

## Авторска справка за приносния характер на трудовете

Приносите описани от автора са признати от научната общност чрез публикуването им в реномирани peer-reviewed списания и множество цитати.

### **А. Приноси с научно-фундаментален характер:**

#### **- в областта на имунологията на бременността**

Бременността е имунологичен феномен заради съжителството на два генетично различни субекта - фетуса и майката. Въпросът как семиалогенния фетус преживява и се развива в майчината утроба без да бъде провокиран отговор на отхвърляне интригува имунолозите от много дълго време и все още е без отговор. Смята се, че уникалната композиция на тъканно-базираните майчини имунни клетки, количествената динамика и профил на разпределение в ендометриалните структури по време на имплантацията и ранната бременност са от ключово значение за разпознаване на бременността и нормалното протичане на имплантацията.

Серия от наши проучвания представи цялостна картина на количествената динамика и специфичната локализация на основните популации имунни клетки в ендометриума в трите фази (пре-контактна, контактна и пост-контактна) на адецидуалната, повърхностна имплантация при епителнохориален тип плацента като е изследван директният ефект на концептуса чрез сравнителен анализ в плацентарните и интерплацентарните региони (Dimova T. et al 2007, 2008).

- Дори и неинвазивна, повърхностната имплантация /модел свине/ има силен ефект върху количеството и разпределението на ендометриалните Т- и НК-клетъчни популации, докато не се установяват значителни количествени промени в техните периферни аналози. На базата на задълбочен сравнителен анализ е предложен модел за фазово-зависима миграция и преразпределение на ендометриалните левкоцити *in situ* с напредване на повърхностната адецидуалната имплантация: Т лимфоцити в посока от жлезния слой и граничната зона ендометриум-миометриум към субепителната проприя в непосредствен контакт с плацентата. В лимфоцити, НК (CD16+) клетки и моноцити /макрофаги в обратна посока от субепителната проприя дълбоко към жлезната част на ендометриума, далече от мястото на контакт с фетуса.
- По време на повърхностната имплантация преобладават Т лимфоцитите като Тс и Th субпопулациите показват зависими от фазите на имплантацията количествени промени, доминирайки в критичната фаза на имплантацията - контакта на трофектодерма с ендометриалния епител. В лимфоцитите са в относително малко количество в ендометриума при адецидуалната имплантация. Плътноста им е най-висока в пред-имплантационния стадий и с напредване на имплантацията В лимфоцитите мигрират от субепителната проприя дълбоко към жлезната част на ендометриума.
- Публикувани са оригинални данни за наличието на Т-клетъчни кълъстери (ТКК) в

ендометриалните структури по време на неинвазивната имплантация подобно на инвазивната имплантация /човек/ като е показано, че фенотипът и локализацията на ТКК зависят от фазите на имплантация: в пре-рецептивната фаза ТКК съдържат активирани Т клетки и са разположени около кръвоносните съдове, дълбоко в жлезната строма и на границата ендометриум-миометриум. С напредване на имплантацията ТКК се локализират повърхностно, в субепителната строма, тясно свързана с алантохориона на фетуса. ТКК се възприемат като възможни локуси за Т клетъчна диференциация и/или модулиране на майчиния имуен отговор.

- Повърхностната имплантация индуцира намаляване на количествата на CD16+, CD56+ и CD3-CD8+ NK-клетъчни субпопулации и специфичен профил на разпределение на класическите NK клетки в ендометриума – акумулиране в субепителната проприя в пре-рецептивната фаза на имплантацията и релокализиране дълбоко в жлезния слой на ендометриума, далече от прикрепения алантохорион с напредване на имплантацията. Основната NK-клетъчна популация е тази на класическите NK (CD16+) лимфоцити, докато CD56+ NK клетки са в относително малко количество. За първи път са публикувани данни за *in situ* локализацията и динамиката на класическите CD16+ NK клетки по време на повърхностната имплантация. Нови са и данните за количествената динамика на уNK клетки (CD56+), CD3-CD8+ NK клетки и  $\gamma\delta$  Т клетките по време на имплантацията и ранната бременност при епителнохориален тип плацента.
- Клетките на вродената имунна система – еозинофили и моноцити/макрофаги - доминират количествено в пред-имплантационния стадий. Еозинофилите агрегират в големи групи, локализирани субепително - предпоставка за силен и локализиран ефект на активните субстанции, отделяни при тяхната дегрануация. Моноцити/макрофагите преобладават в субепителната проприя в пред-имплантационния стадий, но със започване на имплантацията мигрират от субепителния към жлезния слой на ендометриума, както и в интер-плацентарните региони. Смятаме, че привличането на възпалителни клетки в ендометриума е свързано с процеса на оплождане, а плътността им в субепителната строма в пре-контактната фаза на имплантацията е повлияна от ембрионалните естрогени, отделяни локално.

Издигнати са редица хипотези в опит да се обяснят парадоксалните имунни механизми на майчино-феталната граница, отговорни за поддържането на бременността и установяването на толерогенна за семиалогенния фетус среда – особен профил на HLA експресията от трофобласта, който не провокира имуен отговор от страна на майчината имунна система, масирано присъствие на специфичните утеринни NK (уNK) клетки, имуностимулация и превключване към Th2 отговори, локална имуносупресия и/или имуномодулация чрез цитокини, достъпни на майчино-феталната повърхност. Системната имуносупресия се разглежда в светлината на имуносупресивната активност на хормона на бременността – прогестерона, а локалната – в акумулирането на естествени Т регулаторни клетки и/или генерирането на индуцирани Т регулаторни клетки. Съвместните изследвания с групата на prof. L.Mincheva -Nilsson (Dept of Clinical Immunology, Medical Faculty, Umea University, Sweden) ни даде възможност да проследим наличието на децидуално-базирани естествени Т регулаторни клетки при силно инвазивната интерстициална имплантация при жената (Dimova T. et al. 2011). До този момент повечето

публикувани проучвания бяха съсредоточени основно при миши модел. Нашите приноси са:

- За първи път е демонстрирана *in situ* локализацията и разпределението на CD4+ Foxp3+ Т регулаторни клетки в децидуата по време на ранна бременност при жената.
- Установени са три Foxp3+ клетъчни популации - CD4+ CD25++ Foxp3+, CD4+ CD25+ Foxp3+, и CD4+ CD25- Foxp3+, като и трите са достоверно увеличени локално в децидуата. За разлика от ситуацията на майчино-феталната граница, количеството на периферните Т регулаторни клетки при бременни жени не се различава от това при небременни.
- Децидуалните Foxp3+ клетки експресират повърхностните молекули CD45RO, CTLA-4, CD103, Neuropilin-1, LAG-3, CD62L в съответствие с Th3 регулаторния им фенотип. Освен това от всички тествани цитокини IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF и TGF $\beta$ 1 те експресират единствено TGF $\beta$ 1, което потвърждава Th3 профила им.
- За първи път е описана клетъчната популация CD4+ CD25- Foxp3+ в децидуата по време на ранна бременност. Тази популация е увеличена 10 пъти в децидуата в сравнение с периферната кръв на бременните жени при сравнение на paired samples децидуа и кръв от една и съща жена. Цитокиновият ѝ профил е Th3 подобно на децидуалните Т регулаторни клетки CD4+CD25++ Foxp3+. Нашето предположение е, че CD4+ CD25- Foxp3+ клетките биха могли да се възприемат като резервоар от „наивни“ Foxp3+ Т регулаторни клетки в децидуата, които при нужда бързо биха могли да се превърнат в класически Т регулаторни клетки.

#### - в областта на феталната и неонаталната имунология

В действителност обаче майчината имунологична история по време на бременността се преплита с имунологичната история на фетуса, който развива своя собствена мрежа от имунни клетки и цитокини, включващи се във фетален имуен отговор. Фетусът има уникална способност да детерминира собственото си оцеляване, да бъде толерантен към майчините антигени и да развива активен имуен отговор срещу различни патогени. По време на имплантацията ембрионът сигнализира за присъствието си в матката и трябва да бъде разпознат от майчината имунна система вместо да я избегне. Трофобластът е антигенен, активира майчината имунна система с особен HLA профил (експресия на неklasически MHC клас Ib молекули HLA-G и -E, ниски нива HLA-C) и се имплантира и развива в среда със специфична композиция на децидуално-базираните майчини имунни клетки (преобладават уNK клетките), но в крайна сметка феталната и майчината имунна системи установяват реципрочна толерантност за да осигурят успешна бременност. Дълго време феталната имунна система се възприемаше като незряла, инертна, неспособна да изгради и развие имуен отговор. Смяташе се, че фетусът се развива в стерилна среда, което не налага нуждата от зряла имунна система и такава се оформя и развива едва постнатално при срещата на организма с антигени на околната среда. Доказано е обаче, че

неонаталните TLR стимулирани DC са в състояние да продуцират IL-23, което е белег за това, че неонаталната имунна система съвсем не е толкова недоразвита. Работата ми като пост док в групата на Dr D. Vermijlen (Institute for Medical Immunology, ULB, Belgium) бе фокусирана в областта на  $\gamma\delta$  Т клетъчния имуен отговор при новородени бебета. Въпреки огромния си потенциал за разнообразие (над  $10^{15}$  теоретично възможни TCR специфичности), репертоарът на  $\gamma\delta$  Т клетките при човека е доминиран от специфичен субсет V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, експресиращ TCR с  $\gamma$  верига със CDR3 9 и  $\delta$  верига със CDR3 2, който субсет е доказано, че реагира на набор от малки по размер молекули (фосфоантигени), отделяни от редица патогени и синтезирани ендогенно в малки количества при стрес. Доминирането на този субсет при възрастните организми е в резултат на постнаталното им антиген-специфично намножаване при среща на организма с различни антигени/патогени в околната среда. Ние (Moens et al. 2011) успяхме да покажем, че:

- Непосредствено след раждането V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Т клетките вече са диференцирани и фосфоантиген-реактивни. Специфичното им стимулиране (с фосфоантигени) в комбинация с ко-стимулаторния ефект на IL-23 (продукт на DC) ги превръща в ефекторни клетки, експресиращи набор от цитотоксични медиатори като перфорин, гранзим А и гранулизин.
- Ясно се обособяват два отделни субсета - продуциращи IFN $\gamma$  и продуциращи IL-17. Индукцията на IFN $\gamma$ neg/IL-17pos V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Т клетки е уникално за новородените при човека.

Откритието за бързото постнатално диференциране на  $\gamma\delta$  Т клетките ни провокира да предположим, че тези клетки съзряват функционално пренатално, *in utero*. В последващо задълбочено и всеобхватно проучване върху феталните  $\gamma\delta$  Т клетки ние неочаквано установихме повишено количество  $\gamma\delta$  Т клетки (% и абсолютен брой) в кръвта на човешки фетуси (преди 30-та гестационна седмица) за сметка на V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Т клетъчния субсет, докато останалите  $\gamma\delta$  Т клетъчни субсети са в малки количества. И което беше още по-изненадващо - V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Т клетките имаха фенотип на диференцирани ефекторни клетки, което значи че тези  $\gamma\delta$  Т клетки вероятно изпълняват важна роля в имунната защита на фетуса. Това проучване върху феталните  $\gamma\delta$  Т клетки беше публикувано наскоро в PNAS, IF 9.809, което за нас е много сериозно признание за приносите ни (Dimova T. et al 2015).

- Безспорният принос на това проучване е в това, че са изследвани безценни и трудно достъпни образци от човешки фетуси в средната третина на бременността – кръв и тъкани.
- За първи път е установена експанзията на V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  Т клетки във кръвта на фетуси в средната третина на бременността. Феталните V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Т клетки са фосфоантиген-реактивни ефектори с Th1 цитокинов профил.
- Феталните V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Т клетки показват силно рестриктиран репертоар на CDR3 $\gamma$ 9 веригата и доминиране на инвариантна (канонична) V $\gamma$ 9-J $\gamma$ P секвенция CALWEVQELGKKIKVF, която е същата, която преобладава при възрастните организми и за която се смята, че доминира във феталния черен дроб, а не в тимуса.

- На базата на значително количество и специфични маркери, проследени на протеиново, mRNA и генно нива дефинирахме ефекторните функции на феталните V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T клетки и показахме, че те са функционално пре-програмирани да секретират IFN $\gamma$ , експресират Th1/IFN- $\gamma$ -транскрипционни фактори като T-bet, eomes, Runx3, IL-18RAP, NURR1, TWIST1 и др.), слабо секретират IL-2, експресират гранзими A и K, проинфламаторни хемокини и показват свойства на лесно активирани innate-like T клетки (PLZF, NKR-P1A, NKG2D, NKp30, S1PR5 и др).
- Gene-Expression профила и фенотипната характеристика на V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T клетките показаха недвусмислено, че в тази ранна фаза на ембрионалното развитие те вече са диференцирани за разлика от техните конвенционални  $\alpha\beta$  T аналози.

Тази находка показва, че въпреки развитието в стерилна среда имунната система на човешкия фетус е генерирала патоген-реактивни  $\gamma\delta$  T клетки *in utero* доста рано преди постнаталната среща с антигени/патогени на околната среда. Това поставя въпроса за вероятното намножаване на тези ефекторни клетки в резултат на ендегенна фетална селекция рано в ембрионалното развитие. Това е важен принос на проучването до известна степен в противовес на широко разпространеното мнение, че доминирането на фосфоантиген-реактивните ефектори V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T е типично за възрастния организъм. Това изследване добавя ново измерение към биологията на тези клетки и е много релевантно за времето, в което се натрупват все повече доказателства за това, че профилът на имунната система се оформя не само от срещата с инфекции и чуждомолекулни комплекси, но и от продукти на ендегенен стрес. В резултат на това, данните са уникални. Ще си позволя да цитирам имейла, изпратен от редакцията на PNAS, с който статията е избрана да бъде анонсирана като особено интересна. Смятам, че това е очевидно доказателство за приносът на проучването ни:

„Dear Dr. Vermijlen,

Your article submitted for publication in PNAS has been selected for mention in a front section of the print journal called “In This Issue.” The “In This Issue” section highlights particularly interesting articles published in that given print issue of PNAS.”

Questions regarding embargoes, embargo dates, and publication dates may be directed to [PNASnews@nas.edu](mailto:PNASnews@nas.edu).

Thank you,

Paul Gabrielsen

Science Writer

Proceedings of the National Academy of Sciences

#### - в областта на морфологията

= ремоделиране на адреналната жлеза по време на пубертета и бременността (Dimitrov R. et al 1998, Dimova T. et al. 2003, 2004, 2005)

По време на бременността протичат важни промени във функцията на майчините адренални жлези които включват значително увеличаване на кортизоловата секреция и трафик на C19 прекурсори от адреналните жлези на фетуса и майката за осигуряване на повишената плацентарна естрогеногенеза. Проследено е как увеличената адренална стероидогенеза по време на пубертета и бременността повлияват морфологията на адреналните жлези. Нашето проучване доказва морфологичната адаптация на адреналните жлези към ендокринните изисквания по време на сексуалното съзряване и бременността, което се осъществява чрез специфично хистологично ремоделиране на фасцикуларната и ретикуларната корови зони на адреналните жлези с признаци на активирана капсуларна и съдова бластема и формиране на микроаденоми с активното участие на екстрацелуларните протеини колаген тип IV и ламинин и интегрините  $\beta 3$  и  $\alpha v$ .

= морфогенеза на *os penis* (Dimova T. et al. 1999, Dimitrov D. et al 2000).

Изследвано е залагането и развитието на пенисната кост при червената лисица по време на ембрионалното и постнаталното развитие. Доказано е, че прекурсорът на *os penis* е анатомично обособен на 21 ден от ембрионалното развитие. На 7-мия месец от постнаталното развитие (пубертет) хрущялната тъкан е тотално заменена с костна и *os penis* е ламеларна кост с дефинирана костномозъчна празнина, изпълнена с костен мозък. Костта завършва морфогенезата си до 3-та година от постнаталното развитие.

#### **Б. Приноси с методичен характер:**

- Разработен е неензимен метод за изолиране на моонуклеарни клетки от ендометриум на свиня на базата на механично дезинтегриране на ендометриалната тъкан и последващо градиентно сепариране. Този метод осигурява относително добър добив на моонуклеарни клетки със запазени повърхностни рецептори, подходящи за флоуцитометричен анализ.
- Извършен е анализ за приложимостта на шест различни фиксатора (формалин, цинков фиксатор, фиксатор на Carnoy, фиксатор на Bouin, фиксатор на Zenker и NOPE) за визуализиране на CD маркери и използването им в имунохистохимичните процедури при тъкани, включени в парафин.
- Разработен е и е оптимизиран метод за изолиране на вилозни човешки трофобласти базиран на меко ензимно третиране, перкол градиентно центрофугиране и допълнително магнитно-базирано пречистване. Този метод за изолация е прост и ефективен, дава висок добив от вилозни трофобластни клетки с висока чистота и жизнестойност и отлична морфология, преценена флоуцитометрично и електронномикроскопски. Този протокол осигурява трофобластни клетки за фенотипни, ултраструктурни, молекулярни и функционални анализи за получаване на първични култури (Stenqvist et al 2011).