



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО „АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“

Секция „Репродуктивни ОМИКс технологии“

Румяна Иванова Сусуркова

***ОПРЕДЕЛЯНЕ РОЛЯТА НА Т КЛЕТЪЧНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ
МЕХАНИЗМИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА НОРМАЛНА БРЕМЕННОСТ
ПРИ ЧОВЕК***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“

Научна специалност „Имунология“

шифър 01.06.23

Научен ръководител

Доц. Д-р Велислава Терзиева, дм

СОФИЯ, 2023

Дисертационният труд е онагледен с **23** фигури, **3** таблици и **1** приложение. Библиографията обхваща **229** литературни източници, всички на английски език.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на.....2023г. от.....часа в заседателната зала на ИБИР-БАН, бул. Цариградско шосе №73, София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН, пред **Научно жури в състав:**

Членове:

Проф. д-р Сорен Хайрабедян, дбн

Проф. д-р Виктория Сарафян, д.м, дмн

Проф. д-р Димитрина Димитрова-Диканарова, д.м

Доц. д-р Румен Русев, д.м.

Доц. д-р Велислава Терзиева, д.м.

Резервни членове:

Проф. Красимира Тодорова, дб, дбн

Доц. д-р Анастас Пашов, д.м.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, бул Цариградско шосе №73, София, както и на интернет страницата на ИБИР.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответсват на номерата в дисертационния труд.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО „АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“

Секция „Репродуктивни ОМИКс технологии“

Румяна Иванова Сусуркова

***ОПРЕДЕЛЯНЕ РОЛЯТА НА Т КЛЕТЪЧНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ
МЕХАНИЗМИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА НОРМАЛНА БРЕМЕННОСТ
ПРИ ЧОВЕК***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“

Научна специалност „Имунология“

шифър 01.06.23

Научен ръководител

Доц. Д-р Велислава Терзиева, дм

СОФИЯ, 2023

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Увод.....	5
2. Цел и задачи.....	6
3. Материали и методи.....	7
4. Резултати и обсъждане.....	9
5. Изводи.....	25
6. Приноси на дисертационния труд.....	25
7. Списък на научните статии свързани с дисертационния труд.....	26
8. Списък с участия на научни форуми във връзка с дисертацията.....	26

СЪКРАЩЕНИЯ

Използвани съкращения на английски:

CD Cluster of differentiation - Клъстер на диференциация

ERK1/2 Extracellular signal-regulated kinases –
Екстрацелуларни сигнал-регулаторни кинази

FOXP3 Forkhead box Protein 3 –
Транскрипционен фактор

HLA-DR Human leukocyte antigen DR –
Човешки левкоцитен антиген DR

IL-2 Interleukin 2 - Интерлевкин 2

iTregs Inducible Regulatory T cells -
Индуцирани регулаторни Т-клетки

MAPKs MAP kinase-interacting
serine/threonine-protein kinases

nTregs Naturally occurring Tregs - Естествени
регулаторни Т-клетки

RPL Recurrent pregnancy loss-Повтаряща се
загуба на бременност

STAT Signal transducer and activator of
transcription

TCR T-cell receptor - Т-клетъчен рецептор

Tregs Regulatory T cells - Регулаторни Т-
клетки

WHO World Health Organization - Световна
здравна организация

Използвани съкращения на български:

АРТ Асистирани репродуктивни технологии

НЦОЗА Националният център по
обществено здраве и анализи

ПМНК периферни мононуклеарни клетки.

1. УВОД

По данни на Световната здравна организация (WHO, 2022) всяка осма двойка или около 15% от населението в световен мащаб има трудности със зачеването. Официалните данни за България сочат, че двойките страдащи от безплодие са над 145 000 хил. (фондация „Искам бебе“). Независимо от прогреса на Асистираните репродуктивни технологии (АРТ), основната причина за неуспех не се установява (идиопатичен стерилитет) при около 20% от двойките. Неизяснена остава и етиологията на около 40% от случаите на повтарящи се ранни загуби на плода (преди 12 г.с.). Статистиката на Националния център по общественото здраве и анализи (НЦОЗА) за 2022г. показва, че в България са направени общо 18 821 аборта, от които 5 438 спонтанни.

Множество проучвания показват съществената роля на регулаторните Т-клетки (Tregs) още в най-ранните етапи на бременността. Те са изключително важни за контрола на имунния отговор и поддържането на толерогенно състояние в организма на майката. Някои репродуктивни неуспехи са свързани с намален брой и/или функция на Tregs. При редица автоимунни и туморни заболявания се откриват запазени нива на FOXP3⁺Tregs, но със слаба експресия CD25.

Настоящото проучване е насочено към определяне ролята на активационния потенциал на Tregs за постигане на имунологична толерантност, чрез фенотипна характеристика на периферните Tregs, анализ на експресията на активационни молекули и на свързаните с тях сигнални пътища, при жени с репродуктивни неуспехи. Това обуславя не само фундаменталния характер на настоящата работа, но предлага и клиничен аспект в областта на репродуктивната имунология. Надяваме се, получените данни да допринесат за по-доброто разбиране процесите на успешна репродукция при човек от имунологична гледна точка. Постигането на нови знания ще прецизира своевременното диагностициране на двойките и ще допринесе за подобряване на демографската криза в страната.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи експресията на характерната молекула CD25 и на активационния маркер HLA-DR върху FOXP3⁺ регулаторни CD4⁺T клетки, и на свързаните с тях основни транскрипционни фактори и елементи на вътреклетъчната сигнализация (pSTAT5a и ERK1/2), при жени с репродуктивни неуспехи.

Задачи

За изпълнение на поставената цел, бяха определени следните задачи:

Задача 1: Фенотипно характеризиране на субпопулациите регулаторни и не-регулаторни Т-клетки в периферна кръв на раждали жени и такива с репродуктивни неуспехи.

Задача 2: Сравнителен анализ на повърхностната експресия на HLA-DR в CD25 положителните и CD25 отрицателните FOXP3⁺Treg и nTreg субпопулации между контроли и пациенти.

Задача 3: Сравнителен анализ на вътреклетъчната експресия на pSTAT5a и ERK1/2 молекулите в CD25 положителните и CD25 отрицателните FOXP3⁺Treg и nTreg субпопулации между контроли и пациенти.

Задача 4: Проследяване динамиката на HLA-DR, pSTAT5a и ERK1/2 молекули в условия на *in vitro* стимулация с IL-2 при CD25 положителните и CD25 отрицателните Tregs.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани лица

В проучването бяха включени 108 жени в репродуктивна възраст. Контролната група (n=54) обхващаше клинично здрави, раждали жени без аборт пожелание или по медицински причини, на възраст 23-39 г. Изследването е проведено минимум 2 години от последното им раждане. Жените в групата на пациентите (n=54), на възраст 25-40 г. бяха подбрани на база репродуктивни неуспехи по неизяснена причина, изразяващи се в спонтанни аборти (n=16), повтарящи се имплантационни неуспехи (n=23), при повече от един неуспешен ембриотрансфер или неизяснен стерилитет (n=15). От всички доброволци беше взета периферна кръв, след подписване на информирано съгласие. Проучването е извършено съобразно Декларацията от Хелзинки (1964 г) и в съответствие с Хартата на основните човешки права на ЕС7. Лица с хронични възпалителни или автоимунни отклонения не бяха включвани. Изследванията бяха проведени в Институт по Биология и Имунология на Размножаването (ИБИР) към БАН, в колаборация с МЦ РепроБиоМед, НСБАЛХЗ - Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София и МУ Грац, Австрия.

Методи

1. Получаване на клетъчни популации:

1. Изолиране на периферни мононуклеарни клетки (ПМНК).
2. Магнитно сепариране на наивни nCD4-Тлимфоцити.
3. Fluorescent Activated Cell Sorting на CD25⁺ и CD25⁻nTregs.

2. Клетъчно култивиране:

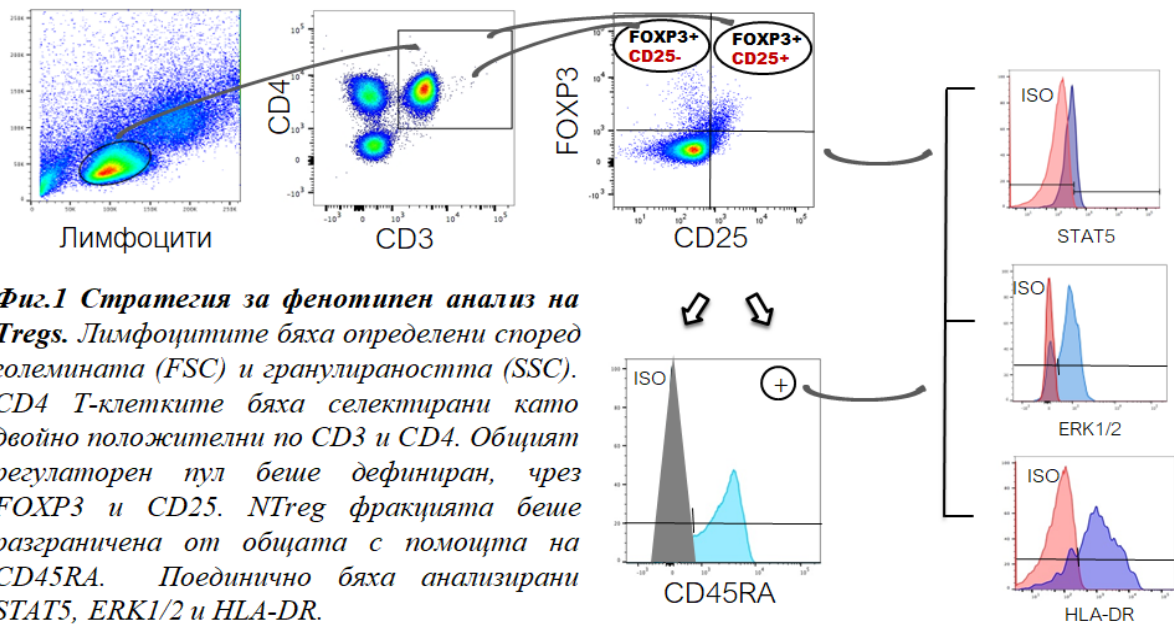
- 2.1. *In vitro* стимулация на ПМНК в присъствието на IL-2 в средата и Т-клетъчен активационен модел, чрез магнитни анти-CD3/CD28 бидчета, за симултанно изследване на pSTAT5 и HLA-DR.

- 2.2. *In vitro* стимулация на сортирани CD25^{hi}Tregs в присъствието на IL-2 в средата и Т-клетъчен активационен модел, чрез магнитни анти-CD3/CD28 бидчета за проучване динамината на ERK1/2.
3. Проточна цитометрия (Flow Cytometry)
 - 3.1. Интрацелуларно маркиране с моноклонални антитела - Анти-FOXP3 (PE/FITC), Анти-pSTAT5 (Y694) (PE), Анти-ERK1/2 (T202/Y204) (APC).
 - 3.2. Екстрацелуларно маркиране с моноклонални антитела - Анти-CD3 (HV450), Анти-CD4 (eFluor506), Анти-CD25 (Pacific blue/ PeCy7) Анти-CD45RA (eFluor 450/ PerCP), Анти-CD127 (FITC), HLA-DR (APC).
4. Подготовка на ПМНК по PrimeFlow (eBioscienceTM) метода, за отчитане на генна експресия посредством флоуцитометрия:
 - 4.1. Маркиране с моноклонални антитела: Анти-CD3 (HV450), Анти-CD4 (eFluor506), Анти-CD25 (PeCy7), Анти-FOXP3 (PE).
 - 4.2. Пермеабилзация и фиксация.
 - 4.3. Хибридизация.
 - 4.4. Амплификация и детекция на сигнала (Сонда: Анти-ERK1/2 Alexa Fluor 488).
5. Конфокална микроскопия (Immunofluorescence) на сортирани CD25^{hi}Treg клетки: *Alexa594* (ERK1/2), ядро (Hoechst dye).
6. Методи за обработка на данни:
 - 6.1. Флоуцитометричен анализ - Flow Jo V10 Software (Treestar).
 - 6.2. Статистическа обработка - GraphPad Prism v. 7 (GraphPad Software Inc).

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

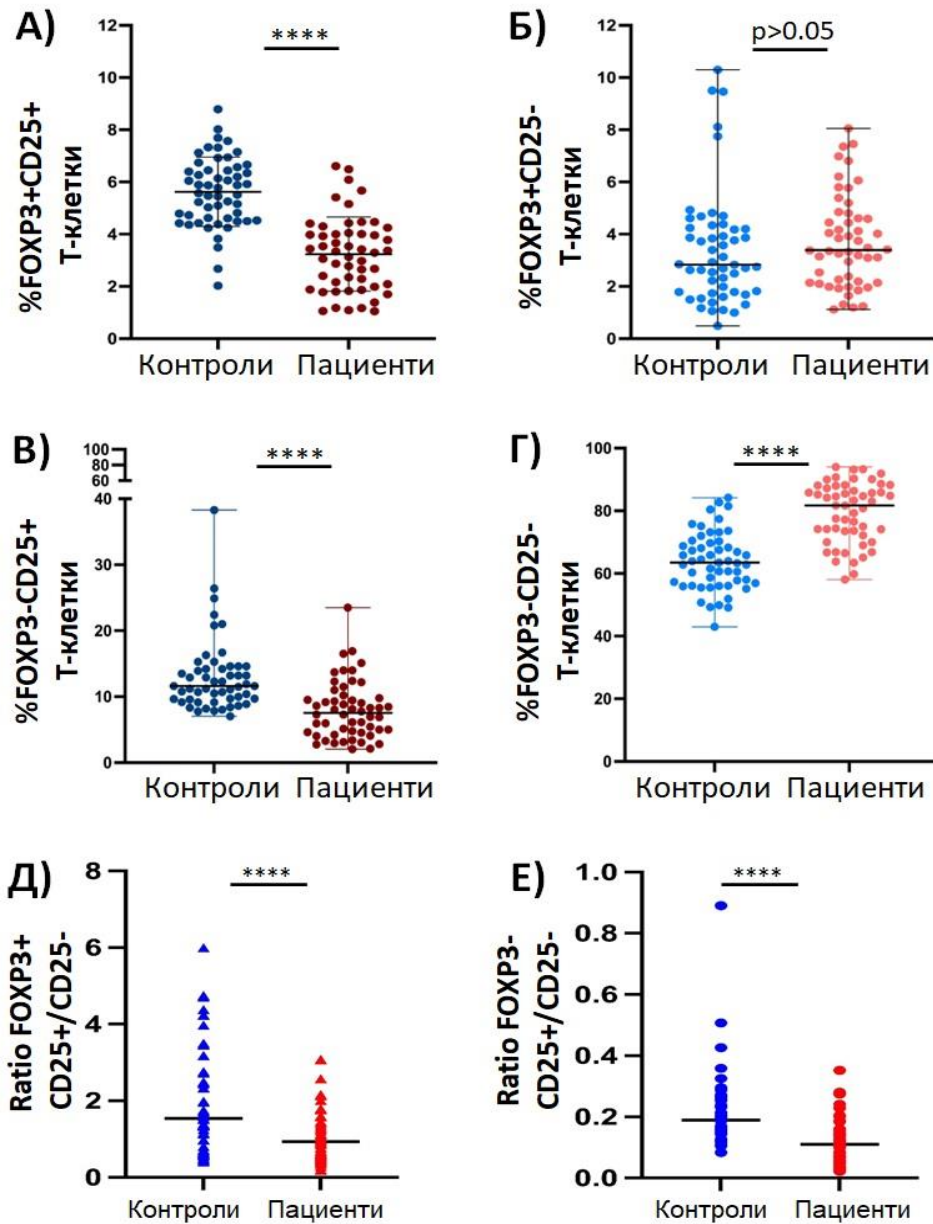
ФЕНОТИПНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА РЕГУЛАТОРНИ Т-КЛЕТКИ

Фенотипната характеристика на Tregs беше направена чрез многоцветна проточна цитометрия. Тъй като Tregs са част от Т-хелперните лимфоцити, първо определихме **CD3⁺CD4⁺** фракцията. Общият пул от Tregs беше идентифициран въз основа експресията на специфичните маркери **CD25** и **FOXP3**. За разграничаване субпопулацията на естествените регулаторни Т-клетки (nTregs) използвахме маркера за наивни клетки **CD45RA**. В така определените общи и естествени Tregs бяха анализирани молекули, свързани с функционирането им: повърхностният активационен маркер **HLA-DR** и две сигнални молекули **STAT5a** и **ERK1/2** (Фиг.1). Използваната комбинация даде възможност едновременно да бъде проследено сигналното предаване (STAT5a, ERK1/2) и повърхностна експресия на активационни маркери (CD25 и HLA-DR) с цел търсене на възможни нарушения в сигналната трансдукция в общия Treg пул, и в частност при nTregs, при жени с репродуктивни неуспехи. Контролна група от раждали жени бе използвана за сравнение.



АНАЛИЗ НА РЕГУЛАТОРНИТЕ (FOXP3⁺CD25^{+/-}) И НЕ-РЕГУЛАТОРНИ (FOXP3⁻CD25^{+/-}) СУБПОПУЛАЦИИ Т-КЛЕТКИ ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ

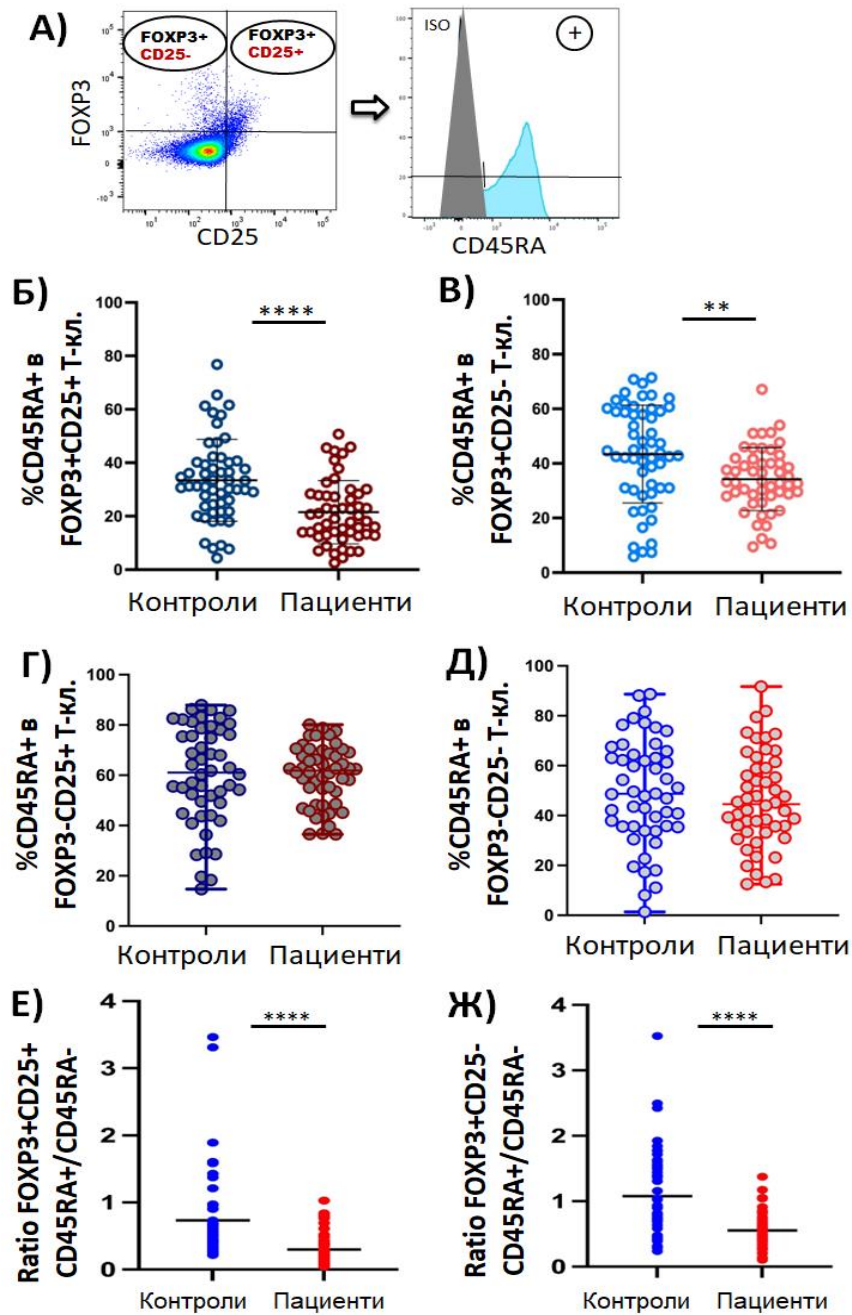
Регулаторните Т-клетки участват в редица имунологични процеси при човека: развитие и поддържане на имунологична толерантност, имунна хомеостаза, а особен интерес поражда значението им за патогенезата на различни заболявания (Paust & Cantor, 2005) (Qian et al., 2018). Намаленият процент и нарушената функционалност на Tregs се свързват с репродуктивни неуспехи и усложнения при бременност (Somerset et al., 2004) (Munoz-Suano et al., 2011). По литературни данни, регулаторните Т-клетки (FOXP3⁺CD25⁺) представляват малка част (5%-10%) от CD4⁺Т лимфоцитите (Zou WP, 2006). Анализите при 108 жени (пациентки n=54, контроли n=54) показват значително по-малък процент общи регулаторни Т-клетки (**25⁺Tregs**) при пациентките отколкото при контроли [ср.ст. (обхват): Пациенти 3.23% (1.05-6.61), Контроли 5.62% (2.03-8.79), $p=0.0001$], (**Фиг. 2А**). Въпреки това, двете изследвани групи жени не се различаваха по процента на **25⁺Treg** субпопулациите си [медиана (обхват): Контроли 2.84% (0.49-10.3), Пациенти 3.39% (1.12-8.05), $p>0.05$], (**Фиг. 2Б**). На този фон, във FOXP3 отрицателната субпопулация, отново при контролите, нивата на CD25⁺ **non-Treg** клетки бяха по-високи [медиана (обхват): Контроли 11.6% (7.02-38.30), Пациентки 7.53% (2.05-23.50), $p=0.0001$], (**Фиг. 2В**), докато CD25⁻ клетките преобладаваха при пациентките [медиана (обхват): Пациенти 81.7% (58.1-94.0), Контроли 63.5% (43.0-84.2), $p=0.0001$], (**Фиг. 2Г**). Въз основа на тези данни беше изведено съотношение между 25⁺ и 25⁻ фракциите Tregs и non-Tregs. Получените резултати показват, че както при Tregs [медиана (обхват): Контроли 1.54 (0.4-6), Пациенти 0.93 (0.1-3), $p<0.0001$ (**Фиг. 2Д**)], така и при non-Tregs [медиана (обхват): Контроли 0.19 (0.1-0.89), Пациенти 0.11 (0.03-0.35), $p<0.0001$], (**Фиг. 2Е**), положителните по CD25 клетки са в достоверно по-висока пропорция при контролите, отколкото при пациенти. Тъй като супресорната функция на Tregs е свързана с експресията на CD25, може да се предположи, че намалената/липсваща такава може да има значимо въздействие върху функцията на тези клетки при пациентките с репродуктивни неуспехи. В подкрепа на това предположение са проучвания при спонтанни аборти в първия триместър, прееклампсия или повтаряща се загуба на бременност (RPL), които показват намален брой на CD25⁺FOXP3⁺ регулаторни Т-клетки (Dimova et al., 2011) (Munoz-Suano et al., 2011) (Somerset et al., 2004).



Фиг. 2 Разлики в *T*-регулаторните (*FOXP3*⁺) и не-регулаторни (*FOXP3*⁻) субпопулации при раждали жени и пациентки. По-малък процент *CD25*⁺ *Tregs* (А) и *non-Tregs* (В) при пациентки ($n=54$), в сравнение с контролите ($n=54$). Изследваните групи не се различаваха по *CD25*⁺ *Tregs* (Б), докато *CD25*⁻ *non-Tregs* доминираха при пациентки (Г). Съотношение *Treg* (Д) и *non-Treg* (Е) клетки между изследваните групи лица според *CD25*. На фигури (Б),(В)и(Г) са представени медиани+SD (непараметричен Mann Whitney Test), На фигура (А) ср. ст.+SD (Parametric unpaired t Test). За статистически достоверна разлика бяха приети стойности на $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***); $p < 0.0001$ ****.

ПОНИЖЕНИ ЕСТЕСТВЕНИ РЕГУЛАТОРНИ Т-КЛЕТКИ ПРИ ПАЦИЕНТКИ

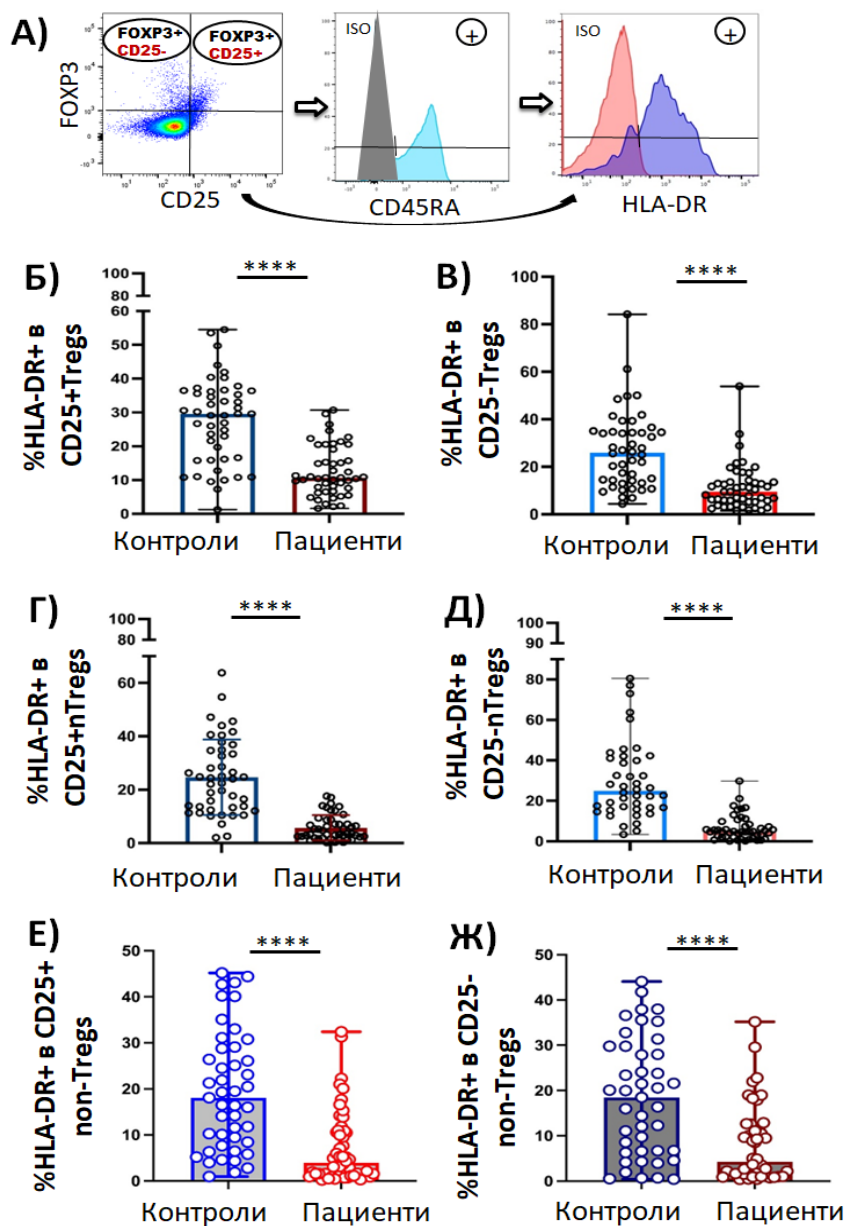
Tregs са хетерогенна популация: естествени nTregs (CD45RA⁺) с тимусен произход и индуцирани iTregs (CD45RA⁻), които се индуцират в периферията под въздействие на различни фактори на средата. Предвид семи-алогенния произход на ембриона се очаква и двете фракции да допринесат за установяването на имунен толеранс. Ето защо, се насочихме към изследване не само на общите, но и на естествените Tregs. Интрапопулационният анализ показва, че при жените с успешна бременност регулаторните Т-клетъчни популации са съставени главно от **CD25⁺nTregs**, в сравнение с пациентките [медиана (обхват): Контроли 31.2% (4.35-76.8), Пациенти 19.65% (2.55-50.7), $p=0.0001$], (**Фиг. 3Б**). По-нисък процент **CD25⁻nTregs** бе наблюдаван в пациентската група [ср.ст. (обхват): 34.22% (9.47-67.1) и 43.42% (5.84-71.4), съотв. за Пациентки и Контроли, $p=0.002$], (**Фиг. 3В**). Направеният анализ на CD25 в FOXP3⁻ негативната фракция не установи разлики между изследваните групи лица [медиана (обхват): Контроли 48.7% (19.5-85.1), Пациенти 44.6% (38.2-82.7), $p>0.05$], (**Фиг. 3Г**) и [медиана (обхват): Контроли 61.1% (4.8-81.9), Пациенти 61.8% (9.1-83.8), $p>0.05$], (**Фиг. 3Д**). Изведеното съотношение показва, че както при CD25⁺ nTregs [медиана (обхват): контроли 0.5 (0.6-3.2), пациенти 0.2 (0.1-1.1), $p<0.0001$ (**Фиг. 3Е**)], така и при CD25⁻ nTregs, CD45RA⁺ субпопулация е в по-висока пропорция при контроли, отколкото при пациенти [медиана (обхват): Контроли 0.85 (0.5-3.4), Пациенти 0.49 (0.3-1.6), $p<0.0001$], (**Фиг. 3Ж**). Предполага се, че CD25⁻ Tregs са или незрели клетки, или имат своята антигенна специфичност, но ре-експресират CD25 при нова среща с антигена (Zelenay et al., 2005). Доказано е, че CD25 се появява рано в процеса на интратимусното развитие (Coquet et al., 2013), при строго регулирани междуклетъчни контакти и наличието на хормонални рецептори (Ladi et al., 2006) (Tibbetts et al., 1999). Следователно образуването на nTregs се подчинява на сложни имуно-ендокринни взаимодействия, които могат да окажат въздействие върху техния фенотипен профил. Това ни даде основание да предположим, че по-ниският процент на CD25 експресиращи nTregs при пациенти е свързан с отклонения по време на тяхното съзряване. Според Inada et al, намаленият процент nTregs може да е свързан с нарушена толерантност в организма на майката (Inada et al., 2015). Авторите на друго проучване, също докладват за понижен процент CD45RA⁺ Tregs при жени, които не са забременели, в сравнение със забременелите след АРТ процедури (Schlossberger et al., 2013).



Фиг. 3 Понижени естествени регулаторни Т-клетки при жени с репродуктивни неуспехи. Фенотипна стратегия на анализа (А). В групата на пациентките (n=52) се откриват по-малко CD45RA⁺ клетки, както в CD25⁺nTregs (Б), така и в CD25⁻nTregs (В), за разлика от контролната група жени (n=54). Изследваните групи не се различават по CD45RA⁺FOXP3⁻CD25⁺ (Г) и CD45RA⁺FOXP3⁻CD25⁻ (Д) популациите си. Съотношение CD25⁺nTregs (Е) и CD25⁻nTregs (Ж) според CD45RA. p<0.05(*); p<0.01(**); p<0.001(***); p<0.0001****.

ИЗСЛЕДВАНЕ ЕКСПРЕСИЯТА НА АКТИВАЦИОННИЯ МАРКЕР HLA-DR

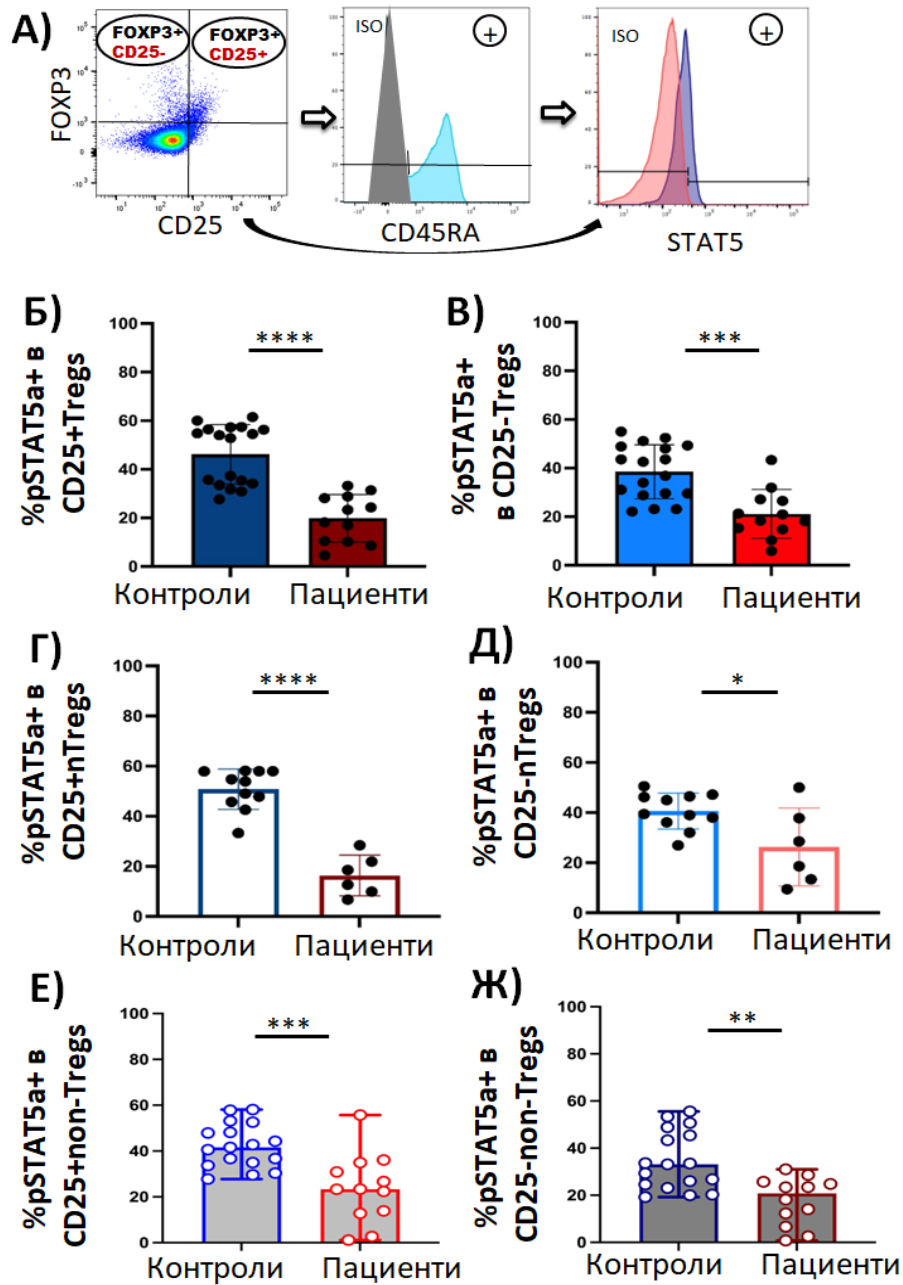
Тъй като CD25 освен присъщ за Tregs, е и активационен маркер, се насочихме към проверка на още една молекула със сходно значение - HLA-DR. Основание за това ни дадоха няколко проучвания, които доказват, че експресията на HLA-DR корелира със способността на регулаторни Т-клетки да упражняват своята супресивна активност (Schaier et al., 2013). Получените резултати показаха, че в контролната група (n=47) процентът на HLA-DR експресиращите Tregs е по-висок и в положителната, и в отрицателната по CD25 субпопулация [%HLA-DR⁺CD25⁺Treg медиана (обхват): Пациенти 10.7% (1.62-30.7), Контроли 29.6% (1.26-54.05), $p=0.0001$], (Фиг. 4Б), [%HLA-DR⁺CD25⁻Tregs медиана (обхват) Пациенти 9.53% (1.51-53.9), Контроли 25.95% (4.43-84.2), $p=0.0001$], (Фиг. 4В). В популацията от естествени регулаторни Т-клетки бяха наблюдавани сходни резултати: жените с успешна бременност се отличаваха с по-висок процент на активирани HLA-DR⁺ клетки и в CD25⁺nTreg и в CD25⁻nTreg субпопулациите [ср.ст. (обхват) Контроли 24.64% (2.02-63.08), Пациентки 5.75% (0.23-17.6), $p=0.0001$], (Фиг. 4Г), [%HLA-DR⁺CD25⁻nTregs медиана (обхват): Контроли 24.9% (3.41-80.05), Пациентки 4.84% (0.1-29.8), $p=0.0001$], (Фиг. 4Д). Подобно разпределение намерихме и при нерегулаторните FOXP3⁻ Т-клетки [%HLA-DR⁺CD25⁺non-Tregs медиана (обхват): Контроли 18.1% (2.5-48.2), Пациентки 3.96% (0.1-31.2), $p<0.0001$], (Фиг. 4Е), [%HLA-DR⁺CD25⁻non-Tregs медиана (обхват): Контроли 18.5% (1.4-41.2), Пациентки 4.27% (0.1-35.2), $p<0.0001$], (Фиг. 4Ж). Следователно, разликите между контроли и пациентки не са само по отношение CD25, но засягат и HLA-DR. Възможно е те да имат значимо въздействие върху установяването на така необходимата имунна толерантност при бременност. Основание за това ни дава и изследването на Baecher-Allan, според което HLA-DR експресиращите Treg клетки са функционално обособена популация, която инхибира клетъчната пролиферация и продукция на цитокини. За разлика от тях, HLA-DR отрицателните Treg клетки не притежават такава супресивна активност (Baecher-Allan et al., 2006). Следователно, въз основа на намерените при пациентките фенотипни особености по отношение експресията на CD25 и на HLA-DR, предположихме отклонение във вътреклетъчната сигнализация.



Фиг. 4 Доминиране на HLA-DR⁺ клетки в Tregs, nTregs и non-Tregs при раждали жени. Фенотипна стратегия на анализа (А). В контролната група (n=47), но не и в пациентската (n=47), дот-плот графиките илюстрират по-висок %HLA-DR⁺ клетки в Tregs: CD25⁺Tregs (Б) и CD25⁻Tregs (В), nTregs: CD25⁺nTregs (Г) и CD25⁻nTregs (Д), както и в non-Tregs: CD25⁺nonTregs (Е) и CD25⁻ nonTregs (Ж). На фиг. (Б),(В),(Д),(Е),(Ж) са представени медиани+SD (непараметричен Mann Whitney Test), (Г) ср. ст.+SD (Parametric unpaired t Test). p<0.05(*); p<0.01(**); p<0.001(***); p<0.0001****.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ФОСФОРИЛИРАН STAT5A В РЕГУЛАТОРНИТЕ Т- КЛЕТЪЧНИ СУБПОПУЛАЦИИ

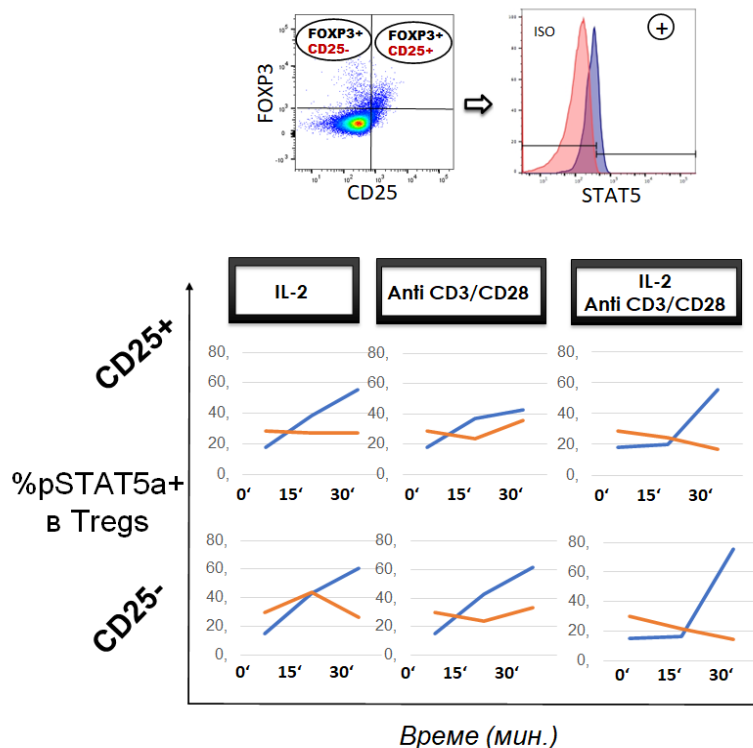
Установените различия в повърхностната експресия на активационните молекули CD25 и HLA-DR на Tregs при пациентките ни насочиха към изследване на молекули, участващи в сигналната трансдукция в клетката. За целта беше анализиран ключовият участник в клетъчната активация **STAT5**. Фосфорилираната му форма (pSTAT5a) представлява транскрипционен фактор, контролиращ важните за Tregs гени *il-2ra* (CD25) и *foxp3*(FOXP3). Флоуцитометрично анализирахме 30 проби (контроли n=18, пациенти n=12) за вътреклетъчна експресия на pSTAT5a. Получените резултати показват, че повече pSTAT5a⁺ положителни клетки има в Treg популацията при контроли, отколкото при пациенти [%pSTAT5a⁺CD25⁺Tregs ср.ст. (обхват): Пациенти 19.84% (4.53-33.2), Контроли 42.70% (27.6-57.3), $p=0.0001$], (**Фиг. 5Б**), [%pSTAT5a⁺CD25⁻Treg ср.ст. (обхват): Пациентки 21.15% (5.86-43.3) и Контроли 38.48% (22.1-55.0) $p=0.0002$], (**Фиг. 5В**). Сходно разпределение наблюдавахме както при nTregs [%pSTAT5a⁺ CD25⁺nTregs ср.ст. (обхват): Пациентки 16.36% (6.75-28.04), Контроли 50.82% (33.03-58.01), $p=0.0001$], (**Фиг. 5Г**), [%pSTAT5a⁺CD25⁻nTregs ср.ст. (обхват): 40.62% (26.9-50.5) и 26.29% (9.45-50), съответно за Пациентки и Контроли, $p=0.01$], (**Фиг.5Д**), така и в нерегулаторната FOXP3⁻ популация [%pSTAT5a⁺CD25⁺ non-Tregs медиана (обхват): 23.35% (0.4-58.1) и 41.6% (22.4-62.9), съотв. за Пациентки и Контроли, $p=0.0005$], (**Фиг. 5Е**), [%pSTAT5a⁺CD25⁻non-Tregs медиана (обхват): 20.8% (0.2-30.1) и 33.1% (19.4-59.9), съотв. за Пациентки и Контроли, $p=0.001$], (**Фиг. 5Ж**). Нашите резултати показват, че пониженият процент pSTAT5a в регулаторните, и в не-регулаторните Т-клетъчни популации на жените с репродуктивни неуспехи, може да е в основата на ниската CD25 експресия. Взаимодействието по оста CD25-STAT5-FOXP3 се контролира чрез естествения супресор на STAT5 - SOCS7. Експресията на SOCS7 в левкоцити нарушава пролактиновата и лептинова сигнализация, инхибира активацията на STAT5 и потиска сигнализицията през прогестероновия рецептор (Able et al., 2017). Следователно отклоненията на STAT5 в Tregs при жените с репродуктивни неуспехи могат да са в следствие на дисрегулация в имуно-ендокринната мрежа. Получените от нас резултати насочват към възможни отклонения в сигнално предаване и понижен активационен капацитет на регулаторните Т-клетки.



Фиг. 5 Изследване на pSTAT5a⁺ клетки в Tregs, nTregs и non-Tregs. Фенотипна стратегия на анализа (А). На бокс-плотовете е представен по-нисък %pSTAT5a⁺ клетки при пациентки (n=12), в сравнение с раждалите жени (n=18), в следните популации: CD25⁺Tregs (Б), CD25⁻Tregs (В), CD25⁺nTregs (Г), CD25⁻nTregs (Д), CD25⁺non-Tregs (Е), CD25⁻non-Tregs (Ж). Данните на групите жени бяха тествани с Parametric unpaired t Test (ср.см.±SD), с изкл. на (Е) и (Ж) с непараметричен Mann Whitney Test, (медиани+SD). p<0.05(*); p<0.01(**); p<0.001(***); p<0.0001****.

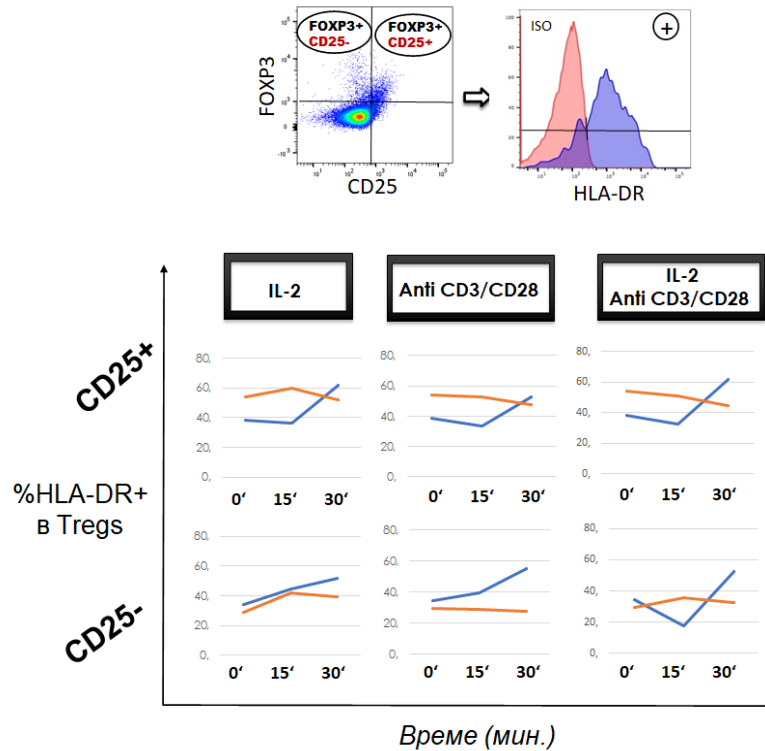
IN VITRO СТИМУЛИРАНА ЕКСПРЕСИЯ НА pSTAT5 α И HLA-DR

IL-2 е ключов цитокин за функционирането на регулаторни Т-клетки (Heltemes-Harris & Farrar, 2012) (Kanai et al., 2012). Фосфорилираният STAT5 е водещ в IL-2 сигналния път на активиране, тъй като може директно да се свързва с определени региони на *FOXP3* и да регулира неговата експресия (Pekalski et al., 2013). Предположихме, че след стимулация, експресията на pSTAT5 α и HLA-DR може да нарасне. За целта периферни мононуклеарни клетки бяха стимулирани с IL-2 самостоятелно или в комбинация IL-2/ с анти-CD3/CD28 за 15 до 30 минути. Динамиката във вътреклетъчната експресия на pSTAT5 α и повърхностната експресия на HLA-DR бяха анализирани в 25⁺Tregs и в 25⁻Tregs. На **фигура 6** са представени резултатите от трикратни повторения на експериментална група от 3 жени със спонтанни аборти и контролна група от 3 жени с успешни бременности. Установихме, че само при раждалите жени третирането с IL-2 на CD25⁺Tregs и на CD25⁻Tregs води до увеличаване на pSTAT5 α ⁺Treg клетки. Клетките на пациентите не реагираха на стимулацията и запазиха едно и също ниво. Подобна динамика беше отчетена и при стимулация през TCR, с изключение на леко увеличение на pSTAT5 α ⁺ 25⁺Treg клетките в групата на пациентите на 30 мин., но все така по-слабо от това на контролите. От получените резултати за костимулация (IL-2 и CD3/CD28) може да обобщим, че само Tregs на жените от контролната група (25⁺Tregs и CD25⁻ Tregs), могат да реагират през STAT5 сигналната каскада, чрез рязко повишение на процента pSTAT5 α ⁺ клетки. Друго проучване, изследващо ролята на IL-2 сигнализацията чрез pSTAT5 също показва, че при жени с повтарящи се спонтанни аборти има понижени pSTAT5⁺Treg клетки (Argvito et al., 2010). Нашите данни показват, че Tregs на жените от пациентката група запазват способността да реагират на TCR стимулация (CD3/CD28), но не и на стимулация през IL-2R (CD25). Като се има предвид, че стимулациите през двата рецептора (IL-2R и TCR) отключват различни сигнални пътища, може да се предположи, че намерените вариации на %pSTAT5 α ⁺ клетки е по-вероятно да бъдат свързани с отсъстваща експресия на CD25, а не с нарушена TCR сигнализация. Потвърждение на тази хипотеза идва от проучвания на автоимунитета доказващи, че дефицитът на STAT5 е свързан с нарушен имунен толеранс към собствени антигени (Zorn et al., 2006).



Фиг. 6 Вариации на %pSTAT5a⁺ клетки в 25⁺Tregs и 25⁻Tregs между раждали и не раждали жени. Tregs на жените от групата на пациентите (n=3), (жълт цвят) не показват отговор към различните стимули в средата: IL-2 (ляв панел) или комбинация IL-2 с анти-CD3/CD28 (десен панел). %pSTAT5a⁺ клетки остава по-нисък в сравнение с контролите (n=3), (син цвят) независимо от времетраенето. Като положителна контрола беше използвано третиране с анти-CD3/CD28 (среден панел).

Резултатите на **фигура 7** показват, че в присъствие на IL-2, %HLA-DR⁺ клетки се повишава в контролната група с максимална стойност на 30 мин. и в двете CD25 субпопулации. При двойна стимулация с IL-2 и CD3/CD28 в контролната група бе намерено краткотрайно понижаване на 15 минута в 25⁻Tregs последван от рязко нарастване на 30 минута. При пациентките не бяха намерени промени в HLA-DR експресията в 25⁺Tregs, а в 25⁻Tregs нивата на HLA-DR⁺ клетки бяха дори по-ниски, в сравнение с контролите. Резултатите от тази група експерименти показаха, че 25⁺Tregs и 25⁻Tregs на жените от контролната група реагират на различните стимули с положителна промяна в %HLA-DR⁺ клетки. За разлика от тях, при клетките на жените от пациентската група беше наблюдаван монотонен отговор, който не се повлия от приложените стимули.



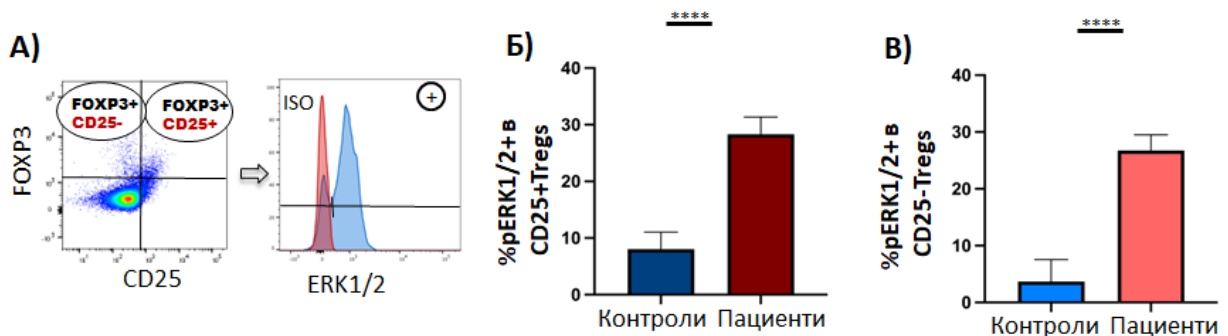
Фиг. 7 Стимуляционен *in vitro* модел отразяващ промяната на %HLA-DR⁺ клетки в 25⁺Tregs и 25⁻Tregs. Със син цвят е показан увеличаващият се %HLA-DR⁺ клетки при раждали жени (n=3) в отговор на IL-2 (ляв панел) или комбинация IL-2 с анти-CD3/CD28 (десен панел). Докато при не раждали жени (n=3) %HLA-DR⁺ клетки не се повлия нито от времетраенето, нито от приложените стимули (жълт цвят). Като положителна контрола беше използвано третиране с анти-CD3/CD28 (среден панел).

Заедно, по-малкият процент на pSTAT5a⁺ и на HLA-DR⁺ клетки в Tregs и pTregs, както и различната динамика в експресията на двете молекули, предполагат промени в сигналното предаване, свързано с активацията на тези клетки. Получените резултати от стимуляционните експерименти, показващи вариации в експресията на тези два маркера, допълнително потвърждават разликите във възможностите за активиране на регулаторните Т-клетки при жени с репродуктивни неудачи.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ERK1/2+ КЛЕТКИ ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ НЕУСПЕХИ

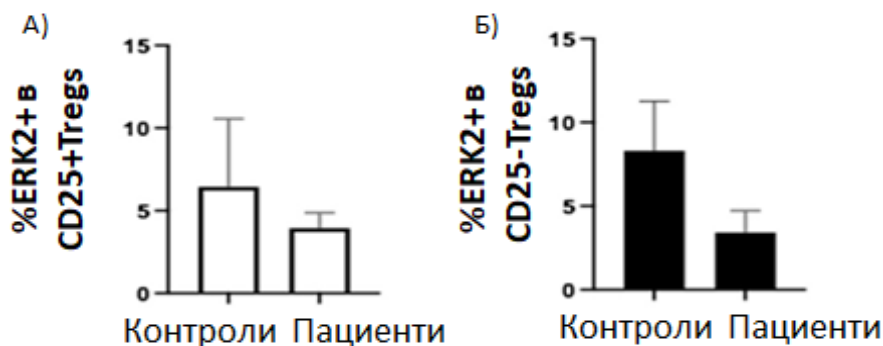
ERK1/2 (МАРК3/ МАРК1) е друг важен участник в сигналната трансдукция, част от системата фосфорилирани протеини на МАРК/ЕРК каскадната ос. ERK1/2, както и STAT5, бива задействан през IL-2R рецептора, чрез фосфорилиране на различни тирозинови остатъци. Целта на МАРК/ЕРК сигналния път е активиране на различни транскрипционни фактори, които регулират транскрипция на различни гени, вкл. *IL-2RA* генния локус (Burbach et al., 2007); (J. Cheng et al., 2011). Освен това е доказано, че ERK1/2 участва активно в имуно-ендокринната връзка, като регулира няколко ядрени рецептора, включително естрогеновия (Kato, 2001). Значението на CD25 за осъществяване на лимфоцитната активация, както и по-високата експресия на CD25 от Tregs в сравнение с останалите Т-клетъчни фракции, ни позволи да предположим връзка между ERK1/2 и CD25.

Изненадващо при пациентките открихме повече ERK1/2 положителни клетки в 25⁺Tregs [ср.ст. (обхват): 28.33% (23.70-31.50)], в сравнение с раждалите жени [ср.ст. (обхват): 7.51% (3.51-11.20), $p=0.0001$], (Фиг. 8 Б). В CD25 негативната Treg фракция, отново ERK1/2 положителни клетки доминираха в групата на пациентите [ср.ст. (обхват): 25.43% (19.10-29.50)], за разлика от контролите [ср.ст. (обхват): 4.84% (3.06-7.54)], ($p=0.0001$), (Фиг. 8 В).



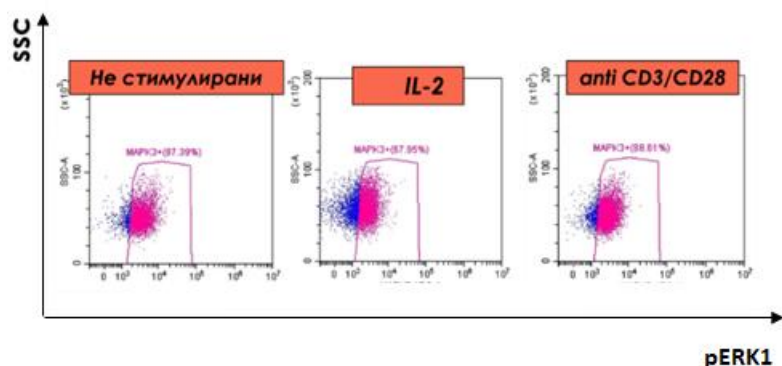
Фиг. 8 Сравнителен анализ на pERK1/2⁺ клетки в 25⁺Tregs и 25⁻Tregs. Фенотипна стратегия на анализа (А). Графиките демонстрират по-висок %ERK1/2⁺ клетки при жените от групата на пациентите (n=6), в сравнение с контролната група (n=6), в 25⁺Tregs (Б) и в 25⁻Tregs (В). Изследваните групи бяха анализирани с Parametric unpaired t Test (mean±SD). $p<0.05$ (*); $p<0.01$ (**); $p<0.001$ (***); $p<0.0001$ ****

С помощта на PrimeFlow RNA assay имахме възможността да направим допълнителна оценка на ERK2 mRNA експресията. Получените данни показваха присъствие на ERK2 mRNA положителни 25⁺Tregs и 25⁻Tregs и в двете изследвани групи лица. С по-висок процент ERK2mRNA⁺ клетки се отличаваха жените от контролната група [25⁺Tregs: контроли ср.ст. (обхват): 6.44% (1.73-13.80), пациентки: [ср.ст. (обхват): 3.94% (3.30-4.60)]. Сходен резултат беше получен и за 25⁻Tregs [контроли ср.ст. (обхват): 8.30% (4.26-10.10), пациенти ср.ст. (обхват): 3.42% (2.49-4.35)], (Фиг. 9). Впечатление правят двойно по-високите стойности в контролната група. В изследването не беше използван сравнителен статистически анализ за достоверни различия, поради малкия брой проби в групите. Следователно получените резултати насочват към отклонения в експресията на ERK2 РНК транскрипта при пациентките. Можем да допуснем, че различни условия на средата могат да повлияят регулацията на имунния отговор, осъществявана от Tregs. Множество проучвания показват превалиране на про-инфламаторни Т-клетъчни популации при жени с репродуктивни проблеми, успоредно с количествени и качествени промени в Tregs (Sykes et al., 2012).



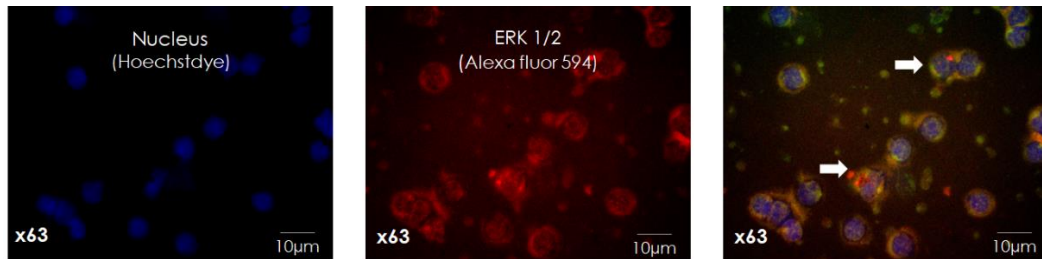
Фиг. 9 ERK2⁺ Treg експресиращи клетки в изследваните групи лица. Фигура (А) отразява количеството на клетките експресиращи ERK2 в 25⁺Tregs, а фигура (Б) ERK2mRNA⁺ 25⁻Tregs между контроли (n=6) и пациенти (n=3). Данните на графиките са представени със ср. ст. +SD.

Получените до тук резултати показват различия в протеиновата и mRNA експресия на ERK1/2 между двете изследвани групи жени в Tregs. Високите стойности на CD25 негативната фракция при пациентките в Tregs, вкл. nTregs, ни насочиха към допълнителни изследвания върху сортирани живи CD25⁻nTreg клетки от здрави жени, стимулирани през TCR и IL-2R. Това наложи изготвяне на друга стратегия за фенотипно характеризиране на nTregs, на база данни в литературата за обратна корелация на FOXP3 с експресията на α веригата на IL-7 рецептора (CD127) (Seddiki et al., 2006). Резултатите показаха по-малък процент ERK1⁺ клетки в присъствието на IL-2 (**Фиг. 10**). Изненадващо, стимулираните през TCR клетки, не се различаваха по процента pERK1⁺ от нестимулираните. Вероятно, стимулираните 25⁻nTregs са способни да осъществяват алтернативна вътреклетъчна сигнализация през TCR рецептора. При така проведеня експеримент не успяхме да извършим сравнение на резултатите за 25⁻nTregs и 25⁺nTregs. Поради малкия процент на 25⁺nTreg фракцията в периферията и лимитираното количество кръв взето от всеки доброволец, беше сортиран недостатъчен брой 25⁺nTreg клетки (<100x10⁵кл./мл) за извършване на *in vitro* стимулация. Все пак, от получените резултати се вижда, че фенотипните различия, заедно с намерените вариации на ERK1/2 вероятно са свързани с нарушения във вътреклетъчната сигнализация и със супресорната функция на Tregs.



Фиг. 10 Анализ на pERK1⁺ клетки (MAPK3) при стимуляционен модел с IL-2. Горният панел графика представлява съответните негативни контроли. На долния панел са представени резултатите за промяната в процента на на pERK1⁺ клетки в сортираните CD25⁻nTregs и третирани с различни стимули: IL-2 (среден панел) и CD3/CD28 (десен панел), не стимулирани клетки (ляв панел).

В подкрепа на получените резултати бе извършен експеримент, в който е доказано цитоплазменото присъствие на нефосфорилиран ERK1/2 (MAPK1/3) (с червен цвят) сред CD25⁻ субпопулацията (**Фиг. 11**). Клетките бяха маркирани с Alexa 594 (ERK1/2) и Hoechst dye (ядро) за извършване на конфокална микроскопия.



Фиг. 11 Image анализ на ERK1/2 при нестимулирани 25⁻ CD45RA⁺CD4⁺ T-клетки от здрави жени. На първото изображение със син цвят са показани ядрата на клетките, на второто - ERK1/2⁺ клетки с червен цвят (Alexa594), а последното е събирателен образ на двете заедно.

В заключение, получените резултати в дисертационния труд предоставят интересни доказателства за CD25⁺ и CD25⁻ Tregs в светлината на репродуктивните процеси при човек. Обобщено, при жените с репродуктивни неуспехи установихме променено съотношение между %CD25⁺ и %CD25⁻ Tregs и nTregs, заедно с повишен процент не-регулаторни T-клетки. Втората особеност на пациентската група жени е по-малкият процент на HLA-DR⁺ Tregs и nTregs, независимо от експресията на CD25. Подобни резултати получихме и за FOXP3⁻ T-клетките. Като трета характеристика, можем да изведем ниския процент pSTAT5a⁺ Tregs и nTregs, но превалиране на ERK1/2⁺ регулаторни T-клетки при пациентките. Получените резултати при жените с репродуктивни неуспехи предполагат, че измененията в процента и функцията на Tregs в периферията, могат да бъдат свързани с аномален майчин имуен отговор и нарушение на имунологичната толерантност. За разлика от здравите контроли без репродуктивни нарушения, смущенията в регулацията на имунния отговор при пациенти, биха довели до проблемно забременяване и протичане на бременност. По-обстойното проучване на динамиката на различните Treg популации по време на бременност, ще предостави нови познания за механизмите на имуен толеранс и ще увеличи възможностите за нови терапевтични интервенции.

5. ИЗВОДИ

1. При жени с репродуктивни неуспехи е установено различие между CD25⁺/CD25⁻ FOXP3⁺ регулаторните Т-клетки, изразено в доминиране на CD25⁻ отрицателната фракция.
2. Повърхностната експресия на активационния маркер HLA-DR е понижена при регулаторните и нерегулаторни Т-клетки при пациентки.
3. При жени с репродуктивни неуспехи са установени понижени нива на активната форма на сигналната молекула pSTAT5a, което е възможно обяснение на ниските стойности на CD25.
4. Само при пациентките процента на mRNA ERK2⁺ експресиращите клетки е по-малък, което може да се обясни с променения контрол на активация, установен при *in vitro* стимулация.
5. Променените нива на HLA-DR, pSTAT5a и ERK1/2 при групата на пациентките могат да бъдат свързани с различната експресия на IL-2Ra (CD25) и последващите функционални промени.

6. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Получени са оригинални данни за понижена експресия на HLA-DR върху регулаторни и нерегулаторни Т-клетки при жени с репродуктивни нарушения.
2. Установени са ниски нива на pSTAT5a и високи нива на ERK1/2 при пациентки с репродуктивни неуспехи в сравнение със здрави контроли.
3. Намерена е положителна връзка между CD25 и HLA-DR при регулаторни и нерегулаторни Т-клетки, ниските нива на pSTAT5a и на ERK2 mRNA експресиращите клетки при жените с репродуктивни неуспехи.

7. Списък на научните статии във връзка с дисертацията

1. **Rumyana Susurkova**, Andrey Velichkov, Antoaneta Mihova, Maria Muhtarova, Margarita Guenova, Iskra Antonova, Georgi Nikolov, Velislava Terzieva. Phosphorilated STAT5 is associated with differential activation capacity of T regulatory cells in women with reproductive failure. C. R. Acad. Bulg. Sci., 74, No 3: 431-438, 2021. DOI: 10.7546/CRA BS.2021.03.15, IF: 0.343
2. **Rumyana Susurkova**, Andrey Velichkov, Iskra Antonova, Iliyan Manoylov, Georgi Nikolov, Velislava Terzieva. Differential expression of HLA-DR on human natural regulatory T cells, but not in naive cd4 t cells, in patients with pregnancy failure. Compt. rend. Acad. Bulg. Sci., 69, No 4: 449-458, 2016. IF: 0.251

8. Списък на участия в научни форуми във връзка с дисертацията

1. „Анализ на естествените регулаторни Т-клетки при жени с репродуктивни неуспехи“. Интердисциплинарен докторантски форум, 6-7.04.2016, София, България (**Sort Oral Presentation**)
2. „Експресия на активационната молекула HLA-DR при регулаторни и конвенционални Т-клетки“. Регулярен общоинститутски научен семинар (ИБИР), 15.06.2016, София, България (**Sort Oral Presentation**)
3. ”HLA-DR expression variations on human regulatory T cells is associated with impaired immune tolerance”. 14th Conference of the European Society for Reproductive Immunology (ESRI), 29.09-02.10.2017, Kos Island, Greece (**Poster Presentation**)
4. “Impaired activation of Tregs in patients with pregnancy failure”. 15th International Symposium for Immunology of Reproduction, 15-17.06.2018, Varna, Bulgaria (**Sort Oral Presentation**)
5. “Evaluation of MAPK3 in the context of CD25 expression on natural Tregs for the immune tolerance development in patients with recurrent pregnancy loss”. 5th European Congress of Immunology, 02-05.09.2018, Amsterdam, The Netherlands (**Poster Presentation**)
6. “Morphological and structural changes of MAPK3 in CD25 subsets of natural regulatory T cells”. 5th National Congress of Immunology, 25-28.10.2018, Plovdiv, Bulgaria (**Poster Presentation**)
7. “Activation potential of regulatory T-cells”. Viewpoints on immune tolerance - Lessons from human reproductive immunology, 02.07.2019, Sofia, Bulgaria (**Sort Oral Presentation**)
8. “Analysis of MAPK3 in natural regulatory T-cells”. 12th International Congress of Autoimmunity, 28.05-01.06.2021, Virtual (**Poster Presentation**)
9. “Analysis of Tregs ’activation potential through pSTAT5 and HLA-DR molecules in women with pregnancy failure”. 6th European Congress of Immunology 01-05.09.2021, Virtual (**Poster Presentation**).

Ръководство и участие в проекти във връзка с дисертацията

1. Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания - 2016, ФНИ „Молекулярни механизми на имунния толеранс - значение на ендокринната среда за функцията на регулаторните Т клетки“. ДН 03/4, 2016г. (*участник в проект*)
2. Програма за подпомагане на млади учени и докторанти на БАН, „Значение на експресията на Mitogen-activated protein kinase 3 (МАРК3) за фенотипната характеристика и функционалния капацитет на естествените регулаторни Т клетки, като основа за поддържане на Т клетъчния имуен толеранс“. ДФНП 17-118/2017г. (*ръководител на проект*).

Този дисертационен труд е изработен с финансовата подкрепа на:



Министерство на образованието, младежта и науката

Проект ДН 03/4 (2016г.-2021г.), с ръководител доц.
Д-р Велислава Терзиева.



Програма за подпомагане на млади учени и докторанти на БАН, по
проект ДФНП 17-118 (2017г.-2019г.), с ръководител Румяна Сусуркова.



Персонален грант от Европейската федерация на
имунологичните дружества (EFIS-IL Short-term
Fellowship) 2019г. Medical University of Graz, Division of
Cell Biology, Histology and Embryology, Austria.

Благодарности

Искам да изкажа най-сърдечни благодарности на научния си ръководител Доц. д-р Велислава Терзиева, дм. Признателна съм Ви за опита и знанията, които споделихте с мен, за подкрепата и ценните напътствия, с които стана възможно изготвянето на настоящата дисертация. Благодаря за предоставената възможност да имам ръководител като Вас!

Изразявам своята искрена благодарност към всички колеги от ИБИР-БАН и най-вече на гл.ас. Андрей Величков, за множеството продуктивни дискусии, всеотдайна помощ и приятелско отношение, които допринесоха за спокойната работна атмосфера.

Специални благодарности на Д-р Георги Николов за предоставените материали, на ембриолог Искра Антонова и целия екип на МЦ “Репробиомед“- София за отличното сътрудничество.

Изключително съм признателна на Проф. д-р Маргарита Генова и д-р Мария Мухтарова (НСБАЛХЗ) за професионалното отношение по време на съвместната ни работа.

Благодаря на Проф. Андрей Чорбанов, на гл.ас. Илиян Манойлов и целият екип от лаборатория „Експериментална имунология“ към института по Микробиология (БАН) без които, не би било възможно извършването на предварителните ми експерименти.

Безкрайно съм признателна на Доц. Thomas Kroneis и Доц. Amin El-Heliebi за гостоприемството, с което ме приеха в научения им екип. Благодаря искрено на Матина, Дженифър, Оливия, Бернадет и на останалите колеги от МУ Грац, Австрия.

Благодаря на Проф. Красимира Тодорова и на Проф. Сорен Хайрабемян за оказаното съдействие и професионализъм.

Благодаря на всички доброволци, които се съгласиха да участват в проучването.

Не на последно място съм благодарна на родителите си и на моя житейски партньор за търпението и вярата в мен.