



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО
„АКАД. К. БРАТАНОВ”**

Андрей Георгиев Величков

**„ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕСТЕСТВЕНИТЕ РЕГУЛАТОРНИ Т
КЛЕТКИ КАТО ФАКТОР ЗА ОСЪЩЕСТВЯВАНЕ НА
БРЕМЕННОСТ ПРИ ЧОВЕК“**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

Научна специалност: Имунология

шифър 01.06.23

Научен ръководител: **Доц. д-р Велислава Терзиева, дм**

София, 2021

Дисертационният труд е илюстриран с 16 фигури и 3 таблици. Библиографията включва 260 литературни източника, всички на английски език.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 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:

Проф. Сорен Хайрабемян, дбн

Проф. д-р Виктория Сарафян, дм, дмн

Проф. д-р Доброслав Кюркчиев, дмн

Доц. д-р Емилияна Конова, дм

Доц. д-р Велислава Терзиева, дм

Проф. д-р Димитрина Димитрова -Диканарова, дм (резервен)

Доц. Цветелина Орешкова, доктор (резервен)

Доц. д-р Анастас Пашов (резервен)

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 (<http://ibir.bas.bg>)

Забележка: Номерата на фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Съдържание

Увод	4
Цел	5
Задачи	5
Материали и методи	5
Резултати и обсъждане	7
Изводи	26
Приноси на дисертационния труд	26
Списък на научните статии свързани с дисертационния труд	27
Списък с участия на научни форуми във връзка с дисертацията	27

Използвани съкращения на английски език

- CD – Cluster of differentiation; клъстер на диференциация
EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2
FOXP3 - Forkhead Box Protein 3
IL – Interleukin - интерлевкин
P4 – Progesterone; Прогестерон
PCR – Polymerase chain reaction; Полимеразна верижна реакция
РНА – Phytohemagglutinin
PRC2 - Polycomb repressive complex 2
TCR – T-cell receptor; Т-клетъчен рецептор
TECs – Thymus epithelial cells; Тимусни епителиални клетки
Th – T-helper - Т-хелперна / помощтна клетка
TRECs – T-cell receptor excision circles
Tregs – Regulatory T-cells; Регулаторни Т-клетки

Използвани съкращения на български език

- АПК - антиген-представящи клетки
АРТ – Асистиращи репродуктивни технологии
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
ПМНК - периферни мононуклеарни клетки

Увод

Имунната хомеостаза е в основата на правилното функциониране на всички системи в периферията. Основна роля в поддържането ѝ имат Т-лимфоцитите. Те придобиват своите функционални характеристики по време на развитието си в тимуса. Тогава бъдещите Т-клетки са обучавани да разпозват „свое“ от „чуждо“ с помощта на изградения на повърхността им Т-клетъчен рецептор (TCR). За да бъдат функционално активни в периферията, те преминават през редица етапи на узряване и качествена проверка от структурите, застъпени в централния толеранс.

В кръвообращението циркулират предимно ефекторни Т-клетки, които осигуряват защита спрямо “опасните” за организма антигени. Заедно с тях действа и регулаторно звено от клетки със супресивни свойства (регулаторни Т-клетки (Tregs)). Tregs участват в контрола на имунния отговор и в изграждането на периферния Т-клетъчен толеранс. Те са представени от клетки с тимусен произход (nTregs) и такива, индуцирани от наивния Т-клетъчен пул (iTregs).

Фундаментални проучвания показват, че nTregs участват активно в предотвратяването на имунни реакции към собствените антигени, което ги прави водещи в процесите на поддържане на имунната хомеостаза в периферията. В този смисъл, те са особено важни при създаването на подходящи условия за развитието на растящия фетус през бременността. Неправилното регулиране на имунния отговор от nTregs в такъв момент би имал негативен ефект върху целия процес. Затова, редица патологични състояния по време на бременността са асоциирани с количествени и качествени промени в Treg популацията.

В последните години се наблюдава експоненциално увеличаване на двойките с репродуктивни неуспехи от неизяснен характер на първичен инфертилитет и/или спонтанни аборти в 1-вия триместър. Разбирането на тези процеси би имало положителен социално-демографски ефект. Настоящата работа е насочена към изследване на nTregs за поддържане на имунната хомеостаза при жени с репродуктивни неуспехи. Паралелно с това е направен анализ на устойчивите във времето (трайните) промени в периферията след успешно прекарана бременност.

Цел

Целта на настоящата работа е проучване значението на естествените регулаторни Т-клетки за развитие на бременност при човека.

Задачи

1. Анализ на естествените регулаторни Т-клетки в периферна кръв на здрави контроли и пациентки с неизяснен инфертилитет.
2. Сравнителен анализ на наивните Т-клетки при здрави лица и пациентки.
3. Изследване на тимусната функция и посттимусната пролиферация при пациентки с неизяснен инфертилитет чрез количествен анализ на T-cell receptor excision circles (TRECs) в периферна кръв.
4. Проследяване генната експресия на *EZH2* при ин-витро модели и посредством PrimeFlow в регулаторни и не-регулаторни Т-клетки.

Материали и методи

Пациентки и контроли

В настоящото изследване бяха включени само жени в репродуктивна възраст. Те бяха разделени на здрави контроли (n=51) и пациентки [ПНИ; n= 25; години (обхват): 35.0 (26-44)]. В състава на контролите се различаваха две основни подгрупи: на нераждали [НК; n=17; 28.5 (24-38)] и раждали жени [РК; n=34; 32.0 (21-45)], всички без съпътстващи репродуктивни и/или други здравословни отклонения, които могат да имат ефект върху проучването. Също така, раждалите жени се отличаваха с период от поне 2 години след последната успешна бременност. За разлика от контролите, в групата на пациентките бяха включени жени с диагностициран неизяснен инфертилитет (n=25), от които се отличаваха и лица със спонтанни аборти в 1-вия триместър (n=5). По-голямата част от всички пациентки са били подложени на АРТ (n=22). Повече от половината случаи са завършили с повече от 1 неуспешен ембриотрансфер [≥ 2 (n=15); ≥ 3 (n=7)], докато не малка част със загуба на плода в 1-вия триместър (n=7). Пробовземането на периферна кръв от участниците в проучването, бе съобразено с основните етични принципи, включително тези в Декларацията от Хелзинки и Хартата на основните

човешки права на ЕС7. Всички лица бяха предварително запознати с темата на изследването и доброволно подписаха декларация за информирано съгласие.

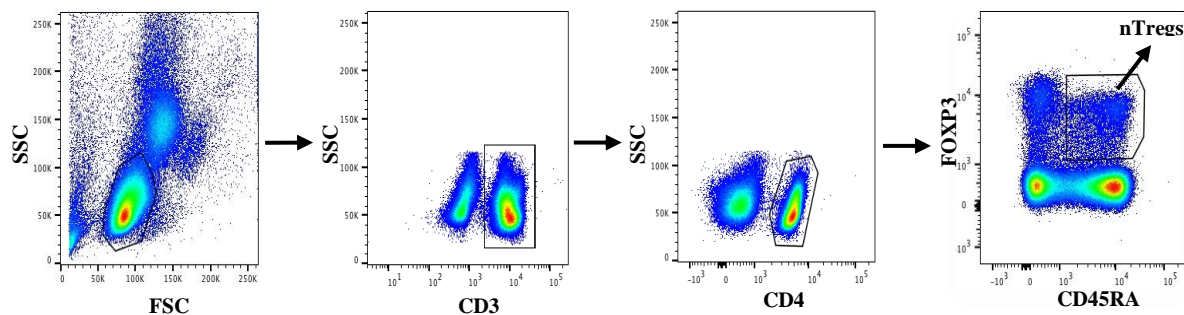
Методи

1. Изолиране на периферни мононуклеарни клетки (ПМНК) от периферна кръв
2. Оцветяване с моноклонални антитела за проточна цитометрия.
 - 2.1. Вътреклетъчни антитела- FOXP3 (PE); Ki67 (APC)
 - 2.2. Екстрацелуларни антитела – CD3(HV450); CD4 (HV500); CD45RA (PerCP)
3. Подготовка и оцветяване на ПМНК по PrimeFlow (eBioscience™) метода, за отчитане на генната експресия посредством флоуцитометрия.
 - 3.1. Пермеабилзация и фиксация.
 - 3.2. Хибридизация.
 - 3.3. Амплификация на сигнала.
4. Количествено измерване на TREC молекулите в ПМНК с помощта на nested PCR-технологията.
 - 4.1. Лизиране
 - 4.2. Pre-PCR реакция с включени външни двойки праймери за single joint (sj)TRECs и DJ β TRECs.
 - 4.3. Втора PCR реакция с вътрешни двойки праймери. Отчитане на резултата.
5. Клетъчно култивиране
 - 5.1. Ин-витро стимулиране в присъствието на прогестерон в средата.
 - 5.2. Т-клетъчен активационен модел чрез магнитни анти-CD3/CD28 бидчета.
 - 5.3. Проследяване на генната експресия на *EZH2* и *FOXP3* след използваните ин-витро модели.
6. Статистическа обработка на данните.

Резултати и обсъждане

Фенотипно характеризиране на естествените регулаторни Т-клетки чрез проточна цитометрия

Естествените регулаторни Т-клетки заемат важно място в поддържане на имунната хомеостаза. Затова, използването на правилен подход за тяхното фенотипизиране е от ключово значение при изясняване на ролята им в периферията. В настоящото проучване последователността на анализ на nTregs започна с определяне на фракцията от CD3⁺CD4⁺ лимфоцити. Този ход беше предприет, тъй като Tregs принадлежат към популацията от Т-хелперни клетки. За фенотипизирането на nTregs използвахме комбинацията от двойно положителни по FOXP3⁺CD45RA⁺ Т-клетки. Не за първи път се използва подобна комбинация за характеризиране на nTregs. Така Sakaguchi и колеги докладват за наличието на 3 отделни популации в зависимост от присъствието или не на CD45RA, но и съобщават за различната експресия на FOXP3 при всяка една от тях. CD45RA⁺Tregs не се характеризират с много висока експресия на FOXP3 (Miyara et al., 2009) и са определени като клетки с тимусен произход (Abbas et al., 2013). Алгоритъмът на използваната от нас последователност на анализ е представен на фигура 1.



Фиг. 1. Стратегия на фенотипен анализ на естествените регулаторни Т-клетки (nTregs).

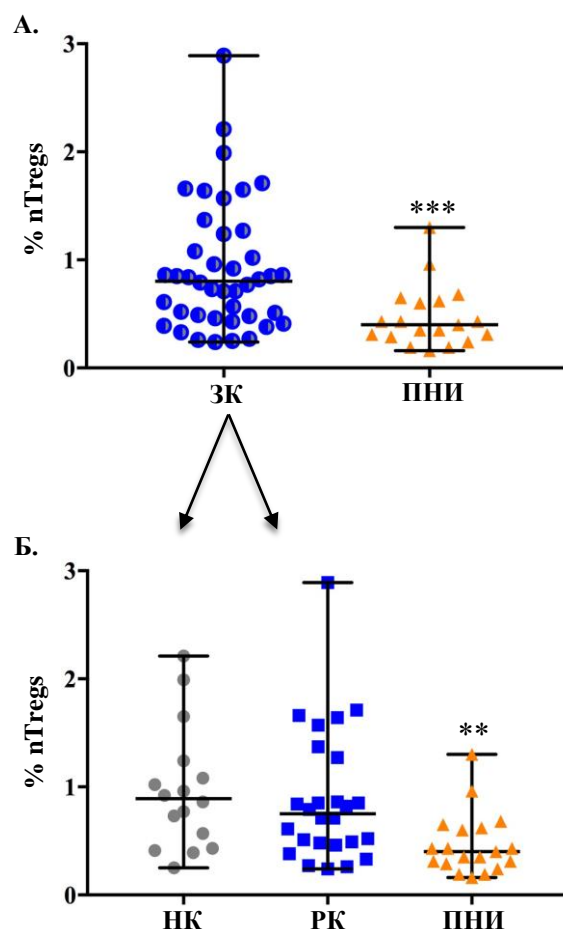
Първоначално определихме лимфоцитната фракция в изолираните ПМНК спрямо флоуцитометричните показатели за големина и гранулираност - forward scatter (FSC) и side scatter (SSC). След това беше направена селекция на Т-клетките, като за целта използвахме последователно положителните популации от CD3 и CD4. От тях двойно положителните по FOXP3 и CD45RA бяха определени като nTregs.

Понижен процент на естествените регулаторни Т-клетки в групата на пациентките

Изследвания върху ранните етапи от бременността показват, че успешната имплантация е съпроводена с промяна на имунния отговор от възпалителен към толерогенен. Направени изследвания в областта на ин-витро технологиите свидетелстват за ролята Tregs през ранните стадии на развитие на бременността при хора (Hosseini et al., 2016; Saifi et al., 2014). Това ни даде основание да предположим, че именно nTregs имат основна роля за правилното насочване на имунния отговор през този период на развитие на бременността.

Настоящото проучване беше насочено към изследване на естествените регулаторни Т-клетки в контекста на нарушен имуен толеранс при жени с неизяснен първичен инфертилитет и/или спонтанни аборти в 1-вия триместър (ПНИ; n= 19). За сравнение използвахме група от здрави контроли (ЗК), състояща се от раждали и нераждали жени (n= 42). Всички проби бяха анализирани фенотипно, според алгоритъма, посочен на фиг. 1. След това съпоставихме резултатите, получени в двете групи. Намерени бяха значително по-ниски стойности на nTregs в групата на ПНИ [(медиана (обхват): %FOXP3⁺CD45RA⁺CD4⁺ Т-лимфоцити- 0.4% (0.16-1.3)] за разлика от ЗК [(0.81% (0.24 - 2.89), p= 0.0004)], (Фиг. 2 А).

Предположихме, че промените настъпили по време на успешна бременност и/или следродилния период може да имат отношение върху получените резултати. Затова в следващата стъпка разделихме контролната група на раждали [РК: n= 26] и нераждали жени [НК: n= 16]. Това ни предостави възможност да проследим паралелно: 1) дали се наблюдават промени в периферията на раждалите при сравнението им с нераждалите жени; 2) до колко различията между контролните групи и пациентките, могат да бъдат използвани като показател за инфертилитет при вторите.



Фиг. 2. Сравнителен анализ на nTregs между изследваните групи. На дот-плот графиките са представени процентът (FOXP3⁺CD45RA⁺) nTreg клетки като част от популацията на CD4⁺ Т-лимфоците и тяхното разпределение във всяка група. Намерени бяха значително по-ниски стойности при пациентките (ПНИ) в сравнение със здравите контроли (ЗК) (А.). Независимо от разделянето на групата от здрави лица на раждали (РК) и нераждали жени (НК; Б), при сравнителния анализ отново беше установен по-нисък процент на nTregs при ПНИ. За сравнението между две групи използвах непараметричен Mann-Whitney U-тест, докато за повече от две - Kruskal-Wallis, последван от Dunn тест за многократно сравнение между отделните групи. За статистически достоверни разлики бяха приети: $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$.

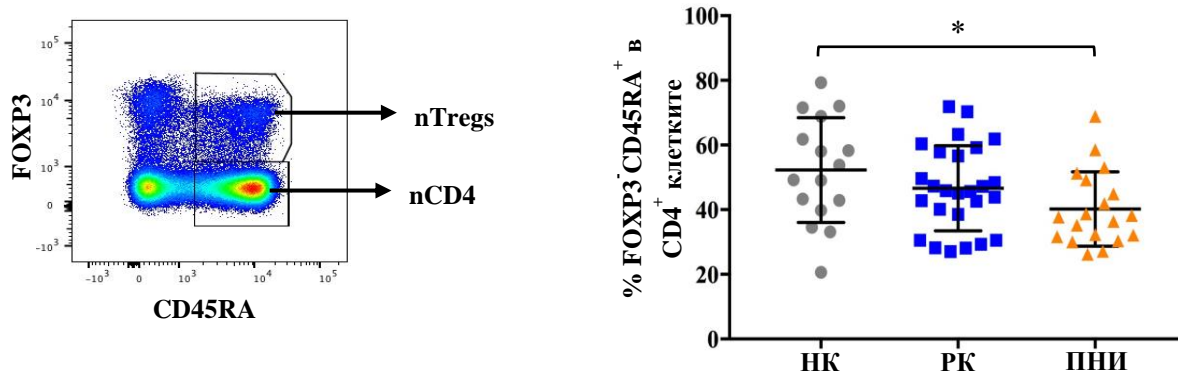
Отново пациентките се отличаваха с най-ниски стойности на nTregs спрямо контролните групи [НК (медиана (обхват): 0.89% (0.25 - 2.21), $p = 0.002$; РК (0.75% (0.24 - 2.89); $p = 0.003$; Фиг. 2 Б]. В същото време, не установихме разлики между групите на здравите лица. Следователно може да се предположи, че бременността вероятно има ограничено действие във времето върху популацията от nTregs. Това се потвърждава от резултатите, намерени от други колективи, при проследяване на колебанията в нивата на Tregs в следродилния период. Непосредствено след раждането е установен рязък спад на циркулиращите Tregs, което е съпроводено от етап на постепенно увеличаване до достигане на стойности близки до тези на нераждали здрави контроли (Lima et al., 2017).

Според други литературни източници, тези промени имат своето отражение до 1 година след прекарана бременност (Shigeta et al., 2018), докато включените в настоящото изследване РК са с поне 2 години след последното раждане. Според гореизложените твърдения, може да предположим съществуването на механизъм за поддържане на определено количество nTregs клетки в периферията, необходим за осигуряване на имунната хомеостаза след успешна бременност при раждателите контроли. За разлика от тях, намерените ниски нива на nTregs при пациентките насочват към отклонения в имунния толеранс при тях. С цел да докажем тази хипотеза и да разберем дали получените от нас резултати се дължат само на nTregs, направихме допълнителен анализ на не-регулаторните CD45RA⁺FOXP3⁻ Т-клетки като по-голяма част от наивната популация от CD4⁺ лимфоцити.

Понижено количество на наивните CD4⁺Т-клетки в групата на пациентките в сравнение с нераждателите, но не и спрямо раждателите контроли.

Наивните конвенционални CD4⁺ Т-клетки (nCD4) са от основно значение при изграждането на адаптивен имуен отговор. Ето защо, за нас беше интересно да проверим дали съществуват количествени различия в тяхната популация при ПНИ подобно на тези в nTregs. Конвенционалните nCD4 бяха определени като негативни по FOXP3, но положителни по CD45RA клетки (FOXP3⁻CD45RA⁺) в CD4⁺Т-лимфоцитите (Фиг. 3). От получените резултати установихме значително понижен процент при ПНИ [ср.ст. ± SD; 40.2 ± 11.5%] спрямо НК [52.3 ± 16.3%; p= 0.02]. В групата на РК процентът nCD4⁺ клетки (46.6 ± 13.2%) беше по-висок от този на ПНИ, но по-нисък от НК. Въпреки това не бяха установени статистически достоверни различия (p> 0.05), (Фиг.3).

Проучванията в областта на репродуктивната имунология обръщат малко внимание на приноса, който наивните конвенционални CD4⁺Т-клетки имат по време на бременността. За разлика от тях, много по-добре са изучени ефекторните Th и CD8 Т-клетки. Способността на nCD4 клетките да се диференцират в различни Th- популации има важна роля при контрола на Th1- и Th17-медиацията възпалителен отговор по време на бременността (Saito et al., 2010). В търсене на причината на какво може да се дължат тези промени се насочихме към изследване на фактори, които вероятно имат отношение към количествената динамика на наивните Т-клетки в периферията.



Фиг. 3. Анализ на наивните $CD4^+$ Т-клетки в изследваните лица. Наивните Т-клетки определихме като $FOXP3^+CD45RA^+$. Отново в групата на пациентките намерихме понижение в процента на nCD4 спрямо нераждалите контроли. На дот плот графиката са представени резултатите като ср.ст. \pm SD. Използваният тест за сравнението между групите беше параметричен post-hoc LSD тест (One-way ANOVA).

$p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$

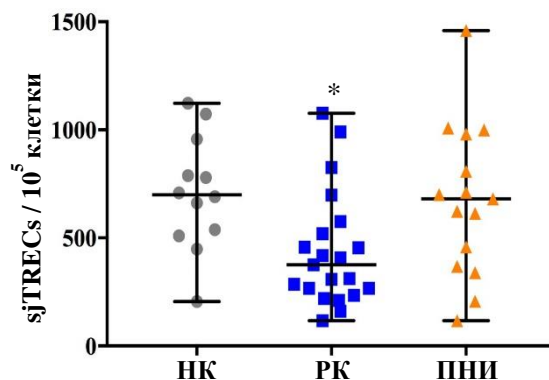
Изследване на тимусната функция и екстратимусната пролиферация чрез количествен анализ на T-cell Receptor Excision Circles (TRECs)

Популацията от наивни Т-клетки в периферията е пряко зависима от хомеостатичната и антиген-медираната пролиферация, но също и от продукцията на нови клетки. За целта се насочихме към анализ на TREC молекулите. Това са кръгови екзозомни ДНК молекули, които се синтезират като остатъчен продукт при процесите на пренареждане на гените за α - и β - веригите на TCR на зреещите Т-клетъчни прекурсори в тимуса. Интересното при тях е, че са изключително стабилни и при деленето на Т-лимфоцитите остават в една от дъщерните клетки т.е. с всяко едно делене, TRECs се разреждат. Анализът на TRECs е златен стандарт за изследване на тимусната функция и посттимусната Т-клетъчна пролиферация без да са необходими инвазивни процедури (Douek et al., 1998; Geenen et al., 2003). Използваният от нас високочувствителен PCR позволява отчитането на 1 TREC молекула в 10^5 клетки.

Значително по-ниско количество на sjTRECs в групата на раждалите жени

При пренареждането на гените за α - веригата се формира single-joint (sj)TREC молекула, която може да бъде проследена в периферията. Изследването на sjTRECs, предоставя информация за екстратимусната пролиферация на клетките. Статистическата обработка на данните показва значително по-ниско количество sjTRECs $\times 10^5$ клетки при РК в сравнение с останалите групи [n= 21; медиана (обхват): 376 (116.7-1076.4); $p = 0.02$]. В същото време, не установихме разлики между ПНИ [n=15; 680.1

(116.9-1459.2)] и НК [n=12; 699.7 (205.3-1123.7)], напротив стойностите им бяха в близки граници (Фиг.4). Количеството на sjTRECс се повлиява предимно от промените, настъпили в периферията и в по-малка степен от тимусната функция при здрави лица след пубертета. Следователно, въз основа на получените резултати може да се предположи повишена Т-клетъчна пролиферация в групата на РК.

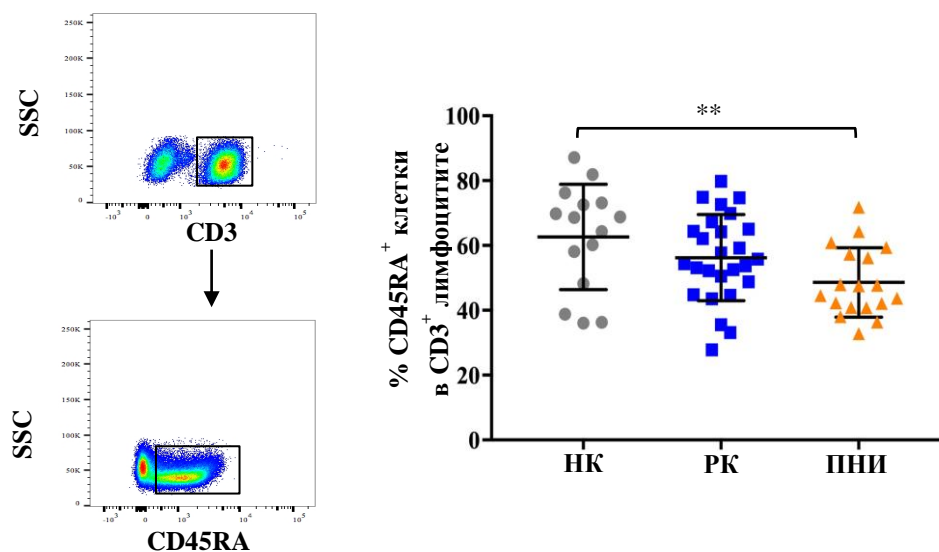


Фиг. 4. Количествен анализ на sjTRECс. Изследването на посттимусната пролиферация чрез sjTRECс се осъществи върху 48 лица от трите групи. Сравнителният анализ разкри значително по-високи нива при НК (n= 12; p= 0.01) и ПНИ (n= 15; p= 0.03) спрямо тези на РК (n= 21). На дот плот графиката са представени медианата и обхвата. За сравнението между групите беше използван непараметричен post-hoc Dunn тест (Kruskal-Wallis). p< 0.05 = *; p< 0.01 = **; p< 0.001 = ***

Скорошно публикувани данни разкриват кога може да са настъпили тези промени при РК. При проследяване на количеството на sjTRECс при бременни и небременни здрави жени не са открити количествени различия между групите (Hellberg et al., 2019). От това следва, че получените резултати за sjTRECс в групата на РК имат отношение към процесите настъпили след раждането. Една от възможните причини е свързана със създаването на „памет“ по време на 1-вата бременност (Lissauer et al., 2012; Loewendorf et al., 2014; Rowe et al., 2012; Ruocco et al., 2014). За да разберем дали това твърдение е достоверно, направихме детайлно разглеждане на групата от РК, която бе съставена от жени с едно или повече от едно раждания. При последвалия сравнителен анализ не установихме различия в стойностите на sjTRECс и процента на CD45RA⁺Т-клетките независимо от броя на ражданията. Според това, може да кажем, че първата бременност оказва най-силно влияние върху Т-клетъчната популация, която впоследствие благоприятства развитието на последваща бременност.

Пациентките се отличаваха с понижен процент на наивната CD3⁺ T-клетъчна фракция

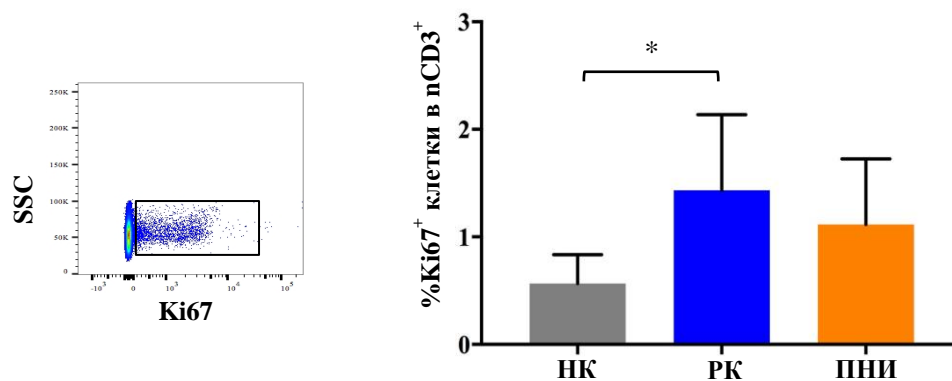
За да потвърдим получените данни за sjTRECс, направихме допълнителен анализ на CD45RA⁺CD3⁺ клетките (nCD3), тъй като те са носители на най-много TREC молекули в периферията. Най-висок процент на nCD3⁺ беше отчетен в групата на НК [ср.ст. ± SD; 62.7 ± 16.2%], докато пациентките се отличаваха с много по-ниски стойности от останалите две групи (48.6 ± 10.7%). Интересен резултат установихме за РК, при които процентът на nCD3⁺ (56.2 ± 13.0%) беше по-нисък от този на НК, но по-висок спрямо пациентките. Сравнителният анализ между групите показва статистически значими различия между ПНИ и НК (p= 0.004), (фиг.5). Получените данни показаха несъответствие между високите нива на sjTRECс и процента на nCD3⁺ при ПНИ. При РК също не установихме връзка между понижените нива на sjTRECс и липса на промяна в процента nCD3⁺ клетките. С цел да изясним на какво може да се дължат тези разминавания в отделните групи, се насочихме към анализ на пролиферативната активност на наивните CD3⁺T-клетки.



Фиг. 5. Флоуцитометрично изследване на nCD3. Определените CD45RA⁺ клетки в CD3⁺ (nCD3) - лимфоцити, бяха сравнително повече при НК (n=15) спрямо останалите две групи. Въпреки това, статистически достоверна разлика имаше само с ПНИ (n= 18; p= 0.004), но не с РК (n= 26; p> 0.05). На дот плот графиката всяка група е представена със ср.ст. ± SD. За изследване на различията беше приложен параметричен post-hoc LSD тест (One-way ANOVA). p< 0.05 = *; p< 0.01 = **; p< 0.001 = ***

Пролиферацията на наивните T-клетки е основният механизъм за поддържане на T-клетъчната популация в периферията, но е и от важно значение при изграждане на адаптивен имуен отговор. Именно поради тази причина потърсихме подходящ маркер

за изследване на пролиферацията на Т-клетките в периферията при малка група изследвани лица. Използвахме Ki67, който участва в организирането на хромозомите по време на митозата т.е. отразява клетките в цикъл на делене. Анализът на получените резултати показва различия в процента на Ki67⁺ клетки в CD3⁺CD45RA⁺ популацията между двете контролни групи от здрави лица. От тях със значително по-високи стойности бяха раждалите здрави жени [РК: n=7; 1.43 ± 0.70%, НК: n=5; 0.57 ± 0.27% (p= 0.02)]. Този резултат бе очакван от нас и напълно съответства на стойностите за sjTRECs и nCD3⁺. При ПНИ (n=5), въпреки по-ниските стойности за Ki67⁺nCD3 (1.16 ± 0.57%) не открихме статистическа разлика в сравнение с РК (Фиг. 6).



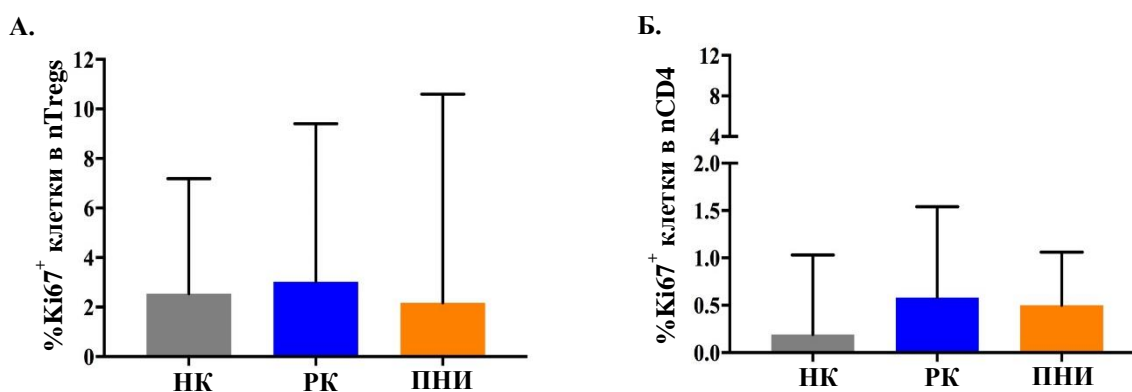
Фиг. 6. Количествено проследяване на пролифериращите nCD3⁺Т-лимфоцити. Изследването беше осъществено върху 17 лица от трите групи. Процентът на Ki67⁺ клетки в CD3⁺CD45RA⁺ Т-лимфоцити в групата на РК (n= 7) беше значително по-голям от този в НК (n= 5), но не и спрямо ПНИ (n= 5). Стойностите на фигурата са представени като ср.ст. ± SD, докато за сравнителния анализ използвахме post-hoc LSD тест (One-way ANOVA). p< 0.05 = *; p< 0.01 = **; p< 0.001 = ***

При проследяване на промените възникнали при лица, с направена тимектомия в ранна детска възраст, са установени много ниски стойности на sjTRECs и nCD4, което се обяснява с високата хомеостатична пролиферация на Т-клетките. Това явление е свързано с наличието на компенсаторен механизъм за осигуряване на достатъчно количество наивни Т-клетки в периферията за по-дълъг период от време, поради липсата на продукция на нови клетки (Gudmundsdottir et al., 2016; Silva et al., 2017). Следователно, пониженото количество на sjTRECs може да бъде свързано с усилена пролиферация в периферията. По този начин може да обясним високия процент nCD3⁺Ki67⁺ клетки в цикъл на делене и ниските стойности на sjTRECs при раждалите контроли, което свидетелства за повишена пролиферативна активност в периферията при тях. В същото време, при пациентките наблюдаваме съвсем различна динамика на получените резултати - високи стойности на sjTRECs и понижен процент на nCD3 без да е отчетена значителна промяна на Ki67⁺ клетките в тях.

Раждалите контроли се отличаваха с повишен процент на Ki67⁺ в конвенционалните и регулаторни nCD4⁺ T-клетки

В следващата стъпка се насочихме към изясняване на това, дали различията отчетени до този момент в групата на пациентките имат отношение и към периферната пролиферация на nTregs и nCD4. Анализът на Ki67⁺- клетките, в състава на nTregs, показва най-високи стойности в РК [медиана (обхват): 3.02% (1.28 - 3.45)]. Нераждалите контроли и пациентките бяха със сравнително еднакви показатели [ПНИ: 2.17% (0.53-10.6); НК: 2.54% (0.69 - 7.19)], (Фиг. 7 А). При изследването на nCD4 установихме двойно по-нисък процент на Ki67⁺ клетките в групата на НК [Ki67⁺ nCD4 - 0.19% (0.16 - 1.03)] в сравнение с РК [0.58% (0.29 - 1.54)] и ПНИ [0.5% (0.21 - 1.06)], (Фиг. 7 Б). Въпреки това, приложеният статистически анализ не показва значими различия между изследваните групи.

Вероятно, отчетените ниски стойности на sjTRECs при раждалите контроли имат отношение към повишения процент на пролифериращите клетки в тях. На този етап може да предположим, че съществува механизъм отговорен за поддържането на определено количество nTregs и nCD4 в периферията, което при пациентките е нарушено. В търсене на отговори в подкрепа на тази хипотеза се насочихме към изследване на вероятните фактори имащи роля с възникването на тези промени.



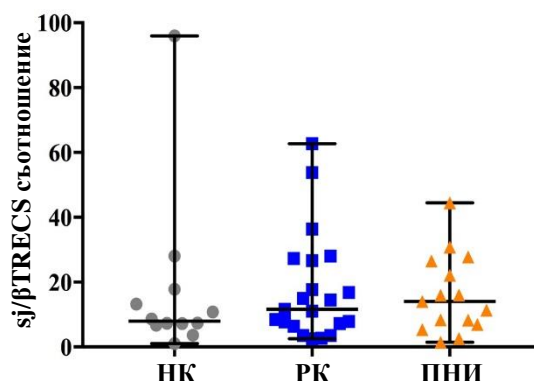
Фиг. 7. Анализ на Ki67 в nTregs и nCD4. Най-високи стойности на Ki67⁺ и в двете популации CD4⁺T-клетки бяха отчетени в групата на раждалите жени (n=7). В сравнение с тях, НК (n=5) се отличаваха с по-високи стойности на Ki67⁺ nTregs спрямо ПНИ (n=5) (А.), но не и за nCD4⁺ (Б.). Приложен тест при сравнителния анализ: непараметричен post-hoc Dunn тест (Kruskal-Wallis). Представените графики отразяват медианата и съответно обхващат на изследваните проби в отделните групи. p< 0.05 = * p< 0.01 = ** p< 0.001 = ***

Повишена тимусна функция при пациентките

Производството на нови Т-лимфоцити от тимуса е една възможна причина за получените несъответствия в изследваните групи. Поради това, направихме изследване върху тимусната функция, за да установим до каква степен има отношение в отчетените от нас различия в периферията. За проследяване на интратимусната пролиферация, която дава информация и за приблизителния експорт на нови Т-клетки използвахме S β TRECs съотношението. В случая беше необходимо да изследваме продуктите, получени не само от пренареждането на α -веригата (sjTRECs), но и тези на β -веригата (DJ β TRECs). Анализът на sj/ β TRECs показва хетерогенно разпределение и в трите групи. За наша изненада установихме високи стойности при ПНИ [n=15; медиана (обхват): 15.98 (1.46-44.5)], докато в групата на НК бяха най-ниски [n=12; 7.98 (1.04-96.0)]. Въпреки двойно завишените нива на sj/ β TRECs, не открихме статистическа достоверност между тях. Вероятно обяснение на този резултат са големите индивидуални различия на всяка една проба, влизаща в състава на отделните групи. При РК, sj/ β TRECs съотношението [n=21; 11.0 (2.54-63.0)] беше с по-високи стойности спрямо НК, но по-ниски от тези на ПНИ (Фиг. 8). От събраните при проучването върху S β TRECs данни може да предположим, че при пациентките се наблюдава повишена тимусна функция в сравнение с НК. Друга възможност е промените при ПНИ да не са свързани с нарушена тимусна функция, а на събития случващи се в периферията. Това твърдение се подкрепя от факта, че след пубертета целостта и обема на популацията от наивни Т-клетки в периферията зависи предимно от хомеостатичната пролиферация, като производството на нови клетки от тимуса заема незначителна част в тези процеси (Goronzy et al., 2015).

Един неразкрит до този момент казус, който буди интерес е ролята на тимуса по време на бременността. До този момент, не са установени промени в нивата на скорошните тимусни емигранти (RTE) при бременни жени, независимо от принадлежността им като регулаторни или конвенционални Т-лимфоцити (Hellberg et al., 2019; Shah et al., 2017; Shigeta et al., 2020). Получените от нас данни при изследването на sj/TRECs съотношението не показаха количествени отклонения в групата на РК. Така,

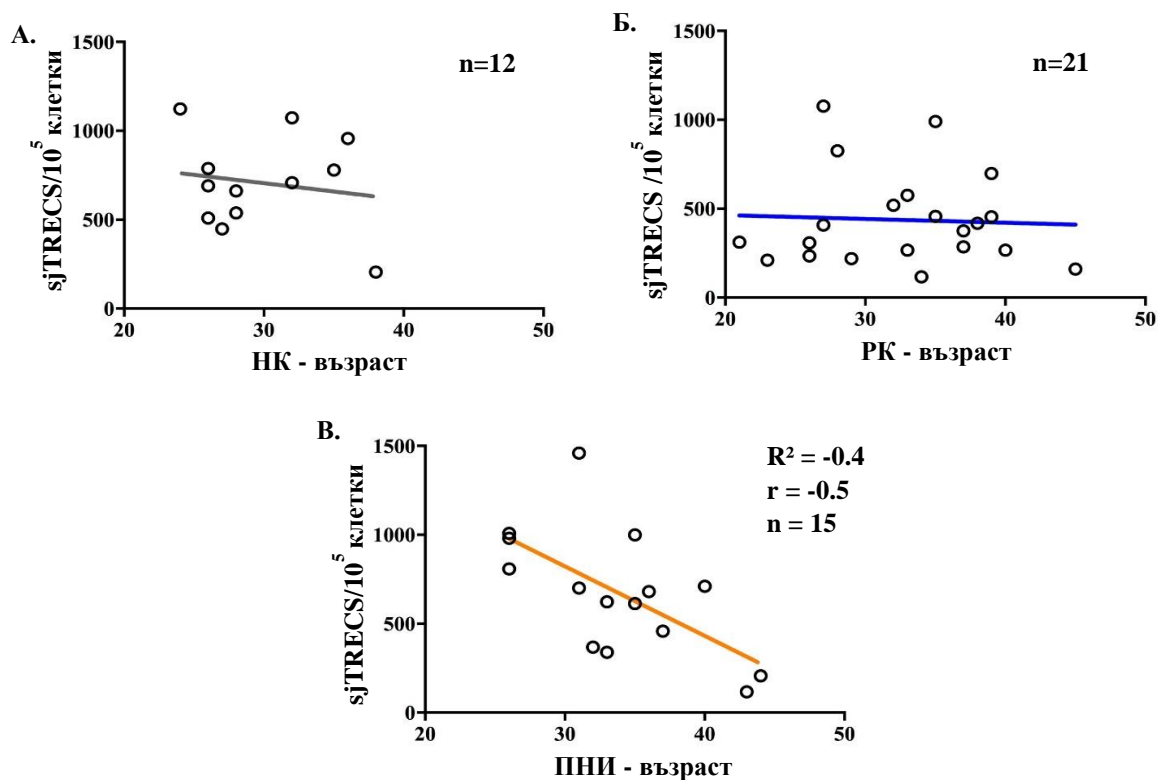
може да се предположи, че на този етап липсват конкретни доказателства за настъпили дълготрайни изменения в тимусната функция в резултат от бременността.



Фиг. 8. Изследване върху тимусната функция чрез анализ на $sj/\beta TRECS$ съотношението. На фигурата е показано количественото разпределение на $sj/\beta TRECS$ съотношението в отделните групи. Не установихме значителни разлики по този показател. Статистически анализ: post-hoc Dunn тест (Kruskall- Wallis).

Повишена тимусна функция с възрастта при нераждалите жени.

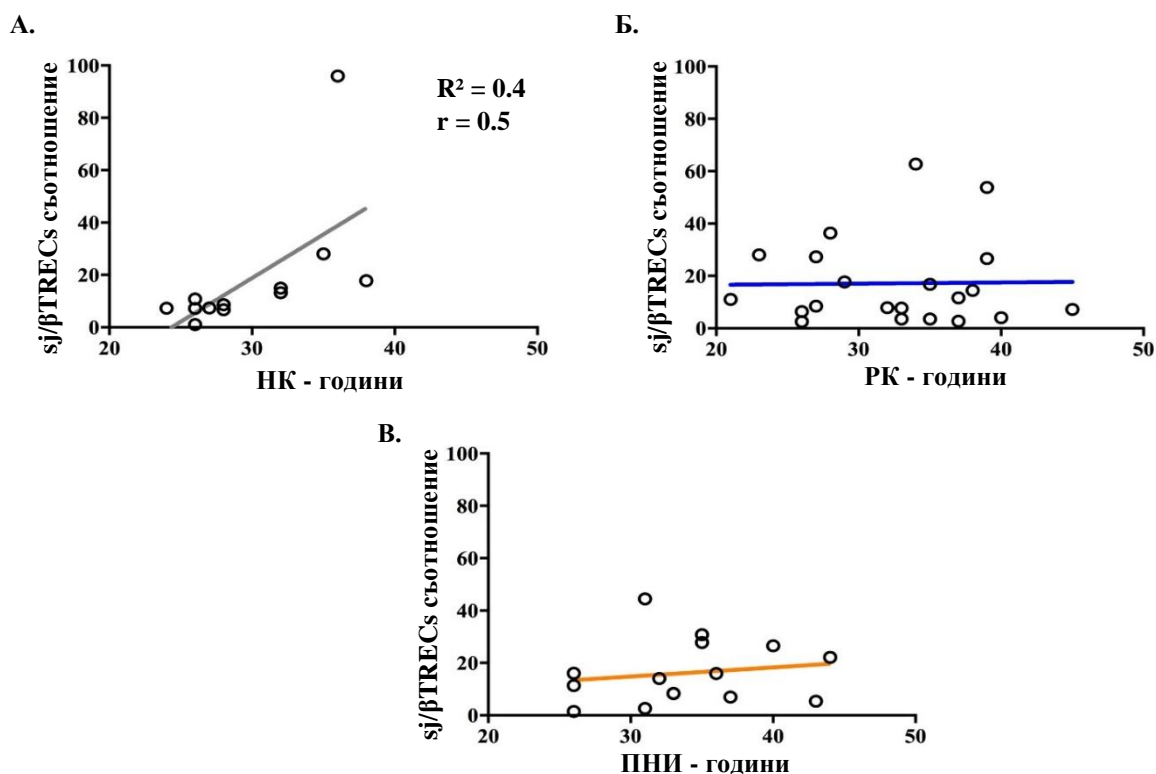
Тимусната инволюция е основен белег с нарастване на възрастта. Тя се изразява в понижаване на продукцията на нови клетки. За да разберем дали тази зависимост има отражение върху изследваните от нас групи, направихме проучване на зависимостта между възрастта на включените в проучването лица и нивата на $Sj/\beta TRECS$ в тях. Статистическата обработка на данните показва позитивна корелационна зависимост в групата на НК ($R^2 = 0.4$; $r = 0.53$), но не и в останалите две групи (Фиг.9). Тези данни дават основание да смятаме, че тимусната функция при НК има различен ход на развитие с годините, вземайки под внимание краткия времеви интервал на възрастта на изследваните лица. Проучването върху инратимусната пролиферация като оценка на тимусната функция показва, че вероятно тя има отношение към количеството на Т-клетките в периферията в изследваните групи. Ако при НК тя е възрастово зависима, то при ПНИ е възможно да допринася за установените различия в периферията при тях.



Фиг. 9. Възрастово разпределение на sj/ β TRECs съотношението в отделните групи. При НК беше установено повишаване на sj/ β TRECs с възрастта (Spearman's correlation test $p=0.002$; регресионен анализ $p=0.04$; А), докато в останалите две групи не се наблюдаваше подобна асоциация ($p>0.05$; Б, В). Забележка: на фигурата са включени само стойностите със статистическа значимост- $p<0.05$.

sjTRECs намаляват с възрастта в групата на пациентките

Понижената продукция на новоситезирани Т-клетки от тимуса след пубертета е съпроводена с ускорената постстимулна пролиферация. Това се отразява негативно върху количеството на sjTRECs в периферията. Затова, се насочихме към анализ на промените настъпили с възрастта в изследвани групи. В нашето проучване за sjTRECs всички участници са жени в полово зряла възраст между 20 - 45 години, като средната възраст по групи бе следната: ПНИ - 33.9 ± 5.7 ; НК - 29.8 ± 4.6 ; ЗК - 32.5 ± 6.2 . От събраните след статистическата обработка данни, представени на фигура 10, се наблюдава ясно изразена негативна корелация между възрастта на ПНИ и количеството на sjTRECs ($R^2 = -0.4$, $r = -0.5$), (Фиг. 10 В). И в двете контролни групи не намерихме подобна асоциация между изследваните величини.



Фиг. 10. Количествено разпределение на sjTRECS с възраст. В контролните групи не открихме зависимост спрямо възрастта и sjTRECS (А, Б; $p > 0.05$). За разлика от тях в групата на пациентките установихме корелационна зависимост (Spearman's' correlation test $p = 0.001$), която беше потвърдена от допълнително направен регресионен анализ ($p = 0.01$; В).

Литературни източници твърдят, че жени след 35 годишна възраст имат значително по-ниски шансове за забременяване след прилагане на АРТ процедури в сравнение с по-млади представителки (Tan et al., 2014). Това ни даде основание да предположим, че възрастта може да има отношение с неуспешните ин-витро интервенции или способността за задържане на бременността в 1-вия триместър. При детайлно разглеждане на лицата включени в изследването за sjTRECS, впечатление прави високата средна възраст при ПНИ спрямо тази на НК. Освен това, само при пациентките беше отчетена негативна корелация на нивата на sjTRECS с възрастта. Полученият резултат беше неочакван за нас, поради наличието на данни за плавно понижаване на стойностите на sjTRECS след пубертета в периода между 20-60 години (Pido-Lopez et al., 2001; Steffens et al., 2000), докато лицата включени в проучването бяха на възраст между 25-42 години. Важно е да отбележим, че голяма част от участниците в групата на пациентките са под ≤ 35 ($n=10$; 65 %). Това предполага, че установените различия в периферията вероятно придобиват по-изразителен ефект с възрастта. Това се допълва и от липсата на възрастова зависимост при изследване на тимусната функция,

определена с помощта на sj/ β TRECs съотношението. Получените резултати ни провокираха да потърсим обяснение на това дали тези различия са съпроведени или са в резултат от промени настъпили в популацията на Т-клетките в периферията.

Понижен процент на EZH2 експресиращите Т-клетки в групата на пациентките

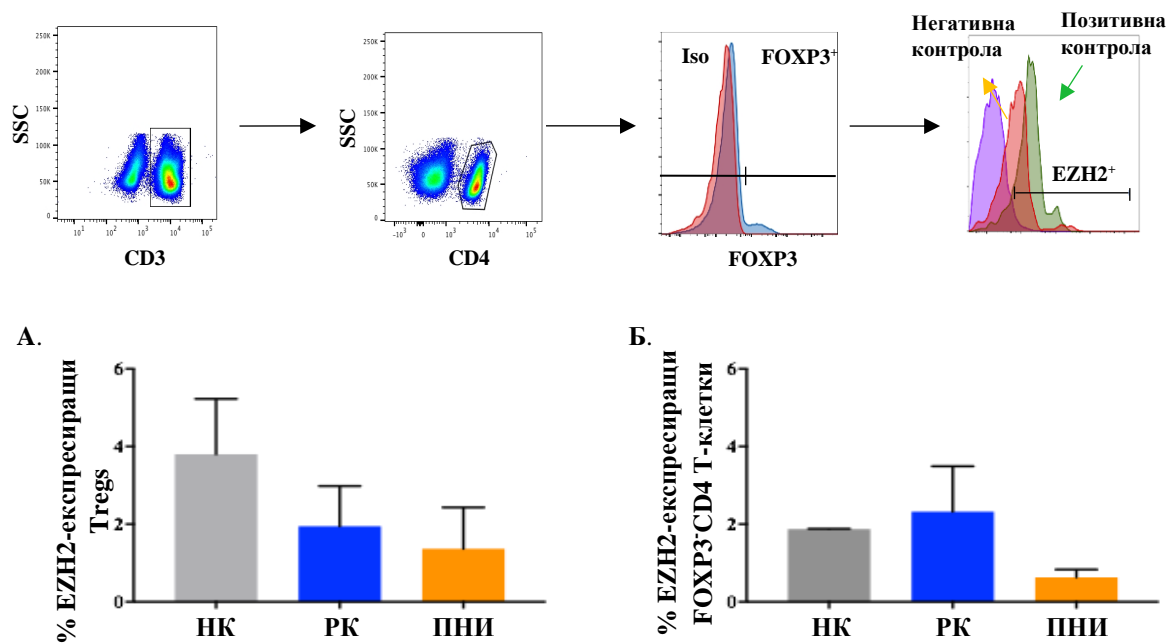
Активирането на Т-лимфоцитите под въздействие на различни дразнители води до вътреклетъчни конформационни промени свързани с модифициране на хистоновите структури в тях. Основна роля в тези процеси има метилтрансферазата – EZH2. Благодарение на каталитичната ѝ активност в структурата на PRC2 комплекса, тя участва в поддържането на основните функционални особености на регулаторни и конвенционални Т-клетки. Участва в индуцирането и поддържането на Treg популацията в периферията (DuPage et al., 2015; Yang et al., 2015). Функционалната активност на Tregs е пряко свързана с координираното действие на EZH2 и FOXP3. В зависимост от нуждите на клетките те действат заедно или поотделно, за да осигурят правилната регулация на основните и специфичните за Tregs клетъчни процеси (Hou et al., 2019).

С помощта на PrimeFlow¹, успяхме да проследим експресията на EZH2 на ниво единична клетка. PrimeFlow съчетава в себе си DNA-branch технологията и флоуцитометрия, поради което за изпълнението му се изисква използването на голям брой клетки. Затова, текущото проучване беше осъществено върху ограничен брой лица.

Анализът на получените данни установи наличие на EZH2 експресиращи (FOXP3⁺CD4⁺) Treg клетки в трите изследвани групи (Фиг. 11). От тях, с най-високи стойности на EZH2mRNA⁺ Tregs се отличаваха здравите нераждали контроли [НК: (ср.ст. \pm SD) $3.8 \pm 1.4\%$; РК: $1.9 \pm 1.0\%$; ПНИ: $1.4 \pm 1.0\%$; (Фиг.11 А)]. Впечатление правят двойно по-високите стойности при НК в сравнение с пациентките. В изследването не беше приложен сравнителен анализ за отчитане на статистически достоверни различия, поради малкия брой на пробите в групите, което може да повлияе върху отчетените резултати.

¹ Програма за подпомагане на млади учени и докторанти на БАН - ДФНП 174/2016 г.: “Значение на EZH2, основен протеин на поликомб комплекса, за епигенетичната регулация на FOXP3”

С цел да проверим дали намерените раличия при ПНИ са свързани само с Tregs, изследвахме процента на EZH2mRNA⁺FOXP3⁻CD4⁺T-клетките. Сравнителният анализ между групите показва по-нисък процент при ПНИ ($0.6 \pm 0.2\%$) в сравнение с РК ($2.3 \pm 1.2\%$), но не и спрямо НК ($1.9 \pm 0.1\%$) (Фиг.11 Б). Това предполага различна функционална активност на регулаторните и конв. Т-клетки. За да подкрепим това твърдение се насочихме към изследване на промените настъпили в експресията на EZH2 в ин-витро стимулационенни модели.



Фиг. 11. **EZH2-експресиращи регулаторни и нерегулаторни Т-клетки.** В горната част от фигурата е представена последователността на анализа. Tregs бяха определени като FOXP3⁺, а конвенционалните Т-клетки като FOXP3⁻ в CD4⁺ лимфоцитите. В тях анализирахме количеството на клетките експресиращи EZH2. Въпреки малкия брой изследвани лица, бяха установени разлики в процента на EZH2mRNA⁺ Tregs (А.) и конв. Т-клетки (В.) при пациентките (n= 3) спрямо контролните групи (НК: n= 2; РК: n= 6). Представените стойности на графиките са със ср.ст. \pm SD.

Повишена експресия на EZH2 и FOXP3 в групата на раждалите контроли.

Култивирахме свежо изолирани ПМНК в хранителна среда, в която клетките престояха една вечер, преди да бъдат добавени стимулиращите фактори- анти-CD3/CD28 магнитни бидчета, прогестерон (P4). Предприехме тази стъпка, за да елиминираме ефекта от други разтворими фактори, които могат да окажат влияние върху проучването. Целта на експеримента беше да проследим промените в експресионните нива на EZH2 след активация през TCR. Наличието на данни, свързани с кооперативния модел на действие на EZH2 и FOXP3 в Tregs, ни провокира да

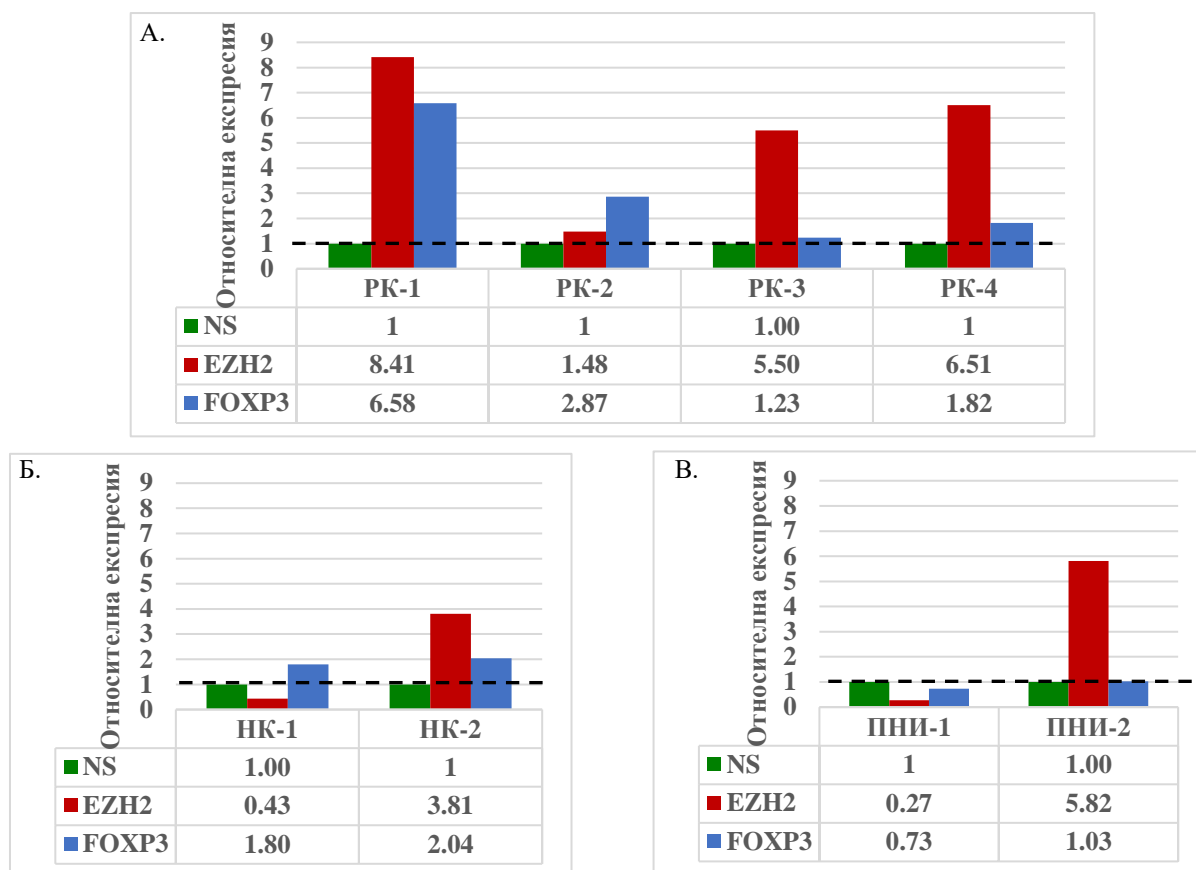
изследваме генната експресията и на двата белтъка. Периодът на инкубация от 48 часа беше съобразен с предишни наши изследвания, както и с протокола на производителя за активация на Т-клетките. Настъпилите промени отчетохме като разлика спрямо контролна проба от същото лице без стимулиращи фактори. В настоящото проучване използвахме осреднени стойности от изработените в две повторения проби.

Получените резултати показаха различна динамика в изследваните групи. Три от лицата включени в групата на РК, се отличаваха с повишени експресионни нива на *EZH2* и *FOXP3* в присъствието на стимулиращи фактори спрямо контролната проба (Фиг. 12 А). За разлика от тях, в групата на НК подобни промени бяха отчетени само за *FOXP3*, докато в една от изследваните проби се наблюдаваше повишение на *EZH2* (НК-2) (Фиг. 12 Б). При пациентките не беше установена промяна в експресията на *FOXP3*, докато такава имаше за *EZH2* (Фиг.12 В).

Намерените от нас данни показват, че при прилагането на активационния модел върху ПМНК изолирани от РК, настъпват промени в генната експресия на *EZH2* и *FOXP3*, в резултат от постъпили стигнали през TCR. В същото време, липсата на промяна в експресията на *FOXP3* при ПНИ в сравнение с НК, предполага различна динамика на Т-клетъчния отговор. От това следва, че намерените на този етап резултати за *EZH2* в групата на пациентките, вероятно се дължат на качествени промени в Tregs, които имат отношение за тяхната активация, но също така и на способността им да запазят своята клетъчна идентичност. Това би създавало предпоставки за възпрепятстване на изграждането на контролиран имунен отговор при динамични промени в условията на средата. Това твърдение се допълва от големия брой литературни източници, които показват превалиращи про-инфламаторни Т-клетъчни популации при жени с репродуктивни неуспехи за сметка на количествени и качествени промени в Treg (Azad et al., 2017; Schlossberger et al., 2013; Wang et al., 2017; Zhou et al., 2012).

В сравнение с останалите групи, раждалите контроли се отличават с различна кинетика на Т-клетъчния имунен отговор. В потвърждение на това твърдение са публикуваните данни от други автори, които показват чувствително по-висока Т-клетъчна пролиферация при раждали в сравнение с нераждали жени след използване на фитохемаглутинин (РНА) (Groer et al., 2005; Matthiesen et al., 1996). Освен това, в настоящото проучване установихме повишен процент на $Ki67^+$ и $EZH2mRNA^+$ в конв.

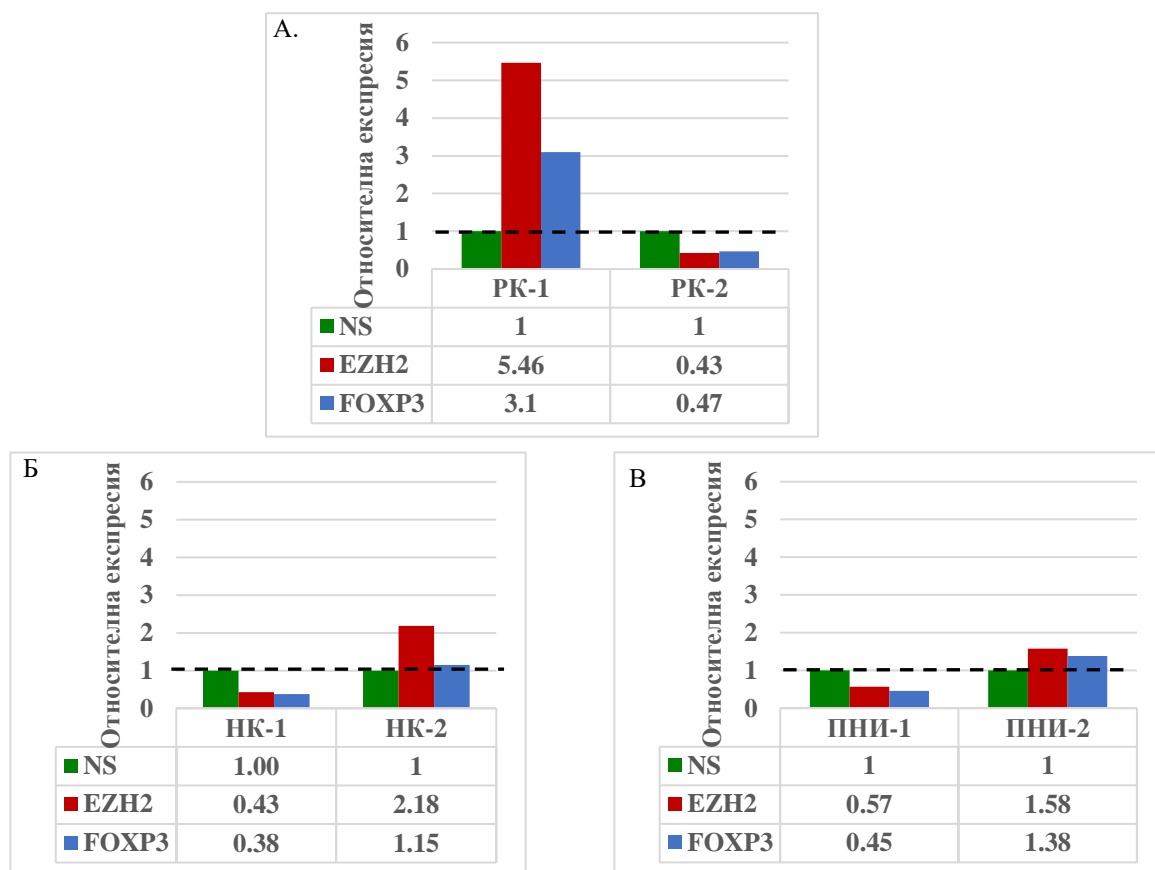
T-клетки в групата на РК спрямо НК. Така, нашите данни предполагат настъпили качествени и количествени изменения в периферията при РК.



Фиг. 12. Ин-витро активационен модел през TCR за проследяване на промените настъпили в експресията на *EZH2* и *FOXP3* при РК (n=4; А.), НК (n=2; Б.) и ПНИ (n=2; В.) С черната пунктирна линия е отбелязано нивото на нестимулираната контрола (NS- в зелено) спрямо която са отчетени промените в експресионните нива на *EZH2* (в червено) и *FOXP3* (в синьо).

В следващия етап направихме допълнително изследване за вероятното директно ендокринно действие върху експресията на *EZH2* и *FOXP3* в ПМНК. В използвания от нас ин-витро модел се спряхме на стероидния хормон - прогестерон (P4), тъй като той повишава експресията на *FOXP3* и има важна имуномодулаторна роля по време на бременността. Поради тези причини, за нас беше интересно да проследим до каква степен присъствието на P4 ще се отрази върху периферните T-клетки. В допълнение, направихме пилотно изследване върху здрави жени с възходящо покачване на концентрацията на P4. Получените резултати показаха най-голям ефект при 10 нг/мл., в резултат на което използвахме тази концентрация и за останалите изследвани групи. Само при една от здравите раждали контроли се наблюдаваше значително повишена генната експресия и на *EZH2*, и на *FOXP3* (Фиг. 13 А; РК-1). За сравнение, при НК се

отличаваше проба с повишена експресия на *EZH2*, но не и на *FOXP3* (Фиг.13 Б; НК-2). Не установихме положителна промяна на изследваните гени в групата на пациентките. За наша изненада, присъствието на Р4 в средата имаше и инхибиращ ефект върху експресия на изследваните от нас гени при три лица независимо от груповата им принадлежност (РК-2; НК-1; ПНИ-1), което вероятно се дължи на индивидуални различия, имащи отношение към получените резултати (Фиг. 13).



Фиг.16. Проследяване на генната експресия на *EZH2* и *FOXP3* след ин-витро стимулиране с Р4 в концентрация от 10 нг/мл. при РК (n=2; А.), НК (n=2; Б.) и ПНИ (n=2; В.)

Едно вероятно обяснение за намерените от нас данни за повишените нива на Р4 при РК-1 са свързани с придобиване на по-висока чувствително към хормона по време на бременността Т-клетките. Тази хипотеза намира опора при проследяване на серумните нива на стероидните хормони при бременни раждали жени спрямо нераждали, където са установени по-ниски стойности при първите (Schock et al., 2016; Toriola et al., 2011). Също така, високата експресията на *FOXP3* при РК-1 потвърждава индиректното имуномодулаторно действие на хормона чрез Tregs. В зависимост от това, може да

предположим участието на ендокринната система в контрола на имунния отговор при раждалите контроли.

Събраните данни показват, че при раждалите жени се наблюдават понижени стойности на sjTRECs, повишен процент на пролифериращите конв. и регулаторни T-клетки. Твърде вероятно е тези промени да са свързани с действието на ендокринните фактори през бременността. В сравнение с тях, при пациентките с неизяснен инфертилитет бяха установени високи нива на sjTRECs и ниски на pCD3. Успоредно с това бяха отчетени понижени стойности и функционални различия в pTregs и pCD4(FOXP3⁺) T-клетките. Тези данни насочват към базови отклонения в имунния толеранс в периферията.

Получените от нас резултати предоставят интересни доказателства и различна гледна точка върху процесите свързани с поддържане на имуен толеранс в периферията. С развитието на методологичните подходи е твърде вероятно да наблюдаваме нови и интересни разкрития в областта на репродуктивната имунология. По-доброто разбиране на фундаменталните процеси застъпени в развитието на нормална бременност биха увеличили шансовете за разкриване на последователността от събития водещи до развитието на неизяснен инфертилитет и спонтанни аборти в 1-вия триместър. Това би подпомогнало намирането на подходи при превенцията и лечението на тези неразкрити до този момент процеси.

Изводи

1. Популацията на естествените регулаторни CD4⁺ Т-клетки е намалена при жени с неизяснен инфертилитет.
2. При пациентките, процентът на наивните Т-клетки (nCD3; nCD4) в периферна кръв е понижен.
3. Значително по-ниските нива на sjTRECs, заедно с повишените Ki67⁺nCD3 клетки в групата на раждалите контроли показва променена посттимулна пролиферация на Т-лимфоцитите в сравнение с нераждалите жени.
4. При пациентките с неизяснен инфертилитет се наблюдава понижаване на sjTRECs нивата с нарастване на годините, докато при нераждалите контроли положителна корелация на възрастта с sj/β TRECs.
5. Пациентките с неизяснен инфертилитет показват по-ниски стойности на EZH2-експресиращите регулаторни и не-регулаторни Т-клетки.
6. Ин-витро Т-клетъчният активационен модел показва, че ендокринната среда може да промени генната експресия на *EZH2* и *FOXP3* при раждалите жени.

Приноси на дисертационния труд

- ❖ Представени са доказателства за нарушен Т-клетъчен имуноен толеранс при жени с неизяснен инфертилитет, включително тези с повтарящи се спонтанни аборти.
- ❖ Използваният алгоритъм за фенотипен анализ на nTregs може да бъде използван с диагностична цел при жени с репродуктивни неуспехи от неизяснен характер.
- ❖ Получени са оригинални данни за периферната и интратимусната пролиферация посредством количествено измерване на TREC молекулите в периферна кръв при раждали жени и пациентки с неизяснен инфертилитет.
- ❖ Представени са доказателства, които подкрепят хипотезата за настъпили дълготрайни изменения в периферната Т-клетъчна популация в резултат от бременността.
- ❖ Въведен е нов методологичен подход за анализ на генната експресия на ниво единична клетка, базиран на флоуцитометрия и DNA-branch технологията.

Списък на научните статии свързани с дисертационния труд

1. **Velichkov**, R. Susurkova, I. Antonova, I. Manoylov, G. Nikolov, V. Terzieva. Gender associated variations in human peripheral T- regulatory cells. "Proceeding of the Bulgarian Academy of Sciences", 2015, 68, 6, 775 – 782. IF: 0.284
2. **A. Velichkov**, R. Susurkova, A. Mihova, M. Muhtarova, M. Guenova, I. Antonova, G. Nikolov, V. Terzieva. Late post-pregnancy modifications in the subset of peripheral natural T regulatory cells in healthy women, submitted. Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy. 2019, 38, 3, 114-119. DOI: 10.1089/mab.2019.0007 IF : 1.38

Списък с участия на научни форуми във връзка с дисертацията

Участие в научни форуми на постерна сесия:

1. **A. Velichkov**, M. Popova, N. Mihaylova, G. Nikolov, V. Terzieva. Reduced frequency of nTregs in patients with reproductive failure. 6th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2014) 26 - 29 September 2014. Timisoara, Romania.
2. **A. Velichkov**, M. Popova, N. Mihaylova, G. Nikolov, V. Terzieva. Analysis of regulatory T-cells in women with reproductive failure. IVth National Congress of Immunology 2 – 5 October 2014, Golden Sands, Varna, Bulgaria.
3. **Velichkov A**, Susurkova R, Manoylov I, Antonova I, Nikolov G, Terzieva V.: Human natural regulatory T cells exhibit gender-associated variations.. 4th European Congress of immunology, September 6-9,2015, Vienna, Austria, P.A.25.11.
4. **Velichkov A**, Susurkova R, Mihova A, Muhtarova M, Guenova A, Antonova I, Nikolov G, Terzieva V: Analysis of FOXP3 expression in women with reproductive failure. 15th International symposium for Immunology of Reproduction, June 15-17, 2018, Varna, Bulgaria, P1.

Участие в научни форуми с устна презентация:

1. **Velichkov A**, Susurkova R, Manoylov I, Antonova I, Nikolov G., Terzieva V. : Analysis of natural regulatory T-cells in women with reproductive failure 14th International Symposium for Immunology of Reproduction "Progress in Reproductive Immunology", 22–24 May 2015 SOP-4, Varna, Bulgaria, Published in American Journal of Reproductive Immunology, 2015, 73, S1,1–22; <https://doi.org/10.1111/aji.12383>.
2. **Velichkov A**, Susurkova R, Mihova A, Guenova A, Antonova I, Nikolov G, Terzieva V: Analysis of EZH2 expression in regulatory T cell.s 14th European Congress of Reproductive Immunology, 28 September-2 October 2017, Kos Island, Greece, published in J Reprod Immunol, 122(2017) p.37, O6. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.07.009>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята искрена благодарност и признателност към научния си Ръководител Доц. д-р Велислава Терзиева за проявеното търпение, разбиране и доверие. Благодаря за ценните напътствия, компетентото мнение, предадения практически опит и подкрепа при разработването и осъществяването на дисертационния труд.

Изключително съм благодарен на д-р Георги Николов и Искра Антонова (МЦ “Репробиомед“) за сътрудничеството и предоставените материали.

Специални благодарности на Проф. д-р Маргарита Генова, д-р Мария Мухтарова и Антоанета Михова (НСБАЛХЗ), на Проф. Георги Милошев и гл. ас. д-р Десислава Станева (ИМБ – БАН) за професионалното отношение по време на съвместната ни работа.

Благодаря на всички колеги от ИБИР-БАН за съветите, препоръките и позивитизма.

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

Искрено благодаря на Румяна Сусуркова за помощта, всеотдайната работа и приятелско отношение.

Не на последно място искам да Благодаря на родителите си, моят спътник в живота Ивка, и всички мои приятели за търпението, подкрепата и вярата в мен.

Дисертационният труд е изработен с финансовата подкрепа на:

Проект № ДН03/4-2016 на Фонд "Научни изследвания., Република България, с ръководител Доц. д-р Велислава Терзиева, дм.

Персонален грант предоставен от Европейската федерация на имунологичните дружества- Immunology letter (EFIS-IL) – 2015 год.

Проект № ДФНП 174 по „Програма за подпомагане на младите учени в БАН –2016 г.“ (МОН) с ръководител Андрей Величков.