



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

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

Секция „Имунобиология на размножаването”

Антония Илиева Терзиева-Караиванова

**РОЛЯ НА $\gamma\delta$ Т КЛЕТКИТЕ ПО ВРЕМЕ НА
БРЕМЕННОСТТА ПРИ ЖЕНАТА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен „**Доктор**”

**Научна специалност: Имунология
шифър 01.06.23**

Научен ръководител: *доц. д-р Тая Димова*

СОФИЯ, 2019



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

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

Секция „Имунобиология на размножаването”

Антония Илиева Терзиева-Караиванова

**РОЛЯ НА $\gamma\delta$ Т КЛЕТКИТЕ ПО ВРЕМЕ НА
БРЕМЕННОСТТА ПРИ ЖЕНАТА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен „**Доктор**”

**Научна специалност: Имунология
шифър 01.06.23**

Научен ръководител: *Доц. д-р Таня Димова*

СОФИЯ, 2019

Дисертационният труд е написан на 123 страници, илюстриран е с 32 фигури и 2 таблици. Библиографията включва 294 литературни източника, всички на латиница.

Защитата 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:

Вътрешни членове:

доц. д-р Велислава Терзиева

доц. д-р Таня Димова

доц. Павел Рашев (резервен)

Външни членове:

проф. Анастасия Михайлова (Медицински Университет, София)

проф. д-р Мария Николова (НЦЗПБ, София)

проф. д-р Искра Алтънкова (Медицински факултет, СУ, София)

доц. д-р Анастас Пашов (Институт по микробиология, БАН, София) (резервен)

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, гр. София, бул. „Цариградско шосе“ №73, както и на интернет страницата на ИБИР (<http://ibir.bas.bg>)

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

Съдържание

I. УВОД	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	6
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	8
V. ИЗВОДИ	33
VI. ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	34
VII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ СТАТИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА	34
VIII. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА	34

Използвани съкращения на български език:

АПК - антиген - представящи клетки
БЦЖ - "Бацил на Калмет-Герен"
ДМК – децидуални мононуклеарни клетки
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
кДНК - комплементарна дезоксирибонуклеинова киселина
ПМК – периферни мононуклеарни клетки
РНК - рибонуклеинова киселина

Използвани съкращения на английски език:

CD - Cluster of differentiation; клъстер на диференциация
CDR - complementary-determining region; комплементарност-определящ регион
EVT - Extravillous trophoblast; екстравилозен трофобласт
HLA – Human Leukocyte Antigen; Човешки лейкоцитен антиген
МбТ - Mycobacterium tuberculosis; Микобактериум туберкулозис
МНС – Major Histocompatibility complex; Главен комплекс на тъканна съвместимост
MIC – MHC class I chain-related protein; МНС клас I подобна полипептидна верига
mRNA – messenger ribonucleic acid; информационна рибонуклеинова киселина
МТВ - Mycobacterium tuberculosis complex; Микобактериум туберкулозис комплекс
NKR – NK cell receptor; НК клетъчен рецептор (NKR)
PCR – Polymerase chain reaction; Полимеразна верижна реакция
TCR- T cell receptor; Т клетъчен рецептор

I. УВОД

Придобиването на нови знания за имунологичната страна на имплантацията с оглед реализиране на успешна бременност е в пряка връзка с майчиното репродуктивно здраве, което е приоритет и цел 5 на Millenium Development Goals (MDG, 2015) на ООН. Имунологично-обусловеният инфертилитет е значителен здравен проблем и в национален, и в световен мащаб. Демографско проучване на Световната здравна организация сочи, че една на всеки четири двойки в развиващите се страни е засегната от инфертилитет, а в САЩ около 6.1 милиона жени /10%/ между 15-44 години не могат да заченат и да изнесат здраво дете (Mascarenhas, Flaxman et al. 2012). Редица изследвания показват, че при много двойки с инфертилитет се случват спонтанни рекурентни аборти в резултат на повишена цитотоксичност на майчини имунни клетки. При тези двойки дори методите на асистирана репродукция водят до неуспешен резултат. Тази дисертация цели проучване на неконвенционалните $\gamma\delta$ T клетки по време на бременността, които в същността си са цитотоксични T клетки. Интензивните изследванията през последните пет години показаха, че неконвенционалните $\gamma\delta$ T клетки разпознават патогени, стресирани и неопластични клетки чрез изцяло нови и различни механизми за антигенно разпознаване и представяне. Въпреки, че са открити преди 30 години тези клетки са все още предизвикателство за имунолозите, но използването им в редица имунотерапевтични програми поддържа траен и сериозен интерес към тях. Специфичната композиция и фенотип на майчините имунни клетки в мястото на контакт с ембриона като част от децидуа-асоциираната лимфоидна тъкан (DALT), както и тяхното взаимодействие със стромалните децидуални клетки и трофобластните (ембрионални) клетки е изключително важно за разпознаване на бременността и установяване на благоприятна среда за развитието на ембриона/фетуса. Проучванията в рамките на този дисертационен труд са насочени към количествената динамика и фенотипните вариации на $\gamma\delta$ T клетките по време на бременността при жената, както в кръвта на бременните жени, така и в мястото на контакт с ембриона. Надяваме се нашите данни да добавят ново измерение към биологията на тези енигматични лимфоцити, характеризирайки ги като част от една пластична имунна система, чийто профил по време на бременността се оформя не само от срещата с фетални ало-антигени, инфекции и чуждомолекулни комплекси, но и от продукти на ендогенен стрес, съпътстващ тъканното ремоделиране по време на и след имплантацията.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи ролята на $\gamma\delta$ T клетките по време на нормална бременност при жената с акцент върху количествената им динамика, фенотипни вариации и репертоарно разнообразие.

За изпълнението на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Проучване на *in situ* локализацията на $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница.
2. Сравнителен *ex vivo* количествен анализ на $\gamma\delta$ T клетките и техните основни субпопулации V δ 1 и V δ 2 в децидуа и кръв от жени в ранна и доносна бременност.
3. Сравнителен *ex vivo* фенотипен анализ на $\gamma\delta$ T клетките по време на бременността чрез проследяване на техния активационен и диференциационен статус, хемокинов профил и цитотоксичен потенциал в децидуа и кръв от бременни жени в ранна и доносна бременност.
4. Изследване на количеството на патоген-реактивните V δ 2 $\gamma\delta$ T клетки в плацента на жени с нормална доносна бременност, позитивни за микобактериални L-форми.
5. Проучване на разнообразието на TCR репертоара на $\gamma\delta$ T клетките в кръвта и на майчино-феталната граница при бременни жени в ранна и терминална бременност с оглед установяване на размножаването на децидуа-специфични $\gamma\delta$ T-клетъчни клонове.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Групи жени

Проучването е проведено в Институт по биология и имунология на размножаването (ИБИР), БАН. В проучването участваха здрави бременни жени със средна възраст 32 ± 7.25 , постъпващи в Университетската акушеро-гинекологична болница "Майчин Дом" към Медицински Университет, София. Те бяха включени в две експериментални групи - жени в 1-ви триместър на бременността (6-12 гестационна седмица - гест. сед., n=32), насочени към аборт по желание и жени в доносна бременност (3-ти триместър, 38-40 гест. сед., n=26), насочени към раждане. Контролната група здрави небременни жени в детородна възраст беше окомплектована

от жени доброволци, съответстващи по възраст (n=23). Жените биваха осведомявани за целите на научното проучване и в случай на съгласие за донорство на материали за изследване те подписваха документ за информирано съгласие. Проучването е в съответствие с Декларацията от Хелзинки и е одобрено от Етичната комисия към МУ, София. ИБИР има сключен договор за научно сътрудничество с болница „Майчин дом”.

Образци за изследване

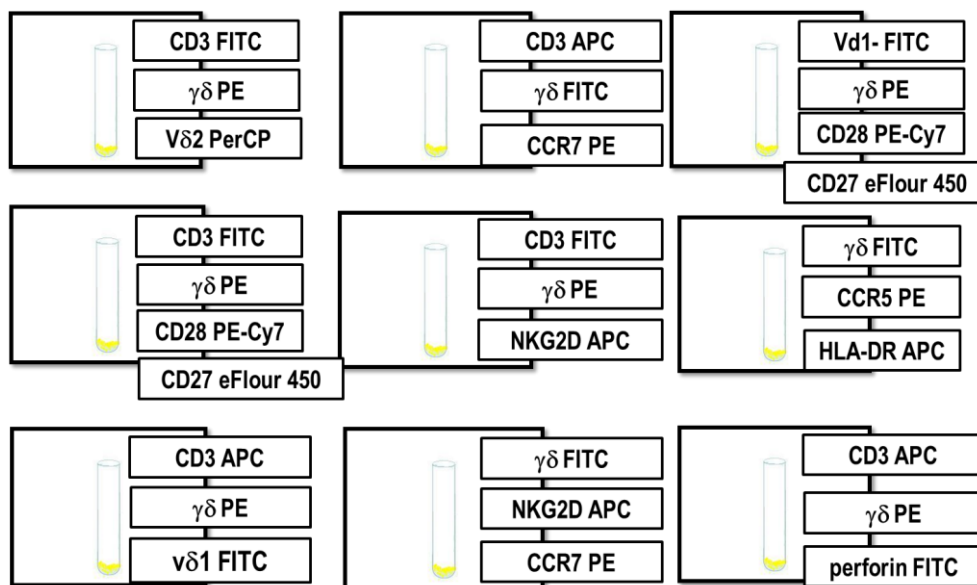
Образците, изследвани в нашето проучване бяха следните: чифтни образци – кръв и децидуа от жени в ранна бременност (1-ви триместър), образци от терминална децидуа (3-ти триместър) от жени с доносена бременност, както и кръвни образци от небременни жени.

Методи

1. Изолране на периферни мононуклеарни клетки (ПМК)
2. Изолране на децидуални мононуклеарни клетки (ДМК)
3. Оцветяване с моноклонални антители за флоуцитометричен анализ
4. Флоуцитометричен анализ
5. Обработка на тъканните материали за обзорно хистологично изследване
6. Получаване на трайни парафинови препарати, обзорно хистологично изследване
7. Имунохистохимично изследване
8. Спектроскопски анализ на CDR3 регионите на γ и δ веригите на $\gamma\delta$ TCR в мононуклеарни суспензии, изолирани от кръв и децидуа
 - 8.1. Изолране на РНК
 - 8.2. Реакция обратна транскрипция
 - 8.3. PCR (Полимеразна верижна реакция)
 - 8.4. Електрофореза върху агарозен гел
 - 8.5. Run-off реакция
9. Спектроскопски анализ на CDR3 регионите на γ и δ веригите с Peak Scanner.
10. Статистически анализи

За определяне на количествената динамика и фенотипните вариации на $\gamma\delta$ клетките и техните субсети, получените ПМК и ДМК суспензии бяха оцветени с антители, конюгирани с флуорохроми в подходящи комбинации. Бяха използвани следните антители: CD3-FITC, CD3-APC, $\gamma\delta$ -PE, $\gamma\delta$ -FITC, V δ 1-FITC, V δ 2-PerCp, CD27-eFluor450, CD28-PE-Cy7, NKG2D-APC, HLA-DR-APC, CCR5-PE, CCR7-PE, Perforin-FITC. За имунохистохимичното визуализиране на $\gamma\delta$ клетките беше използвано неконюгирано моноклонално анти тяло срещу TCR $\gamma\delta$.

Панели за имунофенотипизиране



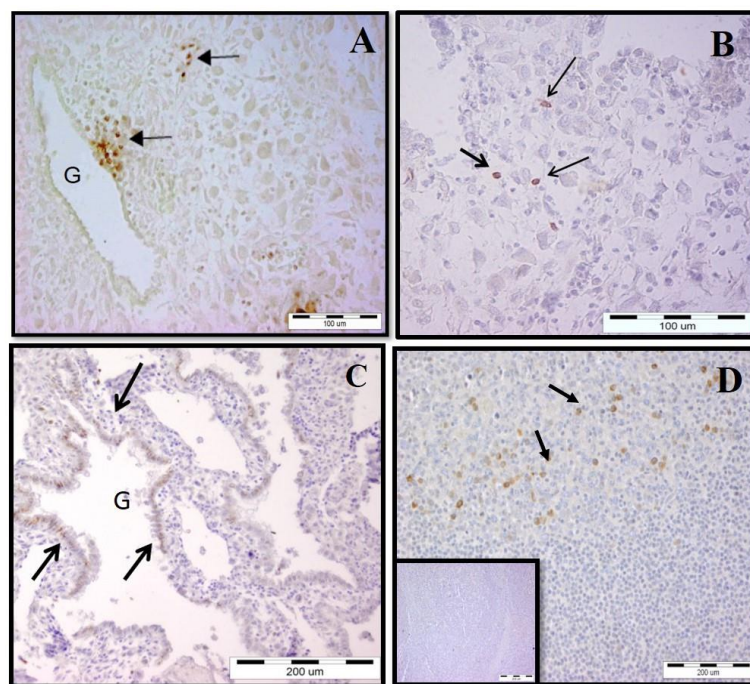
За PCR анализа бяха използвани праймери, синтезирани срещу $C\gamma$ (5'-CAAGAAGACAAAGGTATGTTCCAG-3') и $V\gamma 2$ (5'-GCAAGCACAAGGAASAACTTGAG-3') или $V\gamma 3$ (5'-GTACTATGACGTCTCCACCG-3') или $V\gamma 4$ (5'-ATGACTCCTACACCTCCAGC-3') или $V\gamma 5$ (5'-CCCAGGAGGTGGAGCTGGAT-3') или $V\gamma 9$ (5'-ATCAACGCTGGCAGTCC-3') което води до амплификация на секвенциите, съдържащи CDR3 $\gamma 2$, CDR3 $\gamma 3$, CDR3 $\gamma 4$, CDR3 $\gamma 5$ или CDR3 $\gamma 9$, респективно. За амплифициране на секвенциите, съдържащи CDR3 $\delta 1$, CDR3 $\delta 2$ или CDR3 $\delta 3$, PCR беше направена с праймери срещу $C\delta$ (5'-GTAGAATTTCCTTACCAGACAAG-3') и $V\delta 1$ (5'-CTGTCAACTTCAAGAAAGCAGCGAAATC-3'), $V\delta 2$ (5'-ATACCGAGAAAAGGACATSTATG-3') или $V\delta 3$ (5'-GTACCGGATAAGGCCAGATTA-3'). При наличие на PCR продукти от интерес те бяха белязани в run-off реакция с помощта на $C\gamma$ -специфичен FAM-конюгиран праймер AATAGTGGGCTTGGGGGAAAC и $C\delta$ -специфичен FAM-конюгиран праймер ACGGATGGTTTGGTATGAGGCTGA.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. $\gamma\delta$ T клетките са резидентни клетки със специфична локализация на майчино-феталната граница по време на бременността при жената

За нас беше изключително важно, че успяхме да визуализираме $\gamma\delta$ T клетките локално на майчино-феталната граница, имайки предвид чувствителността на $\gamma\delta$ TCR на фиксиране. Нашите резултати показаха, че $\gamma\delta$ T клетките са резидентни клетки в децидуалната тъкан по време на ранната бременност при жената (Фиг. 1). Интересно е да се отбележи специфичната им локализация, бяха намерени като 1) клъстери в непосредствена близост до децидуалните жлези, 2) интраепителни лимфоцити в децидуалните жлези и 3) единични клетки, разпръснати в децидуалната строма. TCR $\gamma\delta$

лимфоцитите в клетъчните клъстери бяха позиционирани в много тесен контакт с базолатералната част на жлезния епител (Фиг. 1, А). Като оригинална находка отчитаме наличието на интраепително локализирани $\gamma\delta$ T клетки в децидуалните жлези по време на ранната бременност при жената (Фиг. 1, С). Това са първите данни, показващи, че $\gamma\delta$ T клетките аналогично на тези в чревната лигавица се разполагат под формата на лимфоцити, локализирани между епителните клетки на децидуалните жлези. Твърде вероятно е интраепителните $\gamma\delta$ T лимфоцити да съществуват и в луминалния епител, който обаче при интерстициалния тип плацентация бива разрушен в хода на имплантацията. Наличието на децидуални интраепителни $\gamma\delta$ T лимфоцити, първоначално е отчетено при миши модели (Suzuki, Hiromatsu et al. 1995) и в ендометриалния епител на бременни преживни животни, като се предполага, че участват в контрола на трофобластната инвазия (Fox, Lee et al. 1998). Наскоро публикувани данни показват, че децидуалните жлези играят важна роля в ранната бременност, като осигуряват растежни фактори, цитокини и Т-клетъчни имunosупресивни фактори, в допълнение към възможността им да произвеждат хранителни вещества (Rachmilewitz, Riely et al. 1999, Carson, Bagchi et al. 2000, Hempstock, Cindrova-Davies et al. 2004).



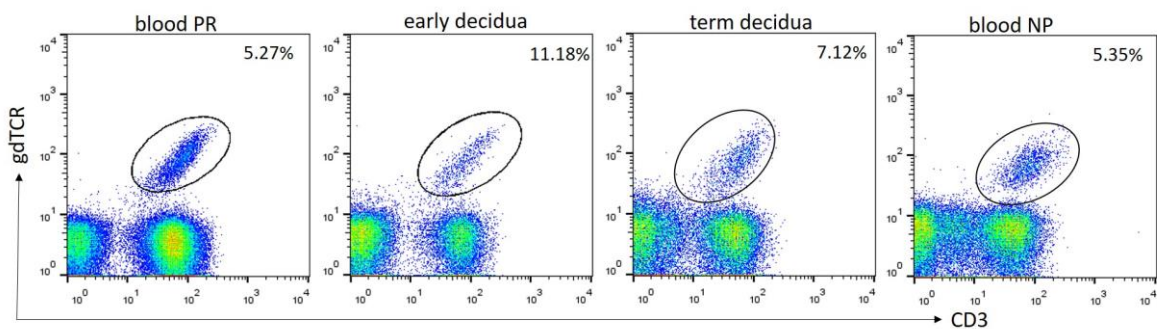
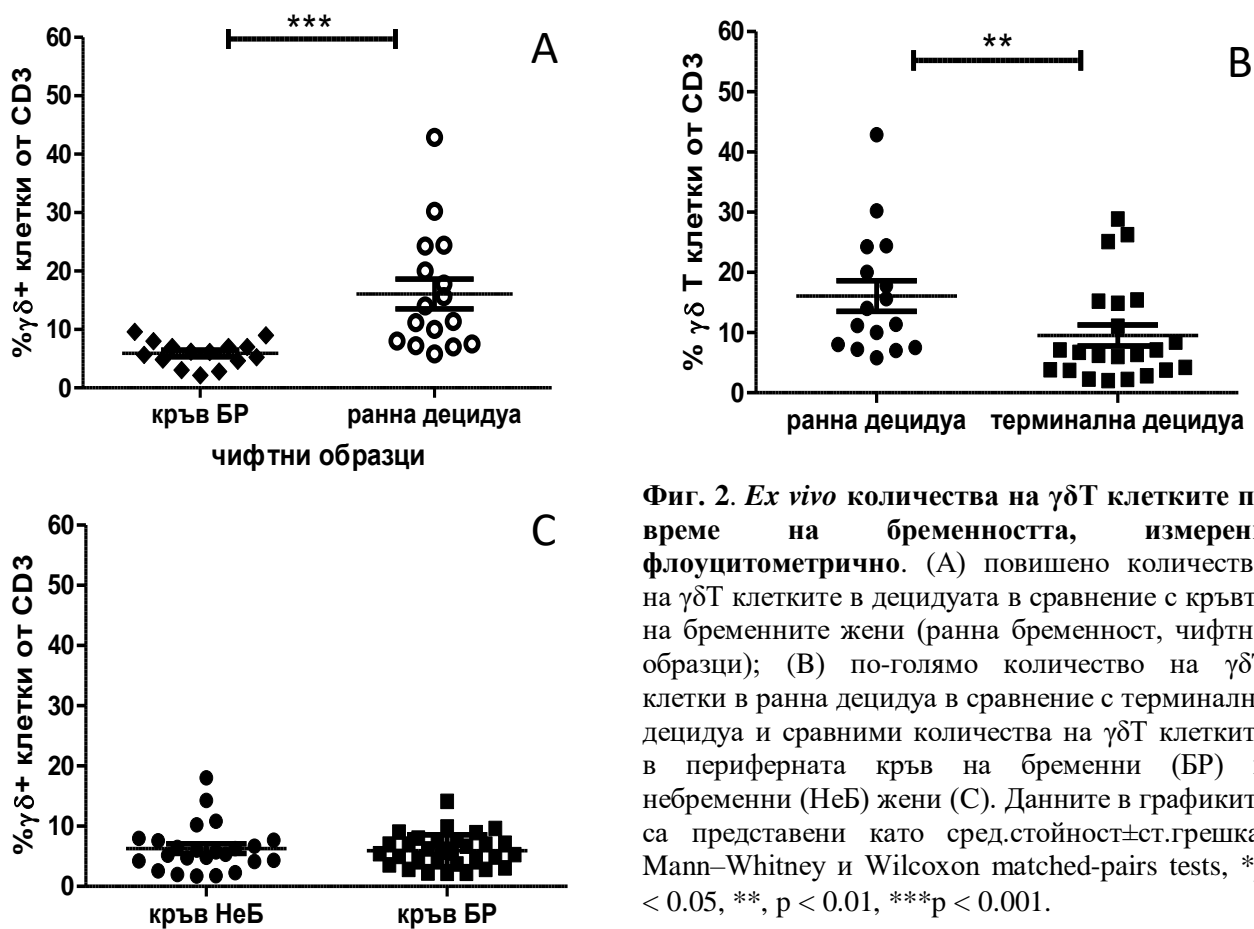
Фиг. 1. *In situ* локализация на $\gamma\delta$ T клетките в децидуа по време на ранната бременност при жената. (А) Клъстери от $\gamma\delta$ T клетки (стрелки) в близост до децидуална жлеза; (В) единични $\gamma\delta$ T клетки в децидуалната строма; (С) интраепителни $\gamma\delta$ T клетки в децидуална жлеза; (D) Оцветяване за $\gamma\delta$ T клетки в тъкан от човешки сливици – (позитивна контрола), като на малкото квадратче е показана отрицателна контрола. G – децидуална жлеза

2. Ранната бременност индуцира повишено количество на $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница

Паралелно с *in situ* визуализацията на $\gamma\delta$ T клетките в децидуалната тъкан по време на бременността ние ги изолирахме чрез неензимно дезинтегриране на тъканта и последващо градиентно сепариране и ги подложихме на *ex vivo* количествен анализ, използвайки флоуцитометричен метод. Количеството им беше сравнено с това в периферната кръв на бременните жени (чифтни образци) в ранна бременност. Резултатите показаха, че $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница са трикратно повече като пропорция от тоталните T клетки в сравнение с количеството им в периферията ($16.08 \pm 2.55\%$ срещу $5.91 \pm 0.56\%$, $p=0.0005$, $n=16$, чифтни образци, **Фиг. 2, 3**). За да проследим количествената динамика на $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница с напредване на бременността ние сравнихме техните количества в ранна и терминална децидуа (плацента). Както е показано на **Фиг. 2** в края на бременността (3-ти триместър) количеството на $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница ($9.53 \pm 1.73\%$, $n=22$), достоверно намалява в сравнение с количеството им в ранна бременност ($16.08 \pm 2.55\%$, $n=16$ vs, $p=0.0097$). За да отчетем ефекта на състоянието бременност върху количеството на периферните $\gamma\delta$ T клетки ние сравнихме пропорцията на $\gamma\delta$ T клетките (от CD3+ T клетките) в кръвта между бременни и небременни жени. Нашите данни показват, че ранната бременност не индуцира промяна в количеството на периферните $\gamma\delta$ T клетки (бременни жени - $5.73 \pm 0.43\%$, $n=29$ срещу небременни жени - $5.71 \pm 0.53\%$, $n=23$, $p=0.7822$, **Фиг. 2**). Количеството на децидуалните T клетки не се променя с напредване на бременността и е около 20% от общия пул лимфоцити (в ранна децидуа $22.46 \pm 1.5\%$, $n=31$, в терминална децидуа - $18.33 \pm 2.5\%$, $n=25$, $p=0.1389$).

Данните, свързани с количественото разпределение на $\gamma\delta$ T клетки на майчино-феталната граница са противоречиви (от 5% до 30% от T клетките) (Mincheva-Nilsson 1992, Haller, Radillo et al. 1993, Vassiliadou and Bulmer 1996, Fan, Duan et al. 2011) като не е докладвана промяна в количеството им в периферната кръв, индуцирана от бременността (Fan, Duan et al. 2011). Тези противоречиви данни могат да се обяснят с различните подходи, използвани за изолиране и анализиране на $\gamma\delta$ T лимфоцитите. Ние комбинирахме имунохистохимична визуализация и определяне на количествената им динамика и фенотипния им профил чрез флоуцитометричен анализ. Освен това за изолиране на децидуалните мононуклеарни клетки приложихме механично дезинтегриране, а не ензимно третиране на тъканта с цел максимално запазване на повърхностните рецептори/маркери от интерес.

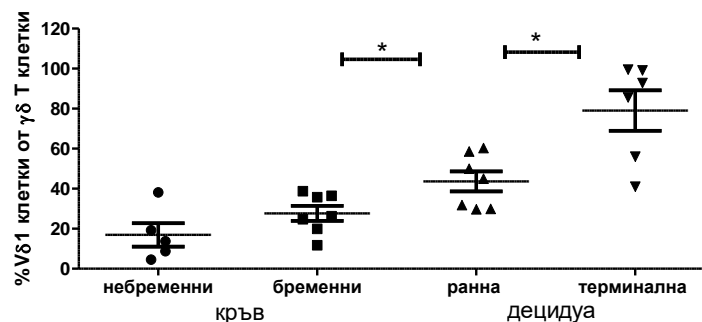
Нашите *ex vivo* резултати показаха, че $\gamma\delta$ T клетките по време на ранната бременност са в трикратно по-голямо количество на майчино-феталната граница в сравнение с кръвта на бременните жени и с напредване на бременността тяхното количество намалява достоверно, което показва, че те имат специфична роля именно по време на ранната бременност при жената и то локално в мястото на контакт с ембриона. В допълнение, не установихме промени, индуцирани от бременността, в количеството на периферните $\gamma\delta$ T клетки.



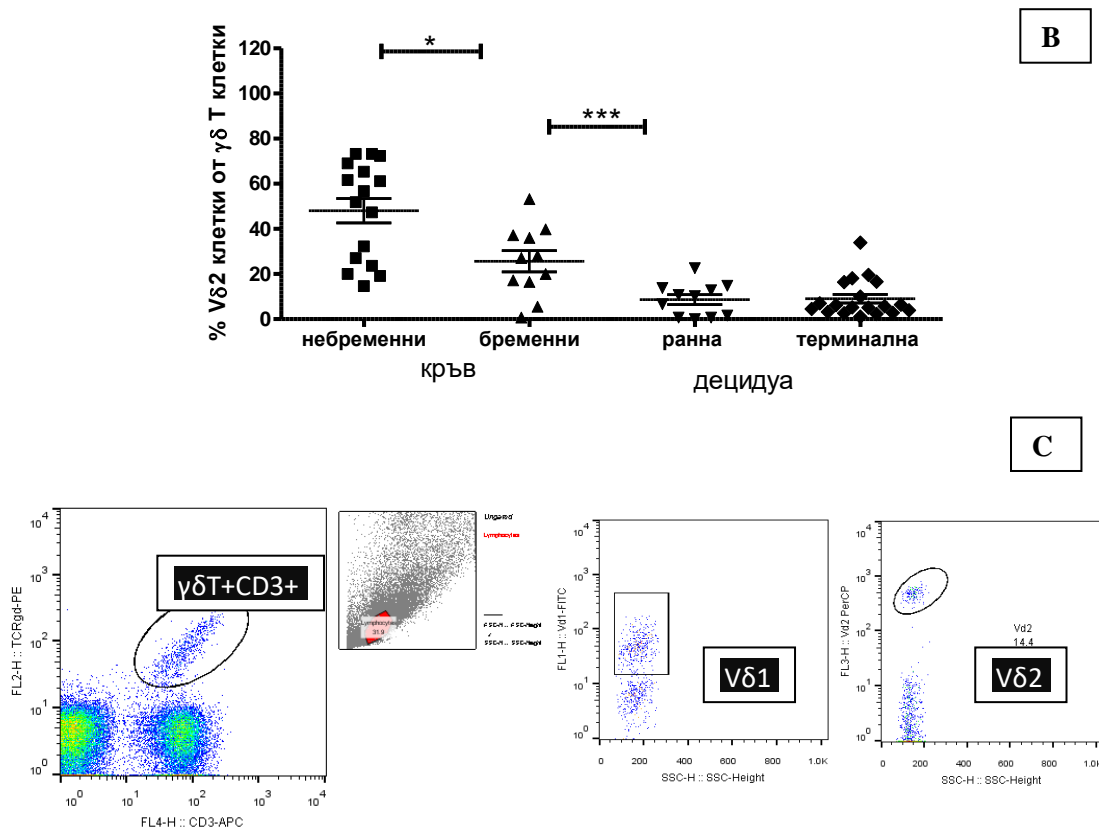
3. Повишеното количество $\gamma\delta$ T клетки на майчино-феталната граница е за сметка на V δ 1 субсета

Следващата ни стъпка беше да проследим количествата на двете основни субпопуации $\gamma\delta$ T клетки по време на бременността при жената. Въпреки че *decidua basalis* е регион много интимно свързан с кръвта на майката и се предполага контаминация от периферна кръв, нашите резултати показаха диференциално разпределение на двете субпопуации - V δ 1 и V δ 2.

Както очаквахме в децидуата доминираше V δ 1 субпопуацията, докато в периферната кръв на бременните жени – V δ 2. По време на ранната бременност ние установихме значително повишаване на V δ 1 клетките на майчино-феталната граница в сравнение с кръвта на бременните жени ($43.64 \pm 5\%$ срещу $24.4 \pm 3.6\%$, $n=7$, $p=0.0156$, чифтни образци) и преобладаването им в терминална децидуа (79% от всички $\gamma\delta$ T клетки, $p=0.0350$, **Фиг. 4**). Количествата на V δ 1 от периферните $\gamma\delta$ T клетки бяха сравними между бременни и небременни жени ($27.68 \pm 3.7\%$ и $16.92 \pm 5.85\%$ респективно, $p=0.1490$). Обратно, патоген-реактивните V δ 2 клетки доминираха в кръвта на небременните жени в сравнение с бременните ($48.07 \pm 5.42\%$ срещу $25.62 \pm 4.69\%$, $p=0.0191$, **Фиг. 4**). На майчино-феталната граница тази субпопуация беше в относително по-малка пропорция (под 10% от $\gamma\delta$ T клетките) без значение от периода на бременността ($8.63 \pm 2.21\%$ и $9.03 \pm 1.9\%$ респективно, $p=0.8973$). V δ 2 $\gamma\delta$ T клетките в ранна децидуа бяха три пъти по-малко от техните периферни аналози при бременните жени ($8.63 \pm 2.21\%$ срещу $25.62 \pm 4.69\%$, $p=0.0010$). Нашите резултати по отношение на доминирането на V δ 1 субсета в терминалната децидуа допълват преходни данни показващи, че V δ 1 клетки са също основна фракция в кръвта от пъпна връв (Morita, Parker et al. 1994, Vermijlen, Brouwer et al. 2010, Moens, Brouwer et al. 2011). Ако сравним децидуалните V δ 1+ клетки по време на ранната и късна бременност (50% и 79% от $\gamma\delta$ T клетките) с периферните такива (20%) по време на бременността, бихме могли да приемем, че V δ 1+ клетките имат значение по-скоро на майчино-феталната граница, отколкото в кръвта на бременните жени. Има проучвания обаче, които свързват повишеното им количество в кръвта на бременните жени с успешното протичане на бременността (J. Szekeres-Bartho, A. Barakonyi et al. 1999, Szereday, Barakonyi et al. 2003).



A



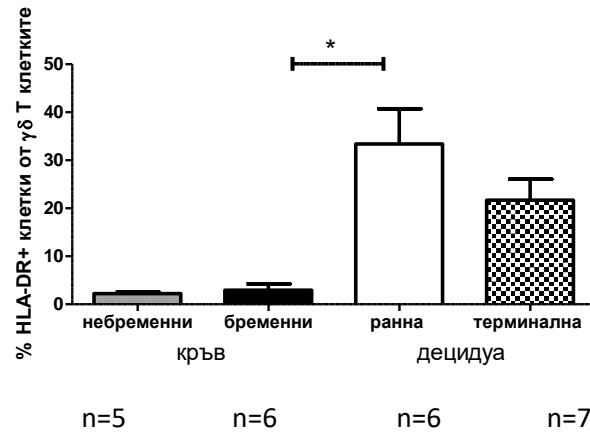
Фиг. 4. Количества на $\gamma\delta$ T-клетъчните субпопулации по време на бременността при жената.

А - по-голямо количество на V δ 1 клетките в децидуалната тъкан в сравнение с кръвта на бременните жени (чифтни образци) и преобладаването им в децидуата в края на бременността; В - обратно, патоген-реактивните V δ 2 клетки доминират в кръвта на небременните жени и са относително по-малко в кръвта на бременните. На майчино-феталната граница този субсет е под 10% от $\gamma\delta$ T клетките; С – представителни флоуцитометрични плотове, показващи количествата на V δ 1 и V δ 2 $\gamma\delta$ T-клетъчните субпопулации в децидуа (1-ви триместър) – гейтът е на $\gamma\delta$ +CD3+ клетките. Данните в графиките са представени като сред.стойност \pm ст.грешка, Mann–Whitney и Wilcoxon matched-pairs tests, * p < 0.05, ** p <0.01, *** p < 0.001.

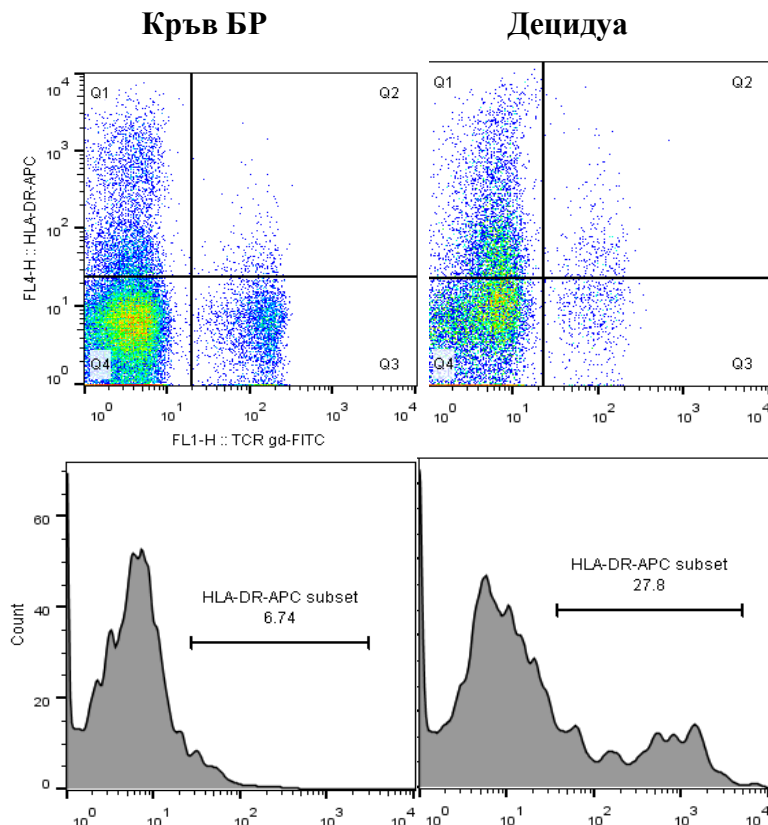
4. По време на ранната бременност на майчино-феталната граница доминират активирани и терминално диференцирани $\gamma\delta$ T клетки

След като установихме повишено количество на $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница по време на ранната бременност при жената, за нас беше интересно да проследим техния фенотип и възможните фенотипни вариации в зависимост от локацията на $\gamma\delta$ T клетките и фазата на бременността. Ние открихме, че по време на ранна бременност децидуалните $\gamma\delta$ T клетки са с фенотип на диференцирани клетки. Значителна пропорция от децидуалните $\gamma\delta$ T клетки бяха активирани, отчетено чрез експресията на късния активационен маркер HLA-DR, като липсват активирани $\gamma\delta$ T клетки в кръвта на бременните жени ($36.85\pm 7.92\%$ срещу $1.64\pm 0.22\%$, $p=0.0313$, чифтни образци, **Фиг. 5, 6**). Повишени нива на $\gamma\delta$ +HLA-DR+ клетките в децидуата по време на ранна бременност се установяват и в края на бременността ($36.85\pm 7.92\%$ и

21.68±4.37%, респективно, $p=0.2949$). Не се наблюдаваха активирани $\gamma\delta$ T клетки в кръвта нито при бременни, нито при небременни жени (Фиг. 5, 6). Първите данни свързани с наличието на активирани T клетки по време на бременността са докладвани от S. Saito и колектив. Те установяват присъствието на активирани $\alpha\beta$ T клетки по време на ранната бременност като на майчино-феталната граница те отчитат преобладаване на активирани CD8+ T лимфоцити (S. Saito, K. Nishikawa et al. 1992).

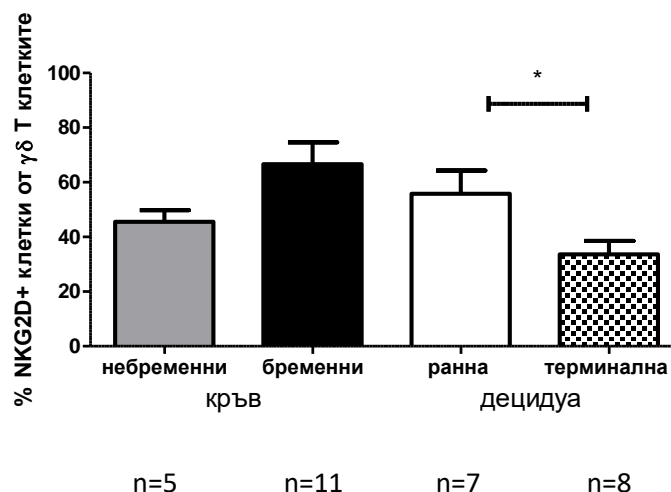


Фиг. 5. На майчино-феталната граница по време на ранна бременност доминират активирани (HLA-DR+) $\gamma\delta$ T клетки, докато количеството на активираните им периферни аналози както в кръвта на бременни, така и в кръвта на небременни жени е пренебрежимо малко. Данните в графиките са представени като сред.стойност±ст.грешка, $n=5-7$, paired and unpaired t-tests, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.



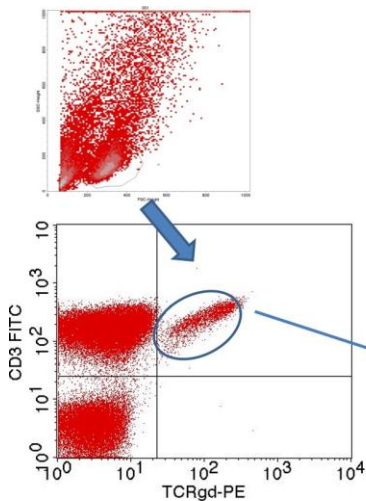
Фиг. 6. Репрезентативни флоуцитометрични плотове и хистограми, показващи количеството на $\gamma\delta$ +HLA-DR+ клетки в децидуа и кръв от бременни жени (БР) в 1-ви триместър – чифтни образци. Плотове - гейт на CD3+ клетките, хистограми – гейт на CD3+ $\gamma\delta$ + клетките.

Имайки предвид, че активационният NK рецептор NKG2D е отличителен белег за $\gamma\delta$ T клетките ние проследихме експресията му във връзка с бременността и открихме, че повечето $\gamma\delta$ T клетки са NKG2D-позитивни, независимо от състоянието на бременност. Установихме, че в периода на ранна бременност мнозинството от $\gamma\delta$ T клетките експресират NKG2D, независимо дали са в кръвта на бременните жени или на майчино-феталната граница - $66.59\pm 8.049\%$ срещу $55.76\pm 8.50\%$, $p=0,2772$ (Фиг. 7). Също така не установихме значима разлика в количествата на периферните NKG2D+ $\gamma\delta$ + T клетки между бременни и небременни жени – $66.59\pm 8.049\%$ срещу $45.53\pm 4.30\%$, $p=0.1137$ (Фиг. 7). Интересно е, обаче, че $\gamma\delta$ T клетките, позитивни за активационния рецептор NKG2D значително намаляваха на майчино-феталната граница в края на бременността, показано чрез сравнение на количествата на децидуа-базираните $\gamma\delta$ +NKG2D+ T клетки по време на ранна и късна бременност ($55.76\pm 8.50\%$ срещу $33.66\pm 4.88\%$, $p=0.0366$, Фиг. 7). С помощта на този рецептор $\gamma\delta$ T клетките разпознават лигандите MICA и MICB (MHC клас I верига подобни молекули A и B) (Groh, Rhinehart et al. 1999). Тези лиганди се експресират от нормален и трансформиран екстравилозен трофобласт. Смята се, че повишените нива на разтворимите MIC молекули в кръвта на бременните жени са в състояние да блокират NKG2D рецептора върху периферните мононуклеарни клетки и по този начин да предотвратят цитотоксичната им функция. Това предполага нов механизъм, чрез който фетуса е способен да избегне майчин потенциално цитотоксичен имуноен отговор (Mincheva-Nilsson, Nagaeva et al. 2006).

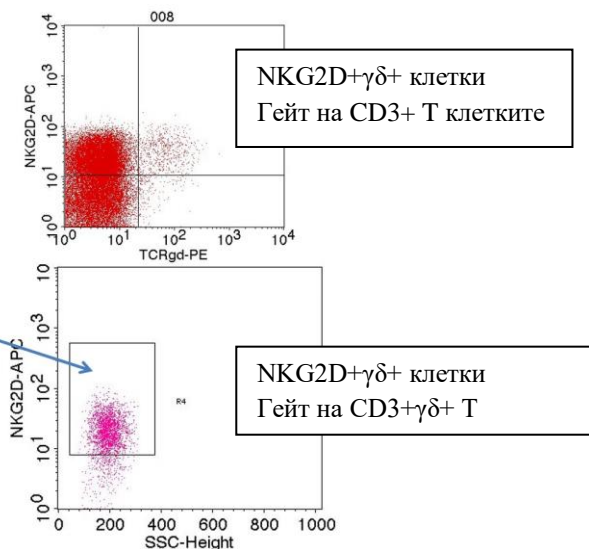


Фиг. 7. Количествени промени на NKG2D+ $\gamma\delta$ + T клетките по време на бременността. NKG2D+ $\gamma\delta$ T клетките показват високи нива независимо от състоянието на бременност, но достоверно намаляват на майчино-феталната граница в края на бременността. Данните са представени като сред.ст-ст±ст.грешка, GraphPad Prism v.5, unpaired и paired t tests, $n=7-11$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Гейт на лимфоцитите



Гейт на CD3+ клетките



Гейт на CD3+γδ+ Т клетките

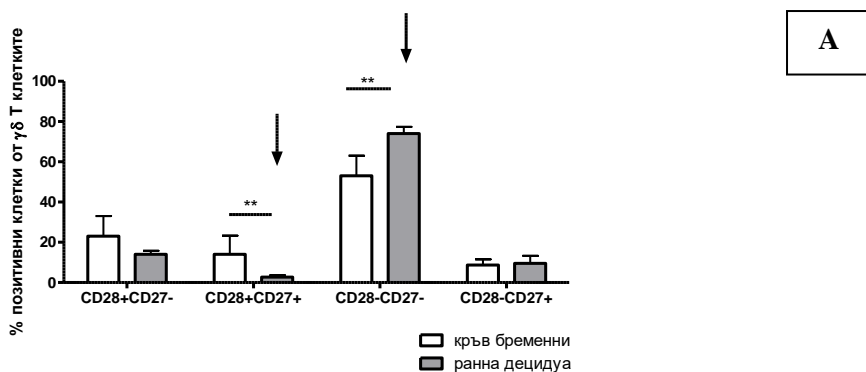
Фиг. 8. Репрезентативни флоуцитометрични плотове, показващи експресията на NKR NKG2D от децидуални $\gamma\delta$ T клетки.

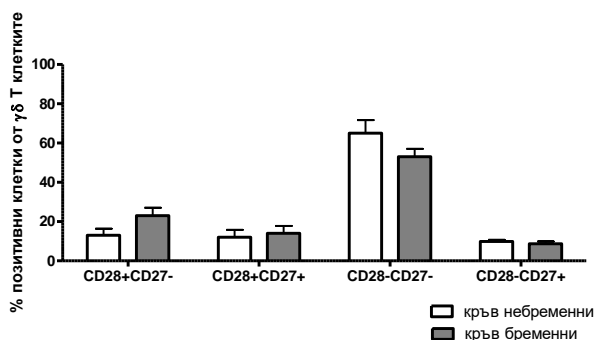
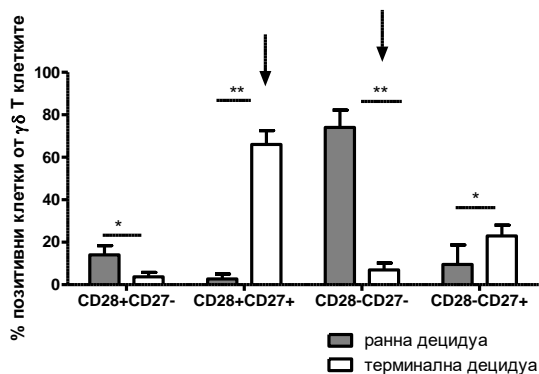
Дълго време активирането на Т клетки на майчино-феталната граница се възприемаше като предпоставка за неуспешна имплантация и аборти. Сега вече е ясно, че разпознаването на трофобластни антигени е свързано с активиране на Т клетки, например регулаторните Т клетки трябва да бъдат активирани, за да проявят толерогенна функция. Все повече данни описват натрупване на активирани ефекторни клетки (CD4+ и CD8+) и малки количества на наивни Т клетки в децидуалната тъкан в сравнение с кръвта при нормална бременност (Tilburgs, D.Schonkeren et al. 2010, Tilburgs and Strominger 2013). За нас беше интересно да проверим дали съществува подобна тенденция и при неконвенционалните Т лимфоцити.

Ние проследихме диференциационния статус на децидуалните и периферни $\gamma\delta$ T клетки по време на бременността на базата на експресията на ко-стимулаторните молекули – CD28 и CD27. Терминалната диференциация на конвенционалните Т клетки се характеризира с липса на експресия на ко-стимулаторните молекули CD28 и CD27 (Array, Callan et al. 2002). Тези маркери се използват за идентифициране на степента на диференциация и на $\gamma\delta$ T клетките (Morita, Jin et al. 2007). Ко-стимулаторните молекули CD27 и CD28 могат да бъдат използвани като повърхностни маркери за различаване на наивни/паметови Т клетки (CD27+CD28+) от терминално (напълно) диференцирани ефекторни Т клетки (CD27-CD28-). CD27+CD28- и CD27-CD28+ субпопулациите са междинни етапи от диференциацията от CD27+CD28+ до CD27-CD28-. Чрез използване на CD27/CD28 модела на ко-експресия ние дефинирахме диференциационния статус на $\gamma\delta$ T клетките по време на бременността. Неочаквано за нас, доминиращата популация $\gamma\delta$ T клетки в децидуата по време на ранна бременност

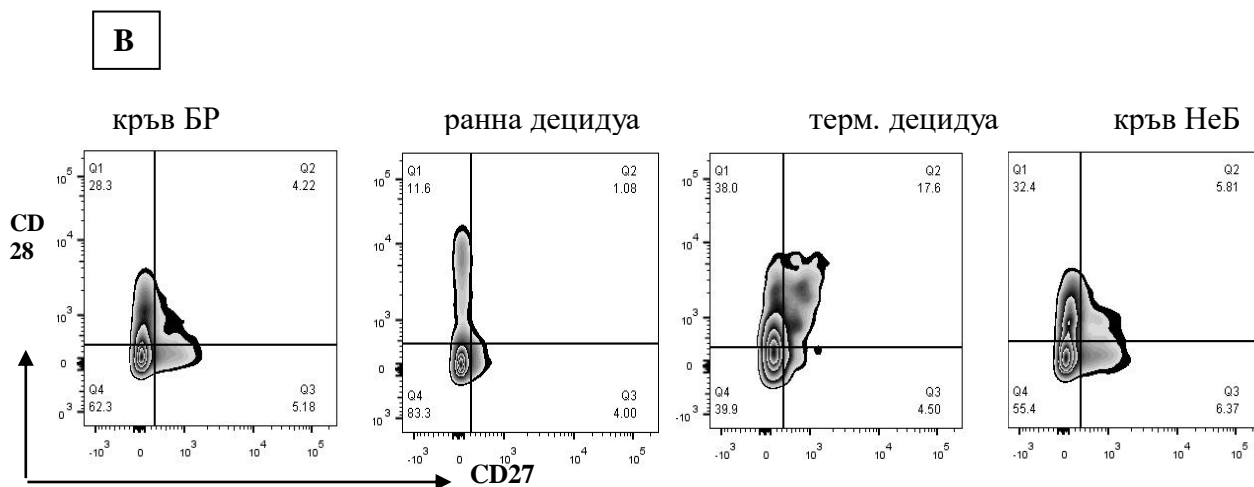
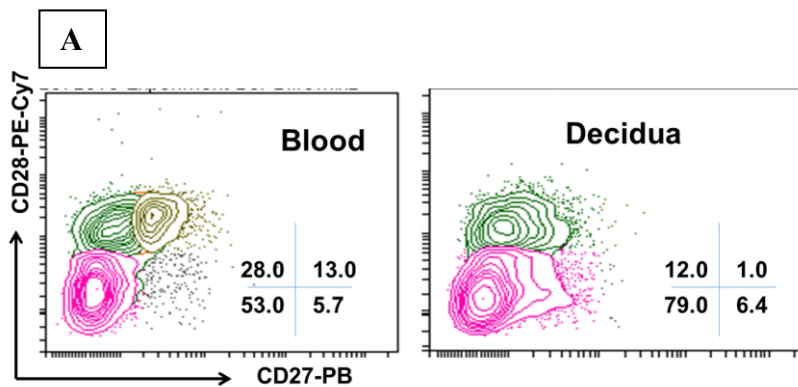
беше тази на крайно диференцираните ефекторни $\gamma\delta$ T клетки (CD27-CD28-), които съставляваха $74\pm 3.3\%$ от целия $\gamma\delta$ T-клетъчен пул (Фиг. 9). Въпреки че този субсет е добре представен и в майчината кръв, ние установихме достоверно по-ниско количество ($53\pm 4.1\%$, $p=0.0225$, Фиг. 9). Проследявайки ефекторните $\gamma\delta$ T клетки на майчино-феталната граница ние регистрирахме спад в техния брой в края на бременността ($37.34\pm 5.8\%$, $p=0.0012$, Фиг. 9). Интересна находка беше, че наивните/паметови $\gamma\delta$ T клетки (CD27+CD28+) показаха обратна тенденция на разпределение. Те почти отсъстваха от ранната децидуа и достигаха до 20% от $\gamma\delta$ T клетките в кръвта на бременните жени ($p=0.0087$, чифтни образци, Фиг. 9). При раждането пропорцията им на майчино-феталната граница беше по-висока в сравнение с ранната бременност ($11\pm 2\%$, $p=0.0047$, Фиг. 9). Забележително е, че половината от $\gamma\delta$ T клетките в терминална децидуа бяха CD28+CD27- т.е. показваха междинен диференциационен профил. Както се вижда на Фиг. 9 няма разлика в количествата на ефекторните и наивните/паметови $\gamma\delta$ T клетки в кръвта между бременни и небременни жени (ефекторни $\gamma\delta$ T клетки: БР - $53\pm 4.1\%$ и НеБ - $65\pm 6.8\%$, $p=0.0823$, и наивни/паметови $\gamma\delta$ T клетки: БР - $14\pm 3.8\%$ и НеБР - $12\pm 3.8\%$, $p=0.7538$).

TCR $\gamma\delta$ T клетките с междинен диференциационен (транзиторен, CD28+CD27-) фенотип не показаха статистически достоверна разлика в количествата си в децидуата и в кръвта на бременните жени в ранна бременност ($22.88\pm 4.128\%$ срещу $13.53\pm 1.79\%$, $p=0.1095$, Фиг. 9). Подобни резултати получихме и за количествената динамика на транзиторните CD28-CD27+ ($9.533\pm 3.741\%$ срещу $8.683\pm 1.137\%$, $p=0.8257$, Фиг. 9). Не беше отчетена статистическа значима разлика за тези $\gamma\delta$ T клетки с междинен фенотип и в кръвта между бременни и небременни жени. Получените резултати ясно показват доминирането на терминално диференцирани ефекторни $\gamma\delta$ T клетки в децидуата по време на ранната бременност при жената. Крайно диференцираните (CD27-CD28-) T клетки секретират редица цитокини и хемокини, включващи про-инфламаторни Th1-подобни цитокини (Koizumi, Liu et al. 1991, Appay, Callan et al. 2002).





Фиг. 9. На майчино-феталната граница по време на ранната бременност при жената доминират крайно диференцирани ефекторни $\gamma\delta$ T клетки. (А) по време на ранна бременност в децидуалната тъкан преобладават напълно диференцирани ефекторни (CD27-CD28-) $\gamma\delta$ T клетки, докато наивните/паметови (CD27+CD28+) $\gamma\delta$ T клетки са в пренебрежимо малка пропорция, в кръвта на бременните жени половината от $\gamma\delta$ T клетките са напълно диференцирани, а останалата половина са наивни/паметови или такива с междинен фенотип (n=6); (В) ранната децидуа е доминирана от напълно диференцирани $\gamma\delta$ T ефектори и не се установяват наивни/паметови $\gamma\delta$ T клетки, докато терминалната децидуа е населена главно с $\gamma\delta$ T клетки с наивен или междинен фенотип (n=6); (С) диференциационният статус на периферните $\gamma\delta$ T клетки по време на ранната бременност е подобен при бременни и небременни жени (n=5); На графиките са отбелязани средна ст-ст \pm ст.грешка, n=5-6, paired and unpaired t-tests, GraphPad Prism v.4. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001.



Фиг. 10. Репрезентативни флоуцитометрични плотове, показващи CD27 и CD28 експресията на $\gamma\delta$ T клетки, изолирани от децидуа и кръв от жена в ранна бременност – чифтен образец (A) и от образци ранна децидуа, терминална децидуа, кръв от бременни (БР) и небременни (НеБ) жени (B). Гейтът е поставен на CD3⁺ $\gamma\delta$ ⁺ T клетките.

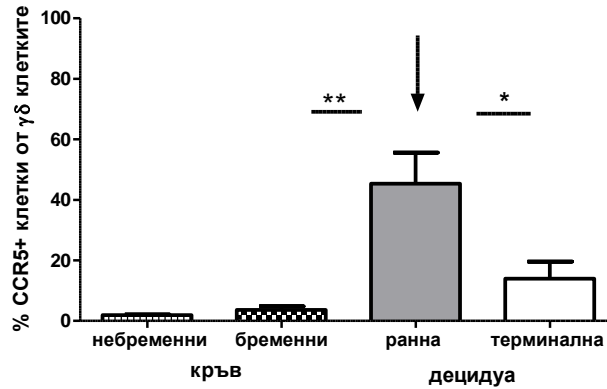
Доминирането на ефекторни $\gamma\delta$ T клетки на майчино-феталната граница в сравнение с кръвта на бременните жени предполага механизъм за тяхното селективно привличане и/или задържане в мястото на ембрионален контакт. И наистина, ние установихме, че диференциационният статус на $\gamma\delta$ T клетките пряко корелира с миграционния им профил и по-точно с експресията на инфламаторния хемокинов рецептор CCR5.

5. По време на ранна бременност на майчино-феталната граница преобладават про-инфламаторни и потенциално цитотоксични $\gamma\delta$ Т клетки

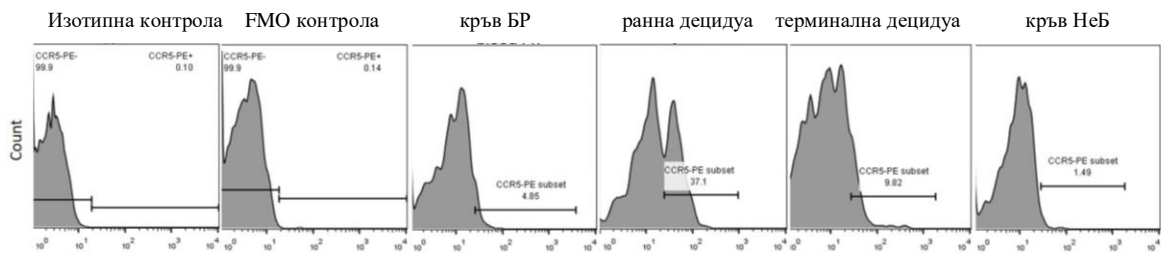
За да дефинираме миграционните възможности на $\gamma\delta$ Т клетките, ние отчетохме експресията на хомеостатичния (lymph node homing) хемокинов рецептор CCR7 и експресията на инфламаторния (tissue-homing) хемокинов рецептор CCR5. CCR7 е хемокинов рецептор, който функционира като хоуминг рецептор в миграцията на наивните и паметови Т клетки към вторичните лимфоидни тъкани и служи да дефинира субсет от централни паметови клетки (CM, CCR7+) и ефекторни паметови (EM, CCR7-) Т клетки (Sallusto, Lenig et al. 1999). Докладвано е, че CCR5 преференциално се експресира от CCR7-негативни CD45RO-позитивни Th1 ефектори, продуциращи IFN- γ (Loetscher, Ugucioni et al. 1998, Sallusto, Lenig et al. 1998, Glatzel, Wesch et al. 2002).

Изглежда, че CCR7 постепенно се губи с напредване на диференциацията на Т клетките и има ясна прогресия от CCR7+ CCR5- (наивни/паметови), към CCR7-CCR5- или CCR7+CCR5+ (преходен етап), до CCR7-CCR5+ (ефекторни/паметови) Т клетки (Sallusto, Mackay et al. 2000). Нашите резултати показват различен хемокинов профил на децидуалните и периферните $\gamma\delta$ Т клетки по време на бременността. Както е илюстрирано на **Фиг. 11** и **Фиг. 12** има повишена експресия на CCR5 върху децидуалните $\gamma\delta$ Т клетки, но не върху кръвните им аналози при бременните жени ($47.33\pm 8.67\%$ срещу $3.20\pm 1.07\%$, $p=0.0027$). В края на бременността количеството на CCR5+ $\gamma\delta$ + Т клетките на майчино-феталната граница намалява достоверно ($13.97\%\pm 5.64$, $p=0.0132$). Както и очаквахме, пренебрежимо малък е броя на CCR5-позитивните $\gamma\delta$ Т клетки в кръвта на жените без значение дали са бременни или не (БР- $3.20\pm 1.07\%$ и НеБР – $1.9\pm 0.2\%$, $p=0.3057$). Както се вижда на **Фиг. 13** по време на ранна бременност количеството на децидуалните CCR7+ $\gamma\delta$ + Т клетки беше двойно по-високо ($21.1\pm 3.7\%$) в сравнение с това в кръвта на бременните жени ($10.13\pm 1.33\%$, $p=0.0182$) и слабо се повишаваше в края на бременността ($38.25\%\pm 9.02$, $p=0.1374$). Ранната бременност не повлиява количеството на периферните $\gamma\delta$ Т клетки, позитивни за CCR7 рецептора, показано чрез липсата на разлика между бременни и небременни жени (**Фиг. 13**).

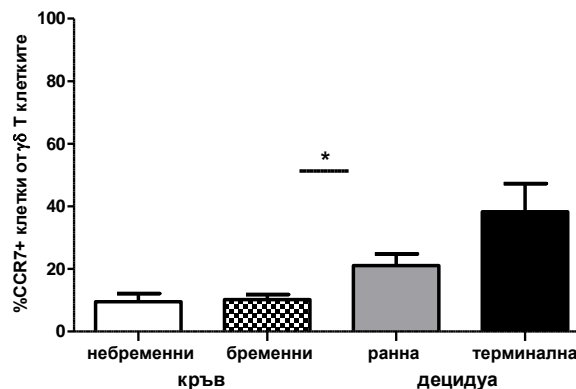
Доминирането на ефекторни $\gamma\delta$ Т на майчино-феталната граница по време на ранната човешка бременност корелира с високата експресия на CCR5, докато доминирането на наивни и преходни $\gamma\delta$ Т клетки в терминалната децидуа се свързва с високата експресия на CCR7. Известно е, че по време на ранната бременност на майчино-феталната граница се експресират лиганди, които могат да бъдат разпознати от CCR5, като MIP-1 α /MIP-1 β /RANTES (Nelson and Krensky 2001, Kitaya, Nakayama et al. 2003, Carlino, Stabile et al. 2008, Santoni, Carlino et al. 2008). Освен това, прогестеронът значително увеличава продукцията на RANTES, което може да е свързано с локалната индукция на Th1-тип отговора, необходим за успешната имплантация (Ramhorst, Patel et al. 2006). Данните ни до момента предполагат, че CCR5 може би е отговорен за селективното натрупване и задържане на ефекторните $\gamma\delta$ Т клетки в мястото на контакт с ембриона.



Фиг. 11. Експанзия на проинфламаторни $\gamma\delta$ T клетки (CCR5+) на майчино-феталната повърхност по време на ранната бременност при жената. По време на първия триместър про-възпалителните $\gamma\delta$ T клетки доминират на майчино-феталната граница и са в минимално количество в кръвта на бременните жени (чифтни образци). С напредване на бременността тяхното количество на майчино-феталната граница намалява достоверно. В кръвта на небременните жени не се установяват про-възпалителни $\gamma\delta$ T клетки. На графиката са показани средна ст-ст \pm ст.грешка, paired и unpaired t-tests, n=5, GraphPad Prism v.4. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001.



Фиг. 12. Репрезентативни хистограми, показващи количеството на проинфламаторните CCR5+ $\gamma\delta$ T клетки в кръв на бременни и небременни жени, и в ранна и терминална децидуа; гейт на CD3+ $\gamma\delta$ T клетки; FMO (fluorescence minus one) контрола.



Фиг. 13. Експресия на хомеостатичен хемокинов рецептор CCR7 върху $\gamma\delta$ T клетките по време на бременността. По време на ранната бременност CCR7+ $\gamma\delta$ T

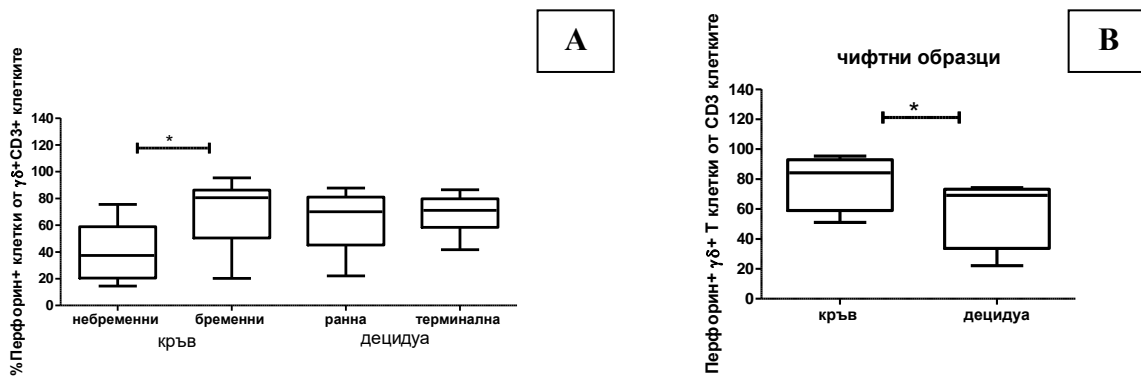
клетките са в по-голямо количество в ранната децидуа в сравнение с кръвта на бременните жени (чифтни образци). С напредване на бременността се наблюдава тенденция за тяхното увеличаване на майчино-феталната граница. CCR7+ $\gamma\delta$ + T клетките в кръвта на бременните и небременни жени са в сравними количества. На графиката са показани средна ст-ст \pm ст.грешка, paired и unpaired t-tests, n=5-6, GraphPad Prism v.4. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001.

Твърденията, че възпалителният процес по време на ранната бременност е асоцииран единствено и само с негативни последици за бременността вече не са актуални (Kemp 2014). Въпреки че ранни проучвания са показали, че цитокиновият профил на майчино-феталната граница е насочен в Th2 посока (Lin, Mossman et al. 1993), проучване при мишки демонстрира, че отсъствието на Th2 цитокини като IL-4, IL-5, IL-9, и IL-13 на майчино-феталната граница не води задължително до загуба на концептуса (Fallon, Jolin et al. 2002). Нещо повече, напоследък бяха публикувани данни показващи, че подходящото генериране на “мека” про-възпалителна среда е важно условие за успешната имплантация (Rugeles and Shearer 2004, Abrahams, Visintin et al. 2005) и че децидуалните лимфоцити по време на бременността при жената имат предимно Th1, Th17 и T-регулаторен профил (Zeng, Liu et al. 2017). Ефекторните T клетки на майчино-феталната граница продуцират редица Th1 цитокини включително TNF- α и IFN- γ , които са изключително важни за ангиогенезата и ремоделирането на маточните спирални артерии по време на имплантацията (Saito, Nishikawa et al. 2010, Erkers, Stikvoort et al. 2017), за контрола на трофобластната инвазия (Bauer, Pollheimer et al. 2004, Hu, Dutz et al. 2006, Otun, Lash et al. 2011) и за плацентарната протекция от патогени. В това проучване ние демонстрираме, че ефекторният про-възпалителен фенотип на децидуалните $\gamma\delta$ T клетки е съвместим с нормалната ранна бременност при жената.

6. Продуциране на перфорин от $\gamma\delta$ T клетките по време на бременността

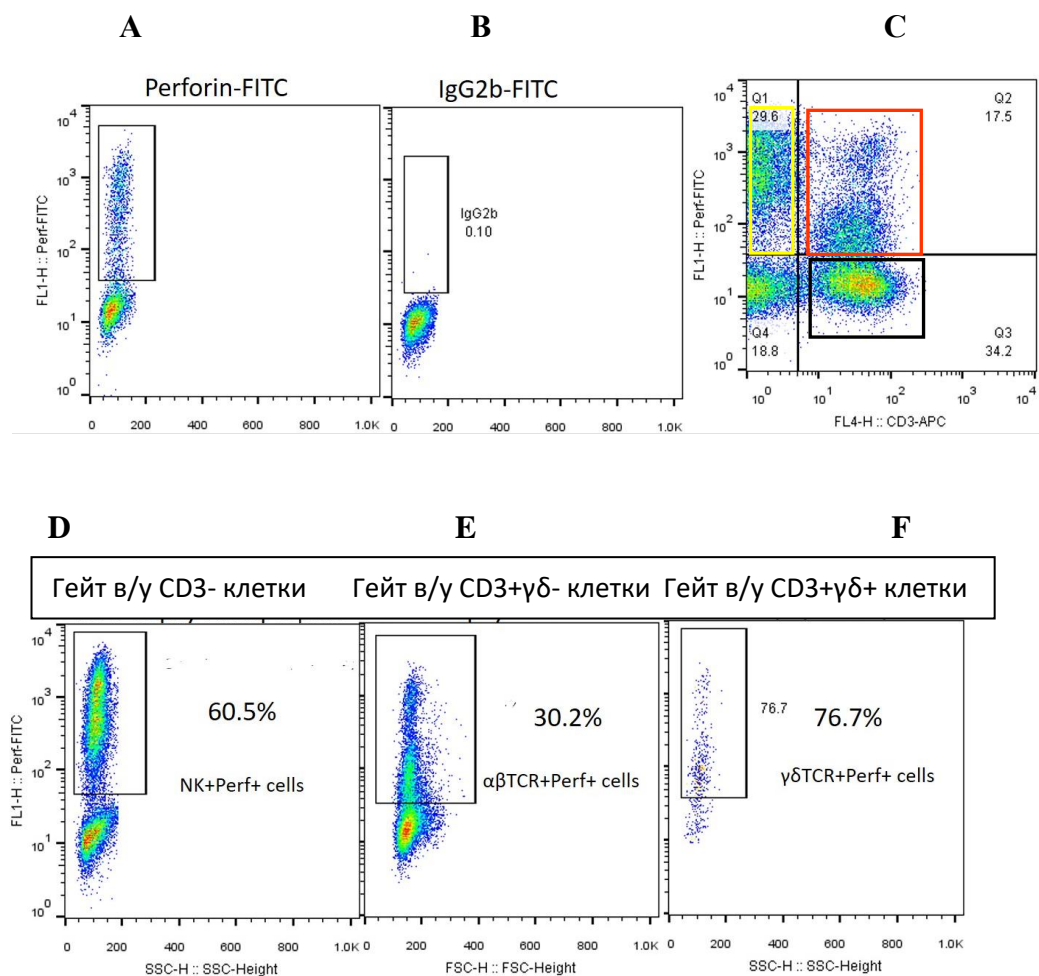
Неконвенционалните $\gamma\delta$ T клетки са цитотоксични клетки, които могат да разпознават и елиминират както патогени, така стресирани и неопластични клетки (Hayday 2000, Kabelitz, Glatzel et al. 2000, Born, Reardon et al. 2006, Xi X Guo, Chen et al. 2009). Тяхната цитотоксичност се осъществява с помощта на цитолитичните молекули перфорин, гранзими и гранулизин. Цитотоксичните механизми имат важна роля в отстраняването на вирусни и бактериални инфекции, участват в туморния контрол, отхвърлянето на трансплантата, хомеостатичната регулация на имунните отговори и периферния толеранс (Spielman, RK et al. 1998). Като част от фенотипната характеристика на $\gamma\delta$ T клетките за нас беше интересно да проследим експресията на порообразуващата цитотоксична молекула перфорин вътреклетъчно в $\gamma\delta$ T клетките, намиращи се на майчино-феталната граница и в кръвта на бременните жени. Независимо от локацията на $\gamma\delta$ T клетките и етапите на бременност повече от половината от целия пул $\gamma\delta$ T клетки експресират перфорин. Единствено в кръвта на небременните жени пропорцията на цитотоксичните клетки беше около 40% от $\gamma\delta$ T клетките и тя е достоверно по-ниска в сравнение с пропорцията им в кръвта на

бременните жени (39.26 ± 10.26 срещу 70.31 ± 8.15 , $p=0.0387$, **Фиг. 14**). Интересно е, да се отбележи, че при сравнение на перфорин+ $\gamma\delta$ + Т клетките в нашите чифтни образци - кръв и ранна децидуа от една и съща жена - цитотоксичните $\gamma\delta$ Т клетки на майчино-феталната граница бяха в достоверно по-малко количество, отколкото в кръвта на бременните жени (58.58 ± 12.3 срещу 78.68 ± 9.6 , $p=0.0230$, **Фиг. 14**). НК клетките, независимо периферни или децидуални продуцират интензивно перфорин и се дефинират като bright (Perf++), докато в популацията на Т клетките ($\alpha\beta$ или $\gamma\delta$) се установяват dim (Perf+) и bright (Perf++) субсети (**Фиг. 15**). Нашите данни показват, че $\gamma\delta$ Т клетките на майчино-феталната повърхност са с потенциал да бъдат цитотоксични, но дали реално ще проявят цитотоксична активност срещу трофобластните клетки не е ясно. В ход са изследвания, показващи наличието и на други цитотоксични медиатори в $\gamma\delta$ Т клетките, както и функционални тестове с оглед доказване на тяхната функционална цитотоксичност.



Фиг. 14. Експресия на перфорин от $\gamma\delta$ Т клетките по време на бременността.

А) В периферната кръв на бременните жени перфорин+ $\gamma\delta$ + Т клетките са в значително по-високо количество в сравнение с небременните жени. По време на бременността количеството на перфорин+ $\gamma\delta$ + Т клетките е над 60% от всички $\gamma\delta$ Т клетки, като не се наблюдава статистическа разлика в количествата им в зависимост от локацията на $\gamma\delta$ Т клетките. В) При анализ на чифтни образци кръв – децидуа от една и съща жена в ранна бременност, цитотоксичните (перфорин+) $\gamma\delta$ Т клетки са в по-малко количество на майчино-феталната граница в сравнение с кръвта на бременните жени. На графиките са показани средна ст-ст \pm ст.грешка, GraphPad Prism v.4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. На графика А - unpaired t-tests, $n=5-9$, на графика В - paired t test, $n=4$.

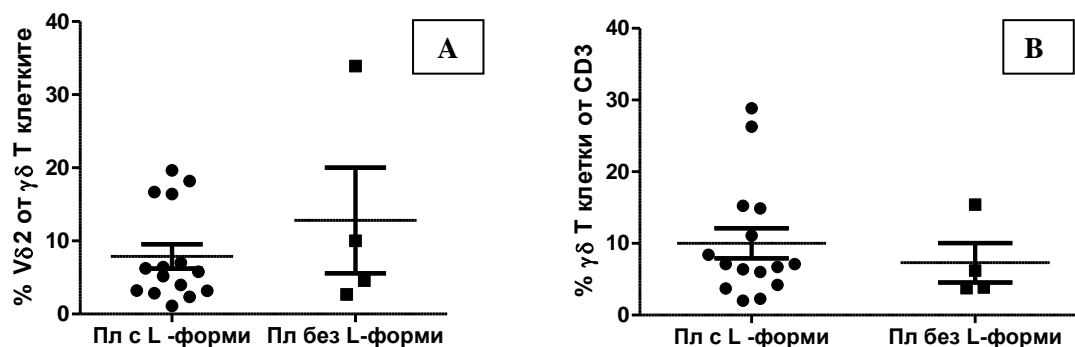


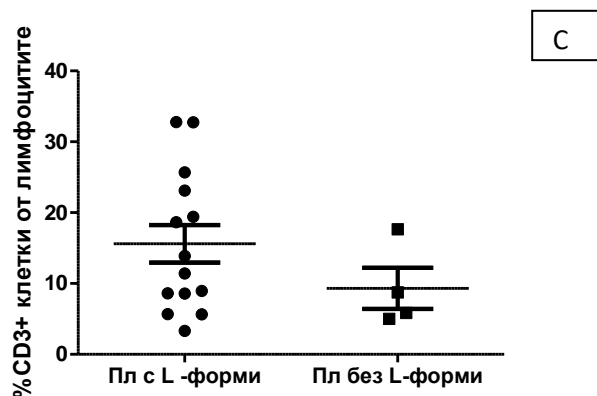
Фиг. 15. Репрезентативни флоуцитометрични плотове, показващи продукцията на перфорин от периферни и децидуални мононуклеарни клетки. А, В – оцветяване на ПМК с антияло срещу перфорин, конюгирано с FITC и изотипна контрола (IgG2b, конюгиран с FITC); С – продукция на перфорин от периферни NK (жълт контур) и CD3 T клетки (червен контур). CD3 T клетки, негативни за перфорин (черен контур). Количества на децидуални NK (D), $\alpha\beta$ T (E) и $\gamma\delta$ T (F) клетки, продуциращи перфорин.

7. $\gamma\delta$ T-клетъчен отговор в плацентобиом с и без микобактериални L-форми при жени с нормална доносна бременност

Всички бременни жени, включени в това изследване са БЦЖ-ваксинирани. В част от плацентите на жени с доносна бременност беше установено наличието на микобактериални L-форми. Микобактериалните L-форми бяха доказани чрез микробиологично култивиране по специфичен протокол и генетична идентификация с TaqMan qPCR на специфичната за МТБ комплекса инсерционна секвенция IS6110. Тези изследвания бяха проведени в BSL3 сектора в секцията по Патогенни бактерии,

Институт по микробиология – БАН от екипа на доц. д-р Надя Маркова. Микобактериалната инфекция и БЦЖ ваксинацията индуцират специфична експанзия на $\gamma\delta$ Т клетките в частност V δ 2 субсета при възрастни индивиди *in vivo* (Eberl and Jomaa 2003) и *in vitro* при ре-стимулация с микобактериални лизати и БЦЖ (Hoft, Brown et al. 1998), вследствие на продукцията на фосфоантигени от MbT и БЦЖ (Constant, Roquet et al. 1995). За нас беше интересно да проследим дали наличието на микобактериални L-форми в плацентобиома би повлияло количеството на плацентарните патоген-реактивни V δ 2 Т клетки на БЦЖ ваксинираните жени. За тази цел сравнихме количествата на V δ 2 Т клетките в плаценти с и без L-форми. В допълнение сравнихме количествата и на тоталните $\gamma\delta$ Т клетки и на Т клетките като цяло. Нашите резултати показаха, че наличието на микобактериални L-форми в плацентобиома на бременни жени, ваксинирани с БЦЖ в детството им не индуцира повишени нива нито на плацентарните патоген-реактивни V δ 2 $\gamma\delta$ Т клетки, нито на $\gamma\delta$ Т клетките и Т клетките като цяло (Фиг. 16). Не бихме могли, обаче, да изключим възможен ефект върху техния фенотип. Досега от микобактериалната стена са изолирани и идентифицирани четири различни фосфоантигена, наречени TUBag1 до TUBag4 (Constant, Davodeau et al. 1994), които са отговорни за индуциране на специфичен V δ 2 имунен отговор (Andersen and Kaufmann 2014). Когато бактериите изгубят клетъчната си стена, превръщайки се в L-форми, те губят „патоген-свързани молекулни модели“, които са важни за разпознаването им от имунната система на гостоприемника (Akira, Uematsu et al. 2006, Mogensen 2009, Sukhithasri, Biswas et al. 2013). Това би могло да обясни липсата на количествена промяна в патоген-реактивните $\gamma\delta$ Т клетки.

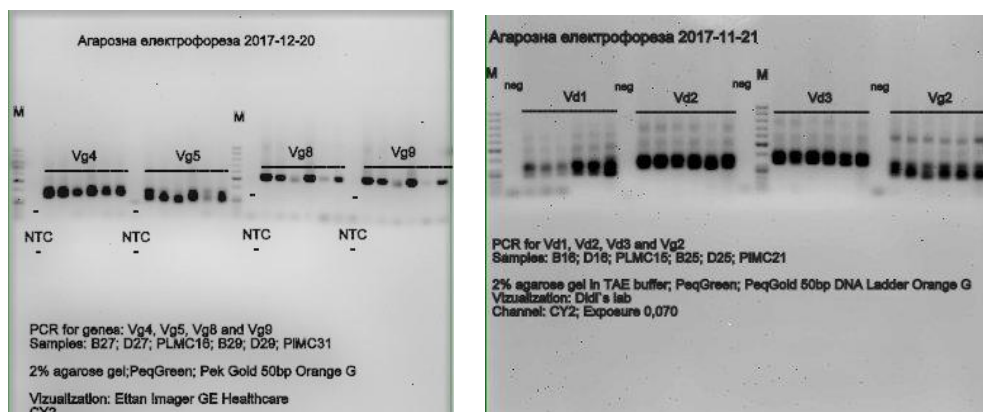




Фиг. 16. Наличието на микобактериални L-форми в плацентобиома на БЦЖ-ваксинирани бременни жени с доносена бременност не повлиява количеството на резидентните патоген-реактивни V δ 2 клетки (A), $\gamma\delta$ T клетки (B) и T клетки (C). GraphPad Prism v.4 (San Diego, CA), Student t test, $p < 0.05$ отразява статистически достоверни разлики. Пл - плацента.

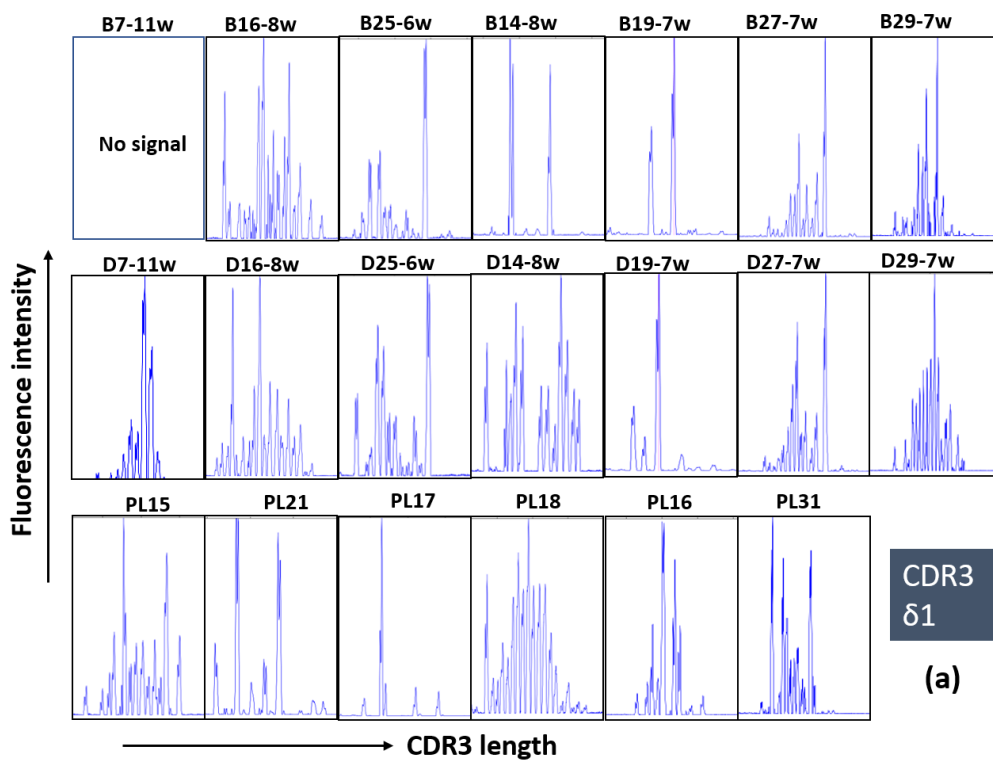
7. Поликлонални профили на CDR3 регионите на всички δ и всички γ вериги с изключение на $\gamma 9$ веригата, която е със силно рестриктиран CDR3 репертоар

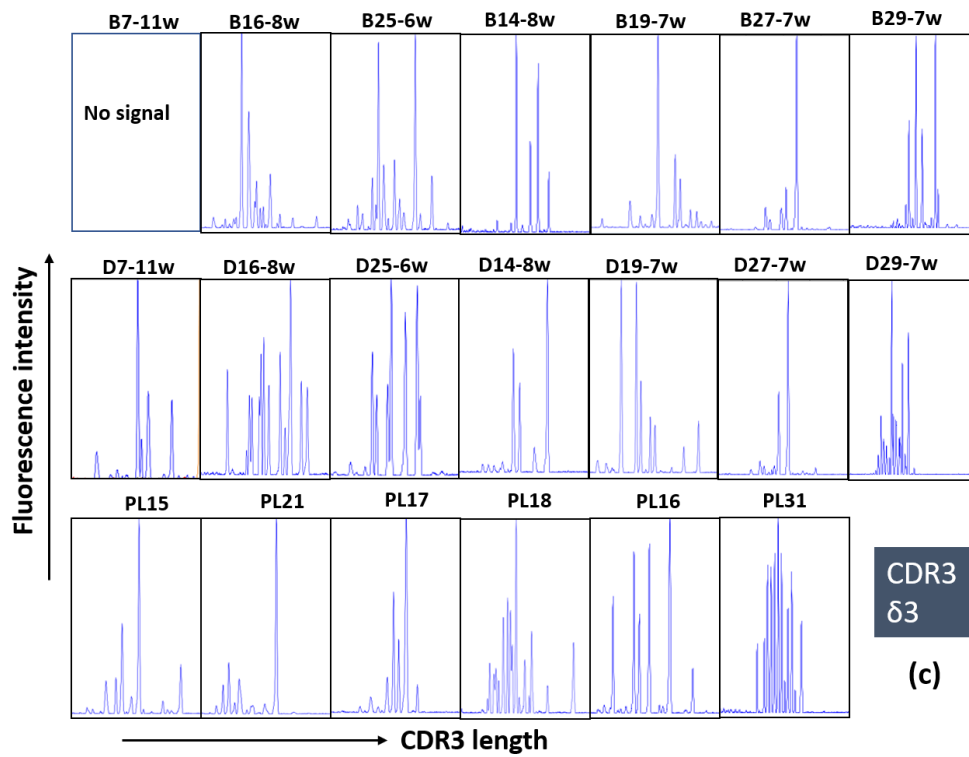
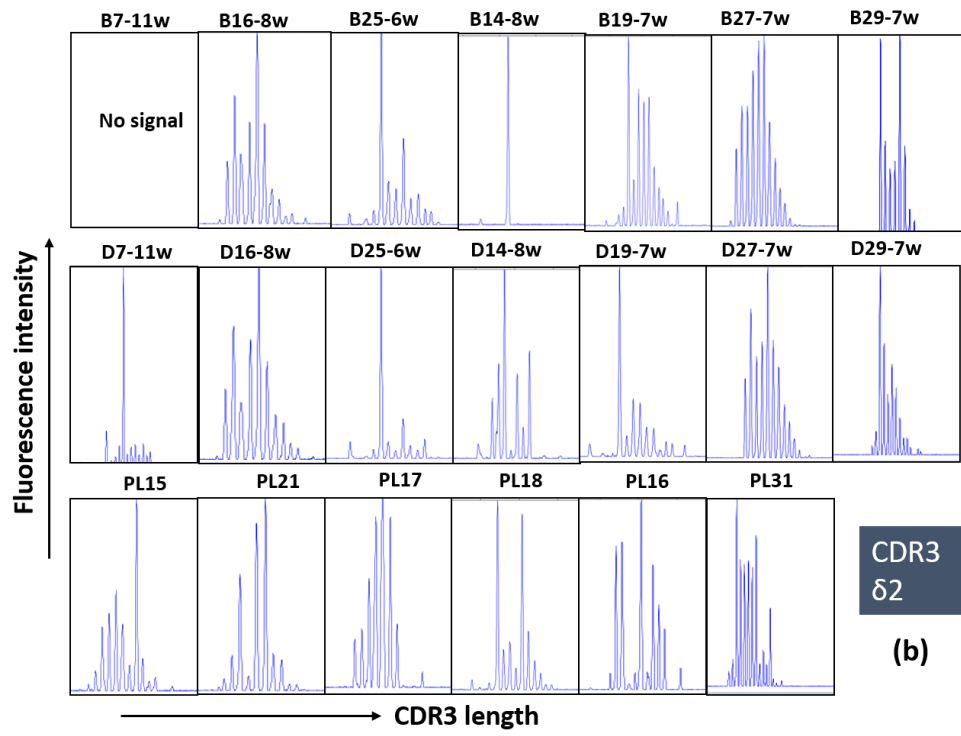
Нашата находка, че в децидуата по време на ранна бременност има натрупване на крайно диференцирани $\gamma\delta$ T клетки със специфичен фенотип ни провокира да потърсим отговор на въпроса дали бременността повлиява по някакъв начин репертоара на $\gamma\delta$ T клетките с оглед фокусирането му и доминиране на децидуа-специфични $\gamma\delta$ T клетъчни клонове. За тази цел направихме спектрален (имуноскопски) скрининг на дължината на CDR3 регионите на всички възможни V γ и V δ транскрипти на γ и δ веригите в $\gamma\delta$ T-клетъчните популации, изолирани от децидуа и кръв на жени в ранна бременност и от децидуа на жени в доносена бременност. Трябва да подчертаем, че този анализ е направен върху клетъчни популации от първични клетки *ex vivo*, а не след култивиране и предварително размножаване на $\gamma\delta$ T клетките. На **Фиг. 17** е показан репрезентативен агарозен гел с визуализирани V γ и V δ транскрипти в образци от кръв, ранна и терминална децидуа.

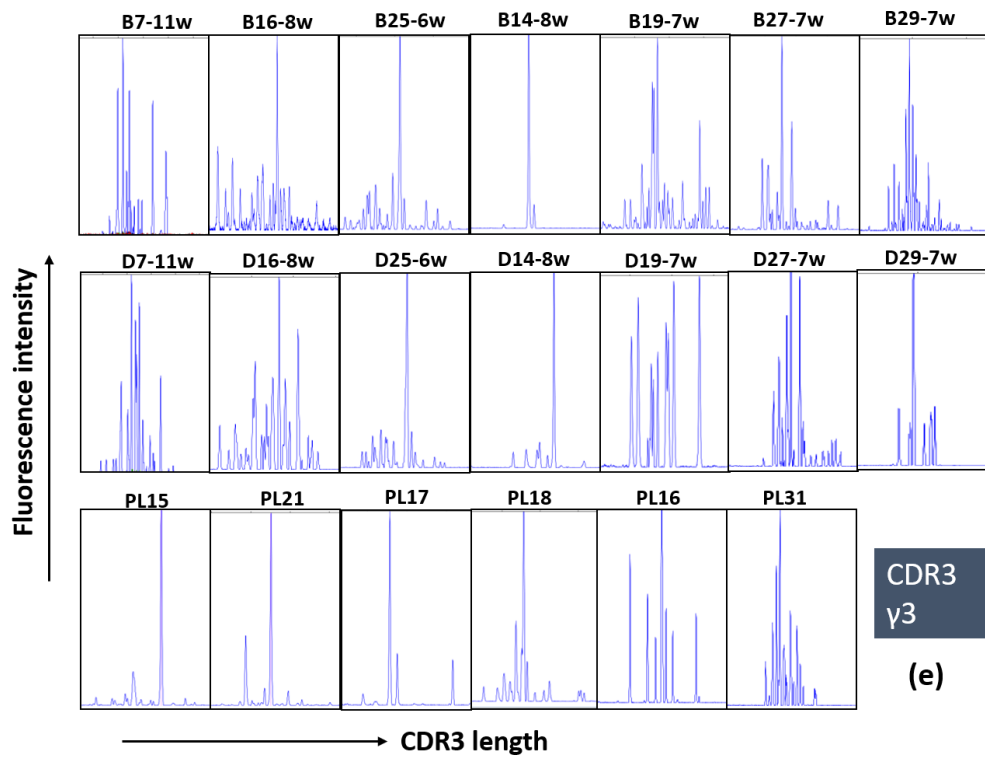
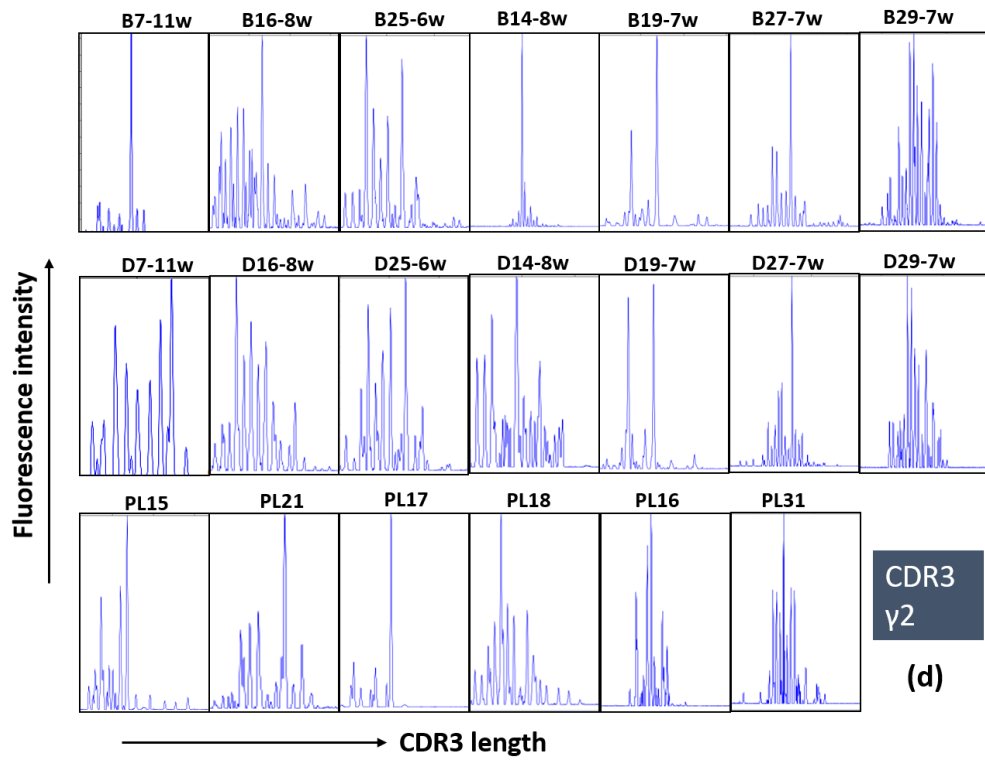


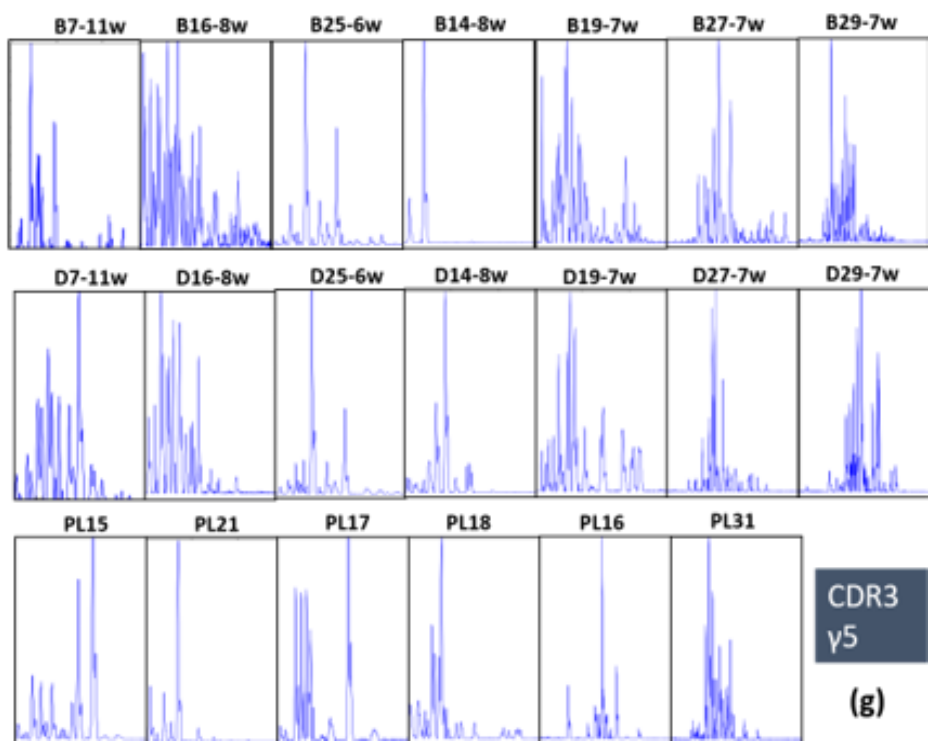
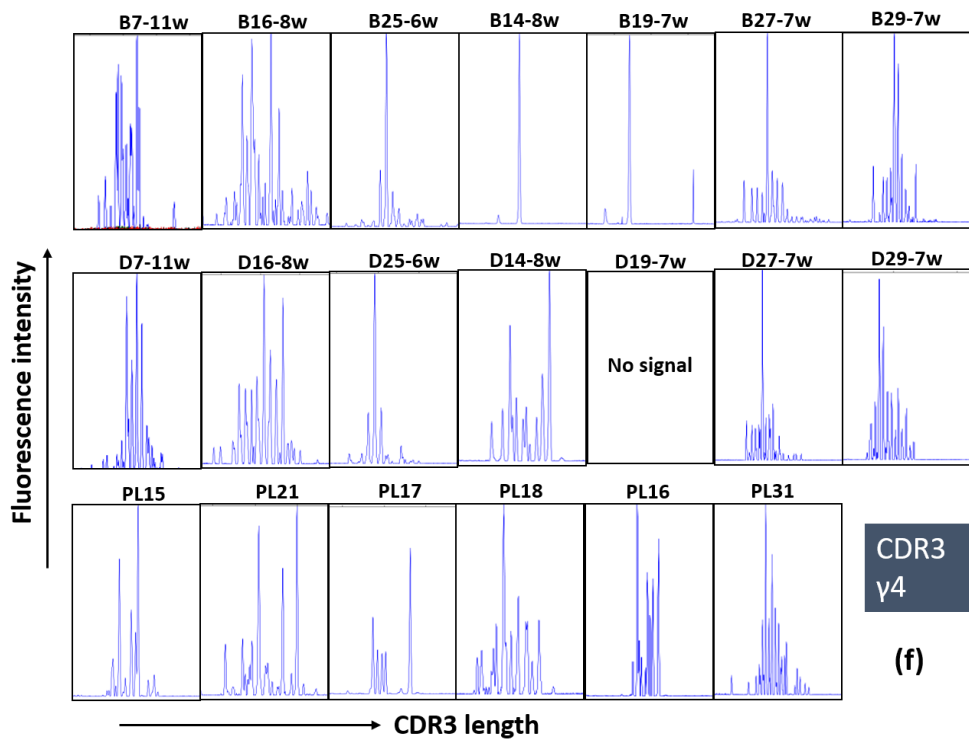
Фиг. 17. Снимки на репрезентативни агарозни гелове с $V\gamma$ и $V\delta$ транскрипти в образци от кръв, ранна и терминална децидуа. NTC (non-template control) – проба без ДНК (негативна контрола).

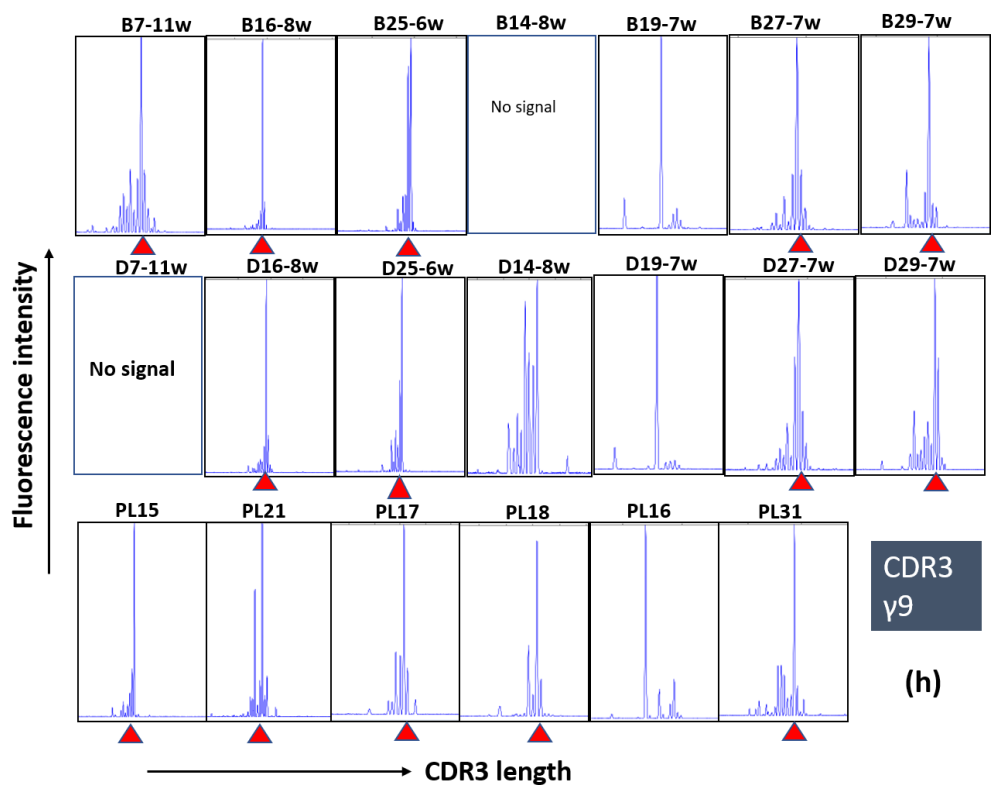
Както се вижда на **Фиг. 18** спектроскопският анализ на CDR3 дължините на всички δ и γ вериги от децидуа и кръв на 7 жени в ранна бременност (6-11 гест. сед.) и от децидуа от 6 жени с доносена бременност (38-40 гест. сед.) показва две основни находки: 1) поликлонални CDR3 репертоари на $\delta 1$, $\delta 2$ и $\delta 3$ веригите и $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$ и $\gamma 5$ веригите в образците, получени от кръв, ранна децидуа и терминална децидуа и 2) олигоклонална експанзия на $V\gamma 9$ транскрипти и силно рестриктиран CDR3 $\gamma 9$ репертоар в повечето от тестваните образци като е интересно да се отбележи, че CDR3 регионите с една и съща дължина перзистират и в трите тествани локации – децидуа и кръв (1-ви триместър) и в децидуа (3-ти триместър). Установихме известно припокриване на $V\delta$ и $V\gamma$ TCR профилите между децидуалните $\gamma\delta T$ клетки и тези на циркулиращите $\gamma\delta T$ клетки, докато доминантните $V\delta$ и $V\gamma$ T клетъчни клонове, установени в терминалната децидуа бяха различни (**Фиг. 18**). Нещо повече, в терминална децидуа репертоарите бяха по-фокусирани т.е. с близки до олигоклоналния профил, характеризиращ се с намножаване на ограничен брой клонотипове, което се изразява в появата на относително малък брой пикове (<5) в спектрограмите. Имуноскопските профили на $\delta 3$ транскриптите от ранна и терминална децидуа, както и от кръв на бременни жени демонстрира присъствието на олигоклонални експанзии в тези три компартиента без припокриване на репертоарите (**Фиг. 18**).





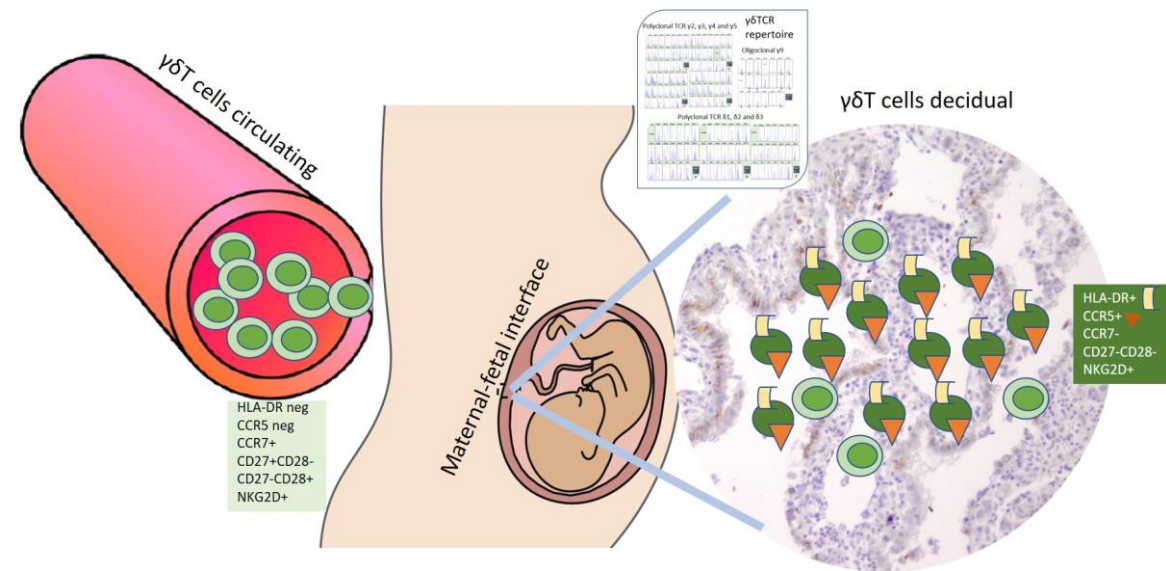






Фиг. 18. Профили на $\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$ репертоарите (a, b, c) и $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\gamma 5$ и $\gamma 9$ репертоарите (d, e, f, g, h) на $\gamma\delta T$ клетъчни популации, изолирани от чифтни образци кръв-децидуа (ранна бременност) и от терминална децидуа на жени с нормална бременност. Репертоарите на всички изследвани δ и γ вериги с изключение на $\gamma 9$ са поликлонални. $\gamma 9$ веригата е със силно рестриктиран CDR3 репертоар, показано чрез доминиране на CDR3 региони с една и съща дължина (червена стрелка) и олигоклонален спектър.

Като обобщение на по-голямата част от резултатите, получени в това проучване бихме могли да предложим следния модел за децидуа-специфичен фенотипен и спектрален профил на $\gamma\delta$ T клетките по време на ранната бременност при жената (Фиг. 19).



Фиг. 19. Фенотипен и спектрален профил на $\gamma\delta$ T лимфоцитите на майчино-феталната граница и в кръвта на бременните жени в периода на ранна бременност.

Бременността не индуцира промени нито в количеството, нито във фенотипа, нито в репертоара на периферните $\gamma\delta$ T клетки. Това е обяснимо имайки предвид, че по време на първи триместър на бременността интимният контакт между майчините имунни клетки и трофобластните клетки е рестриктиран до децидуалната тъкан. Едва в началото на втори триместър майчината кръв перфузира в интервилозното пространство и плацентарните вили освобождават екзозоми и клетъчни елементи, които могат да се установят в майчината кръв (Foidart, Hustin et al. 1992, Jaffe, Jauniaux et al. 1997, Burton, Jauniaux et al. 1999, Nelson 2003, Schaaps, Tsatsaris et al. 2005). Това означава, че по време на втори триместър първоначално ограниченият до децидуалната тъкан контакт между феталните и майчините имунни клетки става вече системен.

V. ИЗВОДИ

1. $\gamma\delta$ T лимфоцитите са резидентни клетки в децидуалната тъкан по време на ранната бременност при жената, разположени: 1) интраепително в децидуалните жлези; 2) в клъстери в непосредствена близост до децидуалните жлези и 3) като единични клетки в децидуалната строма.
2. Ранната бременност индуцира по-голямо количество на $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница в сравнение с кръвта на бременните жени. На майчино-феталната граница доминират V δ 1 $\gamma\delta$ T клетките, докато V δ 2 субсетът е в незначително и относително постоянно количество. Ранната бременност при жената не повлиява количествата на периферните $\gamma\delta$ T клетки и техните V δ 1 и V δ 2 субсети.
3. Наличието на микобактериални L-форми в плацентобиома на жени с доносена бременност не индуцира повишени нива нито на плацентарните патоген-реактивни V δ 2 клетки, нито на тоталните $\gamma\delta$ T и CD3 клетки.
4. В периода на ранната бременност мнозинството (над 50%) от $\gamma\delta$ T клетките експресират активирация NK рецептор NKG2D независимо дали са на майчино-феталната граница или в кръвта на бременните жени, но с напредване на бременността позитивните за този рецептор $\gamma\delta$ T клетки на майчино-феталната граница намаляват достоверно.
5. По време на бременността $\gamma\delta$ T клетките на майчино-феталната граница са активирани, не се установяват обаче активирани $\gamma\delta$ T клетки в кръвта нито на бременни, нито на небременни жени.
6. На майчино-феталната граница по време на ранна бременност преобладават напълно диференцирани ефекторни $\gamma\delta$ T клетки, докато наивните $\gamma\delta$ T клетки са в минимално количество. В края на бременността наблюдаваме обратно съотношение – по-малко количество и предимно наивни $\gamma\delta$ T клетки.
7. Ранната бременност индуцира експанзия на про-инфламаторни (CCR5+) $\gamma\delta$ T клетки на майчино-феталната граница, докато същите са в пренебрежимо малко количество в кръвта на бременните жени. Моделът на разпределение на проинфламаторните и хемостатичните $\gamma\delta$ T клетки повтаря модела на разпределение на ефекторните и наивните $\gamma\delta$ T клетки, респективно.
8. Ранната бременност не повлиява нито количеството, нито фенотипа /активационен и диференциационен статус, хемокинов профил/ на периферните $\gamma\delta$ T клетки, което е индикация, че важните и интересни $\gamma\delta$ T-клетъчни имунни събития протичат на майчино-феталната граница.
9. По време на бременността и на майчино-феталната граница, и в кръвта на бременните жени доминират потенциално цитотоксични $\gamma\delta$ T клетки.
10. δ 1, δ 2 и δ 3 веригите и γ 2, γ 3, γ 4 и γ 5 веригите на T-клетъчните рецептори на $\gamma\delta$ T клетки от кръв, ранна и терминална децидуа от бременни жени показват поликлонални репертоари. Установява се обаче олигоклонална експанзия на V γ 9 транскрипти и висока рестрикция на γ 9 репертоара.

VI. ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

- На базата на сравнителен анализ на количествената динамика на $\gamma\delta$ T клетките по време на бременността при жената е установено **по-голямото им количество на майчино-феталната граница** в сравнение с кръвта на бременните жени.
- Представени са оригинални данни за наличието на **интраепителни $\gamma\delta$ T клетки в децидуални жлези** по време на ранната бременност при жената.
- **Колонизацията на плацентобиома** на БЦЖ-васкинирани бременни жени с доносена бременност с микобактериални L-форми **не повлиява количеството на плацентарните патоген-реактивни V δ 2 $\gamma\delta$ T клетки.**
- По време на ранната бременност в мястото на майчино-фетален контакт $\gamma\delta$ T клетките показват **децидуа-специфичен профил** на активирани и напълно диференцирани, проинфламаторни клетки.
- Представени са оригинални данни за **поликлонални репертоари на γ 2, γ 3, γ 4 и γ 5 веригите и олигоклонален CDR3 γ 9 репертоар** на $\gamma\delta$ T клетки от кръв, ранна и терминална децидуа от бременни жени в децидуа от ранна и доносена бременност.

VII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ СТАТИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Dimova T., **Terzieva A.**, Djerov L., Dimitrova V., Nikolov A., Grozdanov P., Markova N. Mother-to-newborn transmission of mycobacterial L-forms and V δ 2 T-cell response in placentobiome of BCG-vaccinated pregnant women. Nature Scientific Report 2017, 7: 17 366. DOI: 10.1038/s41598-017-17644-z. **IF 5.228**

2. **Terzieva A.**, Dimitrova V., Djerov L., Dimitrova P., Zapryanova S., Hristova I., Vangelov I., Dimova T. Early Pregnancy Human Decidua is Enriched with Activated, Fully Differentiated and Pro-Inflammatory Gamma/Delta T Cells with Diverse TCR Repertoires. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 687; doi:10.3390/jims20030687. **IF 3.687**

VIII. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Terzieva A.** „Роля на $\gamma\delta$ T клетките по време на бременността при жената”, Интердисциплинарен докторански форум, 6 април 2016, София, България, SOP.
2. Dimova T., **A. Terzieva**, G. Slavchev, L. Djerov, N. Markova. Normal term placenta harbors mycobacterial L-forms: possible mother-to-child transmission of BCG vaccine. 13-th ESRI Congress, 22-25 of June 2016, Erfurt, Germany, poster.
3. **Terzieva A.**, Dimitrova V., Dimitrova P., Zlatkov V., Dimova T. Enrichment of differentiated maternal $\gamma\delta$ T cells at materno-fetal interface during early human pregnancy. 8th EFIS/EJI SOUTH EAST EUROPEAN IMMUNOLOGY SCHOOL (SEEIS2016), October 14 - 17, 2016, Durres, Albania, SOP.
4. **Dimova T.**, **Terzieva A.**, Djerov L., Slavchev G., Markova N. Colonization of normal placentas with mycobacterial L-forms: possible mother-to-child transmission of BCG vaccine

and an impact on $\gamma\delta$ T-cell immunity. 10-th Jubilee Conference of ВАСИ, 28-29 October 2016, Sofia, Bulgaria, SOP.

5. **Терзиева А.**, Я. Христова, В. Димитрова, Л. Джеров, Т. Димова. Количествен и фенотипен анализ на $\gamma\delta$ Т клетките по време на бременността. Седма работна среща – „Репродуктивна медицина 2017-противоречия и консенсус“, 28-30 Април 2017, Плевен, България, постер.

6. **Димова Т.**, **А. Терзиева**, Л. Джеров, А. Николов, Г. Славчев, Н. Маркова. Трансплацентарен пренос на микобактериални L-форми и $\gamma\delta$ Т-клетъчен отговор в плацентобиома. Плевенски дни на репродуктивната медицина 2017 – консенсус и противоречия, 28 – 30 Април, 2017 – Плевен, Книжка с абстракти стр.43, SOP.

7. **Terzieva A.**, Hristova Y., Dimitrova V., Dimitrova P., Dimova T. Decidua-based $\gamma\delta$ T cells are enriched and fully differentiated during early human pregnancy. 14th ESRI Congress, Cos, Greece, 28.09.-02.10 2017, Abstracts/Journal of Reproductive Immunology, 122 (2017) p. 47, poster.

8. **Т. Димова**, **А Терзиева**, L. Djerov, A. Nikolov, V. Dimitrova, P. Grozdanov, N. Markova. Mycobacterial L-forms and Vdelta2-cell response in the placentobiome of BCG-vaccinated pregnant women. 14th ESRI Congress, 28.09.-02.10 2017 Kos, Greece. Abstracts/Journal of Reproductive Immunology, 122 (2017) p. 39. SOP.

9. **Terzieva A.**, Hristova I., Dimitrova V., Djerov L., Dimitrova P., Vangelov I., Dimova T. Early pregnancy induces an influx of activated and fully differentiated pro-inflammatory $\gamma\delta$ T cells at the materno-fetal interface. 15th ISIR, June 15-17.06. 2018, Varna, Bulgaria, P2.

10. **Dimova T.**, **Terzieva A.**, Djerov L., Nikolov A., Dimitrova V., Grozdanov P., Markova N. BCG vaccination in the childhood of women influences their placenobiome during pregnancy: vertical transmission of mycobacterial L forms. 5th European Congress of Immunology ECI 2018, 2-5.09.2018, Amsterdam, The Netherlands. Book of abstracts P.D1.04.04 – p 443, poster.

11. **Terzieva A.**, **Zapryanova S.**, Hristova I., Dimitrova V., Djerov L., Dimitrova P., Dimova T. Human early pregnancy decidua is highly enriched for differentiated and pro-inflammatory gamma/delta T cells with diverse TCR repertoires. 5th European Congress of Immunology ECI 2018, 2-5.09.2018, Amsterdam, The Netherlands. Book of abstracts P.A3.05.19, p160, poster.

БЛАГОДАРНОСТ

Бих искала да изразя своята най-искрена благодарност към научния си ръководител **доц. Таня Димова** за търпението, предадените знания и практически опит. Благодаря за съветите, подкрепата и неоченимата помощ при изготвянето на дисертационния труд. Признателна съм на **доц. Таня Димова** за предоставената възможност да работя с ръководител като нея.

Изключително съм благодарна на доц. д-р Виолета Димитрова, д-р Любомир Джеров и проф. д-р Асен Николов от Университетската акушеро-гинекологична болница “Майчин Дом”, както и на проф. Стефан Лолов (ИБИР-БАН) за предоставените материали.

Благодаря на доц. д-р Надя Маркова, гл. ас. Георги Славчев, гл. ас. Петър Грозданов и Албена Чернева от Институт по Микробиология „Стефан Ангелов” към БАН за съвместната работа и обучение.

Благодаря на всички колеги за топлото отношение и участието им, като доброволци в нашите експериментални групи.

Специална благодарност изказвам на гл. ас. Силвина Запрянова, гл. ас. Ивайло Вангелов и специалист Верка Пешева за помощта и приятната работна атмосфера, както и на доц. Павел Рашев за съдействието и доброто отношение.

Искрено благодаря на Деси и Деспина за приятелското рамо, за куража и за хубавите мигове, прекарани с тях.

Благодаря на родителите си, на съпруга ми Стоян и на Ева за подкрепата, разбирането и вярата в мен.

Дисертационният труд е изработен с финансиране от Фонд Научни Изследвания, България на проект с ръководител доц. д-р Таня Димова (ДН 03-5, 2016-2020).

