipid syndrome: their clinical features and beta 2-glycoprotein-I plasma levels. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22:482-487.
- **Von Landenberg P, Doring Y, Modrow S, Lackner KJ.** Are antiphospholipid antibodies an essential requirement for an effective immune response to infections? *Ann N Y Acad Sc* 2007; 1108:578-583.
- **Vora S, Shetty S, Ghosh K.** Thrombophilic dimension of recurrent fetal loss in Indian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008;19:581-584.
- **Walker LSK, Abbas AK.** The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Imm* 2002; 2:11-19.
- **Wang SX, Sun YT, Sui SF.** Membrane-induced conformational change in human apolipoprotein H. *Biochem J* 2000; 348:103-106.
- **Wassermann A, Neisser A, Bruck C.** Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. *Deutsche Med Wochenschr* 1906; 32:745-746.
- **Watanabe T, Onda H.** Henoch-Schönlein purpura with antiphospholipid antibodies following an influenza vaccination. *Pediatr Nephrol* 2001; 16:458-459.
- **Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S.** Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356:314-317.
- **Weber M, Knoefler I, Schleussner E, Markert UR, Fitzgerald JS.** HTR8/SVneo Cells Display Trophoblast Progenitor Cell-Like Characteristics Indicative of Self-Renewal, Repopulation Activity, and Expression of "Stemness-" Associated Transcription Factors. *Biomed Res Int* 2013; 2013:243649.
- **Willis R, Pierangeli S.** Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Highlights* 2011; 2:35-52.
- **Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, et al.** 'International Consensus Statement on Preliminary Classification Criteria for Definite Antiphospholipid Syndrome.', *Arthritis Rheum* 1999;. 42:1309-1311.
- **Wilson WA.** Ethnicity and APS. *J Autoimmun* 2000; 15:153-155.
- **Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, Liang YR, Hong HC, Chiang WF, et al.** Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 2009; 7:311-318.

- **Wucherpfennig KW, Strominger JL.** Molecular mimicry in T cell mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80:695-705.
- **Xiao Z, Shanguan D, Cao Z, Fang X, Tan W.** Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. *Chemistry* 2008; 14:1769-1775.
- **Xu G, Guimond MJ, Chakraborty C, Lala PK.** Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidual product. *Biol of Reprod* 2002; 67:681–689.
- **Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y, Luo S, Zhuang L.** Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during first trimester. *Biol Reprod* 2001; 65:240-246.
- **Yanase K, Smith RM, Puccetti A, Jarett L, Madaio MP.** Receptor mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1. *J Clin Invest* 1997; 100:25-31.
- **Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Kobayashi K, Inagaki J, et al.** Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* 2004; 103:3766-3772.
- **Yoshikawa M, Mukai Y, Okada Y, Tsumori Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Aird WC, et al.** Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. *Blood* 2013; 121:2804-2813.
- **Yudate T, Isaka K, Kosugi Y, Koshiishi M, Shiraishi K, Hosaka M, Takayama M.** Analysis of the mechanism of trophoblast infiltration. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1996; 48:191-198.
- **Yuki N.** Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52:99-105.
- **Zack DJ, Stempniak M, Wong AL, Taylor C, Weisbart RH.** Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. *J Immunol* 1996; 157:2082.
- **Zhang J, McCrae KR.** Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood* 2005; 105:1964-1969.
- **Zhou Y, Fisger S, Janatpour M, Gentbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky C.** Human cytotrophoblast adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997; 99:2139-2151.

- **Ziporen L, Blank M, Shoenfeld Y.** Animal models for antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23:99-117.
- **Živković I, Stojanović M, Petrušić V, Inić-Kanada A, Dimitrijević L.** Induction of APS after TTd hyper-immunization has a different outcome in BALB/c and C57BL/6 mice. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65: 492-502.
- **Živković I, Petrušić V, Stojanović M, Inić-Kanada A, Stojićević I, Dimitrijević L.** Induction of decreased fecundity by tetanus toxoid hyper-immunization in C57BL/6 mice depends on the applied adjuvant. *Innate Immun* 2012; 18:333-342.

# **PRILOG**

## BIOGRAFIJA

Tamara Kovačević je rođena 02.10.1982. godine u Pljevljima, Crna Gora. Diplomirala je 2007. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, sa prosečnom ocenom 9,29. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, je upisala školske 2007/2008 godine. U periodu 2008.-2009. godine je bila stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od novembra 2009. je zaposlena u Institutu za primenu nuklearne energije- INEP Univerziteta u Beogradu.

Od 2009. do 2010. je bila angažovana na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije “Ćelijske interakcije i molekularni mehanizmi u diferencijaciji ćelija u implantaciji embriona i placentaciji”. Trenutno je uključena u projekat Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije “Trofoblast i ekstraembrionalne fetalne ćelije: plastičnost, faktori diferencijacije i *in vitro* modulacija funkcionalnih svojstava”. Eksperimentalni deo doktorske disertacije je uradila u Odeljenju za biologiju reprodukcije pod mentorstvom dr Ljiljane Vićovac Panić, naučnog savetnika INEP-a.

Do sada je objavila 3 naučna rada u časopisima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Тамара М. Ковачевић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ ИО 070004 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Утицај имуноглобулина са специфичношћу значајном за \_\_\_\_\_  
антифосфолипидни синдром на експресију карактеристичних протеина и  
инвазивност екстравилусног трофобласта човека *in vitro*”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2013.

Kovačević Tamara

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара М. Ковачевић  
Број индекса ИО070004  
Студијски програм Молекуларна биологија  
Наслов рада “Утицај имуноглобулина са специфичношћу значајном за  
антифосфолипидни синдром на експресију карактеристичних  
протеина и инвазивност екстравилусног трофобласта човека  
*in vitro*”  
Ментор др Љиљана Вићовац Панић, научни саветник Института за  
примену нуклеарне енергије-ИНЕП Универзитета у Београду  
др Милена Катарановски, редовни професор Биолошког  
Факултета Универзитета у Београду  
Потписани/а Тамара М. Ковачевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 23.05.2013.

Потпис докторанда

Kovacic Tamar



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Утицај имуноглобулина са специфичношћу значајном за антифосфолипидни синдром на експресију карактеристичних протеина и инвазивност екстравилусног трофобласта човека *in vitro*”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23.05.2013.

Kovačević T. T.