

Rola limfocytów T $\gamma\delta$ w kontroli statusu immunologicznego układu rozrodczego w badaniach *in situ* i *ex vivo* oraz ich wpływu na odpowiedź na antygeny podawane dopochwowo.

Streszczenie

Limfocyty T $\gamma\delta$ określa się często w literaturze jako „most” pomiędzy odpornością wrodzoną a nabytą. Komórki te są najbardziej rozpowszechnione w tkankach nabłonkowych, co sugeruje, że tworzą pierwszą linię obrony przed patogenami. Ich główne funkcje zostały poznane przede wszystkim poprzez badania homeostazy naskórka u myszy, jednakże ich rola w układzie rozrodczym pozostaje w dużej mierze niezbadana. W niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia znaczenia limfocytów T $\gamma\delta$ w kontroli immunologicznej żeńskiego układu rozrodczego.

Z uwagi na brak dostępnych protokołów pierwszym etapem pracy badawczej było opracowanie metod analizy komórek T $\gamma\delta$ w mysiej pochwie. Aby zapewnić barierę ochronną przed światem zewnętrznym, nabłonek pochwy jest stosunkowo gruby i zwarty, co znacząco utrudnia korzystanie z klasycznych technik obrazowania oraz analizy cytometrycznej. Wykorzystując nowoczesne podejście w mikroskopii grubych preparatów tkankowych, opracowano metodę oczyszczania optycznego pochwy opartą na technice CUBIC, która umożliwiła wizualizację 3D limfocytów T $\gamma\delta$ oraz określenie ich dystrybucji. Dzięki tej metodzie wykazano, że liczba komórek T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy zależy od fazy cyklu rujowego, osiągając maksimum w fazie diestrus, zdominowanej przez progesteron. Limfocyty T $\gamma\delta$ lokalizują się wówczas bliżej światła pochwy, w porównaniu do fazy estrus, zależnej od estrogenów. Ich ilość w nabłonku pochwy jest trzykrotnie większa niż w podścielisku pochwy, co jest niezależne od zmian hormonalnych cyklu płciowego. Drugim podejściem do analizy komórek T $\gamma\delta$

w układzie rozrodczym było zastosowanie cytometrii przepływowej po wcześniejszym enzymatycznym trawieniu tkanki. Porównując wiele enzymów, wybrano Liberazę TL jako enzym najbardziej skuteczny do oceny składu komórkowego mysiego układu rozrodczego. Opracowany protokół pozwolił na weryfikację danych mikroskopowych oraz na wykazanie, że limfocyty T $\gamma\delta$ nie mają znaczącego wpływu na liczebność i udział procentowy innych populacji komórek układu odpornościowego w stanie homeostazy, jak i w przebiegu zapalenia pod wpływem stymulacji receptorów Toll-podobnych (TLR7 i TLR9), zarówno w pochwie, jak i w macicy. Wnioski te wyciągnięto na podstawie porównania cytometrycznego komórek wyizolowanych z tkanek pobranych od myszy typu dzikiego i modyfikowanego genetycznie

szczepu, pozbawionego komórek T $\gamma\delta$ (*Tcrd*^{-/-}). Uzyskane dane znalazły częściowe potwierdzenie w badaniach roli limfocytów T $\gamma\delta$ we wzbudzeniu reakcji odpornościowych po immunizacji antygenami aplikowanymi na błonę śluzową pochwy. Przy braku komórek T $\gamma\delta$ indukcja odpowiedzi immunologicznej na antygen białkowy – owoalbuminę, podaną dośluzówkowo, jest podobna jak u myszy szczepu dzikiego. Limfocyty T $\gamma\delta$ wzmagają jednak nieznacznie odpowiedź po szczepieniu dopochwowym antygenem cukrowym z grzyba *Candida albicans* w postaci koniugatu z toksoidem tężca, co sugeruje ich ochronną rolę przed zakażeniami mikologicznymi. Analiza porównawcza dróg podania antygenów wykazała, że jedynie droga dopochwowa jest zależna od fazy cyklu rujowego, podczas gdy zmiany hormonalne nie mają wpływu na podanie podskórne i donosowe. Niejednoznaczny wpływ komórek T $\gamma\delta$ na status i odpowiedź układu odpornościowego u myszy w wieku rozrodczym był inspiracją do zbadania ich roli u myszy starych, u których dochodzi do dysfunkcji reakcji immunologicznych na wielu poziomach. Za pomocą analiz ekspresji genów związanych ze starzeniem się i produkcji cytokin zapalnych wykazano, że proces starzenia w żeńskim układzie rozrodczym powoduje zmianę odpowiedzi układu odpornościowego w kierunku prozapalnym, która bardzo wybiórczo zależy od limfocytów T $\gamma\delta$. Brak tych komórek u starych samic z jednej strony osłabia odporność przeciwwakaźną, co było widoczne na przykładzie spadku ekspresji genu laktoferyny u myszy *Tcrd*^{-/-}, z drugiej strony zwiększa ekspresję niektórych genów układu dopełniacza i powoduje wzrost produkcji czynnika GM-CSF, co końcowo może przyczyniać się do zaburzeń regulacji mechanizmów odpowiadających za kontrolę zapalenia.

Przeprowadzone badania nie wykazały kluczowej roli komórek T $\gamma\delta$ w kontroli reakcji odpornościowych w nabłonku układu rozrodczego. Otrzymane wyniki wskazują raczej na ich subtelny wpływ na niektóre procesy immunologiczne na zasadzie strojenia potencjometrem (ang. *fine-tuning*). Możliwe jest, że w przypadku niedoboru limfocytów T $\gamma\delta$, inne populacje komórek układu odpornościowego przejmują funkcje utrzymania homeostazy nabłonka rozrodczego. Niewątpliwie jednak śródnabłonkowe komórki T $\gamma\delta$ przyczyniają się do wrodzonych odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowych, a ich rola zależy od miejsca zasiedlenia określonego przedziału układu rozrodczego oraz kontekstu komórkowego tkanki. Dalsze badania są niezbędne, aby dokładniej scharakteryzować ich funkcjonowanie i zależności współdziałania z innymi komórkami układu odpornościowego zarówno w pochwie, jak i w macicy.