

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk**



**Katarzyna Skulska**

**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.**

The role of  $\gamma\delta$  T cells in the immunological control of the reproductive system in  
*in situ* and *ex vivo* studies, and their effect on the response to antigens  
administered intravaginally.

**Promotor**

Dr hab. Grzegorz Chodaczek

Wrocław 2022

*Moim najdroższym  
Michałowi i Dominice*

Pracę zrealizowano w ramach projektu NCN SONATA BIS 4  
„Wieloparametryczna charakterystyka kontroli homeostazy nabłonka układu rozrodczego  
przez komórki T gamma-delta z uwzględnieniem wysokorozdzielczej mikroskopii  
przyżyciowej”

Składam serdeczne podziękowania

**Promotorowi, dr. hab. Grzegorzowi Chodaczkowi** za wprowadzenie mnie w świat mikroskopii, za poświęcony czas, cierpliwość i pomoc, na którą zawsze mogę liczyć oraz za pozwolenie mi na dużą swobodę w realizacji naukowych pomysłów

**Prof. Annie Chelmońskiej-Soyta** za przyjęcie mnie do zespołu Laboratorium Immunologii Rozrodu i wsparcie merytoryczne

**Dr. hab. Małgorzacie Krzyżowskiej** za wsparcie w pracy z myszami, cenne uwagi i dociekliwe pytania

**Dr. Monice Toporkiewicz** za nieocenione wsparcie w dzieleniu trudów pracy z komórkami  $\gamma\delta$  i wspólne „mikroskopowanie”

**Dr. Tomaszowi Lipińskiemu** za pomoc w zaplanowaniu immunizacji i udostępnienie do badań koniugatu

**Dr. Michałowi Skowickiemu** za przeprowadzenie testów ELISA

**Dr. inż. Annie Kędzierskiej** za wprowadzenie do pracy z myszami, pomoc w izolacji RNA i cenne uwagi

**Dr. n. med. inż. Agnieszce Węgrzyn** za pomoc w analizach cytometrycznych

**Dr. Aleksandrze Jasiulewicz** za pomoc w urządzeniu laboratorium

**Dr. inż. Annie Sławek i Mgr. Darii Lorek** za wsparcie w pracy laboratoryjnej i cenne uwagi

**Wszystkim koleżankom i kolegom z Laboratorium Immunologii Rozrodu oraz Laboratorium Bioobrazowania** za nieocenioną pomoc w pracy laboratoryjnej, życzliwość i miłą współpracę

## Spis treści

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Streszczenie</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>Wykaz stosowanych skrótów</b> .....                                      | <b>8</b>  |
| <b>1. Wstęp</b> .....   | <b>11</b> |
| 1.1. Struktura żeńskiego układu rozrodczego.....                            | 11        |
| 1.2. Zmiany hormonalne w żeńskim układzie rozrodczym.....                   | 12        |
| 1.2.1. Fazy cyklu rujowego myszy.....                                       | 13        |
| 1.3. Elementy immunologiczne żeńskiego układu rozrodczego .....             | 14        |
| 1.3.1. Nieswoiste (wrodzone) mechanizmy odporności.....                     | 14        |
| 1.3.1.1. Komórki nabłonkowe.....  | 14        |
| 1.3.1.2. Komórki dendrytyczne i makrofagi .....                             | 15        |
| 1.3.1.3. Komórki tuczne (mastocyty).....                                    | 16        |
| 1.3.1.4. Neutrofile .....   | 16        |
| 1.3.1.5. Komórki NK .....   | 17        |
| 1.3.1.6. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe .....                               | 17        |
| 1.3.1.7. Cytokiny.....  | 18        |
| 1.3.2. Swoiste mechanizmy odporności .....                                  | 20        |
| 1.3.3. Limfocyty T $\gamma\delta$ .....                                     | 22        |
| 1.3.3.1. Limfocyty T V $\gamma$ 6-V $\delta$ 1.....                         | 25        |
| 1.3.4. Regulacja układu odpornościowego przez żeńskie hormony płciowe ..... | 26        |
| 1.4. Infekcje układu rozrodczego .....                                      | 27        |
| 1.4.1. Kandydoza .....  | 28        |
| 1.5. Szczepionki dośluzówkowe .....   | 29        |
| 1.5.1. Wybrane adiuwanty w szczepionkach dośluzówkowych.....                | 30        |
| 1.6. Proces starzenia i menopauza.....                                      | 32        |
| 1.6.1. Immunostarzenie .....  | 32        |
| 1.7. Techniki wykorzystane do analizy komórek układu rozrodczego .....      | 34        |
| 1.7.1. Oczyszczanie tkanek .....  | 34        |
| 1.7.2. Mikroskopia konfokalna i dwufotonowa .....                           | 37        |
| 1.7.2.1. Autofluorescencja .....  | 39        |
| 1.7.2.2. Generacja drugiej harmonicznej.....                                | 40        |
| 1.7.3. Cytometria przepływowa .....   | 40        |
| 1.7.3.1. Homogenizacja układu rozrodczego .....                             | 41        |
| <b>2. Założenia i cel pracy</b> .....                                       | <b>42</b> |
| <b>3. Materiały i metody</b> .....  | <b>43</b> |
| 3.1. Odczynniki .....   | 43        |
| 3.2. Gotowe zestawy odczynników .....                                       | 44        |
| 3.3. Oprogramowanie.....  | 45        |
| 3.4. Sprzęt.....  | 45        |
| 3.5. Myszy.....   | 45        |
| 3.5.1. Synchronizacja cyklu rujowego myszy .....                            | 46        |
| 3.5.2. Wymaz cytologiczny z pochwy .....                                    | 46        |
| 3.5.3. Immunizacje.....   | 46        |
| 3.5.3.1. Immunizacja podskórna .....  | 46        |
| 3.5.3.2. Immunizacja donosowa.....  | 47        |
| 3.5.3.3. Immunizacja dopochwowa.....  | 47        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.4. Pobranie krwi .....  | 47        |
| 3.5.5. Pobranie wydzielin pochwy .....  | 48        |
| 3.5.6. Eutanazja .....  | 48        |
| 3.6. Oczyszczanie tkanek .....  | 48        |
| 3.6.1. Oczyszczanie metodą ScaleS .....   | 48        |
| 3.6.2. Oczyszczanie metodą CUBIC .....  | 50        |
| 3.7. Analiza poziomu ekspresji $\gamma\delta$ TCR i V $\gamma$ 5 w limfocytach T $\gamma\delta$ naskórka i pochwy .....   | 52        |
| 3.8. Mikroskopia konfokalna i dwufotonowa .....   | 52        |
| 3.8.1. Analiza obrazu .....   | 53        |
| 3.8.2. Analiza lokalizacji limfocytów T $\gamma\delta$ .....  | 53        |
| 3.8.3. Analiza grubości nabłonka pochwy .....   | 54        |
| 3.8.4. Analiza liczby limfocytów T $\gamma\delta$ w ścianie pochwy .....  | 55        |
| 3.8.5. Analiza poziomu ekspresji $\gamma\delta$ TCR i łańcucha V $\gamma$ 5 .....   | 55        |
| 3.9. Opracowanie protokołu trawienia układu rozrodczego .....   | 56        |
| 3.10. Przygotowanie węzłów chłonnych do analizy cytometrycznej .....  | 57        |
| 3.11. Cytometria przepływowa .....  | 57        |
| 3.11.1. Strategie bramkowania .....   | 58        |
| 3.11.2. Analiza subpopulacji komórek w układzie rozrodczym i węzłach chłonnych .....  | 58        |
| 3.11.3. Fenotypowanie komórek GFP <sup>+</sup> izolowanych od myszy Tcrd-H2BeGFP .....  | 60        |
| 3.11.4. Ocena wpływu limfocytów T $\gamma\delta$ na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy .....   | 62        |
| 3.12. Pomiar stężenia cytokin w pochwach i macicach .....   | 65        |
| 3.13. Izolacja RNA .....  | 66        |
| 3.14. Synteza cDNA .....  | 66        |
| 3.15. Analiza Real-Time PCR .....   | 66        |
| 3.16. ELISA .....   | 69        |
| 3.17. Analiza statystyczna .....  | 70        |
| <b>4. Wyniki .....</b>  | <b>71</b> |
| 4.1. Opracowanie metody wizualizacji limfocytów T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy za pomocą technik mikroskopii konfokalnej i dwufotonowej .....                               | 71        |
| 4.1.1. Porównanie podstawowych protokołów oczyszczania metodami ScaleS i CUBIC .....  | 71        |
| 4.1.2. Porównanie kompatybilności metod AbScale i CUBIC z barwieniem cytoszkieletu .....  | 74        |
| 4.1.3. Porównanie kompatybilności metod ScaleS i CUBIC z barwieniem błony podstawnej .....  | 75        |
| 4.1.4. Analiza in situ limfocytów T $\gamma\delta$ w zależności od fazy cyklu rujowego .....  | 77        |
| 4.1.5. Analiza poziomu ekspresji $\gamma\delta$ TCR i łańcucha V $\gamma$ 5 .....   | 81        |
| 4.2. Ustalenie fizjologicznej dynamiki populacji limfocytów T $\gamma\delta$ w zależności od fazy cyklu (faza estrus i diestrus) .....  | 84        |
| 4.2.1. Optymalizacja metody trawienia enzymatycznego układu rozrodczego – wpływ na wydajność izolacji i żywotności komórek .....  | 84        |
| 4.2.2. Wpływ trawienia enzymatycznego na skład komórkowy układu rozrodczego .....   | 87        |
| 4.2.3. Wpływ trawienia enzymatycznego na analizę komórek T $\gamma\delta$ pochwy podczas cyklu rujowego .....   | 88        |
| 4.3. Ustalenie roli limfocytów T $\gamma\delta$ w indukcji odpowiedzi odpornościowej na antygeny modelowe, w tym trójsacharyd z <i>Candida albicans</i> .....                             | 92        |
| 4.3.1. Porównanie przebiegu immunizacji owoalbuminą w zależności od fazy cyklu rujowego .....   | 92        |
| 4.3.2. Wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na indukcję odpowiedzi immunologicznej na immunizację owoalbuminą .....  | 96        |
| 4.3.3. Wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na indukcję odpowiedzi immunologicznej po immunizacji koniugatem toksoid tężcowy – trójsacharyd $\beta$ -mannanu z <i>Candida albicans</i> ..... | 103       |
| 4.3.4. Ocena wpływu limfocytów T $\gamma\delta$ na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy .....  | 109       |
| 4.4. Wpływ wieku na populację limfocytów T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy .....   | 115       |
| 4.4.1. Cytometryczna analiza ilości komórek T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy młodych i starych. ....  | 115       |

|  |            |
|--|------------|
| 4.4.2. Mikroskopowa analiza liczby komórek T $\gamma\delta$ w pochwie myszy młodych i starych. ....  | 116        |
| 4.4.3. Analiza ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ . ....                    | 118        |
| 4.4.4. Pomiar zawartości cytokin w pochwach i macicach w zdrowej tkance oraz po indukcji zapalenia nabłonka w zależności od obecności T $\gamma\delta$ i wieku myszy. .... | 122        |
| <b>5. Dyskusja</b> .....   | <b>128</b> |
| <b>6. Wnioski</b> .....  | <b>142</b> |
| <b>7. Literatura</b> .....   | <b>143</b> |
| <b>8. Spis Rycin</b> .....   | <b>161</b> |
| <b>9. Spis Tabel</b> .....   | <b>164</b> |
| <b>10. Publikacje i doniesienia</b> .....  | <b>165</b> |
| 10.1. Publikacje.....  | 165        |
| 10.2. Prace opublikowane w materiałach konferencyjnych .....   | 165        |

## 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*<sup>-/-</sup>). 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*<sup>-/-</sup>, 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.



## Abstract

In the literature,  $\gamma\delta$  T cells are often referred to as the "bridge" between innate and acquired immunity. These cells are most widely distributed in epithelial tissues, suggesting that they form the first line of defense against pathogens. Their main functions have been known primarily through studies of epidermal homeostasis in mice, but their role in the reproductive tract remains largely unexplored. This research attempts to explain the role of  $\gamma\delta$  T cells in the immune control of the female reproductive system.

Due to the lack of available protocols, the first stage of the research work was to develop methods for the analysis of  $\gamma\delta$  T cells in the murine vagina. The vaginal epithelium is relatively thick and dense, which makes it difficult to use standard imaging and cytometric techniques. Based on the CUBIC clearing method, an optical clearing protocol of vaginal tissues was developed, which enabled 3D visualization of  $\gamma\delta$  T cells and determination of their distribution. It was shown that  $\gamma\delta$  T cells sense sex hormone-induced changes of epithelium and reach the peak number in the progesterone-dominated diestrus phase. They are also located closer to the vaginal lumen during diestrus, compared to the estrus phase, which is dependent on estrogens. Their number in the vaginal epithelium is three times greater than in the vaginal stroma, which is independent of hormonal changes during the estrous cycle. The second approach of  $\gamma\delta$  T cell analysis in the reproductive system was to use flow cytometry after enzymatic digestion of the tissue. By comparing multiple enzymes, Liberase TL was selected as the most effective enzyme for the analysis of the cellular composition of the murine reproductive tract. The developed protocol allowed for the verification of microscopic data and to demonstrate that  $\gamma\delta$  T cells do not have a significant impact on the number and percentage of other immune cell populations at the steady-state and in the course of inflammation caused by stimulation of Toll-like receptors (TLR7 and TLR9), both in vagina and uterus. These conclusions were drawn based on a cytometric comparison of cells isolated from tissues obtained from wild-type mice and the genetically modified strain lacking  $\gamma\delta$  T cells (*Tcrd*<sup>-/-</sup>). The obtained data were partially confirmed by studies of the role of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in inducing immune responses after immunization with antigens applied onto the vaginal mucosa. In the absence of  $\gamma\delta$  T cells, the immune response to the protein antigen - ovalbumin, is similar to that in wild-type mice. At the same time,  $\gamma\delta$  T lymphocytes moderately enhance the response after vaginal vaccination with the polysaccharide antigen from *Candida albicans* conjugated with tetanus toxoid, which suggests their protective role against mycological infections. The comparative analysis of the

routes of antigen administration showed that only the vaginal route depends on the estrous cycle phase, and hormonal changes do not affect the subcutaneous and intranasal administration. The ambiguous influence of  $\gamma\delta$  T cells on the status and response of the immune system in mice of reproductive age inspired the study of their role in old mice suffering from the dysfunction of immune responses at multiple levels. The analysis of gene expression and inflammatory cytokine production in aged individuals showed that the aging process skews immune responses in the female reproductive system toward the proinflammatory type, which is very selectively dependent on  $\gamma\delta$  T cells. The lack of these cells in old females, on the one hand, weakens the anti-infective immunity, which was evidenced by the decrease in the lactoferrin gene expression in *Tcrd*<sup>-/-</sup> mice. On the other hand,  $\gamma\delta$  T cells deficiency increases the complement system gene expression and the GM-CSF factor production, which may ultimately contribute to a dysregulation of the mechanisms responsible for controlling the inflammation.

The results indicate that  $\gamma\delta$  T cells do not play a critical role in controlling immune responses in the epithelium of the reproductive tract. Instead, they are responsible for the fine-tuning of immunological processes. Undoubtedly, intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells contribute to innate antimicrobial responses, and their role depends on the location and the cellular context of the tissue. It is possible that in the absence of  $\gamma\delta$  T cells, other populations of the immune system take over the homeostasis maintenance in the reproductive epithelium. Further research is necessary to characterize their function and interactions with other cells of the immune system, both in the vagina and in the uterus.

## Wykaz stosowanych skrótów

| Skrót            | Nazwa angielska                                  | Nazwa polska  |
|------------------|--|---|
| AMPs             | antimicrobial peptides                           | białka przeciwdrobnoustrojowe   |
| APCs             | antigen presenting cells                         | komórki prezentujące antygen  |
| ARs              | androgen receptors                               | receptory androgenowe   |
| AU               | arbitrary units                                  | jednostki umowne  |
| BCR              | B cell receptor                                  | receptor komórek B  |
| BGs              | Birbeck's granules                               | ziarnistości Birbecka   |
| BSA              | bovine serum albumin                             | bydłęca albumina surowicy   |
| CD               | cluster of differentiation                       | antygeny różnicowania komórkowego   |
| CCL-20           | chemokine (C-C motif) ligand 20                  | ligand chemokiny (motyw C-C) 20   |
| CpG              | CpG oligodeoxynucleotide                         | oligodeoksynukleotyd zawierający niemetylowaną guanozynę fosforanu cytydyny |
| CVF              | cervical-vaginal fluid                           | płyn szyjkowo-pochwowy  |
| DAPI             | 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride    | dichlorowodorek 4',6-diamidino-2-fenylindolu                                |
| DCs              | dendritic cells                                  | komórki dendrytyczne  |
| DETC             | dendritic epidermal T cell                       | dendrytyczne naskórkowe komórki T   |
| DMA              | N,N-Dimethylacetamide                            | N,N-dimetyloacetamid  |
| DMSO             | dimethyl sulfoxide                               | dimetylosulfotlenek   |
| E2               | estradiol  | estradiol   |
| EDTA             | ethylenediaminetetraacetic acid                  | kwas edetynowy  |
| ER $\alpha$      | estrogen receptor alpha                          | receptor estrogenowy alfa   |
| ER $\beta$       | estrogen receptor beta                           | receptor estrogenowy beta   |
| ERs              | estrogen receptors                               | receptory estrogenowe   |
| FACS             | fluorescence-activated cell sorting              | cytometria przepływowa  |
| FBS              | fetal bovine serum                               | płodowa surowica bydłęca  |
| Fc $\epsilon$ RI | high affinity Fc epsilon receptor 1              | receptor o wysokim powinowactwie dla IgE                                    |
| FR               | fold regulation                                  | krotność regulacji genów  |
| FSC              | forward scatter channel                          | przedni detektor światła rozproszonego                                      |
| GFP              | green fluorescent protein                        | białko zielonej fluorescencji   |
| GM-CSF           | granulocyte-macrophage colony-stimulating factor | czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów             |
| GSM              | genitourinary syndrome of menopause              | menopauzalny zespół moczowo-płciowy   |
| hBD2             | human beta defensin 2                            | ludzka $\beta$ -defensyna 2   |
| HBSS             | Hank's Balanced Salt Solution                    | buforowany roztwór soli Hanka   |
| HIV              | human immunodeficiency virus                     | ludzki wirus niedoboru odporności   |
| HRE              | hormone response element                         | element odpowiedzi na hormony   |

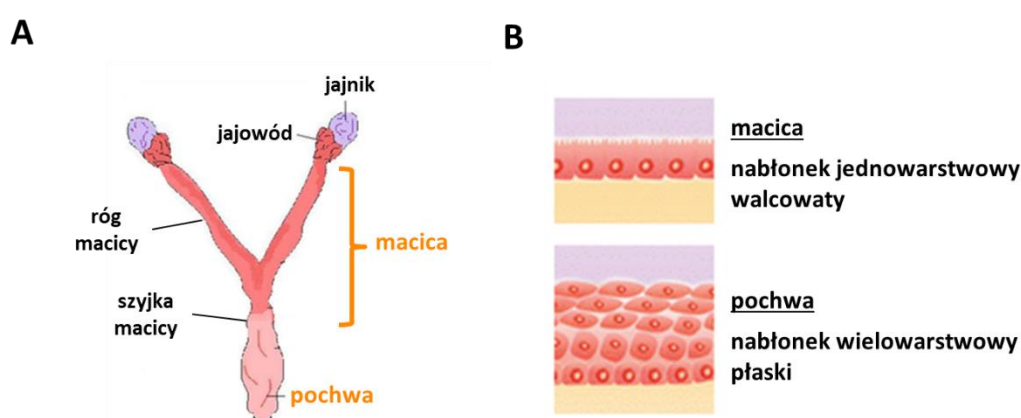
|               |  |   |
|---------------|--|---|
| HSV           | herpes simplex virus                           | wirus opryszczki narządów płciowych                   |
| ICAM-1        | Intercellular Adhesion Molecule 1              | międzykomórkowa molekula adhezyjna-1                  |
| IFN- $\beta$  | interferon beta                                | interferon beta                                       |
| IFN- $\gamma$ | interferon gamma                               | interferon gamma                                      |
| Ig            | immunoglobulin                                 | immunoglobulina                                       |
| IL            | interleukin                                    | interleukina  |
| IN            | intranasal                                     | immunizacja donosowa                                  |
| IR            | infrared                                       | promieniowanie podczerwone                            |
| ITAM          | immunoreceptor tyrosine-based activation motif | tyrozynowy motyw aktywacji immunoreceptora            |
| IVAG          | intravaginal                                   | immunizacja dopochwowa                                |
| LCs           | Langerhans cells                               | komórki Langerhansa                                   |
| MCs           | mast cells                                     | komórki tuczne (mastocyty)                            |
| MCP-1         | monocyte chemoattractant protein 1             | białko chemotaktyczne monocytów                       |
| MHC           | major histocompatibility complexes             | główny układ zgodności tkankowej                      |
| MISS          | membrane-initiated steroid signaling           | sygnalizacja inicjowana w obrębie błony komórkowej    |
| MMPs          | matrix metalloproteinases                      | metaloproteinazy macierzy                             |
| NA            | numerical aperture                             | apertura numeryczna                                   |
| NETs          | neutrophil extracellular traps                 | zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe                  |
| NISS          | nuclear-initiated steroid signaling            | sygnalizacja inicjowana w obszarach jądra komórkowego |
| NKG2D         | NKG2D receptor                                 | receptor charakterystyczny dla komórek NK             |
| NLRs          | NOD-like receptors                             | receptory NOD-podobne                                 |
| ODN           | oligodeoxynucleotide                           | oligodeoksynukleotyd                                  |
| OVA           | ovalbumin                                      | owoalbumina   |
| p             | p-value, probability value                     | wartość p, prawdopodobieństwo testowe                 |
| P4            | progesterone                                   | progesteron   |
| PAMPs         | pathogen associated molecular patterns         | wzorce molekularne związane z patogenami              |
| PBS           | phosphate buffered saline                      | buforowana sól fizjologiczna                          |
| PMT           | photomultiplier                                | fotopowielacz   |
| PRs           | progesterone receptors                         | receptory progesteronowe                              |
| PRRs          | pattern recognition receptors                  | receptory rozpoznające wzorce                         |
| R848          | Resiquimod                                     | agonista TLR7/8                                       |
| RPM           | revolutions per minute                         | obroty na minutę                                      |
| RVVC          | recurrent vulvovaginal candidiasis             | nawracające drożdżakowe zapalenie pochwy i sromu      |
| SC            | subcutaneous                                   | immunizacja podskórna                                 |
| SHG           | second harmonic generation                     | generacja drugiej harmoniczej                         |

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| SLPI          | secretory leukocyte peptidase inhibitor | wydzielniczy inhibitor proteiny leukocytarnej |
| SPF           | specific-pathogen-free                  | wolne od wybranych patogenów                  |
| SSC           | side scatter channel                    | boczny detektor światła rozproszonego         |
| TBABH         | tetrabutylammonium borohydride          | borowoderek tetrabutylamoniowy                |
| TCR           | T-cell receptor                         | receptor limfocytu T                          |
| TGF- $\beta$  | transforming growth factor $\beta$      | transformujący czynnik wzrostu beta           |
| TLRs          | Toll-like receptors                     | receptory Toll-podobne                        |
| TMB           | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine          | 3,3',5,5'-Tetrametylobenzodyna                |
| TNF- $\alpha$ | tumor necrosis factor $\alpha$          | czynnik martwicy nowotworów alfa              |
| UV            | ultraviolet                             | promieniowanie ultrafioletowe                 |
| VCAM-1        | vascular cell adhesion molecule-1       | molekuła adhezyjna – 1 komórki naczyniowej    |
| VEDCs         | vaginal epithelial dendritic cells      | komórki dendrytyczne nabłonka pochwy          |
| VIS           | visible spectrum                        | światło widzialne                             |
| VVC           | vulvovaginal candidiasis                | drożdżakowe zapalenie pochwy i sromu          |
| WHO           | World Health Organization               | Światowa Organizacja Zdrowia                  |

## 1. Wstęp

### 1.1. Struktura żeńskiego układu rozrodczego

Żeński układ rozrodczy jest unikalnym systemem pokrytym nabłonkiem, w którym mechanizmy odporności błony śluzowej przeciwko szkodliwym drobnoustrojom pozostają w równowadze z tolerancją immunologiczną na plemniki i zarodek w celu zachowania reprodukcji. Budowa układu rozrodczego samicy myszy nie odbiega od ogólnej budowy układu rozrodczego samic ssaków łożyskowych (Ryc. 1A) (1). U ludzi, jak i u myszy w żeńskich narządach płciowych wyróżniamy odcinek górny, w skład którego wchodzi macica, jajowody i jajniki oraz odcinek dolny obejmujący pochwę i szyjkę macicy.



Ryc. 1. Budowa układu rozrodczego myszy.

(A) anatomia żeńskiego układu rozrodczego. (B) różnice w budowie nabłonka pochwy i macicy u myszy.  
(Opracowano na podstawie (2)).

Błona śluzowa żeńskich dróg rozrodczych różni się budową między górnym a dolnym odcinkiem (Ryc. 1B). Górny odcinek układu rozrodczego jest pokryty pojedynczą warstwą nabłonka jednowarstwowego walcowatego, w którym komórki są połączone ze sobą ścisłymi (zamykającymi) połączeniami międzykomórkowymi (ang. *tight junctions*) (3). Dolny odcinek narządów płciowych jest miejscem kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym i w przeciwieństwie do wyżej położonych struktur, nie jest sterylny. Pochwa i zewnętrzna część szyjki macicy pokryta jest wielowarstwowym nabłonkiem płaskim, osadzonym na bogatym w kolagen i naczynia krwionośne podścielisku (stromie), które wspólnie tworzą barierę ochronną przed patogenami. Wewnętrzne warstwy nabłonka, położone przy błonie podstawnej, są aktywne metabolicznie i ulegają aktywnej proliferacji oraz różnicowaniu przy ścisłej regulacji przez hormony płciowe (4). Natomiast zewnętrzne warstwy nabłonka są terminalnie zróżnicowane, przez co nie są połączone ze sobą ścisłymi połączeniami międzykomórkowymi.

W konsekwencji nabłonek pochwy jest dość „nieszczelny”, umożliwiając penetrację przez symbiotyczne i patogenne drobnoustroje oraz inne czynniki (5).

Bezpośrednią ochronę układu rozrodczego przed patogenami zapewnia warstwa śluzu. Składa się on z białek glikozylowanych, znanych jako mucyny, które fizycznie unieruchamiają patogeny. Mucyny są kodowane przez rodzinę genów MUC i co najmniej 13 mucyn ulega zróżnicowanej ekspresji w pochwie i macicy, w zależności od fazy cyklu (6). Mucyny wiążą bezpośrednio mikroorganizmy, w tym drożdżaki *Candida albicans*, poprzez  $\alpha(1,2)$ fukozylowane glikany (7).

## 1.2. Zmiany hormonalne w żeńskim układzie rozrodczym

Odpowiedź hormonalna w układzie rozrodczym regulowana jest głównie przez stężenie hormonów płciowych i poziom ekspresji swoistych dla nich receptorów. Progesteron (P4) i estradiol (E2) to główne hormony steroidowe produkowane przez jajniki, które na poziomie komórkowym działają odpowiednio poprzez receptory progesteronowe (ang. *progesterone receptors* PRs) i receptory estrogenowe (ang. *estrogen receptors*, ERs) (3). ERs i PRs są czynnikami transkrypcyjnymi należącymi do rodziny receptorów jądrowych wytwarzanych przez wiele typów komórek układu rozrodczego. Istnieją dwie cytoplazmatyczne izoformy każdego receptora, których poziom ekspresji w tkance endometrium osiąga maksimum w fazie proliferacyjnej cyklu hormonalnego (8).

Receptory jądrowe regulują ekspresję genów w głównej mierze poprzez oddziaływanie na DNA. Ligandy receptorów steroidowych charakteryzują się lipofilnością, dzięki czemu łatwo przenikają przez błony komórkowe. Po przyłączeniu ligandu do receptora hormonu steroidowego następuje zmiana jego konformacji, która umożliwia jego dimeryzację oraz translokację z cytoplazmy do jądra komórkowego. Aktywowany receptor moduluje ekspresję genów, przyłączając się do elementu odpowiedzi DNA na hormony (ang. *hormone response element*, HRE). Działanie genomowe hormonów steroidowych indukuje późną odpowiedź komórkową na drodze szlaku sygnalizacji inicjowanej w obszarach jądra komórkowego (ang. *nuclear-initiated steroid signaling*, NISS) (9).

Receptory hormonów steroidowych mogą również działać bez wiązania się do DNA – takie działanie nazywane jest niegenomowym działaniem i jest niezależne od transkrypcji genów czy syntezy białek. Poprzez działanie pozagenomowe hormony steroidowe indukują szybką

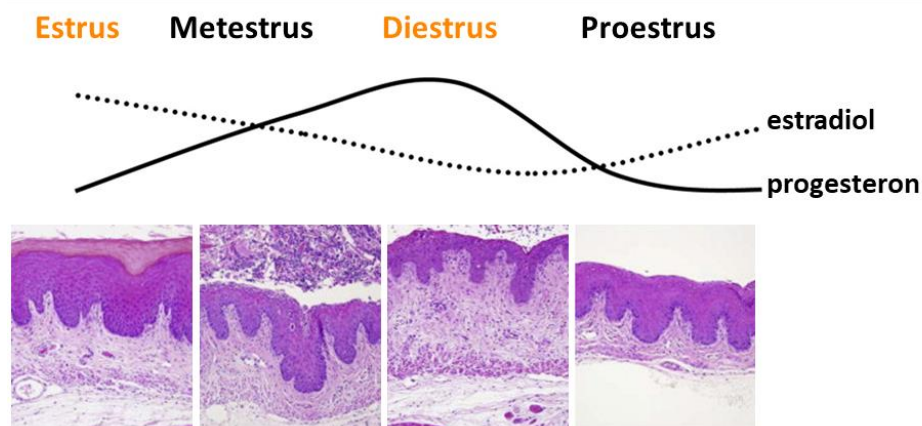
odpowieź komórkową na drodze szlaku sygnalizacji inicjowanej w obrębie błony komórkowej (ang. *membrane-initiated steroid signaling*, MISS) (9).

Nabłonek pochwy podlega ciągłej odnowie poprzez proliferację, różnicowanie i dojrzewanie. Swoisty mechanizm różnicowania i dojrzewania komórek nabłonka pochwy jest wciąż niejasny, jednakże wykazano, że jest on regulowany estrogenami działającymi poprzez aktywację receptora estrogenowego alfa ( $ER\alpha$ ) i receptora estrogenowego beta ( $ER\beta$ ) (10). Analizy immunohistochemiczne pokazały, że komórki nabłonkowe zawierają największą liczbę jądrowych miejsc wiązania estrogenów ze wszystkich struktur narządów płciowych (11). Kobiety w okresie rozrodczym wytwarzają oba rodzaje receptorów estrogenowych, natomiast po okresie menopauzy następuje znaczący spadek ekspresji receptora  $ER\beta$  (12).

### **1.2.1. Fazy cyklu rujowego myszy**

Myszy są bardzo dobrym modelem do badania reprodukcji m. in. ze względu na ich zdolność do spontanicznej owulacji, krótki cykl rujowy, trwający tylko 4-5 dni oraz 19-21-dniową ciążę (13). Aktywność rozrodcza myszy rozpoczyna się w około 26. dniu życia od otwarcia pochwy, które jest uruchamiane hormonalnie i zależne od apoptozy (14). Cykl rujowy objawia się zmianami anatomicznymi i hormonalnymi, które wpływają na fizjologię i zachowanie myszy, zapewniając maksymalną płodność. Pomimo że cykl rujowy jest procesem ciągłym, można zidentyfikować w nim cztery odrębne fazy: proestrus, estrus, metestrus i diestrus (Ryc. 2) (15), podczas których hormony płciowe (estradiol i progesteron) regulują m.in. stan nabłonka pochwy (16). Proestrus to okres, w którym w jajniku następuje synteza i wydzielanie estrogenów. W fazie estrus, zdominowanej przez estradiol, następują końcowe etapy rozwoju pęcherzyków przedowulacyjnych i owulacja. W tym czasie komórki nabłonkowe dzielą się, różnicują i tworzą zrogowaciałą warstwę, która jest ułożona wierzchołkowo i zwrócona do światła pochwy. Jeśli cykl nie zostanie przerwany przez ciążę lub ciążę rzekomą, rozpoczyna się metestrus – wczesna faza lutealna. Natomiast w fazie diestrus, gdy poziom estradiolu jest niski a progesteronu wysoki (16), zrogowaciałe komórki są usuwane, a nabłonek staje się cienki, osiągając grubość około siedmiu komórek (17).





Ryc. 2. Fazy cyklu rujowego myszy.

Zmiany w stężeniu estradiolu i progesteronu podczas czterech faz cyklu rujowego: estrus, metestrus, diestrus i prooestrus oraz analiza preparatów histologicznych pochwy barwionych hematoksyliną i eozyną. (Opracowano na podstawie (18)).

### 1.3. Elementy immunologiczne żeńskiego układu rozrodczego

#### 1.3.1. Nieswoiste (wrodzone) mechanizmy odporności

Odporność wrodzona w żeńskim układzie rozrodczym opiera się na kilku czynnikach, takich jak: śluz, peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMPs) oraz bariera z komórek nabłonkowych, które łącznie mają zapobiegać wnikaniu patogenu do wnętrza ustroju. Dodatkowe wsparcie udzielane jest przez komórki układu odpornościowego (m.in. makrofagi, komórki dendrytyczne, neutrofile, komórki NK), które rozpoznają mikroorganizmy i działają lokalnie, aby zmniejszyć obciążenie patogenami i zainicjować odporność adaptacyjną (19). W stanie spoczynkowym liczba leukocytów w pochwie jest jednak niewielka (20).

##### 1.3.1.1. Komórki nabłonkowe

Komórki nabłonkowe układu rozrodczego pełnią istotną rolę w odporności wrodzonej i w zależności od ich lokalizacji mają różne funkcje immunobiologiczne: w pochwie i zewnętrznej części szyjki macicy chronią organizm przed szkodliwymi czynnikami środowiska zewnętrznego, a w macicy i wewnętrznej części szyjki macicy odpowiadają za utrzymanie ciąży (21). Nabłonek rozrodczy tworzy główną barierę fizyczną, zatrzymującą drobnoustroje na swojej powierzchni. Ponadto komórki nabłonkowe uczestniczą w procesie rozpoznawania mikroorganizmów, wykorzystując tzw. receptory rozpoznające wzorce (z ang. *pattern recognition receptors*, PRRs), w tym receptory Toll-podobne (ang. *Toll-like receptors*, TLRs) i receptory NOD-podobne (ang. *NOD-like receptors*, NLRs), które wiążą konserwatywne wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen-associated*

*molecular patterns*, PAMPs). Po stymulacji receptorów PRRs przez obecne na mikroorganizmach struktury PAMPs, aktywowane komórki nabłonkowe wydzielają szereg peptydów przeciwdrobnoustrojowych, cytokin i chemokin. Czynniki te oddziałują bezpośrednio na patogeny niszcząc je lub uniemożliwiając ich wiązanie do nabłonka. Mogą też pośrednio prowadzić do ich neutralizacji – poprzez rekrutację i aktywację różnych komórek układu odpornościowego, przywołanych z obwodu do miejsca infekcji (22).

### 1.3.1.2. Komórki dendrytyczne i makrofagi

Komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DCs) i makrofagi należą do komórek zdolnych do pobierania materiału zewnątrzkomórkowego na drodze fagocytozy i pinocytozy oraz do prezentacji antygenów, przez co są łącznikiem między odpornością wrodzoną a nabytą. W klasycznym ujęciu DCs są określane jako komórki prezentujące antygen (ang. *antigen-presenting cells*, APCs). Z kolei, makrofagi uważa się za główne komórki żerne, zdolne do neutralizacji patogenów występujących w tkankach. Ponieważ zarówno komórki dendrytyczne, jak i makrofagi pochodzą ze wspólnego prekursora w szpiku kostnym, subpopulacje obu komórek mają wspólne markery powierzchniowe, tzw. antygeny różnicowania komórkowego (ang. *cluster of differentiation*, CD), w tym CD14, CD11c, CD11b i cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complexes*, MHC) klasy II. Ekspozycja na patogeny i fagocytoza pobudza dojrzewanie makrofagów i komórek dendrytycznych oraz prezentację peptydowych fragmentów patogenów przez cząsteczki MHC klasy I lub klasy II. Dopiero takie zaprezentowanie antygenów dziewiczym limfocytom T (ang. *naive T cells*) powoduje indukcję swoistej dla patogenu odporności nabytej lub tolerancję, w zależności od rodzaju cząsteczek kostymulujących zaangażowanych w proces prezentacji (23).

Makrofagi stanowią około 10% leukocytów obecnych w żeńskim układzie rozrodczym, a ich liczba jest największa w macicy (podścielisko i tkanka łączna mięśniówki macicy). Przemieszczanie się makrofagów do błony śluzowej macicy (endometrium) jest regulowane przez estradiol i progesteron, przy czym liczba makrofagów w endometrium jest największa przed miesiączką (24). Z kolei, liczba makrofagów w pochwie pozostaje stabilna przez cały cykl menstruacyjny (19).

Liczebność komórek dendrytycznych w układzie rozrodczym jest mniejsza niż makrofagów. W macicy zlokalizowane są głównie w podścielisku, natomiast komórki dendrytyczne pochwowe są obecne w warstwie nabłonkowej (25). W stanie spoczynkowym rezydujące

w tkankach komórki dendrytyczne mają niedojrzały fenotyp. Po stymulacji patogenem lub pod wpływem procesu zapalnego komórki dendrytyczne dojrzewają, zwiększają poziom ekspresji cząsteczek MHC klasy II i migrują do najbliższych, drenujących węzłów chłonnych, gdzie indukują swoistą dla antygeny odpowiedź limfocytów T (26).

W żeńskim układzie rozrodczym głównymi komórkami dendrytycznymi są komórki Langerhansa (ang. *Langerhans cells*, LCs). W stanie spoczynkowym lokalizują się blisko podstawy nabłonka, a ich liczba zależna jest od fazy cyklu rujowego, osiągając maksimum w fazie diestrus (27). Oddzielną populację stanowią komórki dendrytyczne nabłonka pochwy (ang. *vaginal epithelial dendritic cells*, VEDCs), które różnią się fenotypowo od komórek Langerhansa w skórze (28). VEDCs w porównaniu ze skórnymi LCs nie mają ziarnistości Birbecka (ang. *Birbeck's granules*, BGs), co w konsekwencji zwiększa ich podatność m.in. na zakażenie wirusem HIV-1 (29).

#### **1.3.1.3. Komórki tuczne (mastocyty)**

Komórki tuczne (ang. *mast cells*, MCs) znane są głównie z roli, jaką odgrywają w procesach alergicznych. Mastocyty są aktywowane poprzez ekspozycję na antygen (alergen), który sieciuje swoistą dla alergenu immunoglobulinę E (IgE), zakotwiczoną w błonie komórkowej poprzez receptor o wysokim powinowactwie dla IgE (ang. *high affinity Fc epsilon receptor 1*, FcεRI). Następstwem tego procesu jest zainicjowanie ciągu przemian biochemicznych prowadzących do degranulacji komórki tucznej i wytworzenia mediatorów procesu zapalnego (30). Badania wskazują także, że mastocyty biorą udział w obronie organizmu przed pasożytami, bakteriami i innymi drobnoustrojami, odgrywając rolę zarówno w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej wrodzonej, jak i nabytej (31).

W układzie rozrodczym komórki tuczne zostały najlepiej scharakteryzowane w macicy, gdzie ich ilość jest niezależna od fazy cyklu (32). Mastocyty mają istotny wpływ na procesy rozrodcze, a w szczególności na proces implantacji zarodka. Przy nadmiernym wydzielaniu mediatorów mogą również doprowadzić do przedwczesnego porodu (33).

#### **1.3.1.4. Neutrofile**

Neutrofile to najliczniejsze leukocyty związane z łożyskiem naczyń krwionośnych, które po przejściu do tkanek tworzą pierwszą linię obrony przed patogenami, dzięki obecności receptorów rozpoznających drobnoustroje, w tym receptorów TLR (34). Na powierzchni błon śluzowych neutrofile są odpowiedzialne za szybką eliminację potencjalnych patogenów na

drodze fagocytozy oraz przez uwalnianie związków przeciwdrobnoustrojowych, enzymów proteolitycznych, cytokin i chemokin. Dodatkowo komórki te produkują reaktywne formy tlenu, które uszkodzają strukturę sfagocytowanych patogenów oraz tworzą zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe zwane NETs (ang. *neutrophil extracellular traps*), które wiążą i unieruchamiają drobnoustroje (35,36).

Neutrofile znajdują się zarówno w górnym, jak i dolnym układzie rozrodczym, chociaż najliczniej występują w jajowodach. Ich liczba w macicy znacznie wzrasta przed miesiączką, podczas gdy w pochwie ich liczba nie zależy od fazy cyklu (37). Komórki nabłonkowe w układzie rozrodczym wytwarzają duże ilości interleukiny 8 (IL-8), która jest chemoatraktantem dla tych leukocytów. Pod wpływem gradientu IL-8 neutrofile mogą przenikać przez nabłonek do światła pochwy, aby fagocytować plemniki, mikroorganizmy i inne resztki komórkowe (38).

#### **1.3.1.5. Komórki NK**

Komórki NK (ang. *natural killer*) stanowią integralną część wrodzonego układu odpornościowego i odgrywają kluczową rolę w działaniu przeciwwirusowym i przeciwnowotworowym. Po aktywacji komórki NK działają bezpośrednio poprzez zabijanie komórek zakażonych wirusem lub komórek nowotworowych albo pośrednio, produkując duże ilości cytokin, szczególnie interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ), w celu aktywacji makrofagów (19).

Komórki NK są obecne w całym układzie rozrodczym, stanowią od 10% do 30% leukocytów w układzie rozrodczym, w zależności od lokalizacji (37). Najwięcej badań dotyczy ich funkcji w macicy i oddziaływania matki na płód (39). Komórki NK macicy wytwarzają prozapalne cytokiny, takie jak: czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), IL-10, IL-8 i IFN- $\gamma$ , a tym samym promują odpowiedź zapalną oraz indukują aktywację makrofagów i cytotoksycznych komórek T (40).

#### **1.3.1.6. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe**

Peptydy AMPs to małe białka lub peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, wydzielane głównie przez neutrofile i komórki nabłonkowe układu rozrodczego (zarówno przez nabłonek walcowaty, jak i nabłonek wielowarstwowy płaski), pod kontrolą układu hormonalnego. Do AMPs zaliczamy: defensyny, wydzielniczy inhibitor proteiny leukocytarnej (ang. *secretory leukocyte peptidase inhibitor*, SLPI), lizozym, laktoferynę,

elafinę i katelicydynę (41). Peptydy przeciwdrobnoustrojowe zapobiegają lub ograniczają infekcje za pomocą mechanizmów bezpośrednich lub pośrednich ograniczając wiązanie patogenów do komórek gospodarza. Na przykład, ludzka  $\beta$ -defensyna 2 (ang. *human beta defensin 2*, hBD2) bezpośrednio zabija bakterie poprzez tworzenie porów w błonie (42). Peptydy przeciwdrobnoustrojowe obecne w żeńskim układzie rozrodczym skutecznie powstrzymują bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (np. *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*), grzyby (np. *Candida albicans*) oraz wirusy otoczkowe (np. HIV-1). Niektóre AMPs mają szerokie spektrum działania – jeden AMP może hamować zarówno infekcje bakteryjne, grzybicze, jak i wirusowe. Takim przykładem jest SLPI, który przeciwdziała zakażeniom *S.aureus*, *C.albicans* oraz HIV-1. Pomimo szerokiego zakresu aktywności przeciwdrobnoustrojowej, AMPs nie hamują jednak kolonizacji układu rozrodczego przez ochronne bakterie komensalne, takie jak pałeczki kwasu mlekowego *Lactobacillus* (43).

#### 1.3.1.7. Cytokiny

Cytokiny są małymi białkami (~5–20 kDa) niezwykle ważnymi w sygnalizacji komórkowej. Chemokiny natomiast, to małe cytokiny chemotaktyczne, działające miejscowo, dobrze poznane ze względu na ich rolę w rekrutacji leukocytów do miejsc stanu zapalnego i ich aktywacji. Chemokiny przyciągają komórki odpornościowe do tkanki, podczas gdy cytokiny różnicują i aktywują te komórki (44).

Cytokiny pomagają utrzymać homeostazę w układzie rozrodczym, pośrednicząc w proliferacji endometrium, menstruacji i implantacji (45) a także oddziałując aktywująco bądź hamująco na komórki odpornościowe obecne w tym układzie. W większości przypadków wydzielanie cytokin z komórek nabłonka macicy następuje w kierunku warstwy szczytowej, co powoduje gradient, który jest niezbędny do przyciągania komórek odpornościowych do powierzchni nabłonka (46), co pokazano w przypadku migracji neutrofilii pod wpływem IL-8. Przy braku gradientu chemokin prawdopodobieństwo przekroczenia przez neutrofile bariery nabłonka jest mniejsze, co potencjalnie zmniejsza poziom ochronnych  $\alpha$ -defensyn w wydzielinach (47). Inne cytokiny i chemokiny, takie jak TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* , transformujący czynnik wzrostu beta), są wydzielane do błony podstawnej, gdzie wpływają na rozwój i funkcje rezydujących komórek odpornościowych (48). Poziom wydzielanych cytokin zmienia się podczas cyklu menstruacyjnego i jest kontrolowany

bezpośrednio przez estradiol i/lub progesteron lub pośrednio, poprzez działanie hormonów płciowych na leżące poniżej komórki podścieliska (10).

*Tabela 1. Działanie wybranych cytokin analizowanych w rozprawie doktorskiej.*

| <b>Cytokina</b>                | <b>Główna funkcja</b>   | <b>Bibliografia</b> |
|--------------------------------|---|---------------------|
| <b>IL-1<math>\alpha</math></b> | Cytokina prozapalna. Stymulacja proliferacji limfocytów T, różnicowanie limfocytów B, synteza białek ostrej fazy, infiltracja leukocytów w miejscach zakażeń. IL-1 $\alpha$ jest syntetyzowana jako białko prekursorowe i jest konstytutywnie magazynowana w cytoplazmie komórek pochodzenia mezenchymalnego oraz w komórkach nabłonka. | (49)                |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | Cytokina prozapalna. Mediator odpowiedzi zapalnej, proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek. Produkowana przez aktywowane makrofagi jako probiałko, które jest przetwarzane proteolitycznie do postaci aktywnej przez kaspazę 1 (CASP1/ICE).   | (49)                |
| <b>IL-6</b>                    | Cytokina przeciwzapalna i prozapalna. Wydzielana głównie przez monocyty i makrofagi pod wpływem IL-1 i innych cytokin prozapalnych. Silnie pobudza procesy zapalne i uczestniczy w zwrotnym hamowaniu wytwarzania TNF- $\alpha$ .   | (50)                |
| <b>IL-10</b>                   | Cytokina przeciwzapalna. Hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych takich, jak IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$ czy GM-CSF. Produkują ją głównie makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty B oraz limfocyty T regulatorowe.   | (51)                |
| <b>IL-12p70</b>                | Cytokina prozapalna. Wydzielana przez komórki dendrytyczne, makrofagi, neutrofile i limfocyty B. Składa się z podjednostek p35 i p40, które połączone razem tworzą bioaktywną IL-12p70. Aktywuje komórki NK i limfocyty T.  | (52)                |
| <b>IL-17A</b>                  | Cytokina prozapalna. Wydzielana przez aktywowane limfocyty T. Promuje stan zapalny poprzez indukcję różnych prozapalnych cytokin i chemokin, rekrutację neutrofilek i zwiększenie produkcji przeciwciał.  | (53)                |
| <b>IL-23</b>                   | Cytokina prozapalna. Wydzielana głównie przez aktywowane komórki dendrytyczne i makrofagi. Kluczowa cytokina dla utrzymania i ekspansji komórek pomocniczych T 17 (Th17).   | (54)                |
| <b>IL-27</b>                   | Cytokina przeciwzapalna i prozapalna. Wydzielana przez aktywowane DC, makrofagi i mikroglej. Promuje różnicowanie komórek T do linii Th1 poprzez indukcję ekspresji czynnika transkrypcyjnego T-bet. Ponadto indukuje wytwarzanie przeciwzapalnej cytokiny IL-10.   | (55)                |

|                                |  |      |
|--------------------------------|--|------|
| <b>IFN-<math>\beta</math></b>  | Cytokina przeciwzapalna. Wydzielana głównie przez fibroblasty, ale także makrofagi i komórki dendrytyczne.   | (56) |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Cytokina prozapalna. Wydzielany przez komórki pomocnicze T (w szczególności komórki Th1), cytotoksyczne komórki T, makrofagi, komórki nabłonka i komórki NK. Ma działanie przeciwwirusowe, aktywuje makrofagi, zwiększa funkcje neutrofile i monocytów oraz ekspresję MHC-I i II na komórkach. | (57) |
| <b>GM-CSF</b>                  | Cytokina prozapalna. Wydzielana przez makrofagi, komórki T, komórki tuczne, komórki NK, komórki śródbłonka i fibroblasty. Stymuluje komórki macierzyste do produkcji granulocytów (neutrofile, eozynofile i bazofile) oraz monocytów.  | (58) |
| <b>MCP-1</b>                   | Chemokina prozapalna. Wydzielana przez monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne. Rekrutuje monocyty, komórki T pamięci i komórki dendrytyczne do miejsc zapalenia wywołanego uszkodzeniem tkanki lub infekcją.   | (59) |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Cytokina prozapalna. Wydzielana głównie przez aktywne monocyty i makrofagi. Stymuluje fagocytozę oraz rekrutuje neutrofile.  | (60) |

### 1.3.2. Swoiste mechanizmy odporności

Odporność adaptacyjna jest odpowiedzią swoistą wobec patogenu. Jest ona wzbudzana po prezentacji fragmentów mikroorganizmu limfocytom przez komórki prezentujące antygen. W efekcie dochodzi do aktywacji oraz ekspansji klonalnej limfocytów, prowadzącej do powstania antygenowo-swoistych klonów komórek T i B. Limfocyty T, o których tu mowa, rozpoznają antygeny za pomocą receptora komórek T (ang. *T cell receptor*, TCR), zbudowanego z łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$ . Analogicznie, limfocyty B ulegają aktywacji po związaniu antygeny przez swoisty dla niego receptor komórki B (ang. *B cell receptor*, BCR). Wykazano, że wiele komórek w żeńskim układzie rozrodczym prezentuje antygeny przez cząsteczki MHC. Należą do nich klasyczne komórki APC, w tym makrofagi, komórki dendrytyczne i komórki Langerhansa, oraz komórki nabłonkowe szyjki macicy i endometrium. Prezentacja antygeny odbywa się więc nie tylko w drenujących układ rozrodczy węzłach chłonnych, ale również lokalnie w nabłonku rozrodczym. Odporność nabyta obejmuje różne typy odpowiedzi immunologicznej: Th1 (komórkowa), Th2 (humoralna), T regulatorowa i Th17 (19).

Odporność komórkowa Th1 polega na niszczeniu patogenów wewnątrzkomórkowych i jest prowadzona głównie przez limfocyty T  $\alpha\beta$ . Cytotoksyczne limfocyty T  $\alpha\beta$  podklasy CD8<sup>+</sup> niszczą zakażone komórki po rozpoznaniu na ich powierzchni antygeny pochodzącego od

patogenu związanego z cząsteczką MHC klasy I. Dochodzi wówczas do indukcji apoptozy poprzez cytolizę za pośrednictwem perforyny i granzymu (61). Dodatkowo, komórki T  $\alpha\beta$  podklasy  $CD4^+$ , rozpoznając antygeny patogenowe na cząsteczkach MHC klasy II, wydzielają  $IFN-\gamma$ , który przyciąga cytotoksyczne komórki T, aktywuje makrofagi, jak również bezpośrednio blokuje replikację wirusa (62). Limfocyty T są zlokalizowane w stromie pochwy, szyjki macicy i macicy, oraz pomiędzy komórkami nabłonka, gdzie są znane jako limfocyty śródnabłonkowe (intraepitelialne) (63). W żeńskim układzie rozrodczym limfocyty T  $\alpha\beta CD8^+$  (35-50%) dominują nad limfocytami T  $\alpha\beta CD4^+$  (25%) (37). Limfocyty T występują głównie podczas fazy proliferacyjnej cyklu menstruacyjnego (z dominacją estradiolu) (64).

Odporność humoralna polega na wytwarzaniu immunoglobulin lub inaczej przeciwciał, czyli białek wydzielniczych swoistych wobec określonych sekwencji peptydowych lub polisacharydowych, stanowiących epitop w obrębie danego antygeny. Przeciwciała są produkowane przez komórki plazmatyczne, które powstają po aktywacji i różnicowaniu się limfocytów B przy aktywnym wsparciu pomocniczych limfocytów T  $\alpha\beta CD4^+$  (65). Pod względem budowy przeciwciała składają się z dwóch par glikozylowanych łańcuchów peptydowych: dwóch identycznych łańcuchów ciężkich i dwóch identycznych łańcuchów lekkich. W oparciu o łańcuchy ciężkie wyróżnia się pięć klas przeciwciał: IgA, IgD, IgE, IgG oraz IgM. Przeciwciała wiążą się zarówno do wolnych antygenów, jak i tych obecnych na powierzchni patogenów i zakażonych komórek. Umożliwia to zahamowanie infekcji przez neutralizację aktywności biologicznej patogenu oraz zaalarmowanie układu odpornościowego o zakażeniu. Związanie się przeciwciała z antygenem uruchamia eliminację patogenu na drodze fagocytozy przez makrofagi przy udziale całego kompleksu pomocniczych białek układu dopełniacza.

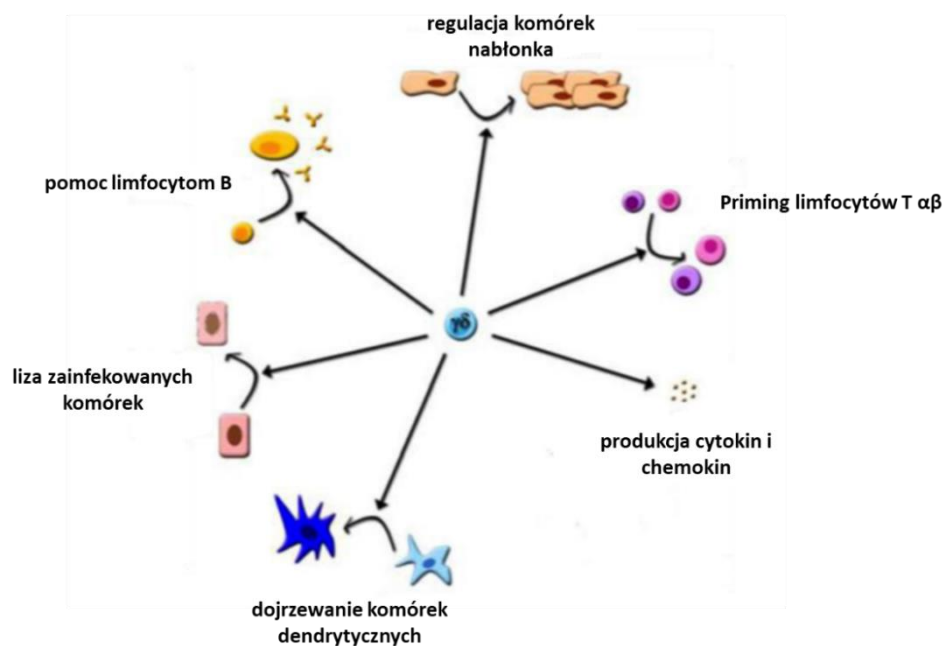
W układzie rozrodczym, w przeciwieństwie do błon śluzowych przewodu pokarmowego i dróg oddechowych, oprócz IgA produkowana jest także IgG (66). Wykazano, że IgG w układzie rozrodczym pochodzi z osocza, podczas gdy IgA jest generowana lokalnie i transportowana aktywnie do światła pochwy (10). Immunoglobuliny wiążą się również ze śluzem poprzez białka mucyny i wychwytyją w nim patogeny. Przykładowo, przeciwciała anti-HSV-1 IgG zatrzymują wirusa opryszczki w śluzie szyjkowo-pochwowym, zapobiegając w ten sposób kontaktowi patogenu z komórkami nabłonkowymi (67). Gęstość i dystrybucja limfocytów B wytwarzających IgA, IgG lub IgM zależy od lokalizacji w układzie rozrodczym. Komórki te znajdują się głównie w pochwie i szyjce macicy (68). Na produkcję



immunoglobulin mają także wpływ hormony płciowe – maksymalna ilość IgA wytwarzana jest 2-3 dni przed owulacją (69).

### 1.3.3. Limfocyty T $\gamma\delta$

Komórki T  $\gamma\delta$  to, oprócz komórek T  $\alpha\beta$  i B, trzecia linia limfocytów, obecna u wszystkich gatunków kręgowców i cechująca się właściwościami z pogranicza odporności nieswoistej i nabytej. Ich receptor TCR zbudowany jest z łańcuchów  $\gamma$  i  $\delta$ . Limfocyty T  $\gamma\delta$  stanowią tylko niewielką część (1-5%) limfocytów krążących we krwi i w narządach obwodowych u większości dorosłych zwierząt (70). Są one bardziej rozpowszechnione w tkankach bogatych w nabłonek, takich jak skóra, jelito i układ rozrodczy, gdzie mogą stanowić do 50% wszystkich komórek T. Chociaż komórki T  $\gamma\delta$  mają wiele wspólnych białek powierzchniowych oraz funkcji efektorowych z komórkami T  $\alpha\beta$ , różnią się od nich właściwościami biologicznymi. Vantourout i Hayday wyróżnili sześć unikalnych właściwości komórek T  $\gamma\delta$ , które odróżniają je od limfocytów T  $\alpha\beta$  (Ryc. 3) (71).



Ryc. 3. Funkcje komórek T  $\gamma\delta$ .

(Opracowano na podstawie (Vantourout i Hayday 2013)).

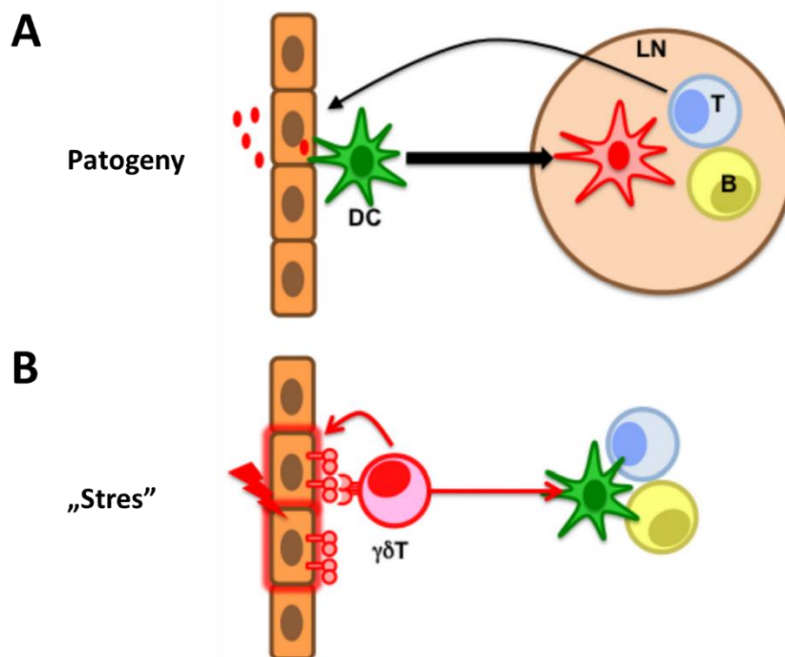
Najlepiej poznaną populacją komórek T  $\gamma\delta$  są mysie dendrytyczne komórki T naskórka (ang. *dendritic epidermal T cells*, DETCs), które tworzą tam pierwszą linię obrony. Odgrywają one kluczową rolę w kontroli homeostazy naskórka, wpływając m.in. na jego przepuszczalność, gojenie ran i ograniczenie procesów nowotworowych (72). Funkcje homeostatyczne DETCs odbywają się poprzez liczne synapsy immunologiczne, które powstają w zdrowej tkance

w warstwie terminalnie zróżnicowanych keratynocytów, gdzie najprawdopodobniej rozpoznają one za pomocą TCR jakiś konstytutywny ligand (73). Po zranieniu lub infekcji dochodzi do redystrybucji synaps i ich zaniku przy jednoczesnym wzroście ruchliwości komórek. Ponadto, pod wpływem infekcji tworzą się stabilne koniugaty limfocytów T  $\gamma\delta$  z komórkami prezentującymi antygeny, przez co komórki te mogą wpływać na indukcję odpowiedzi adaptacyjnej (73,74). Wiele badań pokazuje, że DETCs rozpoznają również antygeny związane ze stresem komórkowym (Mult-1, H60 i Rae-1), za pośrednictwem cząsteczki NKG2D (receptora charakterystycznego dla komórek NK) (75).

Limfocyty T  $\gamma\delta$  mogą prezentować antygeny dzięki ekspresji cząsteczek MHC klasy II i cząsteczek kostymulujących CD80/CD86, podobnie jak klasyczne APCs (76). Aktywowane komórki T  $\gamma\delta$  skutecznie pochłaniają rozpuszczalne antygeny i fagocytują komórki docelowe; prowadzą także do aktywacji komórek NK, komórek T  $\alpha\beta$ , a nawet komórek B, indukując produkcję przeciwciał (77).

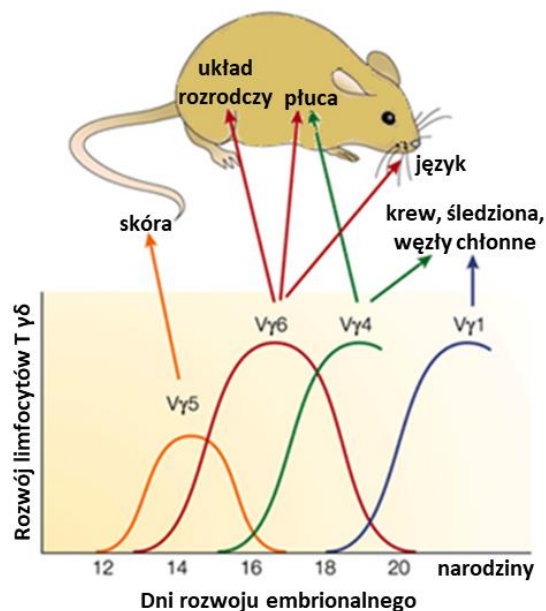
Limfocyty T  $\gamma\delta$  mogą wykazywać efektorowe odpowiedzi cytotoksyczne i cytokinowe przeciwko wirusom, bakteriom, komórkom poddanym czynnikom stresowym i transformacji nowotworowej (Ryc. 4) (78). Jeśli chodzi o cytotoksyczność, istnieją co najmniej trzy różne mechanizmy, poprzez które działają komórki T  $\gamma\delta$ : (1) uwalniają czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) (79), (2) aktywują śmierć komórek zależną od interakcji cząsteczek Fas-FasL (80) oraz (3) uwalniają ziarnistości zawierające cząsteczki cytotoksyczne (81). Podobnie jak w przypadku konwencjonalnych limfocytów T, komórki T  $\gamma\delta$  mogą różnicować się do różnych podtypów komórek efektorowych o charakterystycznym profilu funkcjonalnym typu Th1, Th2, Th17 i Treg (82–84) oraz przekształcać się w komórki pamięci (85).

Limfocyty T  $\gamma\delta$  posiadają oligoklonalne receptory TCR o ograniczonym repertuarze łańcuchów  $\gamma$  i  $\delta$ , zależnym od miejsca zasiedlenia (86) (Ryc. 5). W naskórku u myszy komórki DETC posiadają heterodimery łańcuchów V $\gamma$ 5-V $\delta$ 1 (nomenklatura wg Heiliga i Tonegawy, (87)), podczas gdy nabłonek układu rozrodczego zasiedlają limfocyty T  $\gamma\delta$  z łańcuchami V $\gamma$ 6-V $\delta$ 1 (88).



Ryc. 4. Działanie limfocytów  $T \gamma\delta$ .

(A) Komórki dendrytyczne (DC) wychwytyją patogeny i dojrzewają podczas migracji do węzłów chłonnych, gdzie pobudzają komórki  $T \alpha\beta$  i komórki B. W następstwie aktywacji limfocyty T i B infiltrują zakażoną tkankę, gdzie odpowiednio dochodzi do odpowiedzi efektorowej lub produkcji przeciwciał. Ta bardzo swoista, aczkolwiek powolna reakcja jest uzupełniana przez limfocyty  $T \gamma\delta$ , które w odpowiedzi na różne źródła stresu nie tylko realizują natychmiast lokalne funkcje efektorowe, ale także pobudzają inne „ramiona” odpowiedzi adaptacyjnej (B). Opracowano na podstawie (Vantourout i Hayday 2013).



Ryc. 5. Rozwój limfocytów  $T \gamma\delta$  u myszy w trakcie rozwoju embrionalnego.

Komórki  $T \gamma\delta$  posiadające receptory TCR, które są kodowane przez określone segmenty genu  $V\gamma$ , opuszczają grasnicę w kolejnych dniach okresu płodowego, a następnie migrują i zasiedlają różne tkanki bogate w nabłonek u dorosłych zwierząt. (Opracowano na podstawie (Carding i Egan, 2002)).

### 1.3.3.1. Limfocyty T V $\gamma$ 6-V $\delta$ 1

Limfocyty T V $\gamma$ 6-V $\delta$ 1 emigrują z grasicy między 16-18. dniem rozwoju embrionalnego i zasiedlają nabłonek rozrodczy, płuca i język (89,90). W zależności od szczepu myszy i fazy cyklu rujowego limfocyty T  $\gamma\delta$  stanowią około 2-9% komórek nabłonka i 20-50% wszystkich limfocytów T zasiedlających tę tkankę (91,92). Wiedza dotycząca populacji V $\gamma$ 6-V $\delta$ 1 limfocytów T układu rozrodczego pochodzi głównie z badań procesów dotyczących ciąży (93). Wykazano, zarówno u ludzi, jak i u myszy, że liczba limfocytów T  $\gamma\delta$  wzrasta podczas ciąży w obrębie doczesnej (matczynej części łożyska), jednak mechanizmy tego zjawiska są jak dotąd niewyjaśnione (94,95). Cytokiny wytwarzane przez limfocyty T  $\gamma\delta$  o różnym repertuarze TCR mogą brać udział zarówno w ochronie, jak i w odrzucaniu rozwijającego się płodu: TGF- $\beta$  ma działanie podtrzymujące ciążę, natomiast TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  stymulują jej terminację (93). Badania molekularne wykazały, że przeżycie limfocytów T V $\gamma$ 6-V $\delta$ 1 w nabłonku rozrodczym zależy od kompleksu CD3, który składa się z kilku podjednostek, w tym łańcuchów CD3 $\zeta$  i Fc $\epsilon$ R $\gamma$ 1 (96,97). Oba łańcuchy zawierają tyrozynowe motywy aktywacji immunoreceptora (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM), które są ważne dla przekazywania sygnału, gdy TCR wiąże się ze swoim ligandem. Łańcuch CD3 $\zeta$  zawiera trzy motywy ITAM, które po sieciowaniu TCR są fosforylowane przez kinazę Lck, podczas gdy łańcuch Fc $\epsilon$ R $\gamma$ 1 ma tylko jeden motyw ITAM, który ulega fosforylacji przez kinazę Fyn (98).

Ostatnio opublikowane badania zespołu prof. Hayday'a opisują populację limfocytów T  $\gamma\delta$  macicy, które znajdują się w podścielisku macicy (99), a nie tylko w nabłonku, jak do tej pory sądzono (89). Większość komórek T  $\gamma\delta$  macicy wytwarza kanoniczny TCR V $\gamma$ 6-V $\delta$ 1 i po stymulacji produkuje IL-17A. W przeciwieństwie do komórek V $\gamma$ 6<sup>+</sup> w innych błonach śluzowych, rozwój i funkcjonowanie limfocytów T  $\gamma\delta$  w macicy nie zależy od lokalnej mikroflory (99). Z kolei, wpływ cyklu hormonalnego na populację limfocytów T  $\gamma\delta$  w macicy nie jest jednoznaczny. Część badaczy twierdzi, że najwięcej tych leukocytów występuje w fazie estrus (100), natomiast inni twierdzą, że odsetek limfocytów T  $\gamma\delta$  w macicy jest większy w fazie diestrus niż proestrus (101).

Na temat populacji limfocytów T  $\gamma\delta$  w pochwie wiadomo znacznie mniej. Pierwsza praca pokazująca, że limfocyty T  $\gamma\delta$  w błonie śluzowej pochwy myszy są fenotypowo różne od limfocytów na obwodzie ukazała się w 1996 roku (91). Pochwowe limfocyty T  $\gamma\delta$  zostały scharakteryzowane przez prof. Rakasz. Wykazała ona, że komórki te u myszy wykazują fenotyp efektorowych limfocytów T bez ekspresji cząsteczek CD28 i CD2 (88,102). Komórki

T  $\gamma\delta$  w pochwie zawierają mRNA kodujące czynnik wzrostu keratynocytów, co zwiększa prawdopodobieństwo, że komórki te odgrywają rolę w naprawie nabłonka pochwy po uszkodzeniu, podobnie do DETCs (88). Sugeruje się, że limfocyty T  $\gamma\delta$  układu rozrodczego odgrywają także rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej, m.in. na zakażenie wirusem opryszczki narządów płciowych (ang. *Herpes simplex virus type 2*, HSV-2). Wirus ten indukuje proliferację limfocytów T  $\gamma\delta$  pochwy, ale nie limfocytów T  $\alpha\beta$  (103).

#### **1.3.4. Regulacja układu odpornościowego przez żeńskie hormony płciowe**

Komórki układu odpornościowego obecne w żeńskim układzie rozrodczym są precyzyjnie regulowane przez estradiol i progesteron, które są wytwarzane w sposób cykliczny przez jajniki w trakcie cyklu miesięczkowego. Zmiany poziomów hormonów płciowych wpływają na układ odpornościowy w sposób optymalizujący warunki do udanej migracji plemników, zapłodnienia, implantacji i ciąży (19). Dojrzałe komórki odpornościowe, a także ich prekursorzy, wytwarzają receptory ER i PR oraz receptory androgenowe (ang. *androgen receptors*, ARs), co pokazuje, że hormony płciowe mogą bezpośrednio regulować rozwój lub funkcje komórek odpornościowych (104), przyczyniając się także do kontroli podatności i ochrony przed chorobami przenoszonymi drogą płciową. Wraz z naturalnie występującymi hormonami, stosowanie egzogennych hormonalnych środków antykoncepcyjnych może również wpływać na odporność układu rozrodczego (105).

W zależności od stężenia estrogeny wykazują działanie pro- lub przeciwzapalne. W niskich stężeniach estrogeny indukują ekspresję TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\alpha$ , hamują wytwarzanie cytokin typu Th2 i zwiększają migrację leukocytów do miejsc stanu zapalnego (106). Inne badania wykazały, że estrogeny mogą również hamować wytwarzanie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i IL-6 przez komórki T, makrofagi i DCs oraz indukować cytokiny typu Th2 (IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$ ) powodując działanie przeciwzapalne (107). W wyższych stężeniach estrogeny hamują odporność komórkową i zmniejszają ekspresję licznych markerów aktywacji (108). U szczurów podanie estradiolu było skorelowane ze zmniejszoną prezentacją antygenów w pochwie, prawdopodobnie jako konsekwencja zwiększonego miejscowego wytwarzania TGF- $\beta$  (109). Estradiol również obniża aktywność cytotoksycznych limfocytów T. Dodatkowo, wysoki poziom estrogenów może skutkować zmniejszoną migracją zapalnych komórek T i makrofagów do dróg rodnych ze względu na zmniejszenie aktywności białek adhezyjnych ICAM-1, E-selektyn i VCAM-1, co może przyczynić się do zmniejszenia ryzyka zakażenia wirusem HIV (106).

Stosowanie u ludzi i zwierząt środków antykoncepcyjnych na bazie progesteronu ma znaczący wpływ na odpowiedź immunologiczną na infekcje przenoszone drogą płciową. U myszy progesteron zwiększa podatność oraz zmniejsza odpowiedź immunologiczną na zakażenie wirusem HSV-2 (110). Octan medroksyprogesteronu, hormonalny środek antykoncepcyjny oparty na progesteronie, hamuje aktywność cytotoksycznych limfocytów T i blokuje ekspresję perforyny w limfocytach T (111). Progesteron wpływa również na wytwarzanie cytokin, generalnie faworyzując odpowiedź immunologiczną typu Th2 (112). Nowsze badania wykazały, że leczenie progesteronem w stężeniach osiągniętych podczas terapii hormonalnej zmniejsza proliferację i produkcję cytokin typu Th1 w odpowiedzi na wirusa ospy wietrznej i półpaśca (108). Progesteron może również znacząco wpływać na przenikanie (infiltrację) limfocytów, komórek NK i makrofagów do żeńskich narządów płciowych (113). Medroksyprogesteron hamuje wytwarzanie IFN- $\beta$  przez ludzkie i mysie komórki dendrytyczne po aktywacji receptora TLR9 w odpowiedzi na wirusy przenoszone drogą płciową, takie jak np. HSV-2 (114). W ten sposób hormon ten osłabia ważny aspekt wrodzonej przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej (115).

#### **1.4. Infekcje układu rozrodczego**

Istnieje ponad 30 różnych rodzajów pasożytów, bakterii i wirusów, które infekują żeńskie drogi rozrodcze (116). Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) szacuje, że każdego dnia około milion ludzi przechodzi infekcję przenoszoną drogą płciową, która osiąga rozmiary epidemii na całym świecie.

Z racji swojej lokalizacji i kontaktu ze światem zewnętrznym nabłonek pochwy jest skolonizowany przez wiele mikroorganizmów. Różnorodność mikrobiomu pochwy zależy od wielu czynników, w tym wieku, miejsca zamieszkania czy przyjmowanych leków. U zdrowych kobiet dominującą grupę bakterii kolonizujących pochwę stanowią gram-dodatnie pałeczki kwasu mlekowego *Lactobacillus* (od 60 do 95% mikroorganizmów pochwy), zaś wśród drożdży najczęściej dominują te z rodzaju *Candida* (117). Bakterie *Lactobacillus* hydrolizują glikogen do kwasu mlekowego, zmniejszając pH pochwy do wartości poniżej 4,5, co stanowi ochronę nabłonka przed bakteriami chorobotwórczymi. *Lactobacillus* produkuje także bakteriocyny, które mają działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze w stosunku do szczepów patogennych oraz wytwarza nadtlenek wodoru i inhibitory proteaz, które uniemożliwiają rozwój i namnażanie patogennych drożdży *C. albicans* (118).

Zaburzenia w mikrobiomie pochwy wynikają najczęściej ze zmniejszenia liczebności pałeczek kwasu mlekowego na korzyść mikroorganizmów patogennych. Skutkiem tego są różnego rodzaju infekcje bakteryjne (waginozy) i grzybicze (kandydozy), które często mają charakter przewlekły i trudny w leczeniu. Najczęstsze objawy tych zakażeń to upławy, świąd, pieczenie oraz nadżerki. Szczególnie niebezpieczne są infekcje występujące u kobiet w ciąży, które wymagają leczenia ze względu na ryzyko zakażenia wewnątrzmacicznego i poronienia. Przyczyną zaburzeń homeostazy kobiecej pochwy są antybiotyki, leki sterydowe i inne immunosupresyjne oraz środki antykoncepcyjne (hormonalne i barierowe), powodujące uszkodzenia nabłonka pochwy (119).

#### 1.4.1. Kandydoza

Dominującym patogenem grzybiczym jest *C. albicans*, aczkolwiek kandydozę wywołują również inne gatunki z tego rodzaju, np. *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* i inne (120). Za 85–95% przypadków drożdżakowego zapalenia pochwy i sromu (ang. *vulvovaginal candidiasis*, VVC) odpowiada *C. albicans*. Szacuje się, że około 75% kobiet w wieku rozrodczym przynajmniej raz w ciągu życia doświadcza tego zakażenia, które jest zaliczane do chorób przenoszonych drogą płciową (43). Kolejne 5 do 10% kobiet cierpi na nawracające drożdżakowe zapalenie pochwy i sromu (ang. *recurrent vulvovaginal candidiasis*, RVVC) (121).

Drożdżakowe zapalenie pochwy i sromu powoduje prozapalną wrodzoną odpowiedź układu odpornościowego, w której pośredniczy napływ neutrofilii. Interakcja *C. albicans* z komórkami nabłonka pochwy skutkuje wytwarzaniem IL-1 $\beta$  i alarminy S100A8 (kalgranulina A), które jako chemoatraktanty przyciągają neutrofile do nabłonka pochwy (122). Infiltracja neutrofilii, jako jeden z objawów choroby, zależy od produkcji candidalizyny (ang. *candidalysin*), cytolitycznej toksyny peptydowej wytwarzanej przez *C. albicans* (123). W przeciwieństwie do kandydozy jamy ustnej, gdzie granulocyty obojętnochłonne skutecznie fagocytują drożdże i wychwytyją strzępki przez NETs, pochwowe neutrofile nie są w stanie fagocytować patogenu grzybiczego, co prowadzi do nasilonej odpowiedzi prozapalnej (124). Dysfunkcja neutrofilii w VVC i RVVC jest spowodowana niezdolnością receptora 3 dopełniacza (CR3) do interakcji z białkiem ściany komórkowej *C. albicans*, Pra1 (125). W innych tkankach oddziaływanie CR3 z Pra1 powoduje powstawanie NETs i skuteczne zabijanie strzępek grzybów. Proces ten jest jednak hamowany w wydzielinie pochwowej przez siarczan heparanu, który kompetycyjnie wiąże się z CR3, zapobiegając jego interakcji z Pra1

i prowadząc do objawowej infekcji (126). Siarczan heparanu jest indukowany przez estrogeny, co sugeruje, że kobiety z wysokim stężeniem tych hormonów we krwi są bardziej podatne na objawowe zakażenia ze względu na wyższą zawartość siarczanu heparanu w błonie śluzowej pochwy (127).

Rola komórek T  $\gamma\delta$  w kandydozie pochwy jest dyskusyjna. VVC charakteryzuje się infekcją ograniczoną do nabłonka pochwy i brakiem rozprzestrzenienia zakażenia do szyjki macicy lub macicy. W odpowiedzi na *C. albicans* komórki zapalne (głównie neutrofile) naciekają tkankę nabłonkową a następnie rekrutowane są do światła pochwy (128). W 2001 roku zespół prof. Fidela wykazał u myszy *Tcrd*<sup>-/-</sup> (pozbawionych limfocytów T  $\gamma\delta$ ) zmniejszone nasilenie zakażenia grzybami *C. albicans* w porównaniu do myszy szczepu dzikiego. Badacze doszli do wniosku, że limfocyty T  $\gamma\delta$  odgrywają rolę immunoregulacyjną, która ogranicza odpowiedź przeciwwzakaźną pochwy gospodarza na *C. albicans* (129). Wykazali także brak jakiegokolwiek roli IL-17 w odpowiedzi neutrofile podczas VVC (130), co zostało potwierdzone w najnowszych badaniach (131). Z drugiej strony, zespół prof. Hayday'a pokazał, że wewnątrzmaciczne limfocyty T  $\gamma\delta$  zapewniają pewien poziom ochrony przed VVC poprzez zmniejszoną infiltrację neutrofile zależnych od IL-17 (99). Autorzy sugerują, że rozbieżności w otrzymanych wynikach mogą być skutkiem różnic w mikrobiomie myszy i/lub szczepem *C. albicans* oraz ewentualną migracją wewnątrzmacicznych limfocytów T  $\gamma\delta$  do pochwy (132,133).

### 1.5. Szczepionki dośluzówkowe

Patogeny przenoszone drogą płciową atakują powierzchnię błony śluzowej, powodując choroby w obrębie układu rozrodczego. Jednym ze sposobów prewencji zakażeń jest opracowanie szczepionek skierowanych na śluzówki (134). Wykazano, że immunizacja śluzówkowa jest skuteczna w wytwarzaniu odpowiedzi immunologicznej, obejmującej również odległe tkanki nabłonkowe i krew (135). Natomiast klasyczne immunizacje (podskórne i domięśniowe) zwykle nie wywołują odporności śluzówkowej lub wywołują znacznie słabszą odpowiedź na antygen niż po jego podaniu bezpośrednio na błonę śluzową (136).

Dla skuteczności szczepionek kluczowym aspektem jest komunikacja komórkowa za pomocą naczyń limfatycznych między miejscem podania antygeny a najbliższym położonym (drenującym) węzłem chłonnym, w którym dochodzi do wzbudzenia reakcji immunologicznych. Istnieją znaczne różnice pomiędzy układami limfatycznymi związanymi z błonami śluzowymi różnych układów. Błony śluzowe w nosogardzieli, oskrzelach i przewodzie pokarmowym mają dobrze



rozwinięty układ limfatyczny, podczas gdy układ rozrodczy ma minimalne połączenie z tkankami limfoidalnymi (137). Układ odpornościowy błon śluzowych przede wszystkim wytwarza i wydziela immunoglobuliny IgA i IgM. Jednak w wydzielinach układu rozrodczego IgG jest bardziej dominująca niż immunoglobuliny IgA lub IgM (138). Uważa się, że u ludzi do indukcji wydzielniczych przeciwciał IgA i IgG w układzie rozrodczym, immunizacja donosowa lub droga dopochwowa stanowią najlepszą opcję (139). Czynnikiem, który musi być jednak wzięty pod uwagę, jest cykl menstruacyjny, który wpływa na skuteczność immunizacji dopochwowej u szczurów, myszy i ludzi. Indukcja ludzkich przeciwciał po szczepieniu tą drogą była wyższa w fazie pęcherzykowej (u myszy estrus) niż w fazie lutealnej (u myszy diestrus) (140). Z kolei, w modelu mysim immunizacja dopochwowa podczas fazy diestrus wytwarza lepszą odpowiedź immunologiczną niż w estrusie, w którym dominuje estradiol (141).

### **1.5.1. Wybrane adiuwanty w szczepionkach dośluzówkowych**

Ze względu na obawy związane z bezpieczeństwem stosowania jako szczepionek całych zabitych lub inaktywowanych patogenów, rozwój szczepionek jest obecnie ukierunkowany na wykorzystanie rekombinowanych, niereplikujących się antygenów. Nowa generacja antygenów szczepionkowych nie ma jednak takich właściwości immunostymulujących, jak tradycyjne szczepionki. Immunogenność antygenów próbuje się poprawić przez użycie adiuwantów, czyli substancji pomocniczych dodawanych do szczepionek celem zwiększenia aktywacji układu immunologicznego (142). Sole glinu są najpopularniejszymi adiuwantami szczepionkowymi, które zostały zatwierdzone do stosowania u ludzi. Chociaż ałun (ang. *alum*) generuje silną odpowiedź immunologiczną, to nie jest zbyt skuteczny w wywoływaniu odpowiedzi śluzówkowych i ma marginalną zdolność do wywoływania odpowiedzi komórkowych (143). Indukcja silnej odpowiedzi śluzówkowej wymaga adiuwantów zdolnych do wywierania swojego działania w trudnych warunkach, jakie panują w tkankach śluzowych (tj. niskie pH, mikroflora o dużej gęstości, nieliczne komórki limfoidalne) oraz zdolnych do indukcji odpowiedzi komórek efektorowych (144).

Pod koniec lat 90. odkryto, że aktywacja receptorów TLR na komórkach dendrytycznych podczas immunizacji może nasilać swoistą dla antygeny odpowiedź limfocytów T i B. Obserwacja ta przyczyniła się do znacznego rozwoju w obszarze adiuwantów, aczkolwiek względy bezpieczeństwa i obawy przed reakcjami niepożądanymi w dalszym ciągu mocno ograniczają wykorzystanie ligandów receptorów TLR do formulacji nowych szczepionek. Zastosowanie cząsteczek immunostymulujących jako adiuwantów zwiększa potencjalne

ryzyko wywołania nadprodukcji cząsteczek prozapalnych, które mogą prowadzić do stanu zapalnego bądź indukcji autoimmunizacji (145).

W pracach eksperymentalnych nad szczepionkami testuje się różne ligandy receptorów TLR w roli adiuwantów. Oligodeoksynukleotyd (ODN) zawierający niemetylowaną guanozynę fosforanu cytydyny (CpG) jest agonistą receptora TLR9 i pobudza zarówno wrodzoną, jak i adaptacyjną odpowiedź układu immunologicznego (146). Stymulacja monocytów *in vitro* poprzez CpG prowadzi do ich zróżnicowania do komórek dendrytycznych z silną zdolnością prezentacji antygeny (147). Wykazano także, że CpG może służyć jako silny adiuwant dopochwowy stosowany razem z rekombinowanym białkiem otoczki HSV-2 w celu wytworzenia odporności ochronnej przeciwko infekcji wirusem opryszczki narządów płciowych u myszy (148).

Innym testowanym w roli adiuwanta ligandem receptora TLR jest R848, agonista TLR7/8. TLR7 jest endosomalnym „czujnikiem” wirusowego ssRNA i jego ekspresja rośnie podczas infekcji wirusowych (149). Wykazano, że R848 ma silne działanie przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe poprzez indukcję cytokin prozapalnych, takich jak IL-12 i IFN typu I. Ponadto, R848 aktywuje limfocyty B oraz indukuje proliferację i aktywację ludzkich limfocytów T CD4<sup>+</sup> (150). Zbadano także adiuwantową aktywność R848 w immunizacji dopochwowej rekombinowanym białkiem wirusa HIV-1 (CN54gp140) u owiec. Wykazano, że R848 jest niezbędny do indukcji wysokich poziomów przeciwciał ogólnoustrojowych i śluzówkowych swoistych dla antygeny, które były nieobecne w przypadku szczepienia bez tego adiuwanta (151).

Oprócz receptorów TLR w kontekście adiuwantów bada się również aktywację innych receptorów typu PRR przez ich naturalnie występujące ligandy.  $\beta$ -glukan, jeden z węglowodanów wchodzących w skład ściany komórkowej *C. albicans*, może pobudzać PRRs na powierzchni komórek układu odpornościowego, inicjując szereg efektów, takich jak: aktywacja ścieżek sygnałowych, ekspresja genów, sekrecja cytokin, prowadzących do aktywacji odporności adaptacyjnej (152).  $\beta$ -glukan jest rozpoznawany i wychwytywany przez specyficzne receptory, m.in. dektynę-1 (ang. *dectin-1*) z rodziny receptorów lektynowych typu C, obecną na DCs i makrofagach. Wykazano skuteczność  $\beta$ -glukanu jako adiuwanta w wielu preparatach szczepionkowych w różnych modelach zwierzęcych oraz różnych drogach immunizacji (153). Sygnał po związaniu  $\beta$ -glukanu prowadzi m.in. do produkcji cytokin i chemokin typu Th1 i Th17, co w konsekwencji wzmacnia odpowiedź immunologiczną (154).

## 1.6. Proces starzenia i menopauza

Starzenie się organizmu to niezwykle złożony i wieloczynnikowy proces. Składają się na niego zmiany na poziomie genetycznym, hormonalnym i immunologicznym. Co więcej, proces starzenia można rozpatrywać z punktu widzenia całego organizmu, jak i poszczególnych narządów i tkanek (155). Problem starzenia się pochwy i związany z nim menopauzalny zespół moczowo-płciowy (ang. *genitourinary syndrome of menopause*, GSM) znacznie pogarsza jakość życia kobiet (156).

W okresie menopauzy wraz ze spadkiem estrogenów nabłonek pochwy staje się cienki, a fałdy zostają wygładzone. Zmniejsza się przepływ krwi oraz zawartość glikogenu w nabłonku, przez co dochodzi do suchości pochwy. Następuje wyraźny spadek liczby kolonii *Lactobacillus*, co powoduje zmianę pH w kierunku zasadowym i wzrost liczby bakterii patogennych, szczególnie u kobiet skarżących się na GSM (157,158).

### 1.6.1. Immunostarzenie

Po menopauzie, populacje komórek odpornościowych, jak i ich funkcje ulegają dramatycznym zmianom. Gdy kobiety się starzeją, dwa powiązane ze sobą procesy: menopauza i immunostarzenie, nakładają się na siebie i przyczyniają się do zmian w ochronie immunologicznej w układzie rozrodczym. Chociaż wiele wiadomo na temat wpływu hormonów płciowych na funkcje odpornościowe układu rozrodczego podczas cyklu menstruacyjnego, stosunkowo niewiele wiadomo na temat zmian immunostarzeniowych, które występują po menopauzie oraz w kolejnych latach (159).

Peptydy AMPs i cytokiny wydzielane przez komórki nabłonkowe są kluczowymi składnikami ochronnymi płynów szyjkowo-pochwowych (ang. *cervical-vaginal fluid*, CVF). Po menopauzie dochodzi do zmian w profilu CVF, aczkolwiek mechanizmy tego zjawiska pozostają niejasne. Obniżone poziomy TNF- $\alpha$ , liganda chemokiny (motyw C-C) 20 (ang. *chemokine (C-C motif) ligand 20*, CCL20), SLPI oraz hBD2 były obserwowane w wielu badaniach porównujących CVF kobiet przed i po menopauzie (160). Pomimo tych różnic w profilu CVF, nie stwierdzono różnic w aktywności anty-HSV-2 między kobietami przed i po menopauzie (161).

Limfocyty T CD4<sup>+</sup> stanowią około 35%–50% limfocytów T w układzie rozrodczym. Po menopauzie, obecność tych limfocytów w endometrium jest znacznie zmniejszona w porównaniu z szyjką macicy (162). W populacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> proces starzenia zmienia

dystrybucję limfocytów Th17. U kobiet w wieku rozrodczym komórki Th17 stanowią większą część całkowitej populacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> w szyjce macicy, ale stanowią niewielką frakcję w endometrium (163). Po menopauzie odsetek limfocytów Th17 znacząco wzrasta w endometrium, pozostając bez zmian w szyjce macicy (162).

Limfocyty T CD8<sup>+</sup>, których główną funkcją jest eliminacja zainfekowanych komórek, w układzie rozrodczym mogą także przyczyniać się do niepłodności. Aktywność cytotoksyczna tych limfocytów w endometrium jest znacznie mniejsza u kobiet w wieku rozrodczym w porównaniu z kobietami po menopauzie (64). Nie zaobserwowano jednak wpływu cyklu miesięczkowego i wieku na funkcje cytotoksyczne limfocytów T CD8<sup>+</sup> w szyjce macicy (164).

Komórki NK, które podobnie do limfocytów T CD8<sup>+</sup> działają cytotoksycznie, wraz z wiekiem zwiększają swoją liczbę (165). Natomiast wpływ starzenia na zmiany w populacji komórek NK w układzie rozrodczym pozostaje nieznan.

Wraz z wiekiem u kobiet następuje stopniowy spadek liczby komórek dendrytycznych CD11c<sup>+</sup> w całym układzie rozrodczym (166). Zmniejszona frekwencja komórek prezentujących antygen CD1a<sup>+</sup> została również zaobserwowana w błonie śluzowej pochwy u kobiet po menopauzie w porównaniu z kobietami w wieku rozrodczym (167).

Chociaż wiadomo, że liczba makrofagów wzrasta w endometrium przed miesiączką (24), niewiele wiadomo na temat zmian, jakie następują po menopauzie. Wykazano jedynie znaczące różnice w liczbie makrofagów między kobietami przed i po menopauzie w jajowodach (168), nie jest jednak jasne, czy dotyczą one także macicy i dolnego odcinka układu rozrodczego.

Gęstość i dystrybucja limfocytów B w okresie przedmenopauzalnym zależy od ich lokalizacji w układzie rozrodczym, przy czym komórki wytwarzające IgA, IgG lub IgM znajdują się głównie w pochwie i szyjce macicy (68). Porównując poziomy immunoglobulin IgG i IgA w płynie szyjkowo-pochwowym u kobiet przed menopauzą, po menopauzie i u kobiet w ciąży nie wykryto żadnych różnic. Natomiast w wydzielinach pochwy u kobiet po menopauzie i po przebytej histerektomii poziomy IgG i IgA zmniejszyły się odpowiednio dwukrotnie i 15-krotnie, wskazując na zaangażowanie endometrium w zmiany poziomu immunoglobulin IgG i IgA (169).

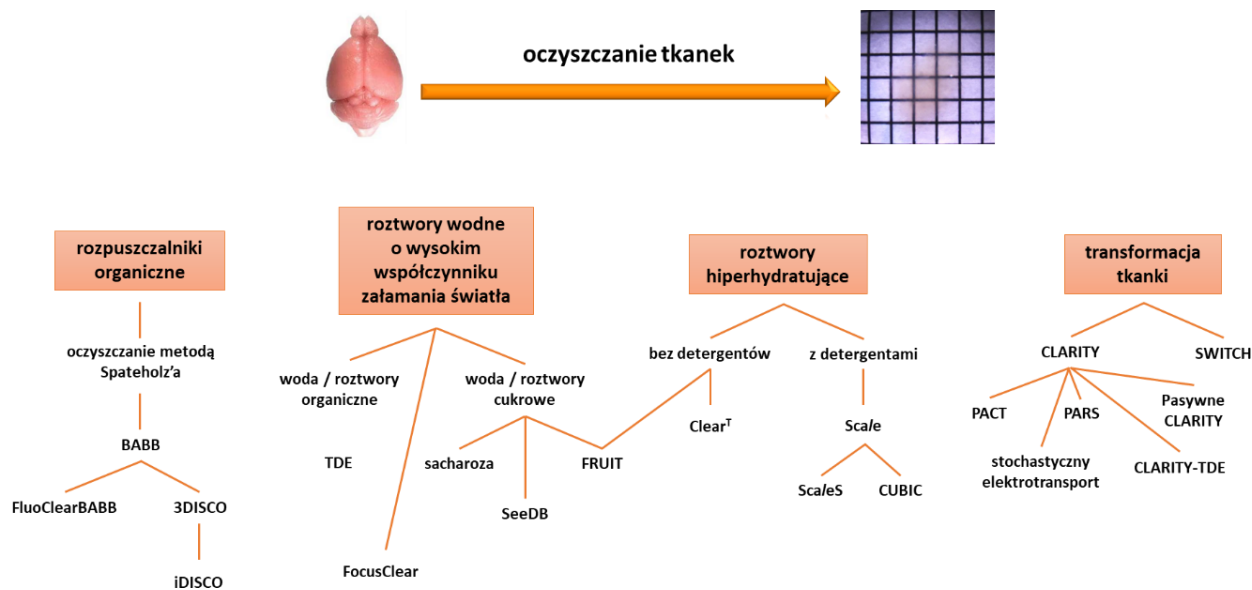
## 1.7. Techniki wykorzystane do analizy komórek układu rozrodczego

### 1.7.1. Oczyszczanie tkanek

W klasycznej technice analizy histologicznej tkanki przetwarza się przeważnie zatapiając je w parafinie a następnie tnąc się na mikrotomie w celu uzyskania cienkich skrawków o grubości kilku mikrometrów. W efekcie, po ich analizie mikroskopowej, otrzymujemy dane jedynie w dwóch wymiarach – dla jednokomórkowej warstwy. Aby odpowiedzieć na wiele pytań biologicznych, musimy poznać jednak trójwymiarową (ang. *three-dimensional*, 3D) strukturę komórek

i narządów (170). Informacje 3D możemy uzyskać na dwa sposoby. Jedną z opcji opiera się na rekonstrukcji informacji przestrzennej poprzez analizę szeregu cienkich skrawków. To podejście jest technicznie trudne ze względu na utratę części tkanki podczas cięcia i zniekształcenia nim wywołane, a także konieczność zastosowania odpowiedniego oprogramowania do analizy zdjęć mikroskopowych i scalenia informacji z pojedynczych warstw. W wielu przypadkach wskutek niedoskonałości preparatyki ostateczna rekonstrukcja tkanki w całej objętości może być niemożliwa. Bardziej nowoczesne podejście obejmuje analizę grubych preparatów tkankowych określanych po angielsku jako tzw. „*whole mount*”. Minimalna obróbka utrwalonych organów eliminuje artefakty wynikłe z klasycznego przetwarzania tkanek i umożliwia obrazowanie całej grubości tkanki bez cięcia na sekcje (171). Pomimo tego, tkanki biologiczne są nadal trudne do analizy mikroskopowej ze względu na trzy główne przeszkody: zabarwienie tkanki, autofluorescencja i nieprzezroczystość (172). Aby pokonać te ograniczenia, opracowano specjalne procedury i odczynniki chemiczne, które sprawiają, że tkanka staje się niemal przezroczysta, co znacznie ułatwia badania obrazowe (173).

Historycznie pierwszą metodę oczyszczania tkanek opisał Spalteholz w 1914 r. (174). Od tego czasu opracowano wiele technik oczyszczania, jednak wszystkie skupiają się na wyrównaniu współczynnika refrakcji w próbce, tak aby zmniejszyć niejednorodność przechodzenia przez nią światła. Wyróżniamy cztery rodziny technik oczyszczania tkanek, bazujących na różnych roztworach i procedurach wykorzystywanych do zwiększenia ich przejrzystości. Są to metody oparte na: [1] roztworach organicznych, [2] roztworach wodnych o wysokim współczynniku załamania światła, [3] roztworach hiperhydratujących i [4] na transformacji tkanek (175) (Ryc. 6). Wszystkie te metody mają zalety i ograniczenia, w zależności od rodzaju tkanki, którą chcemy przetwarzać. Zastosowanie poszczególnych rodzajów metod zostało bardzo dokładnie opisane przez Ariela (176).



Ryc. 6. Podział metod oczyszczania optycznego tkanek  
(Opracowano na podstawie (Silvestri i in. 2016)).

Pomimo, że metod oczyszczania tkanek jest wiele, polegają one głównie na odpowiednim utrwaleniu tkanki i usunięciu lipidów w kolejnym etapie. To właśnie błony lipidowe stanowią jeden z głównych elementów rozpraszających światło w tkance i utrudniających analizy mikroskopowe (177). Kończącym etapem każdej z metod oczyszczania jest wyrównanie współczynnika załamania światła w całej grubości przetwarzanej tkanki (178). Większość metod, poza dedykowanymi odczynnikami chemicznymi, nie wymaga dodatkowego sprzętu, aczkolwiek do niektórych z metod oczyszczania potrzebne są specjalne obiektywy odporne na działanie silnych odczynników chemicznych (175). Z kolei, do technik wymagających transformacji tkanki niezbędne jest urządzenie, w którym zatapia się tkankę w specjalnym żelu, który następnie poddawany jest oczyszczaniu (179).

Rozwój technik oczyszczania nastąpił dzięki chęci poznania struktur 3D mózgu, do czego niezbędne było zachowanie nienaruszonej organizacji komórek (178). Z tego powodu wszystkie metody zostały najpierw opracowane do analizy mózgu. W późniejszych etapach sprawdzano czy metody te są także użyteczne do oczyszczania innych tkanek. W ten sposób udało się uzyskać między innymi przezroczyste płuca (180), nerki (181), kości (182) i wiele innych organów. Metody oczyszczania są stosowane głównie do tkanek izolowanych z myszy transgenicznymi z wprowadzonymi białkami fluorescencyjnymi, znakującymi różne populacje komórek i struktury komórkowe. Jednakże ze względu na ograniczoną dostępność i koszty związane z uzyskaniem myszy transgenicznych, część z metod dostosowano również do znakowania immunofluorescencyjnego.

Pierwsza praca dotycząca zastosowania technik oczyszczania do analizy układu rozrodczego została opublikowana w 2007 roku (183). W artykule skupiono się na ocenie unaczynienia narządów rozrodczych, aczkolwiek przedstawiona metodyka nie była kompatybilna z mikroskopią konfokalną. Gdy rozpoczynałam moją pracę doktorską w 2015 roku, o mikroskopowych analizach oczyszczonego optycznie układu rozrodczego nie znalazłam żadnych informacji. Dopiero pod koniec 2015 roku ukazała się publikacja o zastosowaniu metody ScaleA2 do oczyszczania i analizy mysich jajników (184). Od tego czasu opublikowano wyniki badań oczyszczania macicy (185,186) oraz jajowodów i jajników (187). Publikacja naszego zespołu jest pierwszą i jedyną jak dotąd, pokazującą możliwości zastosowania technik oczyszczania do analizy pochwy (17). Techniki oczyszczania stosowane w oczyszczaniu układu rozrodczego zostały przedstawione w Tabeli 2.

Na podstawie literatury i naszych możliwości technicznych do oczyszczania pochwy wybrałam dwie metody: CUBIC (188) i ScaleS (189). Obie metody polegają na stosowaniu roztworów hiperhydratujących. ScaleS jest oparty na alkoholu cukrowym – sorbitolu, który zapewnia stabilną konserwację tkanek do znakowania immunochemicznego bez usuwania lipidów. CUBIC, z kolei, wykorzystuje mocznik i detergenty w celu usunięcia lipidów i wyrównania współczynnika refrakcji w tkance. Oczyszczanie przeprowadzono na tkankach z myszy transgenicznych Tcrd-H2BeGFP, w których białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) ulega jądrowej ekspresji swoiście w komórkach T  $\gamma\delta$  (190).

Tabela 2. Techniki oczyszczania stosowane w oczyszczaniu układu rozrodczego.

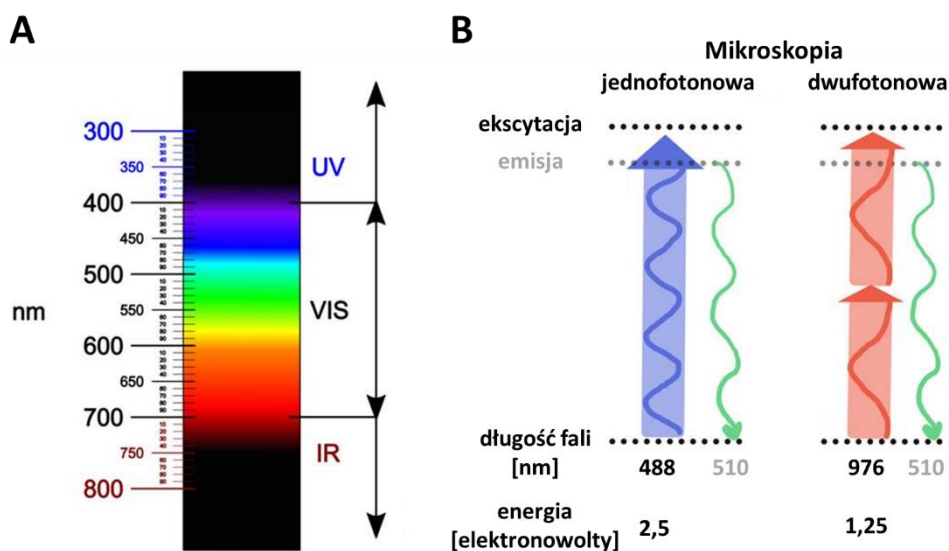
| Tkanka                                | Gatunek  | Testowane metody oczyszczenia                           | Metody wizualizacji                                       | Bibliografia |
|---------------------------------------|--|---|---|--------------|
| Unaczynienie narządów rozrodczych     | koza – układ rozrodczy ciężarnych i nie ciężarnych   | oczyszczanie salicylanem metylo-alkoholowym i gliceryną | obserwacje wizualne z wykorzystaniem zdjęć rentgenowskich | (183)        |
| Jajniki                               | mysz – oocyty  | ScaleA2   | mikroskopia konfokalna<br>mikroskopia dwufotonowa         | (184)        |
| Macica w przygotowaniu do implantacji | mysz -organizacja 3D gruczołów macicznych<br><br>człowiek – endometrium 3D w trakcie cyklu | BABB  | mikroskopia konfokalna                                    | (185)        |
| Macica i łożysko                      | mysz – ciężarna macica i łożysko, interfejs płodowo-matczyny                               | CUBIC   | mikroskopia arkusza światła                               | (186)        |
| Jajowody i jajniki                    | mysz - struktura 3D pęcherzyków w całym jajniku  | CUBIC   | mikroskopia arkusza światła                               | (187)        |
| Pochwa                                | mysz – nabłonek pochwy, komórki T $\gamma\delta$   | CUBIC<br>ScaleS   | mikroskopia konfokalna<br>mikroskopia dwufotonowa         | (17)         |

### 1.7.2. Mikroskopia konfokalna i dwufotonowa

Przełomem w mikroskopii i obrazowaniu grubych próbek stały się mikroskopy konfokalne oraz ich modyfikacje, umożliwiające mikroskopię dwufotonową. Podstawy mikroskopii konfokalnej zostały opracowane i opatentowane przez Marvina Minskiego w latach 60-tych XX wieku (191). Do wytworzenia obrazu w tym typie mikroskopii wykorzystuje się zjawisko fluorescencji wzbudzonej laserem, który zapewnia skupioną wiązkę światła o dużej intensywności. Zwykle stosowane lasery emitują światło widzialne i podczerwone, najczęściej w zakresie 405-1000 nm (UV-VIS-IR, Ryc. 7A) (192). W celu poprawy kontrastu i zwiększenia rozdzielczości w osi Z w mikroskopie konfokalnym wprowadzono przesłonę pierścieniową przed detektorem (z ang. *pinhole*), z regulowaną wielkością otworu, który umożliwia odcięcie sygnału dochodzącego spoza płaszczyzny ogniskowania. Automatyczne powtórzenie skanowania i kolejnych przesunięć wzdłuż osi Z umożliwia zebranie stosu obrazów



z następujących po sobie warstw preparatu, dzięki czemu można wykonać rekonstrukcje obrazowanych tkanek 3D w wysokiej rozdzielczości (193).

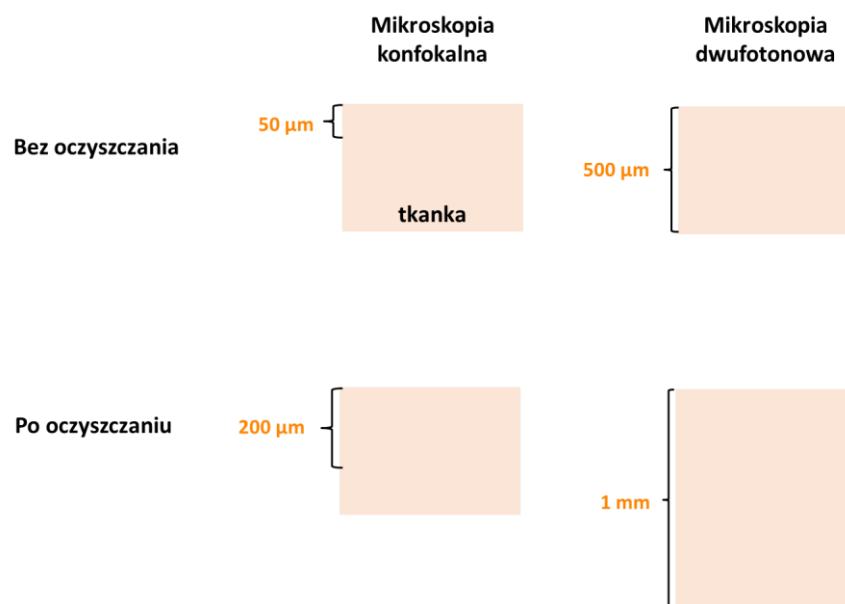


Ryc. 7. Porównanie mikroskopii jedno- i dwufotonowej.

(A) Widmo światła. (B) Absorpcja światła w jednofotonowym oraz dwufotonowym wzbudzeniu fluorescencyjnym. W mikroskopii jednofotonowej fluorofory są zwykle wzbudzane przez pojedyncze fotony w widmie UV lub światła widzialnego. W mikroskopii dwufotonowej każdy foton zwykle znajduje się w widmie podczerwieni i łączona energia dwóch fotonów umożliwia wzbudzenie jednej cząsteczki fluoroforu. W obu przypadkach emitowana fluorescencja jest w podobnym zakresie. (Opracowano na podstawie <http://www.signaltonoisemag.com/allarticles/2018/9/17/dissecting-two-photon-microscopy>).

W mikroskopii dwufotonowej wykorzystuje się pulsacyjny laser podczerwony o skondensowanych pulsach fotonów o długości rzędu femtosekund i z zakresu fal podczerwieni 700-1000 nm (ang. *infrared*, IR). Po zogniskowaniu światła lasera przez soczewki obiektywu jedna cząsteczka fluoroforu zostaje wzbudzona do wyższego stanu energetycznego przez dwa fotony o niższej energii tylko w punkcie ogniskowej obiektywu. Przy powrocie do stanu podstawowego fluoroforu, dochodzi do emisji pojedynczego fotonu o odpowiedniej energii, zależnie od typu fluoroforu (Ryc. 7B) (194). Zaletą systemu dwufotonowego jest to, że używane do wzbudzania światło podczerwone nie ulega rozpraszaniu w objętości preparatu tak silnie, jak krótsze fale, co podnosi efektywność obrazowania (195). Dzięki temu uzyskujemy lepszą penetrację świetlną preparatów biologicznych niż przy stosowaniu światła widzialnego. Umożliwia to pracę z obiektami o większej grubości (196). Ponadto wiązka wzbudzająca powoduje znacznie mniejsze uszkodzenie fotochemiczne i termiczne badanej próbki z uwagi na niższą energię fotonów i fakt wzbudzania fluorescencji tylko w ogniskowej obiektywu, a nie w całej objętości próbki, jak w przypadku mikroskopii jednofotonowej.

W mikroskopii konfokalnej głębokość wzbudzenia fluorescencji promieniem lasera widzialnego i odbierania światła emitowanego wynosi zazwyczaj ok. 50-100  $\mu\text{m}$ , zależnie od rodzaju obrazowanej próbki. W mikroskopach dwufotonowych zakres ten jest zwiększony nawet do 500  $\mu\text{m}$  dla tych samych próbek (17). Łącząc mikroskopię dwufotonową i techniki oczyszczania tkanek możemy analizować tkanki nawet do kilku mm głębokości (Ryc. 8).



*Ryc. 8. Porównanie zakresu głębokości analizowanej tkanki bez oczyszczania i po oczyszczeniu z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej lub dwufotonowej.*

### 1.7.2.1. Autofluorescencja

Autofluorescencja to naturalna emisja fluorescencji tkanki powstająca z endogennych fluoroforów po wzbudzeniu przez promieniowanie o odpowiedniej długości fali. Jest to powszechny rodzaj sygnału zarówno w mikroskopii jednofotonowej z laserami UV-VIS, jak i w mikroskopii dwufotonowej, w której autofluorescencja ma jeszcze silniejszy sygnał. W większości przypadków sygnał autofluorescencji jest nieswoisty, co uniemożliwia różnicowanie obrazowanych typów komórek (197). Zjawisko autofluorescencji jest jednak bardzo użyteczne w mikroskopii, ponieważ tworzy tło i tkankowy kontekst dla komórek, będących przedmiotem analizy. Z uwagi na szerokie pasmo emisji kanał autofluorescencji, rejestrowany dodatkowo w innym zakresie emisji niż kanał zawierający wybrany fluorofor (np. GFP), może być wykorzystywany do matematycznego oczyszczania analizowanego kanału GFP w celu usunięcia obiektów autofluorescencyjnych, obecnych w tym kanale. Za pomocą specjalnych algorytmów w programie Fiji/ImageJ, od kanału GFP odejmuje się odpowiednie dla danego przekroju optycznego zdjęcie kanału z autofluorescencją, dzięki

czemu z badanego kanału GFP usuwa się obiekty autofluorescencyjne, pozostawiając tylko te o emisji charakterystycznej dla GFP (17).

### 1.7.2.2. Generacja drugiej harmonicznej

Jednym ze zjawisk, które jest bardzo często wykorzystywane w obrazowaniu próbek biologicznych, jest tzw. generacja drugiej harmonicznej (ang. *second harmonic generation*, SHG) (196). Z powodu niezerowego współczynnika drugiej harmonicznej, tylko struktury anizotropowe (np. włókna białkowe bez centrum symetrii) są zdolne do emitowania światła SHG o długości stanowiącej połowę długości światła wzbudzenia (198). Jedną z takich struktur jest kolagen, który znajduje się w wielu tkankach. Przy użyciu lasera o pulsach femtosekundowych i odpowiedniego układu optycznego opartego o filtry lub detektory spektralne światło wzbudzenia może być łatwo oddzielone od emitowanego sygnału SHG – o dwukrotnie mniejszej długości i podwojonej częstotliwości. Przykładowo, stosując wiązkę pulsacyjnego lasera IR o długości 900 nm, kolagen w próbce biologicznej wytwarza światło o długości 450 nm, które po zebraniu daje obraz natywnych włókien kolagenowych o bardzo wysokiej rozdzielczości, jednakże bez konieczności dodatkowego barwienia fluorescencyjnego (199).

### 1.7.3. Cytometria przepływowa

Najnowsze techniki oczyszczania tkanek wraz z mikroskopią konfokalną i dwufotonową pozwalają na precyzyjne określenie lokalizacji komórek, jednakże w większości wymagają zastosowania myszy transgenicznych wytwarzających białka fluorescencyjne w różnych populacjach komórek lub strukturach tkankowych. Myszy takie nie są dostępne dla wszystkich typów komórek, ponadto ich koszt jest bardzo wysoki. Często także oczyszczanie tkanek nie jest kompatybilne ze znakowaniem immunofluorescencyjnym, szczególnie w przypadku antygenów o niskim poziomie ekspresji (172). Dodatkowo, analizy liczbowe zdjęć są stosunkowo żmudne i ograniczone do zobrazowanych pól widzenia z wybranych fragmentów próbek mikroskopowych. Komplementarną techniką wobec mikroskopii może być cytometria przepływowa, która pozwala na ilościowe analizy pojedynczych komórek z dużych próbek. Jest to aktualnie jedna z podstawowych technik badawczych i diagnostycznych, znajdująca zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, w szczególności w immunologii. Podobnie jak mikroskopia konfokalna, cytometria przepływowa wykorzystuje przede wszystkim wzbudzaną laserami fluorescencję i pozwala na jednoczesną analizę wielu markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych dzięki zastosowaniu swoistych wobec nich, znakowanych

fluorescencyjnie przeciwciał (200). Umożliwia to np. pracę na komórkach izolowanych z nietransgenicznych myszy bez białek fluorescencyjnych. Nowoczesne cytometry przepływowe pozwalają na przeprowadzanie pomiarów wyznakowanych zawiesin komórkowych z jednoczesnym wykorzystaniem osiemnastu barwników (BD LSRT Fortessa™, BD Biosciences), a dzięki dynamicznemu rozwojowi biochemii i biotechnologii, wybór barwników fluorescencyjnych jest ogromny (201). Kluczowym elementem w tego typu analizach jest jednak przygotowanie próbki, które w przypadku badań tkanek wymaga odpowiedniego protokołu ich homogenizacji, umożliwiającego skuteczne uwalnianie komórek z tkanek i jednoczesną ochronę markerów powierzchniowych komórek przed degradacją.

### **1.7.3.1. Homogenizacja układu rozrodczego**

Mechaniczne rozdrabnianie tkanek jest czasami wystarczające do skutecznej izolacji komórek. Można je zastosować m.in. do izolacji limfocytów z węzłów chłonnych lub śledziony (202). Jednakże do izolacji komórek z tkanek nabłonkowych osadzonych na kolagenowym podścielisku potrzebne jest zastosowanie dodatkowo trawienia enzymatycznego, które umożliwi uzyskanie zawiesiny pojedynczych komórek (91). Charakterystyka populacji komórek odpornościowych z układu rozrodczego jest szczególnie trudna ze względu na zwartą strukturę tkanki i niską liczbę leukocytów w porównaniu do komórek nabłonka i podścieliska, szczególnie w fazie estrus, kiedy nabłonek ma największą grubość (203). Większość opublikowanych protokołów trawienia układu rozrodczego wykorzystuje rozdrabnianie mechaniczne z wcześniejszym trawieniem tkanki lub bez niego. Kolagenaza lub dyspaza w połączeniu z DNazą są powszechnie stosowanymi enzymami w izolacji komórek odpornościowych z macicy myszy (4,101,204). W literaturze trudno jednak znaleźć standardowy protokół trawienia mysiej pochwy. Oprócz klasycznych enzymów do trawienia tkanek, takich jak wcześniej wymienione, dostępne są także liberazy, które składają się z mieszaniny wysokooczyszczonych enzymów: kolagenaz typu I i II oraz obojętnej proteazy (termolizyna lub dyspaza) (205). Wykazano m.in., że zastosowanie liberazy znacząco poprawiło jakość izolacji ludzkich wysp trzustkowych oraz ich żywotność w porównaniu do trawienia kolagenazą (206,207).

## **2. Założenia i cel pracy**

Celem rozprawy doktorskiej jest zbadanie czy limfocyty T  $\gamma\delta$ , zasiedlające śluzówkę układu rozrodczego, uczestniczą w kontroli jego homeostazy zarówno w stanie fizjologicznym, jak i w odpowiedzi na modelowe antygeny, w tym trójsacharyd z *Candida albicans*.

### **Zadania badawcze:**

1. Opracowanie metody wizualizacji limfocytów T  $\gamma\delta$  w układzie rozrodczym myszy za pomocą technik mikroskopii konfokalnej.
2. Opracowanie cytometrycznej metody analizy limfocytów T  $\gamma\delta$  w układzie rozrodczym myszy.
3. Ustalenie fizjologicznej dynamiki populacji limfocytów T  $\gamma\delta$  w zależności od fazy cyklu hormonalnego (faza estrus i diestrus).
4. Ustalenie roli limfocytów T  $\gamma\delta$  w indukcji odpowiedzi odpornościowej na antygeny modelowe, w tym trójsacharyd z *Candida albicans*.
5. Ocena wpływu wieku na populację limfocytów T  $\gamma\delta$  w układzie rozrodczym myszy.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Odczynniki

| Odczynnik   | Producent  |
|---|--|
| 2-hydroksyetyloceluloza                           | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| 3,3',5,5'-tetrametylobenzodyna                    | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| Azydek  | Chempur, Polska  |
| Benzoestan estradiolu                             | Cayman Chemical Company, USA   |
| Beta-glukan                                       | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| BlockAid Blocking Solution                        | ThermoFisher Scientific, USA   |
| Borowodorek tetrabutylamonowy (TBABH)             | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| Bufor fosforanowy (PBS)                           | Biochrom, Niemcy   |
| Bufor węglanowy                                   | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| CountBright™ Absolute Counting Beads              | ThermoFisher Scientific, USA   |
| Cytofix   | Samko, Polska  |
| Cytrynian potasu                                  | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| D-(-)-sorbitol                                    | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| DMSO  | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| DNaza I   | ThermoFisher Scientific, USA   |
| Dyspaza II  | ThermoFisher Scientific, USA   |
| FixRNA  | EURX, Polska   |
| Formaldehyd                                       | POCH, Polska   |
| Gamma-cyklodekstryna                              | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| Glicerol  | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                     | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                    | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| Izofluran (Isoflurin)                             | VETPHARMA ANIMAL HEALTH,<br>Hiszpania                                    |
| Ketamina  | Biowet Puławy, Polska  |
| Kolagenaza IV                                     | Bioshop, Kanada  |
| Koniugat toksoid tężcowy – trójsacharyd β-mannanu | Dr Tomasz Lipiński, Zespół Badawczy Bioinżynierii Łukasiewicz-PORT (208) |
| Ksylazyna (Sedazin)                               | Biowet Puławy, Polska  |
| Kwas edetynowy (EDTA)                             | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| Liberaza DH                                       | ThermoFisher Scientific, USA   |
| Liberaza TH                                       | ThermoFisher Scientific, USA   |
| Liberaza TL                                       | ThermoFisher Scientific, USA   |
| Liberaza TM                                       | ThermoFisher Scientific, USA   |
| Lympholyte-M Cell Separation Media                | Cedarlane Laboratories, Kanada   |
| Medium RPMI 1640                                  | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| Metylo-beta-cyklodekstryna                        | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| Mocznik   | Sigma Aldrich, Niemcy  |
| NaCl  | Sigma Aldrich, Niemcy  |

|   |                              |
|---|------------------------------|
| N,N-dimetyloacetamid (DMA)                          | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroksypropylo)etylenodiamina | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| N-acetylo-L-hydroksyprolina                         | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Octan medroksyprogesteronu (Depogeston)             | Biowet Puławy, Polska        |
| ODN 1826 (CpG)                                      | Invivogen, USA               |
| Olej sezamowy                                       | MP Biomedicals, Polska       |
| Owoalbumina   | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Pefabloc S.C.                                       | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Płodowa surowica bydlęca (FBS)                      | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| ProLong Gold  | ThermoFisher Scientific, USA |
| Roztwór soli Hanka (HBSS)                           | ThermoFisher Scientific, USA |
| R848  | Invivogen, USA               |
| Sacharoza   | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Saponina  | Carl Roth, Niemcy            |
| Sojowy inhibitor trypsyny                           | ThermoFisher Scientific, USA |
| Surowicza albumina wołowa (BSA)                     | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| TBABH   | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Tissue-Tek O.C.T. Compound                          | Sakura, Holandia             |
| Trietanolamina                                      | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Tris-HCl  | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Triton X-100  | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| Tween-20  | Sigma Aldrich, Niemcy        |
| UltraComp eBeads™ Compensation Beads                | ThermoFisher Scientific, USA |
| Wodorotlenk glinu (Alhydrogel 2%)                   | Invivogen, USA               |

### 3.2. Gotowe zestawy odczynników

| Zestaw odczynników                              | Producent                    |
|---|------------------------------|
| Alexa Fluor™ 555 Antibody Labeling Kit          | ThermoFisher Scientific, USA |
| Cytocolor                                       | Merck, Niemcy                |
| DNA/RNA Extracol Kit                            | EURX, Polska                 |
| LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel            | Biolegend, USA               |
| RT <sup>2</sup> First Strand Kit                | Qiagen, Niemcy               |
| RT <sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Aging | Qiagen, Niemcy               |

### 3.3. Oprogramowanie

| Oprogramowanie                             | Producent                          |
|--|------------------------------------|
| Fiji/ImageJ                                | National Institutes of Health, USA |
| FlowJo                                     | Tree Star Inc., USA                |
| GraphPad Prism v6                          | GraphPad Software Inc., USA        |
| Imaris                                     | Bitplane, Szwajcaria               |
| LEGENDplex™ Data Analysis Software         | Biolegend, USA                     |
| RT <sup>2</sup> Profiler PCR Data Analysis | Qiagen, Niemcy                     |

### 3.4. Sprzęt

| Sprzęt  | Producent                    |
|---|------------------------------|
| Cytometr przepływowy LSR Fortessa                   | BD Biosciences, USA          |
| Cytometr przepływowy Canto II                       | BD Biosciences, USA          |
| Czytnik płytek Synergy™ H4 Hybrid Microplate Reader | BioTek, USA                  |
| Laser podczerwony Chameleon Vision II               | Coherent, USA                |
| Mikroskop konfokalny Leica SP8                      | Leica Microsystems, Niemcy   |
| Robot pipetujący Precision™XS                       | BioTek, USA                  |
| Spektrofotometr UV-Vis NanoDrop 8000                | ThermoFisher Scientific, USA |
| Termocykler Stratagene Mx3005P                      | ThermoFisher Scientific, USA |

### 3.5. Myszy

Myszy C57BL/6 oraz *Tcrd*<sup>-/-</sup> (209) pochodziły z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Myszy *Tcrd*-H2BeGFP (190) otrzymaliśmy dzięki uprzejmości doktora Immo Prinz (Institute of Immunology, Hanover Medical School, Hanover, Niemcy). Myszy *Tcrd*<sup>-/-</sup> (209) są modyfikowanym genetycznie szczepem pozbawionym limfocytów T  $\gamma\delta$ . Z kolei, myszy *Tcrd*-H2BeGFP są reporterowym szczepem dla komórek T  $\gamma\delta$ , zawierającym gen GFP w fuzji z genem białka histonowego H2B podłączony do genu dla łańcucha  $\delta$  w TCR. Dzięki temu tylko limfocyty T  $\gamma\delta$  wytwarzają GFP zlokalizowane jądrowo i mogą być identyfikowane za pomocą technik fluorescencyjnych. Myszy hodowano w Sieci Badawczej Łukasiewicz – PORT Polskim Ośrodku Rozwoju Technologii oraz w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu w indywidualnie wentylowanych klatkach w cyklu dzień: noc 12:12 h w warunkach o standardzie SPF (ang. *specific-pathogen-free*), z dostępną wodą i jedzeniem *ad libitum*. Badania przeprowadzono w ramach uzyskanej zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu, nr zgody 58/2015.



### **3.5.1. Synchronizacja cyklu rujowego myszy**

W celu indukcji fazy diestrus samicom myszy w wieku 5-8 tygodni podawano podskórnie 3 mg octanu medroksyprogesteronu (Depogeston) (210) lub 100 µg benzoesu estradiolu w oleju sezamowym w celu indukcji fazy estrus (211).

### **3.5.2. Wymaz cytologiczny z pochwy**

Wymazy pobierano na szkiełko podstawowe przy użyciu wymazówki – sterylnej patyczka o długości ok. 6 cm z nawiniętą watą bawełnianą. Grubość wymazówki nie przekraczała 1-2 mm. Wymazówkę ostrożnie wkładano do pochwy unieruchomionego zwierzęcia i delikatnie obracano. Następnie pobraną wydzielinę rozprowadzano na szkiełku podstawowym i utrwalano preparatem Cytifix. W celu określenia fazy cyklu rujowego pobrane wymazy były barwione zestawem Cytocolor zgodnie z protokołem producenta.

### **3.5.3. Immunizacje**

Samice myszy C57BL/6 i *Tcrd*<sup>-/-</sup> w wieku 5-8 tygodni immunizowano podskórnie, donosowo lub dopochwowo różnymi antygenami (Tabela 3). Do szczepień wykorzystano dwa różne typy antygenów: antygen białkowy – owoalbumina (212) oraz antygen cukrowy, będący koniugatem toksoidu tężca i syntetycznego trójsacharydu, zawierającego reszty cukrowe β-mannanu obecnego w *C. albicans* (213). Koniugat został otrzymany przez dr. Tomasza Lipińskiego z Zespołu Badawczego Bioinżynierii Łukasiewicz-PORT wg protokołu opisanego w pracy Lipinski i in. (2013). Ilość przyłączonych cząsteczek trójsacharydu wynosiła 33 na 1 cząsteczkę toksoidu.

Pięć dni przed rozpoczęciem eksperymentów myszom były podawane hormony w celu synchronizacji cyklu rujowego. Immunizacje przeprowadzono trzykrotnie w odstępach dwutygodniowych. Tydzień po ostatniej immunizacji analizowano poziom przeciwciał w surowicy krwi i w wydzielinie pochwy.

#### **3.5.3.1. Immunizacja podskórna**

Antygeny do immunizacji podskórnej (ang. *subcutaneous*, SC) były mieszane w stosunku objętościowym 1:1 z preparatem wodorotlenku glinu (Alhydrogel 2%) przez noc (Eppendorf ThermoMixer C, 2000 rpm). Zawiesinę podawano podskórnie w objętości 100 µl.

Tabela 3. Antygeny i adiuwanty używane do immunizacji.

| Antygen                                    | Adiuwant immunizacja podskórna | Adiuwant immunizacja donosowa | Adiuwant immunizacja dopochwowa              |
|--|--------------------------------|-------------------------------|--|
| owoalbumina                                | wodorotlenek glinu             | ODN 1826 (CpG)<br>20 µg       | ODN 1826 (CpG)<br>20 µg<br>lub<br>R848 20 µg |
| koniugat toksoid tężcowy -<br>trójsacharyd | wodorotlenek glinu             | β-glukan 100 µg               | β-glukan 100 µg                              |

### 3.5.3.2. Immunizacja donosowa

Przed immunizacją myszy były poddane anestezji iniekcyjnej (ketamina 100 mg/kg + ksylazyna 10 mg/kg). Antygeny do immunizacji donosowej (ang. *intranasal*, IN) były mieszane z adiuwantami: 20 µg ODN 1826 (CpG), 20 µg R848 lub 100 µg β-glukanu w 1,5% roztworze 2-hydroksyetylcelulozy. Myszy były trzymane w pozycji pionowej - nozdrzami do góry. Do każdego z nozdrzy podawano po 10 µl roztworu antygeny.

### 3.5.3.3. Immunizacja dopochwowa

Przed immunizacją myszy były poddane anestezji iniekcyjnej (ketamina 100 mg/kg + ksylazyna 10 mg/kg). Myszy były trzymane głową w dół. Antygeny do immunizacji dopochwowej (ang. *intravaginal*, IVAG) były mieszane z adiuwantami: 20 µg ODN 1826 (CpG) lub 100 µg β-glukanu w 1,5% roztworze 2-hydroksyetylcelulozy. Antygeny były podawane dopochwowo jako zawiesina w 1,5% roztworze 2-hydroksyetylcelulozy w objętości 20 µl. Po podaniu myszy umieszczano w klatce w pozycji leżącej na plecach, aby uniknąć wyciekania podanych substancji.

### 3.5.4. Pobranie krwi

W celu pobrania krwi zwierzęta unieruchomiono i po usunięciu sierści z tylnej nogi kremem depilującym, z żyły odpiszczelowej zwierzęcia pobierano przyżyciowo krew do probówek typu Eppendorf o objętości 1,5 ml. Ewentualne krwawienie hamowano poprzez ucisk. Krew wirowano przy 12000 × g przez 15 minut w 4°C w celu uzyskania surowicy. Surowicę pobierano do probówek typu Eppendorf o objętości 1,5 ml i przechowywano w -20°C do czasu analizy.

### 3.5.5. Pobranie wydzielin pochwy

Myszom poddanym anestezji iniekcyjnej (ketamina 100 mg/kg + ksylazyna 10 mg/kg) pobierane były wydzieliny pochwy. Pochwy płukano trzykrotnie sterylnym roztworem PBS, każdorazowo objętością 50  $\mu$ l.

### 3.5.6. Eutanazja

Eutanazja była przeprowadzana w celu pobrania tkanek do dalszych badań. Procedura odbywała się w głębokim znieczuleniu wziewnym (inhalacja 5% izofluranu) poprzez dyslokację kręgów szyjnych.

## 3.6. Oczyszczanie tkanek

Pobrane pochwy natychmiast utrwalano w lodowatym 3,7% (obj./obj.) roztworze formaldehydu przez 2 godziny w 4°C. Pochwy były oczyszczane przy użyciu dwóch opublikowanych protokołów: ScaleS (189) i CUBIC (188). Jako roztwór kontrolny do tkanek nieoczyszczanych wykorzystano roztwór zawierający saponinę (0,5% wag./obj.), Triton X-100 (0,2% obj./obj.), FBS (2% obj./obj.) i azydek sodu (0,03% wag./obj.) – wszystkie składniki rozpuszczone w buforze PBS. Do obrazowania próbki kontrolne mocowano na szkiełkach podstawowych w preparacie ProLong Gold.

### 3.6.1. Oczyszczanie metodą ScaleS

Oczyszczanie pochwy metodą ScaleS przeprowadzono zgodnie z opublikowanym protokołem wykorzystanym do oczyszczania mózgu (189). Procedura oczyszczania została przedstawiona w Tabeli 4. Skład użytych do oczyszczania odczynników został podany w Tabeli 6. Do obrazowania próbki umieszczano w odczynniku ScaleS4.

Tabela 4. Procedura podstawowego oczyszczania pochwy metodą ScaleS.

| Odczynnik        | Czas | Temperatura |
|------------------|------|-------------|
| 3,7% formaldehyd | 2h   | 4°C         |
| ScaleS0          | ~12h | 37°C        |
| ScaleS1          | ~12h | 37°C        |
| ScaleS2          | ~12h | 37°C        |
| ScaleS3          | ~12h | 37°C        |
| PBS              | ~12h | 4°C         |
| ScaleS4          | ~12h | 37°C        |

Do wizualizacji cytoszkieletu oraz błony podstawnej zastosowano protokół AbScale, który według autorów publikacji jest kompatybilny ze znakowaniem immunofluorescencyjnym (189). Procedura oczyszczania została przedstawiona w Tabeli 5.

Do barwienia cytoszkieletu zastosowano falloidyne (Phalloidin AF647, ThermoFisher Scientific, A22287, rozcieńczenie 1:100). Do barwienia błony podstawnej ściany pochwy zastosowano pierwszorzędowe przeciwciało anti-laminina 5 (Abcam, ab14509, rozcieńczenie 1:200) i znakowane fluorescencyjnie przeciwciało drugorzędowe (kozie przeciwciało przeciw króliczej IgG znakowane AF555, ThermoFisher Scientific, A-21429, rozcieńczenie 1: 1000). Skład użytych do oczyszczania odczynników został podany w Tabeli 6. Do obrazowania próbki umieszczano w odczynniku ScaleS4.

*Tabela 5. Procedura oczyszczania pochwy metodą AbScale.*

| Odczynnik  | Czas | Temperatura |
|--|------|-------------|
| 3,7% formaldehyd   | 2h   | 4°C         |
| ScaleS0  | ~12h | 37°C        |
| ScaleA2  | ~36h | 37°C        |
| ScaleB4(0)   | ~24h | 37°C        |
| ScaleA2  | ~12h | 37°C        |
| PBS  | ~6h  | pokojowa    |
| znakowane przeciwciało pierwszorzędowe w roztworze AbScale | ~48h | 37°C        |
| AbScale  | ~6h  | pokojowa    |
| 2 x AbScale roztwór płuczący                               | 2h   | pokojowa    |
| 4% formaldehyd   | ~1h  | pokojowa    |
| PBS  | ~2h  | pokojowa    |
| ScaleS4  | ~12h | 37°C        |

Tabela 6. Skład odczynników używanych w metodzie ScaleS i AbScale.

| Odczynnik       | Skład  |
|-----------------|--|
| ScaleS0         | 20% (wag./obj.) D-(-)-sorbitol, 5% (wag./obj.) glicerol, 1 mM metylo-beta-cyklodekstryna, 1 mM gamma-cyklodekstryna, 1% (wag./obj.) N-acetylo-L-hydroksyprolina, 3% (obj./obj.) DMSO w PBS |
| ScaleS1         | 20% (wag./obj.) D-(-)-sorbitol, 10% (wag./obj.) glicerol, 4 M mocznik, 0,2% (wag./obj.) Triton X-100 w wodzie dejonizowanej  |
| ScaleS2         | 27% (wag./obj.) D-(-)-sorbitol, 2,7 M mocznik, 0,1% (wag./obj.) Triton X-100, 8,3% (obj./obj.) DMSO w wodzie dejonizowanej   |
| ScaleS3         | 36,4% (wag./obj.) D-(-)-sorbitol, 2,7 M mocznik, 9,1% (obj./obj.) DMSO w wodzie dejonizowanej  |
| ScaleS4         | 40% (wag./obj.) D-(-)-sorbitol, 10% (wag./obj.) glicerol, 4 M mocznik, 0,2% (wag./obj.) Triton X-100, 15% (obj./obj.) DMSO w wodzie dejonizowanej  |
| ScaleA2         | 10% (wag./obj.) glicerol, 4 M mocznik, 0,1% (wag./obj.) Triton X-100 w wodzie dejonizowanej  |
| ScaleB4(0)      | 8 M mocznik w wodzie dejonizowanej   |
| AbScale         | 0,33 M mocznik, 0,1–0,5% Triton X-100 w PBS  |
| AbScale roztwór | 2,5% BSA, 0,05% (wag./obj.) Tween-20 w PBS   |

### 3.6.2. Oczyszczanie metodą CUBIC

Oczyszczanie pochwy metodą CUBIC przeprowadzono zgodnie z opublikowanym protokołem wykorzystanym do oczyszczania mózgu (188). Procedura oczyszczania została przedstawiona w Tabeli 7. Skład użytych do oczyszczania odczynników został podany w Tabeli 9. Do obrazowania próbki umieszczano w odczynniku CUBIC-2.

Tabela 7. Procedura oczyszczania pochwy metodą CUBIC.

| Odczynnik                      | Czas  | Temperatura |
|--------------------------------|-------|-------------|
| 3,7% formaldehyd               | 2h    | 4°C         |
| PBS                            | ~12h  | pokojoowa   |
| CUBIC-1 : H <sub>2</sub> O 1:1 | ~24h  | 37°C        |
| CUBIC-1                        | ~120h | 37°C        |
| 3 x PBS                        | 2h    | pokojoowa   |
| CUBIC-2 : H <sub>2</sub> O 1:1 | ~24h  | 37°C        |
| CUBIC-2                        | ~72h  | 4°C         |

Do wizualizacji cytoszkieletu oraz błony podstawnej zastosowano protokół CUBIC (214) z niewielkimi modyfikacjami. Procedura oczyszczania została przedstawiona w Tabeli 8.

Tabela 8. Procedura oczyszczania pochwy metodą CUBIC z immunofluorescencją.

| Odczynnik   | Czas | Temperatura |
|---|------|-------------|
| 3,7% formaldehyd  | 2h   | 4°C         |
| PBS   | ~12h | pokojowa    |
| CUBIC-1 : H <sub>2</sub> O 1:1  | ~24h | 37°C        |
| CUBIC-1   | ~48h | 37°C        |
| 3 x PBS   | 2h   | pokojowa    |
| 30% (wag./obj.) sacharoza w PBS   | ~24h | pokojowa    |
| Tissue-Tek O.C.T  | ~16h | -80°C       |
| 3 x PBS   | 2h   | pokojowa    |
| znakowane przeciwciało pierwszorzędowe w roztworze BlockAid Blocking Solution | ~48h | 37°C        |
| lub   |      |             |
| przeciwciało pierwszorzędowe w roztworze BlockAid Blocking Solution           | ~48h | 37°C        |
| 3 x PBS   |      |             |
| 3 x PBS   | 2h   | pokojowa    |
| CUBIC-2 : H <sub>2</sub> O 1:1  | ~24h | 37°C        |
| CUBIC-2   | ~72h | 4°C         |

Do barwienia cytoszkieletu zastosowano falloidynę (Phalloidin AF647, ThermoFisher Scientific, A22287, rozcieńczenie 1:100). Do barwienia błony podstawnej ściany pochwy zastosowano pierwszorzędowe przeciwciało anty-laminina 5 (Abcam, ab14509, rozcieńczenie 1:200) i znakowane fluorescencyjnie przeciwciało drugorzędowe (kozie przeciwciało przeciw króliczej IgG znakowane AF555, ThermoFisher Scientific, A-21429, rozcieńczenie 1: 1000). Skład użytych do oczyszczania odczynników został podany w Tabeli 9. Do obrazowania próbki umieszczano w odczynniku CUBIC-2.

Tabela 9. Skład odczynników używanych w metodzie CUBIC.

| Odczynnik | Skład   |
|-----------|---|
| CUBIC-1   | 25% (wag./wag.) mocznik, 15% (wag./wag.) Triton X-100, 25% (wag./wag.) N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroksypropylo)etylenodiamina w wodzie dejonizowanej |
| CUBIC-2   | 50% (wag./wag.) sacharoza, 25% (wag./wag.) mocznik, 0,1% (wag./wag.) Triton X-100, 10% (wag./wag.) trietanolamina w wodzie dejonizowanej          |

### 3.7. Analiza poziomu ekspresji $\gamma\delta$ TCR i V $\gamma$ 5 w limfocytach T $\gamma\delta$ naskórka i pochwy

Od samic myszy Tcrd-H2BeGFP pobierano pochwy wraz z otaczającym je fragmentem skóry. Tkanki natychmiast utrwalano w lodowatym 3,7% (obj./obj.) roztworze formaldehydu przez 2 godziny w 4°C. Po utrwaleniu tkanki płukano dwukrotnie w buforze PBS, a następnie permabilizowano w roztworze zawierającym saponinę (0,5% wag./obj.), Triton X-100 (0,2% obj./obj.), FBS (2% obj./obj.) i azydek sodu (0,03% wag./obj.) w buforze PBS. Po 24 godzinach permabilizacji w temperaturze 37°C tkanki barwiono przez 48 godzin w temperaturze 37°C. Zastosowane przeciwciała przedstawiono w Tabeli 10. Do obrazowania tkanki mocowano na szkiełkach podstawowych w preparacie ProLong Gold.

Tabela 10. Przeciwciała do analizy ekspresji  $\gamma\delta$  TCR i V $\gamma$ 5 w limfocytach T  $\gamma\delta$  naskórka i ściany pochwy.

| Przeciwciało   | Klon | Stężenie<br>[ $\mu$ g/ml] | Producent                  |
|--|------|---------------------------|----------------------------|
| Alexa Fluor 647 TCR $\gamma\delta$   | GL3  | 5,00                      | Biolegend                  |
| TCR V $\gamma$ 3   | 536  | 5,00                      | Santa Cruz                 |
| Zestaw do znakowania przeciwciał Alexa Fluor™<br>555 Antibody Labeling Kit | -    | -                         | ThermoFisher<br>Scientific |

### 3.8. Mikroskopia konfokalna i dwufotonowa

Pobrane tkanki poddawano procedurom oczyszczania i/lub barwienia immunofluorescencyjnego, po czym analizowano je mikroskopowo jako grube i niepocięte fragmenty (ang. *whole mount*) po umocowaniu na szkiełku podstawowym i przykryciu szkiełkiem nakrywkowym. Obrazowanie przeprowadzono na mikroskopie konfokalnym Leica SP8 wyposażonym w skaner rezonansowy, spektralne detektory typu PMT, pulsujący femtosekundowo laser podczerwony Chameleon Vision II (strojony w zakresie 680-1080 nm) i trzy linie laserów światła widzialnego (488 nm, 552 nm, 638 nm). Stosowano obiektyw wodny 25 $\times$  (NA 0,95) z korekcją na szkiełko nakrywkowe (grubość Nr 1,5) i światło podczerwone. DAPI wzbudzano dwufotonowo laserem podczerwonym przy długości 750 nm – zakres zbieranej emisji 425-475 nm, a kolagen wizualizowano za pomocą SHG przy długości 800 nm – sygnał zbierany przy długości 400 nm. Sygnał GFP był wzbudzany jednofotonowo linią 488 nm lub dwufotonowo przy długości 900 nm – zakres zbieranej emisji 500-550 nm. Znacznik Alexa Fluor 555 wzbudzano laserem 552 nm a zbierana emisja była w zakresie 570-610 nm. Znacznik Alexa Fluor 647 wzbudzano laserem 638 nm a zbierana emisja była w zakresie 650-750 nm. Podobnie zbierano sygnał autofluorescencji tkanki – jednofotonowo laserem 638 nm

z emisją w zakresie 650-750 nm lub dwufotonowo – wzbudzając laserem podczerwonym przy długości 900 nm i zbierając emisję w zakresie 565-635 nm. Próbki obrazowano w trybie sekwencyjnym, zaczynając od linii laserów światła widzialnego, aby uniknąć przecieków spektralnych oraz fotowysbielania barwników przez laser podczerwony. Obrazowanie jednofotonowe wykonano przy ustawieniu przesłony konfokalnej (ang. *pinhole*) na poziomie 1-2 AU; do mikroskopii dwufotonowej przesłona ta była całkowicie otwarta. Rozdzielczość obrazów była w zakresie  $512 \times 512 - 1248 \times 1248$  pikseli, z rozmiarem pikseli 1,46  $\mu\text{m}$  i 0,60  $\mu\text{m}$ , odpowiednio. W obrazowaniu w osi Z stosowano interwał 3-7,5  $\mu\text{m}$  pomiędzy pojedynczymi przekrojami optycznymi.

### **3.8.1. Analiza obrazu**

Analizę obrazu przeprowadzono w programach Fiji/ImageJ i Imaris. Sygnał tła i szumu na detektorach w zebranych zdjęciach wstępnie usuwano za pomocą filtra mediany (macierz  $3 \times 3$  piksele) dla każdego kanału oddzielnie. Dodatkowo, autofluorescencję usuwano za pomocą procedur arytmetyki między kanałami (funkcja Image Calculator w programie Fiji/ImageJ) w celu poprawy detekcji komórek GFP-pozytywnych. Wykorzystywano do tego fakt, że spektrum autofluorescencji było szerokie (pomiędzy 500-750 nm) i jej sygnał był obecny zarówno w kanale GFP, jak i w kanale autofluorescencji (zakres 650-750 nm przy wzbudzeniu jednofotonowym i 565-635 nm przy wzbudzeniu dwufotonowym). Aby oczyścić kanał GFP odejmowano od niego w programie Fiji/ImageJ odpowiednie dla tego przekroju optycznego zdjęcie kanału z autofluorescencją, dzięki czemu z kanału GFP zniknęły obiekty autofluorescencyjne a pozostawały tylko te o emisji charakterystycznej dla GFP. Alternatywnie, w celu usunięcia nierównomiernego tła w polu widzenia analizowane zdjęcie duplikowano, następnie kopia była filtrowana przez rozmycie Gaussa (promień = 100  $\mu\text{m}$ ) i odejmowana od oryginalnego obrazu za pomocą opisanej wyżej arytmetyki kanałów.

### **3.8.2. Analiza lokalizacji limfocytów T $\gamma\delta$**

Na podstawie obrazów mikroskopowych analizowano przestrzenną dystrybucję limfocytów T  $\gamma\delta$  w ścianie pochwy. W programie Imaris, bazując na intensywności sygnału fluorescencji GFP, barwienia immunofluorescencyjnego lamininy i sygnału drugiej harmonicznej oraz na algorytmach funkcji Surface, wyznaczano odpowiednio kontury i powierzchnie limfocytów T  $\gamma\delta$  (ograniczone do jądra komórkowego), błony podstawnej oddzielającej nabłonek pochwy od podścieliska i kolagenu obecnego w podścielisku. Wykryte obiekty następnie wykorzystano do obliczenia odległości między nimi za pomocą funkcji transformacji odległości (funkcja



Distance Transformation). Dodatkowo, określono skuteczność procedur oczyszczania tkanek za pomocą różnych protokołów, bazując na detekcji GFP-pozytywnych limfocytów T  $\gamma\delta$  i pomiarze intensywności sygnału GFP w funkcji głębokości w węzłach chłonnych. Dzięki funkcji Spots w programie Imaris wykrywano sferyczne obiekty w kanale GFP i wyznaczano zależność zmierzonych średnich intensywności sygnału GFP w obiektach względem ich pozycji w osi Z.

### **3.8.3. Analiza grubości nabłonka pochwy**

Grubość nabłonka zmierzono w programie Fiji/ImageJ na podstawie bocznych projekcji (XZ lub YZ) uzyskanych ze stosów przekrojów optycznych w płaszczyźnie XY po wzdłużnym obrazowaniu ściany pochwy przez warstwy nabłonka w kierunku podścieliska. Boczne projekcje wykonywano stosując algorytm maksymalnej intensywności sygnału dla wybranej orientacji przestrzennej obrazów ściany pochwy. Zamiast manualnego pomiaru grubości nabłonka ograniczonego do małej ilości obszarów i zdjęć opracowano półautomatyczną procedurę przetwarzania obrazów mikroskopowych, pozwalającą na obliczenia dla wszystkich zobrazowanych obszarów. W pierwszym etapie w zdjęciach kanałów przedstawiających autofluorescencję tkanek i sygnał SHG (kolagen) wyznaczano próg intensywności sygnału, poniżej którego znajdowało się tło a powyżej którego wykrywano określone struktury (nabłonek + podścielisko w kanale autofluorescencji, podścielisko w kanale SHG). Po określeniu progu, zdjęcia poddawano binaryzacji (przypisanie wartości 0 dla pikseli w obszarze tła i wartości 1 dla pikseli w wykrywanej strukturze), aby uzyskać dwa obrazy boczne przedstawiające odpowiednio pełną grubość pochwy (zdjęcie nr 1) i warstwy kolagenu (zdjęcie nr 2). Binarny obraz samego nabłonka (zdjęcie nr 3) uzyskano poprzez odjęcie zdjęcia nr 2 od zdjęcia nr 1. Następnie grubość nabłonka obliczono na podstawie liczby pikseli prostopadłych do powierzchni nabłonka, używając funkcji Reslice na zdjęciu nr 3. Funkcja ta generuje z jednego zdjęcia serię jednopikselowych linii równoległych do powierzchni nabłonka o wartościach intensywności 1 lub 0. Po arytmetycznym dodaniu linii tworzących tę serię uzyskiwano finalną projekcję – jednopikselową linię (zdjęcie nr 4), w której intensywność każdego piksela odpowiadała liczbie pikseli w przekroju nabłonka, pozwalającej na wyliczenie grubości nabłonka w mikronach przy znanej wielkości piksela.

#### **3.8.4. Analiza liczby limfocytów T $\gamma\delta$ w ścianie pochwy**

Liczbę limfocytów T  $\gamma\delta$  w ścianie pochwy z podziałem na warstwę nabłonka i podścieliska analizowano półautomatycznie w zdjęciach uzyskanych z tkanek od myszy Tcrd-H2BeGFP. W badanym stosie zdjęć wzdłuż osi Z, obejmującym trzy kanały (GFP, autofluorescencja i SHG), komórki GFP<sup>+</sup> zaznaczano manualnie narzędziem pędzla w Fiji/ImageJ stawiając małą (10 pikseli) lub dużą kropkę (20 pikseli) w kolorze białym, identyfikując odpowiednio komórki w nabłonku i podścielisku pochwy. Kanały pokazujące autofluorescencję i warstwę kolagenu wykorzystywano do odróżnienia nabłonka pochwy od podścieliska. Analizowany stos zdjęć binaryzowano stosując odpowiednio wysoki próg intensywności, tak by jedynymi wykrytymi obiektami były stawiane kropki o dwóch rozmiarach (wybrany do zaznaczania odcień bieli miał maksymalną intensywność sygnału – wyższą niż inne obiekty obecne w zdjęciach). Komórki T  $\gamma\delta$  w różnych warstwach ściany pochwy zostały policzone na podstawie wielkości kropki przy użyciu wtyczki 3D Objects Counter (215) w programie Fiji/ImageJ.

#### **3.8.5. Analiza poziomu ekspresji $\gamma\delta$ TCR i łańcucha V $\gamma$ 5**

Analizę poziomu ekspresji TCR  $\gamma\delta$  i łańcucha V $\gamma$ 5 w pochwowych limfocytach T  $\gamma\delta$  przeprowadzono w programie Fiji/ImageJ na wybranych pojedynczych przekrojach optycznych pokazujących płaszczyzny równikowe analizowanych komórek zidentyfikowanych za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego ściany pochwy. Po wstępnej redukcji i wyrównaniu tła filtrem Gaussa (procedura opisana powyżej) zmierzono intensywność pozostałego sygnału tła w obszarach pozbawionych komórek za pomocą narzędzia do wykreślenia profilu intensywności (funkcja Analyze/Plot Profile). Najwyższe uzyskane wartości tła zostały odjęte od intensywności sygnału wszystkich pikseli w analizowanym zdjęciu (funkcja Process/Math/Subtract), aby w jak największym stopniu obniżyć poziom tła i uzyskać końcowe obrazy do pomiarów poziomu ekspresji TCR  $\gamma\delta$ /V $\gamma$ 5. Pomiar ten wykonywano w oparciu o narysowaną linię o szerokości pięciu pikseli poprowadzoną przez wykryte komórki GFP<sup>+</sup>, tak by przeciąć błonę cytoplazmatyczną w przynajmniej dwóch miejscach i odczytać z otrzymanego profilu intensywność sygnału wybarwionych immunofluorescencyjnie białek błonowych.

### 3.9. Opracowanie protokołu trawienia układu rozrodczego

Po potwierdzeniu fazy cyklu rujowego myszy poddawano eutanazji. Pochwy przepłukano trzykrotnie roztworem PBS ( $3 \times 50 \mu\text{l}$ ) w celu usunięcia zrogowaciałego nabłonka w fazie estrus i śluzu w fazie diestrus. Następnie izolowano układ rozrodczy dzieląc go na pochwę i macicę (szyjkę macicy i rogi macicy) i umieszczano w probówce z roztworem PBS na lodzie. Do trawienia tkanek użyto sześciu różnych enzymów (Tabela 11).

Tabela 11. Enzymy użyte do trawienia układu rozrodczego.

| Enzym         | Aktywność       | Producent |
|---------------|-----------------|-----------|
| Liberaza DH   | 5,2 U/mg        | Roche     |
| Liberaza TL   | 5,2 U/mg        | Roche     |
| Liberaza TM   | 5,2 U/mg        | Roche     |
| Liberaza TH   | 5,2 U/mg        | Roche     |
| Kolagenaza IV | > 125 U/mg      | BioShop   |
| Dyspaza II    | $\geq 0,8$ U/mg | Roche     |

Liberazy są nazywane zgodnie ze stężeniem termolizyny lub dyspazy: TH – termolizyna o wysokim stężeniu, TM – termolizyna o średnim stężeniu, TL – termolizyna o niskim stężeniu lub DH – dyspaza o wysokim stężeniu. Wszystkie enzymy przygotowano w stężeniu 1 mg/ml w zrównoważonym roztworze soli Hanka (HBSS) z DNazą I ( $30 \mu\text{g/ml}$ ). Pochwę i macicę rozdrabniano osobno na małe fragmenty w probówce typu Eppendorf o objętości 2 ml za pomocą zakrzywionych nożyczek i inkubowano z enzymami lub w PBS (próbki nietrawione) w  $37^\circ\text{C}$  przez 1 godzinę z wytrząsaniem (Eppendorf ThermoMixer C, 800 rpm). Po trawieniu tkanki przecierano przez sitko do komórek o średnicy porów  $40 \mu\text{m}$  (Corning) umieszczone w stożkowej probówce o objętości 50 ml, przemywano 10 ml roztworu PBS i wirowano przy  $300 \times g$  przez 5 minut w  $4^\circ\text{C}$ . Osad zawieszano w 3 ml medium RPMI 1640, przenoszono do 3 ml medium gradientowego Lympholyte-M Cell Separation Media ( $1,875 \pm 0,001 \text{ g/ml}$ ) w stożkowej probówce o objętości 15 ml i wirowano przy  $300 \times g$  przez 20 minut w temperaturze pokojowej (przyspieszenie 2, hamulec 1, wirówka serii Eppendorf 5810R, rotor A-4-62). Komórki ze styku faz ostrożnie zbierano za pomocą pipety serologicznej, przenoszono do nowej probówki i przemywano roztworem PBS (5 ml). Zawiesiny pojedynczych komórek następnie barwiono i analizowano cytometrycznie.

### 3.10. Przygotowanie węzłów chłonnych do analizy cytometrycznej

Pobrane węzły chłonne lędźwiowe i pachwinowe przecierano przez sitko do komórek (średnica porów 40  $\mu\text{m}$ , Corning), płukano w roztworze PBS (10 ml) i wirowano przy  $300 \times g$  przez 5 minut w 4°C. Zawiesiny komórkowe barwiono i analizowano cytometrycznie.

### 3.11. Cytometria przepływowa

Zawiesiny komórkowe inkubowano z barwnikiem Fixable Viability Dye eFluor 780 (1:1000) przez 30 minut w 4°C w celu określenia żywotności komórek. Następnie komórki płukano dwukrotnie roztworem PBS i barwiono przeciwciałami znakowanymi fluorochromem przez 30 minut w 4°C w 100  $\mu\text{l}$  buforu do barwienia (PBS + 2% FBS + 2 mM EDTA). Po inkubacji komórki płukano dwukrotnie roztworem PBS, a następnie utrwalano w 1% roztworze formaldehydu w PBS przez noc. Przed analizą FACS próbki dwukrotnie płukano w PBS. W celu określenia swoistości barwienia stosowano odpowiednie kontrole izotypowe. Do przeprowadzenia kompensacji stosowano kulki kompensacyjne UltraComp eBeads. Próbkę analizowano przy użyciu cytometru przepływowego LSR Fortessa, którego specyfikacja została podana w Tabeli 12. Dane analizowano w programie FlowJo.

Tabela 12. Specyfikacja cytometru przepływowego LSR Fortessa.

| Laser  | Filtr  | Fluorochrom    |
|--------|--------|----------------|
| 488 nm | 530/30 | FITC           |
|        | 710/50 | PerCP/Cy5.5    |
|        | 780/60 | APC/Cy7        |
| 640 nm | 670/14 | APC            |
|        | 730/45 | AF700          |
|        | 710/50 | BV711          |
| 405 nm | 610/20 | BV605          |
|        | 450/40 | BV421          |
|        | 780/60 | BV786          |
|        | 660/20 | BV650          |
|        | 525/50 | BV510          |
| 355 nm | 530/30 | Indo1 (Blue)   |
|        | 450/50 | Indo1 (Violet) |
|        | 710/50 | PE/Cy5.5       |
| 561 nm | 610/20 | PE/Texas Red   |
|        | 780/60 | PE/Cy7         |
|        | 670/30 | PE/Cy5         |
|        | 585/15 | PE             |

### 3.11.1. Strategie bramkowania

Strategie bramkowania, dzięki którym identyfikowano poszczególne populacje komórek przedstawiono na kolejnych rycinach. Na podstawie wartości parametrów FSC (ang. *forward scatter*) i SSC (ang. *side scatter*) tworzono bramkę zawierającą komórki będące przedmiotem zainteresowania. W dalszej analizie eliminowano agregaty komórek i wybierano wyłącznie komórki żywe. Następnie na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych identyfikowano populacje komórek układu odpornościowego. Dokładny opis został zamieszczony pod każdą ryciną przedstawiającą poszczególne strategie bramkowania.

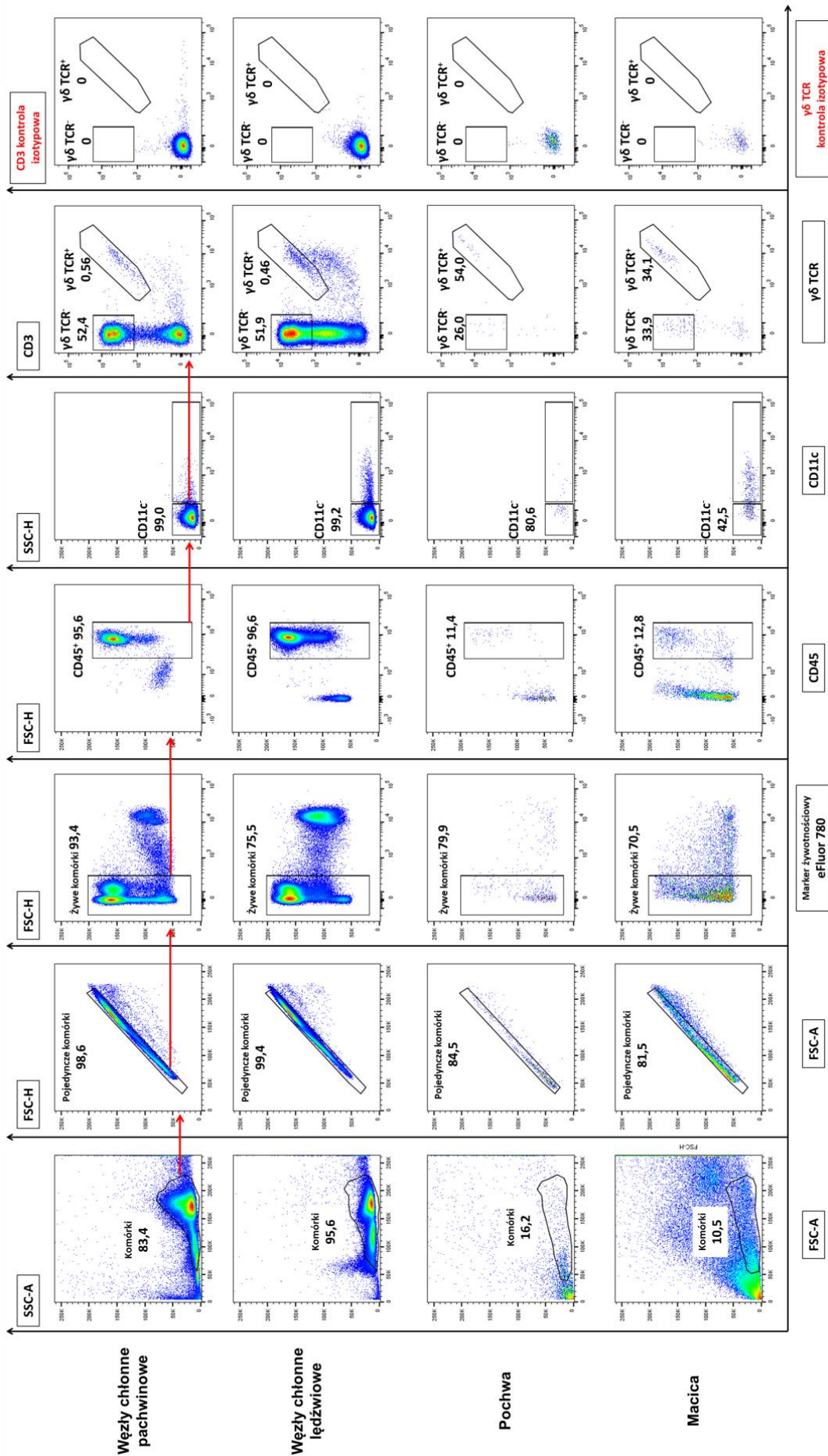
### 3.11.2. Analiza subpopulacji komórek w układzie rozrodczym i węzłach chłonnych

Po trawieniu enzymatycznym komórki układu rozrodczego i węzłów chłonnych barwiono w celu analizy najczęstszych markerów komórek odpornościowych: CD45 (leukocyty), CD3ε (limfocyty T), CD11c (komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty) i γδ TCR (komórki T γδ). Zastosowane przeciwciała przedstawiono w Tabeli 13. Bezwzględne zliczenia komórek w każdej próbce zostały określone dzięki kulkom CountBright™ Absolute Counting Beads zgodnie z zaleceniami producenta.

Tabela 13. Przeciwciała do analizy subpopulacji komórek w układzie rozrodczym i węzłach chłonnych.

| Przeciwciało          | Klon     | Stężenie [μg/ml] | Producent             |
|-----------------------|----------|------------------|-----------------------|
| Alexa Fluor 647 CD3ε  | 145-2C11 | 2,50             | Biolegend             |
| Pacific Blue CD45.2   | 104      | 2,50             | Biolegend             |
| PE TCR γδ             | GL3      | 0,50             | Stemcell Technologies |
| Alexa Fluor 488 CD11c | N418     | 2,50             | Biolegend             |

Otrzymane dane analizowano w programie FlowJo. Strategię bramkowania subpopulacji komórek w układzie rozrodczym i węzłach chłonnych przedstawiono na Rycinie 9.



*Ryc. 9. Strategia bramkowania subpopulacji komórek w układzie rozrodczym i węzłach chłonnych. Bramkę utworzono ręcznie na podstawie parametrów FSC-A i SSC-A odrzucając małe fragmenty komórek i artefakty. Na podstawie parametrów FCS-A i FSC-H wykluczono dublety. Następnie dzięki barwieniu znacznikiem eFluor 780 utworzono bramkę żywotności, aby wykluczyć martwe – eFluor 780-pozytywne – komórki. Spośród żywych komórek dzięki barwieniu przeciwciałem anti-CD45 wydzielono komórki produkujące białko CD45 – marker leukocytów. Na podstawie barwienia przeciwciałem anti-CD11c komórki CD45<sup>+</sup> podzielono na komórki CD11c<sup>+</sup> i CD11c<sup>-</sup>. Komórki CD11c<sup>-</sup> zostały dalej kategoryzowane na podstawie ekspresji CD3. Na koniec komórki CD3<sup>+</sup> oceniono pod kątem ekspresji  $\gamma\delta$  TCR. Swoistość barwienia sprawdzano za pomocą przeciwciał izotypowych. Rysunek pokazuje strategię bramkowania przeprowadzoną na nietrawionych próbkach.*

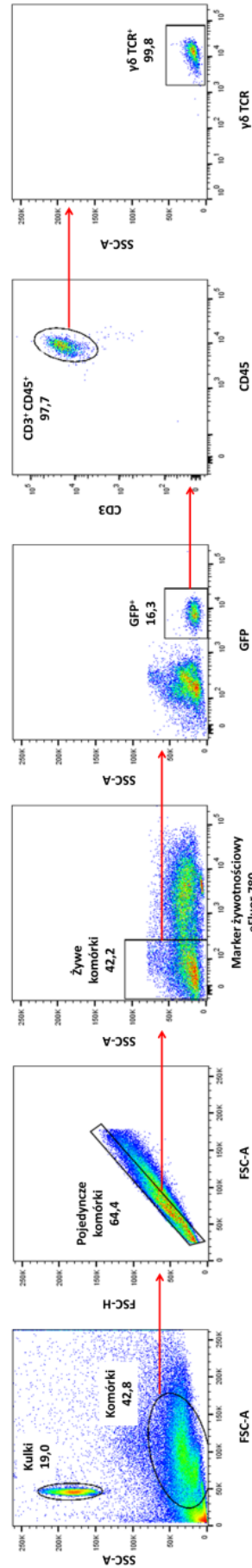
### 3.11.3. Fenotypowanie komórek GFP<sup>+</sup> izolowanych od myszy Tcrd-H2BeGFP

Pochwy i macice myszy Tcrd-H2BeGFP trawione były Liberazą TL. Komórki GFP<sup>+</sup> były fenotypowane pod kątem markerów komórek odpornościowych: CD45 (leukocyty), CD3 $\epsilon$  (limfocyty T) i  $\gamma\delta$  TCR (komórki T  $\gamma\delta$ ). Zastosowane przeciwciała przedstawiono w Tabeli 14. Bezwzględne zliczenia komórek w każdej próbce zostały określone dzięki kulkom CountBright™ Absolute Counting Beads zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

*Tabela 14. Przeciwciała do fenotypowania komórek GFP<sup>+</sup> izolowanych od myszy Tcrd-H2BeGFP.*

| Przeciwciało                       | Klon | Stężenie [ $\mu\text{g/ml}$ ] | Producent |
|------------------------------------|------|-------------------------------|-----------|
| PE CD3                             | 17A2 | 0,80                          | Biolegend |
| Pacific Blue CD45.2                | 104  | 2,50                          | Biolegend |
| Alexa Fluor 647 TCR $\gamma\delta$ | GL3  | 2,00                          | Biolegend |

Otrzymane dane analizowano w programie FlowJo. Strategię bramkowania do fenotypowania komórek GFP<sup>+</sup> izolowanych od myszy Tcrd-H2BeGFP przedstawiono na Rycinie 10.





Ryc. 10. *Strategia bramkowania do fenotypowania komórek GFP<sup>+</sup> izolowanych od myszy Tcrd-H2BeGFP.* Zawiesinę komórek po trawieniu enzymatycznym Liberazą TL barwiono immunofluorescencyjnie i analizowano za pomocą FACS. Po wstępnym bramkowaniu komórek, usunięciu dubletów i wykluczeniu martwych komórek (jak w Ryc. 9) żywe komórki analizowano pod względem ekspresji GFP. Komórki GFP<sup>+</sup> weryfikowano następnie na obecność markerów powierzchniowych CD45 i CD3. W kolejnym kroku podwójnie dodatnie komórki (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) oceniono pod kątem ekspresji  $\gamma\delta$  TCR.

### 3.11.4. Ocena wpływu limfocytów T $\gamma\delta$ na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy.

Pochwy i macice myszy C57BL/6 oraz *Tcrd*<sup>-/-</sup> trawione były Liberazą TL. Otrzymane komórki barwiono immunofluorescencyjnie w celu analizy ekspresji najbardziej powszechnych markerów komórek odpornościowych według dwóch paneli barwień. Panel 1: CD11c (komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty); Gr-1 (granulocyty, makrofagi); CD11b (granulocyty, monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK, subpopulacje komórek T i B); CD45R/B220 (komórki B, subpopulacje komórek T i NK); F4/80 (makrofagi, komórki dendrytyczne); CD19 (komórki B, komórki dendrytyczne). Panel 2: CD3 (komórki T, komórki NK-T); TCR  $\gamma\delta$  (komórki T  $\gamma\delta$ ); NK-1.1 (komórki NK, komórki NK-T); CD117 (hematopoetyczne komórki macierzyste i komórki tuczne); Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  (komórki tuczne i bazofile); CD326 (komórki tuczne i bazofile). Zastosowane przeciwciała przedstawiono w Tabelach 15 i 16.

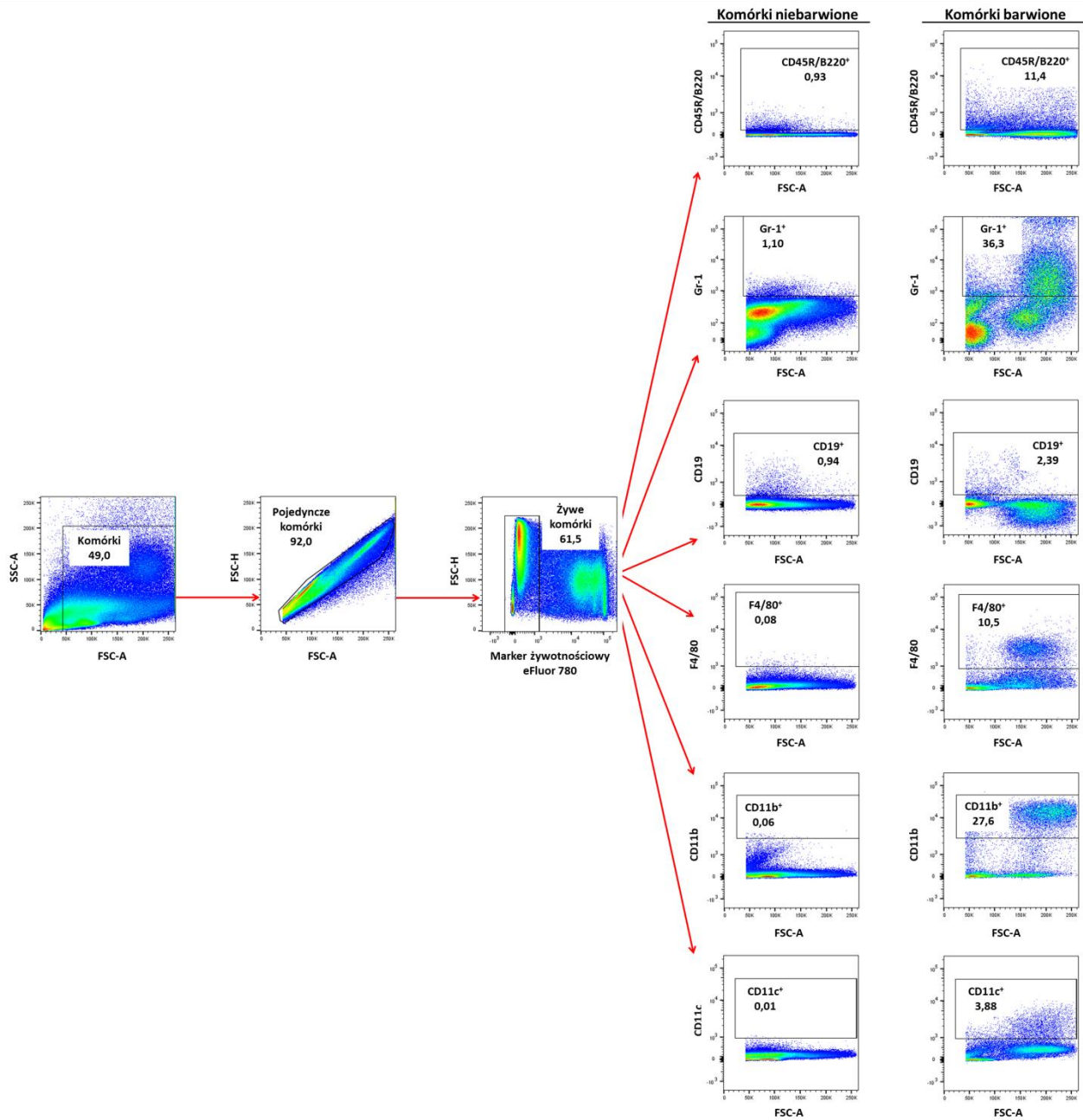
Tabela 15. *Przeciwciała w panelu 1.*

| Przeciwciało          | Klon    | Stężenie [ $\mu$ g/ml] | Producent |
|-----------------------|---------|------------------------|-----------|
| Alexa Fluor 488 CD11c | N418    | 2,50                   | Biolegend |
| PE Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) | RB6-8C5 | 1,00                   | Biolegend |
| PerCP-Cy5.5 CD11b     | M1/70   | 0,50                   | Biolegend |
| PE-Cy7 CD45R/B220     | RA3-6B2 | 0,20                   | Biolegend |
| Alexa Fluor 647 F4/80 | BM8     | 1,25                   | Biolegend |
| APC-Cy7 CD19          | 6D5     | 0,20                   | Biolegend |

Tabela 16. *Przeciwciała w panelu 2.*

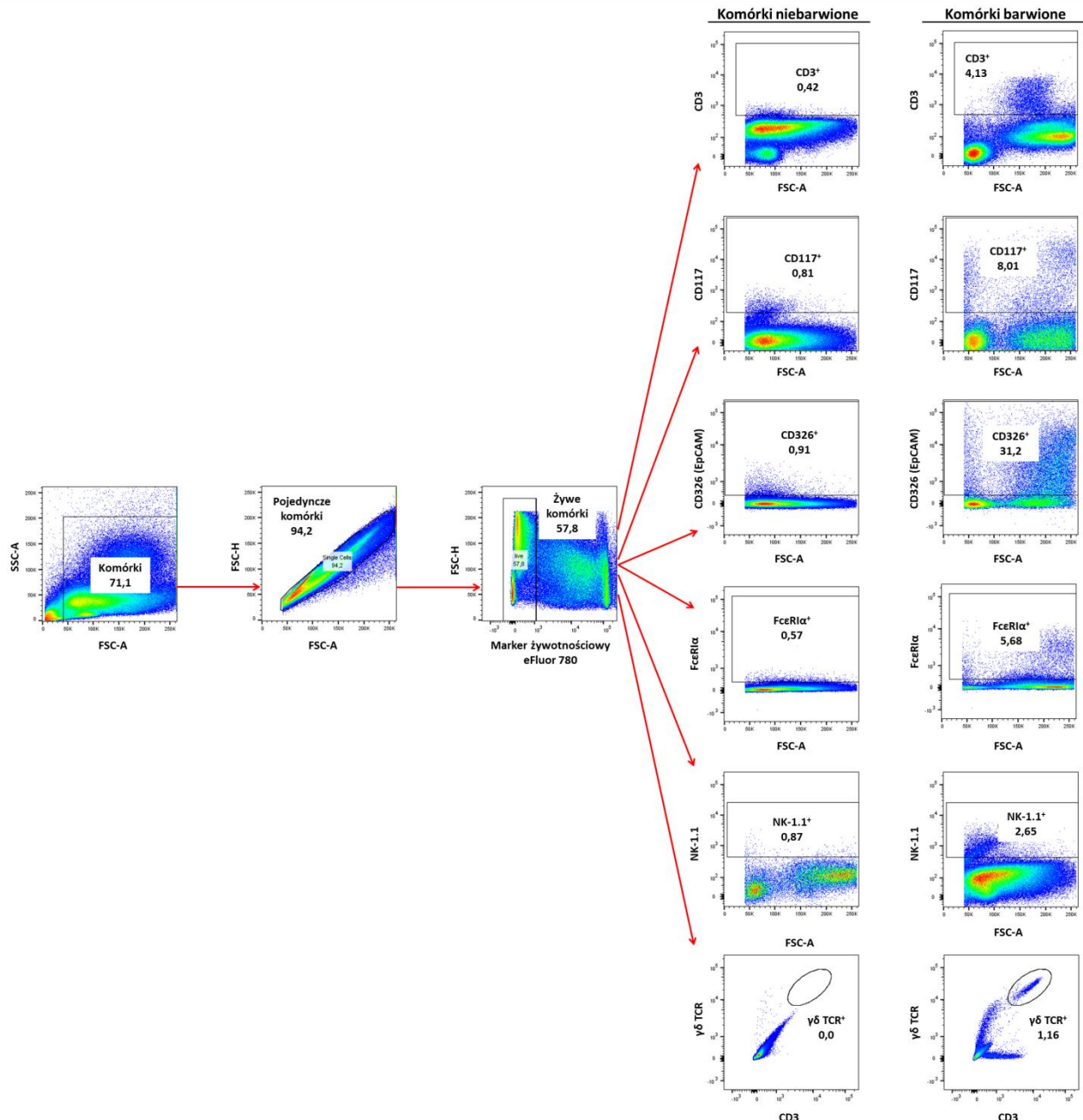
| Przeciwciało                  | Klon  | Stężenie [ $\mu$ g/ml] | Producent             |
|-------------------------------|-------|------------------------|-----------------------|
| Alexa Fluor 488 CD3           | 17A2  | 1,25                   | Biolegend             |
| PE TCR $\gamma\delta$         | GL3   | 0,50                   | Stemcell Technologies |
| PerCP-Cy5.5 NK-1.1            | PK136 | 1,00                   | Biolegend             |
| PE-Cy7 CD117 (c-Kit)          | 2B8   | 1,00                   | Biolegend             |
| APC Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ | MAR1  | 1,00                   | Biolegend             |
| APC-Cy7 CD326 (EpCAM)         | G8.8  | 1,00                   | Biolegend             |

Otrzymane dane analizowano w programie FlowJo. Strategię bramkowania subpopulacji komórek w układzie rozrodczym przedstawiono na Rycinach 11 i 12.



**Ryc. 11. Strategia bramkowania w panelu 1.**

Zawieszę komórek z pochwy i macicy po trawieniu enzymatycznym Liberazą TL barwiono immunofluorescencyjnie i analizowano za pomocą FACS. Po wstępnym bramkowaniu komórek, usunięciu dubletów i wykluczeniu martwych komórek (jak w Ryc. 9) żywe komórki analizowano pod względem ekspresji sześciu markerów powierzchniowych: CD45R/B220 (komórki B, subpopulacje komórek T i NK); Gr-1 (granulocyty, makrofagi); CD19 (komórki B, komórki dendrytyczne); F4/80 (makrofagi, komórki dendrytyczne); CD11b (granulocyty, monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK, subpopulacje komórek T i B); CD11c (komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty).



**Ryc. 12. Strategia bramkowania w panelu 2.**

Zawieszę komórek z pochwy i macicy po trawieniu enzymatycznym Liberazą TL barwiono immunofluorescencyjnie i analizowano za pomocą FACS. Po wstępnym bramkowaniu komórek, usunięciu dubletów i wykluczeniu martwych komórek (jak w Ryc. 9) żywe komórki analizowano pod względem ekspresji sześciu markerów powierzchniowych: CD3 (komórki T, komórki NK-T); CD117 (hematopoetyczne komórki macierzyste i komórki tuczne); CD326 (komórki tuczne i bazofile); FcεR1α (komórki tuczne i bazofile); NK-1.1 (komórki NK, komórki NK-T); TCR γδ (komórki T γδ).

### 3.12. Pomiar stężenia cytokin w pochwach i macicach

Po izolacji pochwy i macice umieszczano w 500 µl buforu PBS zawierającego 1,5 mM Pefabloc SC, 0,1 mg/ml sojowego inhibitora trypsyny, 0,05 M EDTA i 1% BSA. Próbkę następnie zamrażano w temperaturze -80°C. Dzień przed planowanym pomiarem stężenia cytokin próbkę rozmrażano i permeabilizowano przez noc w buforze saponinowym (2% saponina (wag./obj.) w roztworze PBS) w temperaturze 4°C (pochwy w 200 µl buforu, macice w 400 µl buforu). Następnego dnia próbkę wirowano przy 15000 × g przez 10 minut i pobierano 25 µl supernatantu do analizy według protokołu dostarczonego przez producenta zestawu LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel. Próbkę analizowano na cytometrze Canto II, którego specyfikacja została podana w Tabeli 17.

Tabela 17. Specyfikacja cytometru przepływowego Canto II.

| Laser  | Filtr  | Fluorochrom |
|--------|--------|-------------|
| 488 nm | 530/30 | FITC        |
|        | 585/45 | PE          |
|        | 670LP  | PerCP/Cy5.5 |
|        | 780/60 | PE/Cy7      |
| 633 nm | 660/20 | APC         |
|        | 780/60 | APC/Cy7     |
| 405 nm | 450/50 | BV421       |
|        | 510/50 | BV510       |

Stężenia badanych cytokin (Tabela 18) obliczano w programie LEGENDplex™ Data Analysis Software dostarczonym przez producenta zestawu.

Tabela 18. Cytokiny mierzone zestawem *Mouse Inflammation Panel*.

| Nazwa cytokiny |
|----------------|
| IL-23          |
| IL-1 $\alpha$  |
| IFN- $\gamma$  |
| TNF- $\alpha$  |
| CCL2 (MCP-1)   |
| IL-12p70       |
| IL-1 $\beta$   |
| IL-10          |
| IL-6           |
| IL-27          |
| IL-17A         |
| IFN- $\beta$   |
| GM-CSF         |

### 3.13. Izolacja RNA

Wyizolowane pochwy były przechowywane w 300  $\mu$ l odczynnika FixRNA w  $-80^{\circ}\text{C}$ . RNA ekstrahowano przy użyciu zestawu DNA/RNA Extracol Kit zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Stężenie i czystość RNA oceniano za pomocą spektrofotometru UV-Vis NanoDrop 8000.

### 3.14. Synteza cDNA

Całkowite RNA (1  $\mu$ g) zastosowano do syntezy cDNA przy użyciu zestawu RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem producenta.

### 3.15. Analiza Real-Time PCR

Do analizy wybranych genów zaangażowanych w proces starzenia zastosowano płytki RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Mouse Aging. Do analizy wykorzystywano cDNA otrzymane po izolacji i przepisaniu 1  $\mu$ g RNA, które następnie mieszano z odczynnikami RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix i rozpipetowywano po 25  $\mu$ l do 96-dółkowej płytki RT<sup>2</sup> Profiler PCR zawierającej zliofilizowane startery 84 genów (Tabela 19), 5 genów podstawowego metabolizmu (*Actb* – aktyna beta; *B2m* – mikroglobulina beta-2; *Gapdh* – dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa; *Gusb* – glukuronidaza beta, *Hsp90ab1* – białko szoku cieplnego 90 alfa), 3 kontrole transkrypcji, 3 pozytywne kontrole reakcji PCR i 1 kontrolę zanieczyszczenia genomowym DNA myszy. Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Stratagene Mx3005P. Wzmocnienie przeprowadzono w  $95^{\circ}\text{C}$  przez 10 min, 40 cykli w  $95^{\circ}\text{C}$  przez 15 s i  $60^{\circ}\text{C}$  przez 1 min. Dane analizowane w programie RT<sup>2</sup> Profiler PCR Data Analysis.

Tabela 19. Geny RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Aging.

| Symbol genu    | Opis   |
|----------------|--|
| <i>Angel2</i>  | Angel homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )  |
| <i>Anxa3</i>   | Aneksyna A3  |
| <i>Anxa5</i>   | Aneksyna A5  |
| <i>Arid1a</i>  | Bogata w AT domena interaktywna 1A (podobna do SWI)                                  |
| <i>Arl6ip6</i> | Czynnik ADP-rybozylacja 6 podobny do białka 6  |
| <i>Bub1b</i>   | Pączkujący nieinhibowany przez benzimidazole 1 homolog beta ( <i>S. cerevisiae</i> ) |
| <i>C1qa</i>    | Składnik dopełniacza 1, subkomponent q, polipeptyd alfa                              |
| <i>C1qb</i>    | Składnik dopełniacza 1, subkomponent q, polipeptyd beta                              |
| <i>C1qc</i>    | Składnik dopełniacza 1, subkomponent q, łańcuch C                                    |
| <i>C1s1</i>    | Składnik dopełniacza 1, subkomponent s   |
| <i>C3</i>      | Składnik dopełniacza 3   |
| <i>C3ar1</i>   | Składnik dopełniacza 3a receptor 1   |
| <i>C4a</i>     | Składnik dopełniacza 4A (grupa krwi Rodgers)   |
| <i>C4b</i>     | Składnik dopełniacza 4B (grupa krwi Childo)  |
| <i>C5ar1</i>   | Składnik dopełniacza 5a receptor 1   |
| <i>Calb1</i>   | Kalbindyna 1   |
| <i>Casp1</i>   | Kaspaza 1  |
| <i>Ccr1</i>    | Chemokina (motyw C-C) receptor 1   |
| <i>Cd14</i>    | Antygen CD14   |
| <i>Cd163</i>   | Antygen CD163  |
| <i>Cdkn1c</i>  | Zależny od cyklin inhibitor kinazy 1C (P57)  |
| <i>Cfh</i>     | Składnik dopełniacza czynnik h   |
| <i>Cfhr1</i>   | Czynnik dopełniacza związany z H1  |
| <i>Clu</i>     | Klasteryna   |
| <i>Cx3cl1</i>  | Chemokina (motyw C-X3-C) ligand 1  |
| <i>Cxcl16</i>  | Chemokina (motyw C-X-C) ligand 16  |
| <i>Elavl1</i>  | ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i> )-like 1 (Hu antygen R)   |
| <i>Elp3</i>    | Homolog 3 białka elongacji ( <i>S. cerevisiae</i> )                                  |
| <i>Eml1</i>    | Białko związane z mikrotubulą echinodermu 1  |
| <i>Ep300</i>   | Białko wiążące E1A p300  |
| <i>Fbxl16</i>  | F-box i powtórzone białko bogate w leucynę 16  |
| <i>Fcer1g</i>  | Receptor Fc, IgE, wysokie powinowactwo I, polipeptyd gamma                           |
| <i>Fcgbp</i>   | Fragment Fc białka wiążącego IgG   |
| <i>Fcgr1</i>   | Receptor Fc, IgG, wysokie powinowactwo I   |
| <i>Fcgr2b</i>  | Receptor Fc, IgG, niskie powinowactwo IIb  |
| <i>Fcgr3</i>   | Receptor Fc, IgG, niskie powinowactwo III  |
| <i>Foxo1</i>   | Forkhead box O1  |
| <i>Gfap</i>    | Białko filamentów pośrednich   |
| <i>Gsta1</i>   | Glutationowa S-transferaza, alfa 1 (Ya)  |
| <i>Hsf1</i>    | Czynnik szoku cieplnego 1  |
| <i>Jakmip3</i> | Kinaza Janusa i białko oddziałujące na mikrotubule 3                                 |
| <i>Lmna</i>    | Lamina A   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <i>Lmnb1</i>    | Lamina B1  |
| <i>Lmnb2</i>    | Lamina B2  |
| <i>Lsm5</i>     | Homolog LSM5, U6 związany z małym jądrowym RNA ( <i>S. cerevisiae</i> )                      |
| <i>Ltf</i>      | Laktotransferyna   |
| <i>Mbp</i>      | Podstawowe białko mielinowe  |
| <i>Mrpl43</i>   | Mitochondrialne białko rybosomalne L43   |
| <i>Ndufb11</i>  | Dehydrogenaza NADH (ubichinon) 1 subkompleks beta, 11  |
| <i>Panx1</i>    | Panneksyna 1   |
| <i>Pdcd6</i>    | Zaprogramowana śmierć komórki 6  |
| <i>Phf3</i>     | PHD białko palca 3   |
| <i>Polrmt</i>   | Polimeraza (RNA) mitochondrialna (skierowana na DNA)   |
| <i>Pot1a</i>    | Ochrona telomerów 1A   |
| <i>Rap1a</i>    | Białko-1a związane z RAS   |
| <i>Rnf144b</i>  | Białko ring finger144B   |
| <i>S100a8</i>   | S100 białko wiążące wapń A8 (kalgranulina A)   |
| <i>S100a9</i>   | S100 białko wiążące wapń A9 (kalgranulina B)   |
| <i>Scn2b</i>    | Kanał sodowy, bramkowany napięciem, typ II, beta   |
| <i>Sirt1</i>    | Sirtuina 1 (silent mating type information regulation 2, homolog) 1 ( <i>S. cerevisiae</i> ) |
| <i>Sirt3</i>    | Sirtuina 3 (silent mating type information regulation 2, homolog) 3 ( <i>S. cerevisiae</i> ) |
| <i>Sirt6</i>    | Sirtuin 6 (silent mating type information regulation 2, homolog) 6 ( <i>S. cerevisiae</i> )  |
| <i>Smad2</i>    | MAD homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )  |
| <i>Snap23</i>   | Białko związane z synaptosomem 23  |
| <i>Terf1</i>    | Współczynnik wiązania powtarzalnego telomeru 1   |
| <i>Terf2</i>    | Współczynnik wiązania powtarzalnego telomeru 2   |
| <i>Tfam</i>     | Czynnik transkrypcyjny A, mitochondrialny  |
| <i>Tfb1m</i>    | Czynnik transkrypcyjny B1, mitochondrialny   |
| <i>Tfb2m</i>    | Czynnik transkrypcyjny B2, mitochondrialny   |
| <i>Tinf2</i>    | Czynnik jądrowy oddziałujący z Terf1 (TRF1) 2  |
| <i>Tlr2</i>     | Toll-podobny receptor 2  |
| <i>Tlr4</i>     | Toll-podobny receptor 4  |
| <i>Tmem135</i>  | Białko transbłonowe 135  |
| <i>Tmem33</i>   | Białko transbłonowe 33   |
| <i>Tollip</i>   | Białko integracji Toll   |
| <i>Tpp1</i>     | Tripeptydylopeptydaza I  |
| <i>Txnip</i>    | Białko oddziałujące z tioredoksyną   |
| <i>Vps13c</i>   | Białko sortujące wakuoli 13C (drożdżowe)   |
| <i>Vwa5a</i>    | Domena czynnika von Willebranda A zawierająca 5A   |
| <i>Wrn</i>      | Homolog syndromu Wernera (ludzki)  |
| <i>Zbtb10</i>   | Palec cynkowy i domena BTB zawierająca 10  |
| <i>Zfp9</i>     | Białko palca cynkowego 9   |
| <i>Zfr</i>      | Białko wiążące RNA palca cynkowego   |
| <i>Zmpste24</i> | Metalopeptydaza cynkowa, homolog STE24 ( <i>S. cerevisiae</i> )                              |

### 3.16. ELISA

Płytki 96-dółkowe do testu ELISA (MaxiSorp, ThermoFisher) opłaszczano antygenem w stężeniu 5 µg/ml rozpuszczonym w 0,1 M buforze węglanowym o pH 9,6, w objętości 100 µl/dółek i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji płytki płukano trzykrotnie buforem TBS-T (200 µl/dółek). Następnie płytki blokowano w roztworze blokującym w objętości 150 µl/dółek przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Po blokowaniu płytki płukano trzykrotnie w buforze TBS-T (200 µl/dółek). Następnie na płytki nakładano badane surowice krwi lub wydzieliny pochwy w objętości 100 µl/dółek. Surowice analizowano w szeregu rozcieńczeń. W pierwszej kolumnie surowice 100-krotnie rozcieńczone w buforze TBS-T, każda kolejna kolumna rozcieńczona 3-krotnie w stosunku do poprzedniej. Rozcieńczenia wykonano za pomocą robota pipetującego Precision XS. Płytki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C, a następnie płukano trzykrotnie w buforze TBS-T (200 µl/dółek). Następnie płytki inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi (kozy anti-mysz, Tabela 20) rozcieńczonymi buforem 1% BSA w TBS-T w stosunku 1:4000 przez 2 godziny w temperaturze 37°C.

Tabela 20. *Przeciwciała poliklonalne używane w testach ELISA.*

| Przeciwciało                          | Stężenie [mg/ml] | Producent              |
|---------------------------------------|------------------|------------------------|
| kozy anti-mysz IgA łańcuch alfa       | 1,0              | Abcam                  |
| kozy anti-mysz IgE                    | 1,0              | Abcam                  |
| kozy anti-mysz IgM                    | 1,3              | JacksonImmuno Research |
| kozy anti-mysz IgG podklasa 1         | 1,2              | JacksonImmuno Research |
| kozy anti-mysz IgG podklasa 2a        | 1,3              | JacksonImmuno Research |
| kozy anti-mysz IgG podklasa 2b        | 1,3              | JacksonImmuno Research |
| kozy anti-mysz IgG podklasa 2c        | 1,3              | JacksonImmuno Research |
| kozy anti-mysz IgG podklasa 3         | 1,3              | JacksonImmuno Research |
| ośle anti-kozy przeciwciało IgG z HRP | 0,5              | Abcam                  |

Po inkubacji płytki płukano trzykrotnie buforem TBS-T (250 µl/dółek). Kolejno na płytki nakładano 100 µl/dółek przeciwciała trzeciorzędowego, ośle anti-mysz przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową rozcieńczone w buforze 1% BSA w TBS-T w stosunku 1:10000 i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji płytki płukano trzykrotnie buforem TBS-T (300 µl/dółek). W celu wywołania reakcji barwnej do każdej studzienki dodawano 75 µl mieszaniny reakcyjnej i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Zatrzymanie reakcji następowało poprzez dodanie 125 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Wynik testu określano poprzez pomiar absorpcji przy długości fali λ=450 nm czytnikiem płytek



Synergy H4 Hybrid Microplate Reader. Wywołanie i zatrzymanie reakcji wykonywano zgodnie z protokołem opisanym przez Frey'a i współpracowników (216).

Tabela 21. Skład roztworów używanych w metodzie ELISA.

| Odczynnik                    | Skład   |
|------------------------------|---|
| Bufor do opłaszczania        | 0,1 M bufor węglanowy, pH 9,6   |
| Bufor do płukania            | TBS-T: 20 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5  |
| Bufor do rozcieńczania       | TBS: 20 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl  |
| Roztwór blokujący            | 1% BSA w TBS, pH 7,5  |
| Mieszanka reakcyjna          | Roztwór A: 41 mM TMB, 8,2 mM TBABH w DMA<br>Roztwór B: 1,3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 205 mM cytrynian potasu, pH 4,0<br>Przed reakcją mieszano 200 µl roztworu A z 8 ml roztworu B |
| Roztwór zatrzymujący reakcję | 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  |

Do analiz porównawczych wybierano jedno rozcieńczenie z szeregu rozcieńczeń. Na postawie porównania stosunku wartości próbki pozytywnej do kontroli (próbki negatywnej) wybierano stężenie, dla którego iloraz tych wartości był największy.

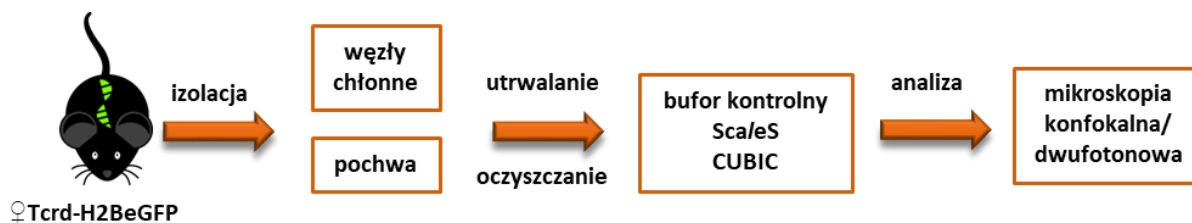
### 3.17. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism v6. Wartości p poniżej 0,05 uznano za świadczące o różnicach istotnych statystycznie. Zgodność rozkładu badanych cech z rozkładem normalnym oceniano testem *W* Shapiro-Wilka. W przypadku porównania dwóch grup zastosowano test nieparametryczny *U* Manna-Whitney'a. Dla porównania większej ilości grup zastosowano test Kruskala-Wallisa, a następnie test Post-Hoc Dunn'a.

## 4. Wyniki

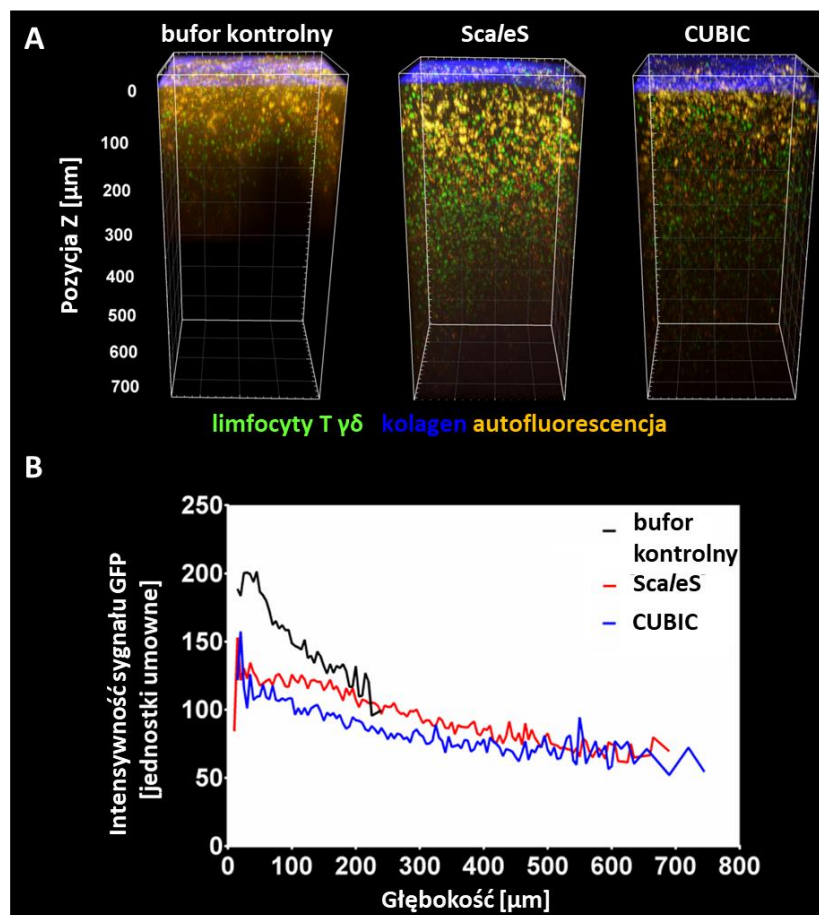
### 4.1. Opracowanie metody wizualizacji limfocytów T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy za pomocą technik mikroskopii konfokalnej i dwufotonowej

#### 4.1.1. Porównanie podstawowych protokołów oczyszczania metodami ScaleS i CUBIC



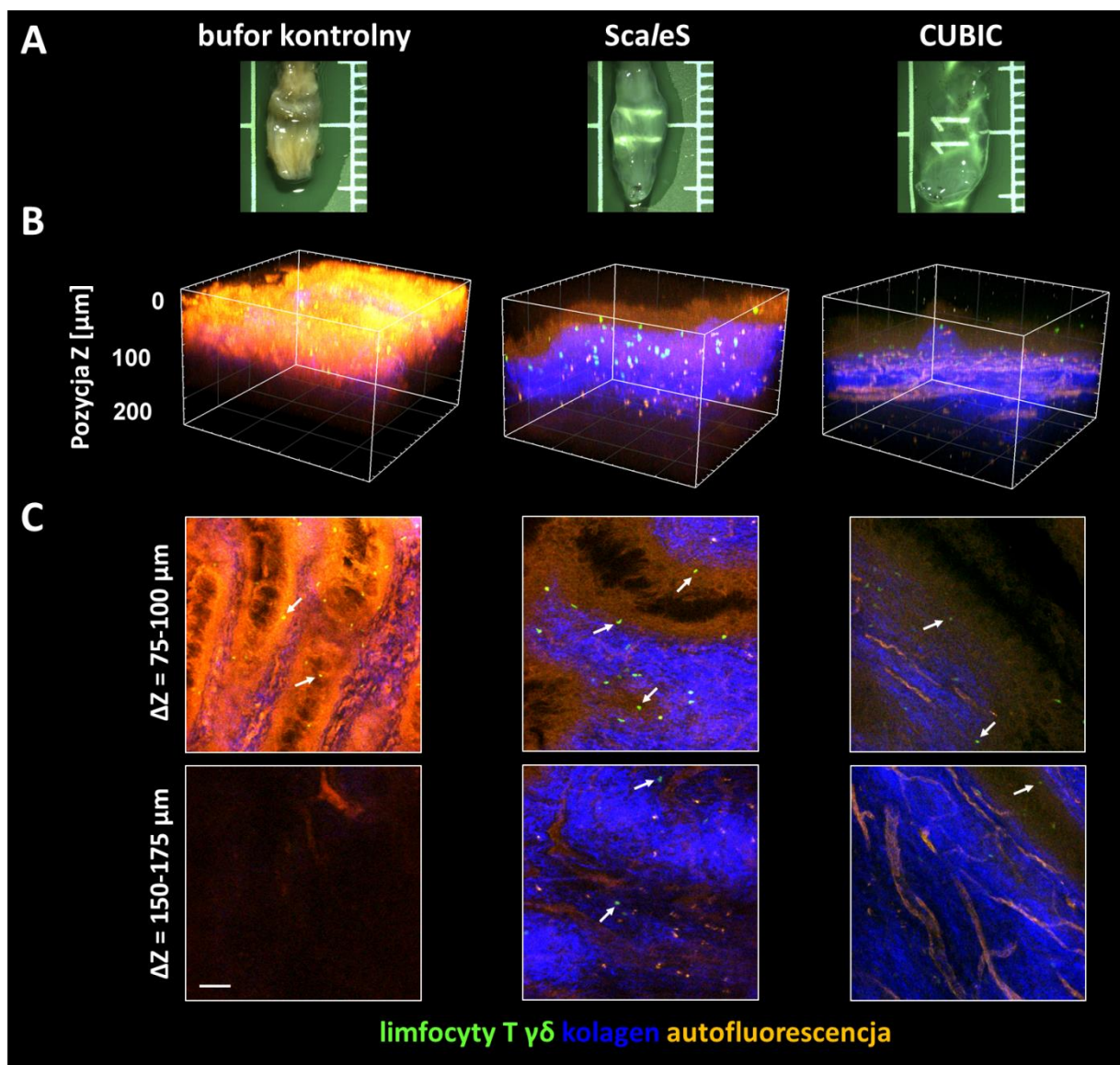
Ryc. 13. Schemat przebiegu eksperymentów porównujących podstawowe protokoły oczyszczania metodami ScaleS i CUBIC.

W celu wstępnego ustalenia warunków oczyszczania optycznego tkanek, najpierw zbadano skuteczność metod ScaleS i CUBIC w oczyszczaniu węzłów chłonnych transgenicznych myszy Tcrd-H2BeGFP, które są szczepem reporterowym dla komórek T  $\gamma\delta$ . Do porównania wykorzystano węzły chłonne utrwalone w formaldehydzie, a następnie inkubowane w buforze zawierającym FBS i detergenty. Do obrazowania próbki kontrolne zamykano w preparacie ProLong Gold. Na rycinie 14A przedstawiono reprezentatywne wizualizacje 3D oczyszczonych węzłów chłonnych pachwinowych oraz analizę intensywności sygnału GFP wzdłuż osi Z (Ryc. 14B). W węzłach kontrolnych sygnał GFP miał znacznie wyższą intensywność niż w węzłach chłonnych oczyszczonych metodą ScaleS lub CUBIC aż do głębokości 200  $\mu\text{m}$ . W próbkach kontrolnych na głębokościach większych niż 200  $\mu\text{m}$  nie wykryto żadnych komórek wytwarzających GFP. Natomiast w próbkach poddanych oczyszczaniu obiema metodami komórki T  $\gamma\delta$  GFP<sup>+</sup> były widoczne do głębokości około 700  $\mu\text{m}$ . Metoda ScaleS pozwoliła zachować sygnał GFP nieco lepiej niż CUBIC, ponieważ intensywność GFP była wyższa wzdłuż osi Z do około 500  $\mu\text{m}$  w porównaniu do metody CUBIC. Jedynie metoda CUBIC pozwoliła na wykrycie sygnału GFP na głębokości większej niż 700  $\mu\text{m}$  (Ryc. 14B).

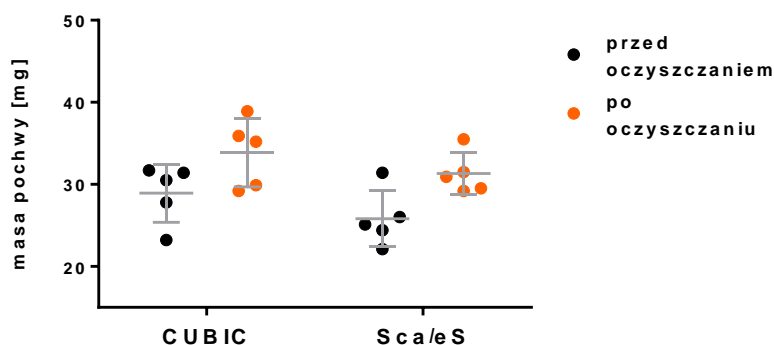


Ryc. 14. **Oczyszczanie węzłów chłonnych za pomocą podstawowych protokołów CUBIC i ScaleS.**  
 (A) Wizualizacja 3D komórek T  $\gamma\delta$  GFP<sup>+</sup> w kontrolnych i oczyszczonych węzłach chłonnych z wykorzystaniem mikroskopii dwufotonowej. (B) Analiza intensywności sygnału GFP w węzłach chłonnych w zależności od głębokości w tkance. Reprezentatywne wyniki dla 3 myszy w grupie.

Po wstępnych eksperymentach potwierdzających działanie metod ScaleS i CUBIC przystąpiono do oczyszczania pochwy. Po zastosowaniu obu metod oczyszczania uzyskano przezroczystą tkankę w porównaniu z tkanką kontrolną. Makroskopowo oczyszczanie metodą CUBIC dało lepszy rezultat niż metodą ScaleS (Ryc. 15A). Aby ustalić, czy oczyszczanie tkanek zmienia strukturę pochwy lub powoduje jej ekspansję, zmierzono masę próbki przed i po oczyszczaniu. Zaobserwowano niewielki wzrost masy tkanek po oczyszczaniu w porównaniu do masy tkanek przed oczyszczaniem, który mógł wynikać z wymiany wody w tkance na roztwory o większej gęstości (172). Wzrost ten jednak nie był istotny statystycznie (Ryc. 16).



Ryc. 15. *Oczyszczanie pochwy za pomocą podstawowych protokołów CUBIC i ScaleS.*  
 (A) Reprezentatywne makrofotografie mysich pochew przed i po oczyszczeniu (myszy w fazie diestrus).  
 (B) Widoki 3D ścian pochwy myszy Tcrd-H2BeGFP. (C) Pojedyncze sekcje optyczne z różnych głębokości ściany pochwy. Strzałki wskazują limfocyty T  $\gamma\delta$ . Skala 50  $\mu\text{m}$ . Dane są reprezentatywne dla co najmniej trzech eksperymentów, dla pięciu myszy w grupie.

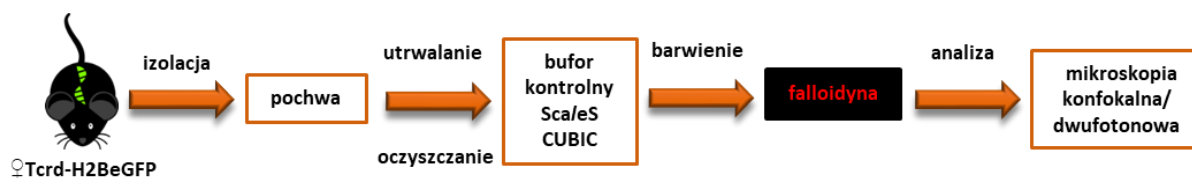


Ryc. 16. Porównanie masy pochwy przed i po oczyszczaniu za pomocą podstawowych protokołów CUBIC i ScaleS.

Wyniki przedstawiono jako średnią z odchyleniem standardowym, 5 myszy na grupę. Czarne kropki przedstawiają masę pochwy przed oczyszczaniem, pomarańczowe kropki przedstawiają masę pochwy po oczyszczaniu. Test U Manna-Whitneya.

Następnie przeanalizowano intensywność sygnału GFP w oczyszczonych i kontrolnych pochwach (Ryc. 15B, 15C). Podobnie jak w węzłach chłonnych, sygnał GFP został zachowany we wszystkich badanych próbkach, a jądra GFP<sup>+</sup> komórek T  $\gamma\delta$  były obecne głównie wśród komórek nabłonkowych powyżej bogatej w kolagen stromy. W próbkach kontrolnych sygnał GFP był widoczny do głębokości 100  $\mu\text{m}$ , podczas gdy w oczyszczonych pochwach można go było wykryć na głębokości około 200  $\mu\text{m}$ . Tak jak poprzednio, intensywność GFP była wyższa w pochwach oczyszczonych metodą ScaleS w porównaniu do tkanki oczyszczanej metodą CUBIC. Niemniej jednak, po zastosowaniu metody CUBIC autofluorescencja tkanek znacznie się zmniejszyła. Obie testowane metody oczyszczania były odpowiednie do analizy komórek GFP<sup>+</sup> w ścianie pochwy i pozwoliły na wykrycie komórek T  $\gamma\delta$  na większych głębokościach niż w przypadku próbek kontrolnych bez oczyszczania.

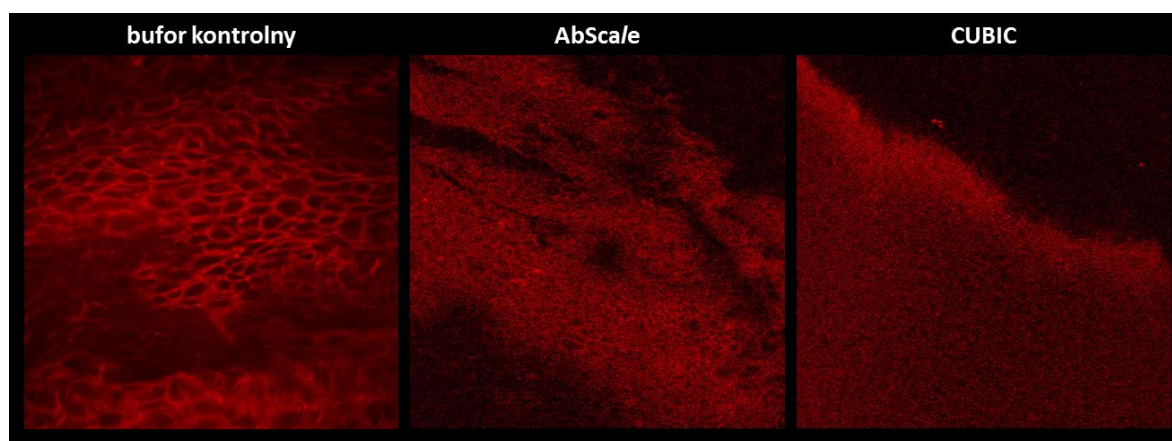
#### 4.1.2. Porównanie kompatybilności metod AbScale i CUBIC z barwieniem cytoszkieletu



Ryc. 17. Schemat przebiegu eksperymentów porównujących kompatybilność metod AbScale i CUBIC z barwieniem cytoszkieletu.

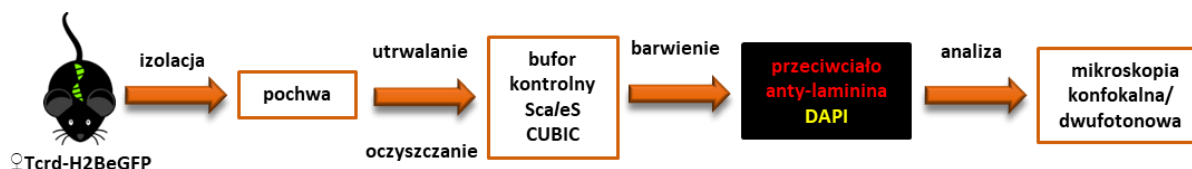
Następnie zbadano, czy wybrane metody są kompatybilne ze znakowaniem fluorescencyjnym. W tym celu zastosowano zmodyfikowane protokoły oczyszczania CUBIC i ScaleS (AbScale),

według autorów obu metod kompatybilne z dodatkowym barwieniem znakowanymi przeciwciałami. Do barwienia cytoszkieletu wykorzystano toksynę grzyba *Amanita phalloides* (falloidynę), która wiąże włókna F-aktyny. W nieoczyszczonych próbkach kontrolnych widoczne były kontury komórek nabłonkowych, co wskazywało na zachowany cytoszkielet (Ryc. 18). W oczyszczonych pochwach barwienie falloidyną wykazało jedynie rozmyty i jednolity sygnał sugerujący rozpad F-aktyny w trakcie procedury oczyszczania.



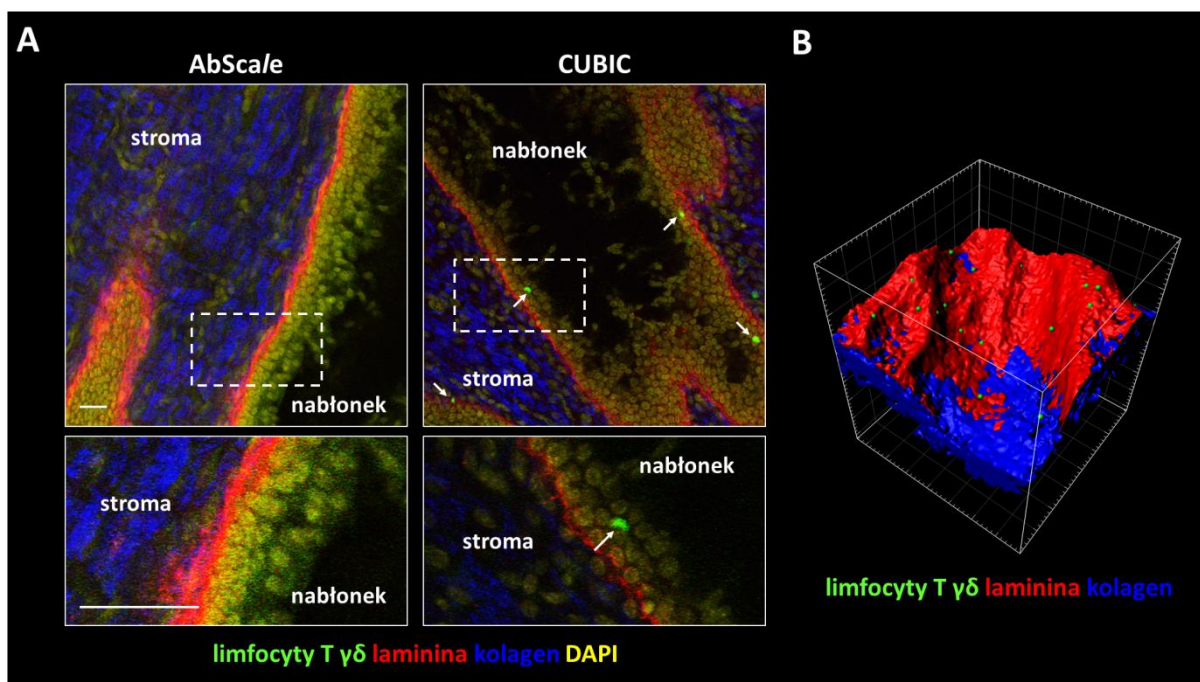
Ryc. 18. Porównanie kompatybilności metod ScaleS i CUBIC z barwieniem cytoszkieletu. Barwienie falloidyną pochwy myszy w buforze kontrolnym oraz po oczyszczaniu metodą CUBIC i AbScale. Reprezentatywne dane dla pięciu myszy na grupę.

#### 4.1.3. Porównanie kompatybilności metod ScaleS i CUBIC z barwieniem błony podstawnej



Ryc. 19. Schemat przebiegu eksperymentów porównujących kompatybilność metod AbScale i CUBIC z barwieniem błony podstawnej.

W celu sprawdzenia kompatybilności metod AbScale i CUBIC z immunofluorescencyjnym barwieniem błony podstawnej między nabłonkiem a podścieliskiem pochwy wykorzystano przeciwciało anty-laminina 5 i odpowiadające mu fluorescencyjnie znakowane przeciwciało drugorzędowe. Do wizualizacji jąder komórkowych zastosowano DAPI.

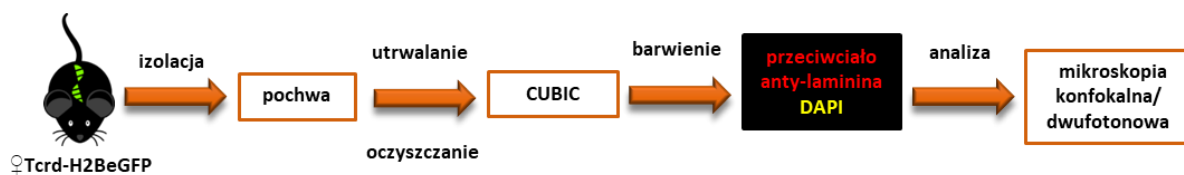


Ryc. 20. Wizualizacja immunofluorescencyjna lamininy w ścianie pochwy.

(A) Optyczne przekroje pochwy myszy w fazie diestrus po oczyszczeniu metodą AbScale i CUBIC (reprezentatywne obrazy dla pięciu myszy w grupie). Strzałki wskazują limfocyty T  $\gamma\delta$  na podstawie sygnału GFP. Prostokąt o przerywanej linii wskazuje powiększony obszar. Skala 50  $\mu\text{m}$ . (B) Widok 3D ściany pochwy po oczyszczeniu CUBIC i znakowaniu immunofluorescencyjnym. Wizualizacja w programie Imaris.

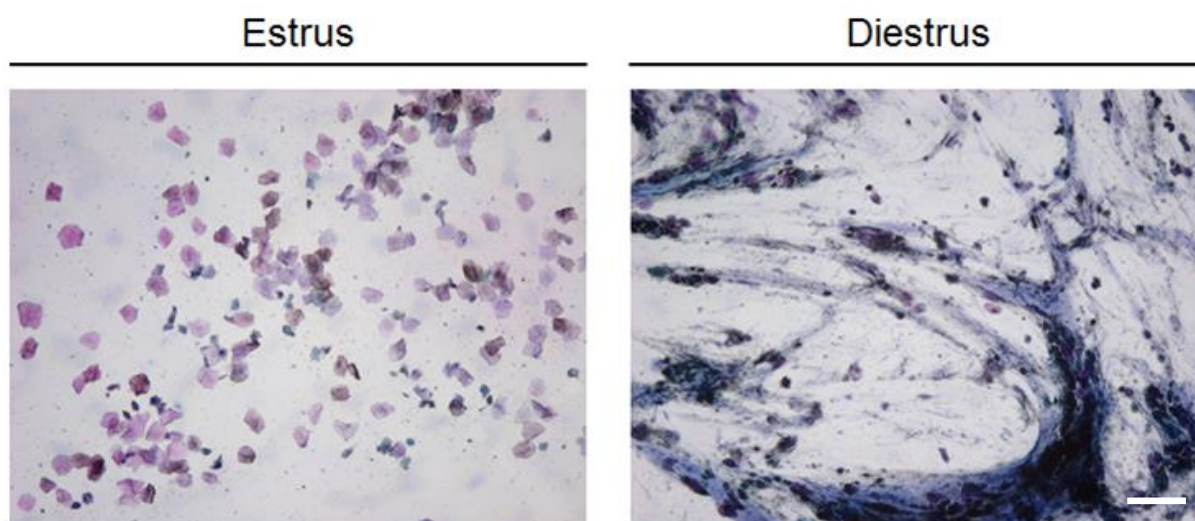
W kontroli, jak i po zastosowaniu obu protokołów oczyszczania zaobserwowano wyraźne zabarwienie błony podstawnej pomiędzy bogatym w kolagen podścieliskiem a gęsto upakowanym jądrami komórkowymi nabłonka pochwy (Ryc. 20). Po zastosowaniu metody AbScale sygnał GFP od limfocytów T  $\gamma\delta$  był niewykrywalny (Ryc. 20A). Jedynie metoda CUBIC była kompatybilna z barwieniem lamininy i jednocześnie zachowała sygnał GFP, co pozwoliło zobrazować rozmieszczenie 3D limfocytów T  $\gamma\delta$  (GFP<sup>+</sup>) w stromie i nabłonku pochwy (Ryc. 20B).

#### 4.1.4. Analiza *in situ* limfocytów T $\gamma\delta$ w zależności od fazy cyklu rujowego



Ryc. 21. Schemat analizy *in situ* limfocytów T  $\gamma\delta$  z wykorzystaniem metody CUBIC.

Po opracowaniu metody wizualizacji błony podstawnej pochwy i komórek T  $\gamma\delta$  przystąpiono do analizy limfocytów T  $\gamma\delta$  w zależności od fazy cyklu rujowego. Zmiany poziomu estradiolu i progesteronu podczas cyklu rujowego mają silny wpływ na ścianę pochwy i jej nabłonek. W celu indukcji dwóch najbardziej zróżnicowanych faz cyklu rujowego (estrus i diestrus) samicom myszy w wieku 5-8 tygodni podawano podskórnie octan medroksyprogesteronu (Depogeston) w celu indukcji fazy diestrus (210) lub benzoesan estradiolu w celu indukcji fazy estrus (211). W fazie estrus w wymazie cytologicznym dominują zrogowaciałe komórki nabłonka. Rozmazy z fazy diestrus zawierają głównie leukocyty i kilka większych komórek nabłonkowych (Ryc. 22).

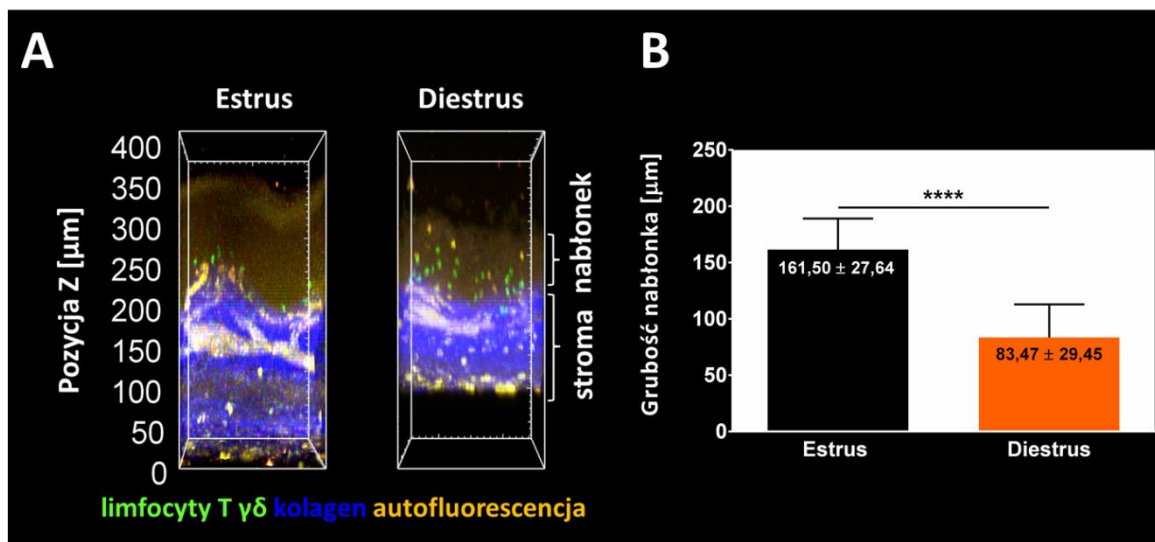


Ryc. 22. Cytologia pochwy po podaniu hormonów.

Rozmazy barwiono zestawem Cytocolor (Merck, Niemcy), zgodnie z instrukcjami producenta. Wymazy z pochwy przygotowano z wymazów zebranych przed lub po trzech płukaniach roztworem PBS. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

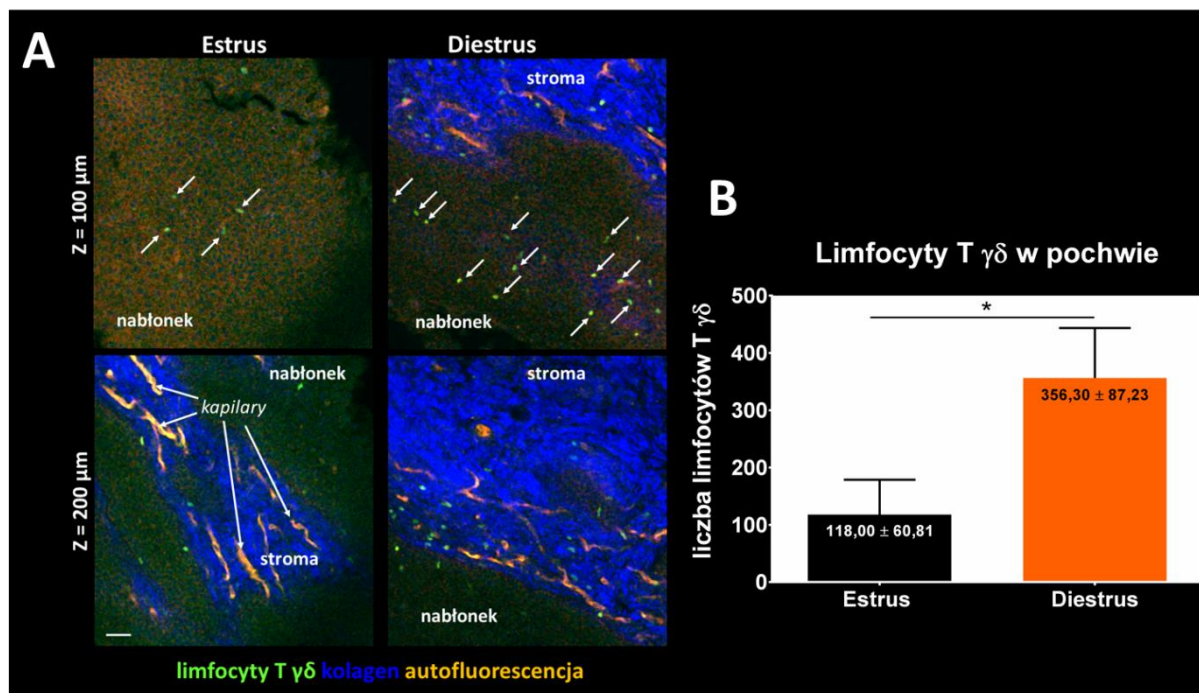


Dodatkowo, aby potwierdzić działanie hormonów, zmierzono grubość nabłonka po ich wstrzyknięciu i stwierdzono, że podczas fazy estrus wywołanej estradiolem, nabłonek miał grubość około  $161,5 \pm 27,64 \mu\text{m}$ . Po podaniu medroksyprogesteronu i wejściu myszy w fazę diestrus nabłonek zmniejszył grubość do  $83,47 \pm 29,45 \mu\text{m}$  (Ryc. 23B).



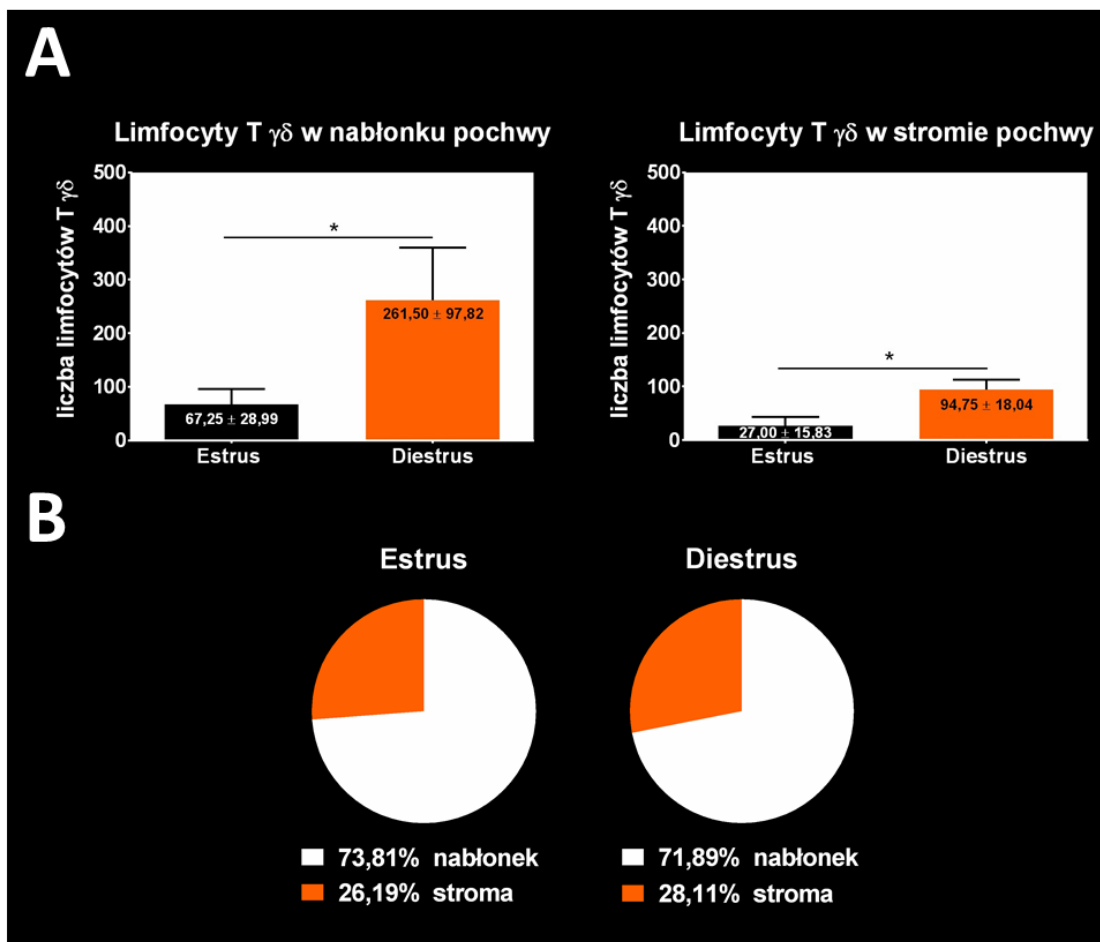
Ryc. 23. Analiza grubości nabłonka pochwy oczyszczonej metodą CUBIC podczas cyklu rujowego. (A) Widok 3D ściany pochwy w dwóch różnych fazach cyklu rujowego. (B) Wykres grubości nabłonka pochwy w fazie estrus i diestrus. Słupki przedstawiają średnią z odchyleniem standardowym, 5 myszy na grupę. \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; test U Manna-Whitneya.

Następnie sprawdzono, czy cykl rujowy wpływa na liczbę komórek T  $\gamma\delta$  obecnych w pochwie. Analiza mikroskopowa, która obejmowała zarówno nabłonek, jak i stromę pochwy wykazała, że podczas fazy diestrus w całej ścianie pochwy następuje prawie trzykrotny wzrost liczby komórek T  $\gamma\delta$  ( $\text{GFP}^+$ ) w porównaniu do fazy estrus (Ryc. 24B).



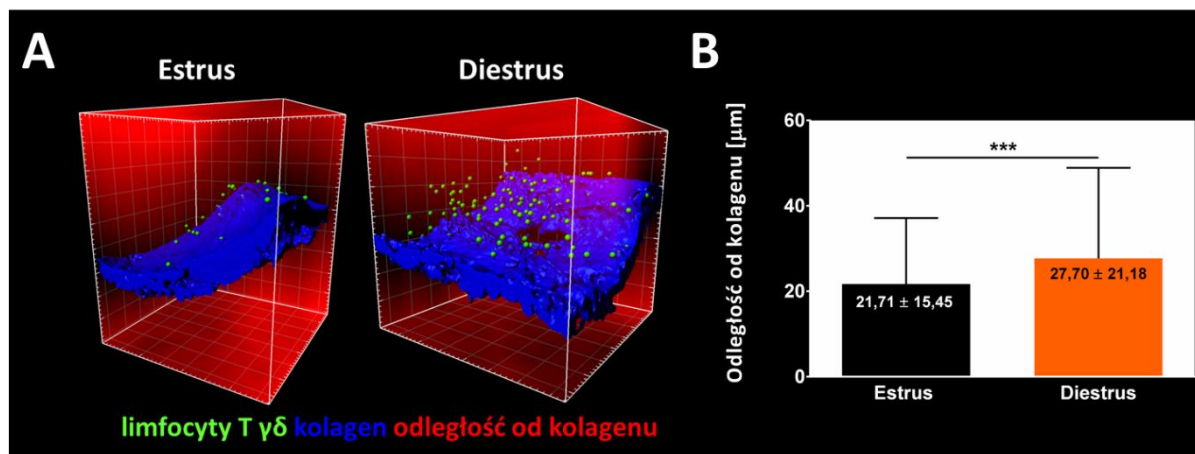
Ryc. 24. Analiza ilościowa limfocytów T  $\gamma\delta$  w pochwie oczyszczonej metodą CUBIC podczas cyklu rujowego. (A) Reprezentatywne obrazy komórek T  $\gamma\delta$  w nabłonku i stromie pochwy. Strzałki wskazują limfocyty T  $\gamma\delta$  na podstawie sygnału GFP. Skala 50  $\mu\text{m}$ . Dane są reprezentatywne dla co najmniej trzech eksperymentów. (B) Analiza liczby limfocytów T  $\gamma\delta$  w pochwie podczas fazy estrus i diestrus. Słupki przedstawiają średnią z odchyleniem standardowym, 5 myszy na grupę. \* $p < 0,05$ ; test U Manna-Whitneya.

W kolejnym etapie, w celu ustalenia precyzyjnej lokalizacji komórek T  $\gamma\delta$ , przeanalizowano ich liczbę oddzielnie w nabłonku i w stromie pochwy. Zaobserwowano wzrost liczby limfocytów T  $\gamma\delta$  zarówno w nabłonku, jak i w stromie pochwy w fazie diestrus (Ryc. 25A). Natomiast stosunek liczby komórek T  $\gamma\delta$  zlokalizowanych w nabłonku do komórek zlokalizowanych w stromie pochwy pozostał stały, około 3:1, niezależnie od fazy cyklu (Ryc. 25B).



Ryc. 25. Analiza ilościowa limfocytów T  $\gamma\delta$  w nabłonku i stromie pochwy podczas cyklu rujowego. (A) Liczba limfocytów T  $\gamma\delta$  w nabłonku i stromie pochwy w fazie estrus i diestrus. Słupki przedstawiają średnią z odchyleniem standardowym, 5 myszy na grupę. \* $p < 0,05$ ; test U Manna-Whitneya. (B) Wykresy kołowe przedstawiają rozkład procentowy limfocytów T  $\gamma\delta$  w nabłonku i stromie pochwy w fazie estrus i diestrus.

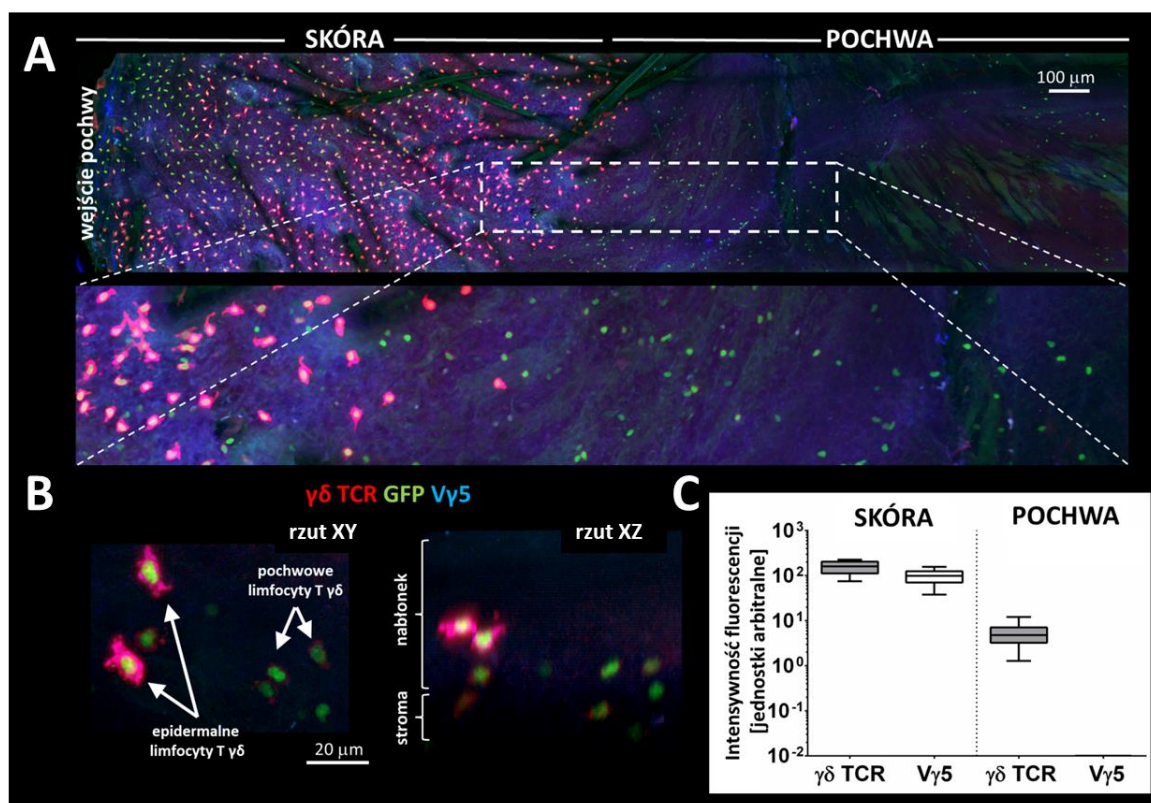
Następnie, wykorzystując funkcję *Distance Transformation* w programie Imaris, w oparciu o powierzchnię warstwy kolagenu, zbadano dokładną lokalizację limfocytów T  $\gamma\delta$  w zależności od fazy cyklu rujowego. Wykazano, że w fazie diestrus komórki T  $\gamma\delta$  znajdują się w większej odległości od kolagenu ( $27,70 \pm 21,18$ ) niż w fazie estrus ( $21,71 \pm 15,45$ ) (Ryc. 26B).



Ryc. 26. Analiza lokalizacji limfocytów T  $\gamma\delta$  w pochwie oczyszczonej metodą CUBIC podczas cyklu rujowego. (A) Wizualizacja 3D objętości ściany pochwy. Czerwony kanał pokazuje transformację odległości na podstawie powierzchni kolagenu. Zielone kropki reprezentują komórki T  $\gamma\delta$ . Dane są reprezentatywne dla co najmniej trzech eksperymentów. (B) Ocena odległości nabłonkowych komórek T  $\gamma\delta$  od kolagenu. Słupki przedstawiają średnią z odchyleniem standardowym, 4 myszy na grupę. \*\*\* $p < 0,001$ ; test U Manna-Whitneya.

#### 4.1.5. Analiza poziomu ekspresji $\gamma\delta$ TCR i łańcucha V $\gamma$ 5

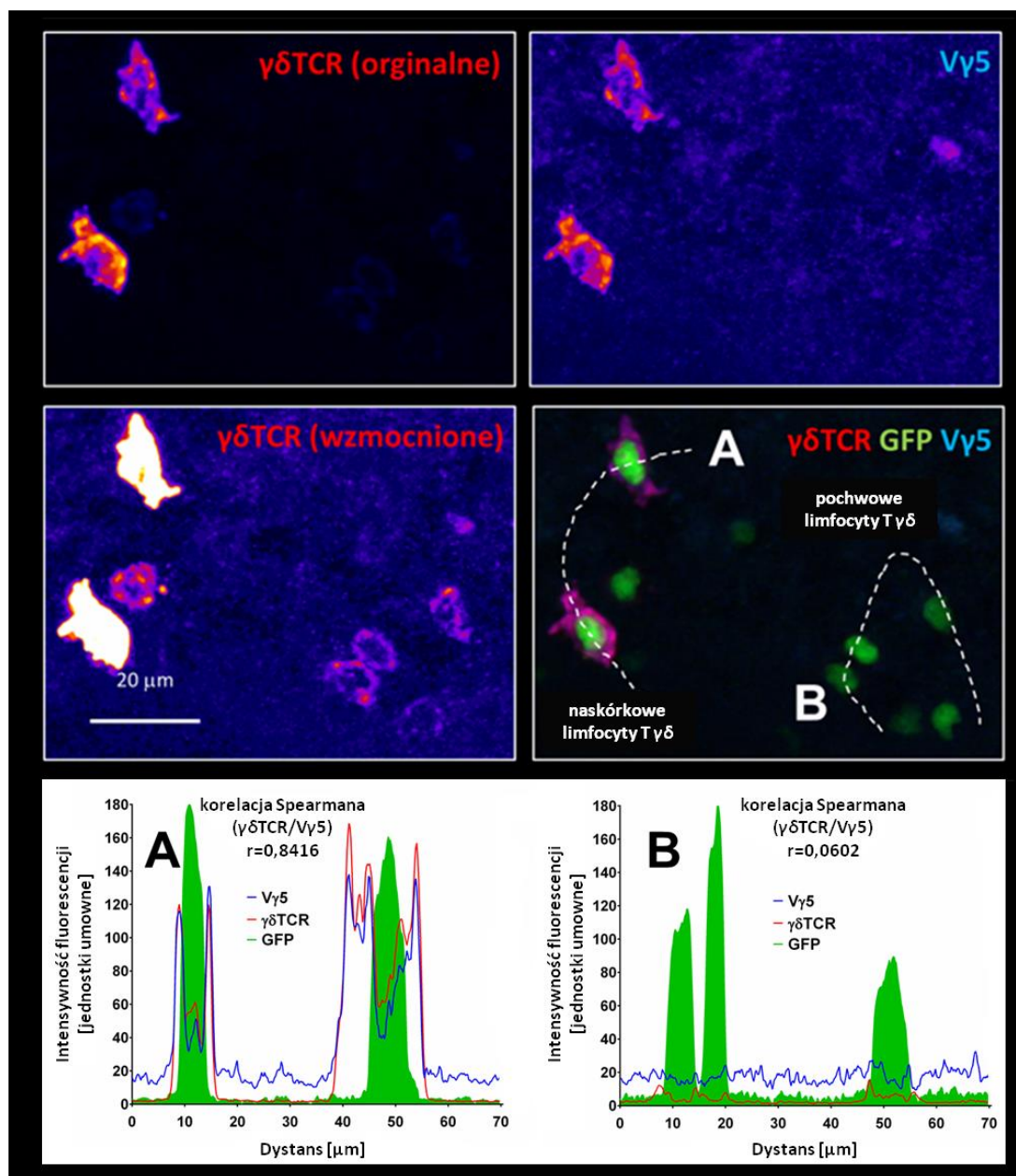
Anatomicznie skóra dość płynnie przechodzi w nabłonek pochwy, dlatego kolejnym etapem analizy była odpowiedź na pytanie czy komórki GFP<sup>+</sup> widoczne w ścianie pochwy są komórkami T  $\gamma\delta$  rezydującymi w pochwie (V $\gamma$ 6) czy raczej dendrytycznymi komórkami T naskórka (V $\gamma$ 5, DETCs). Przeciwciało anti-V $\gamma$ 6, rozpoznające łańcuch TCR obecny w komórkach T  $\gamma\delta$  pochwy, nie jest komercyjnie dostępne, dlatego postanowiono przeprowadzić podwójne barwienie receptora  $\gamma\delta$  TCR i łańcucha V $\gamma$ 5 do rozróżnienia populacji komórek T  $\gamma\delta$ . Obrazowanie limfocytów T wzdłuż pochwy od jej wejścia w kierunku szyjki macicy pozwoliło wyodrębnić dwie populacje  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> o wysokim i niskim poziomie ekspresji TCR (Ryc. 27).



Ryc. 27. Wizualizacja limfocytów  $T \gamma\delta$  skóry i pochwy od wejścia pochwy w kierunku szyjki macicy. (A) Mozaika złożona z obrazów nieoczyszczonej optycznie pochwy znakowanej immunofluorescencyjnie przeciwciałami anty-pan- $\gamma\delta$  TCR i anty- $V\gamma 5$ . Prostokąt o przerywanej linii wskazuje powiększony obszar (B) Komórki  $T \gamma\delta$  w strefie przejściowej skóry i nabłonka pochwy. Zdjęcie pokazuje epidermalne (naskórkowe) komórki  $V\gamma 5^+ \gamma\delta$  TCR<sup>wysoki</sup> i pochwowe komórki  $V\gamma 5^- \gamma\delta$  TCR<sup>niski</sup>. Sygnał  $\gamma\delta$  TCR wzmocniono korekcją Gamma, aby poprawić na zdjęciu widoczność sygnału  $\gamma\delta$  TCR w komórkach T pochwy. Połączenie sygnału łańcucha  $V\gamma 5$  i sygnału  $\gamma\delta$  TCR daje odcień fioletu. Komórki  $V\gamma 5^-$  mają tylko czerwony sygnał błonowy. Dane są reprezentatywne dla co najmniej trzech eksperymentów. (C) Analiza poziomu ekspresji  $\gamma\delta$  TCR i  $V\gamma 5$  w komórkach  $T \gamma\delta$  naskórka i pochwy w obrazach bez korekcji. Dane zebrano z  $n=10$  komórek/mysz u trzech myszy, pokazanych jako ramka z medianą i zakresem międzykwartylowym za pomocą wąsów Tukeya.

Analiza poziomu TCR w błonach komórkowych wykazała 50-krotną różnicę między tymi dwiema populacjami. Populacja  $\gamma\delta$  TCR<sup>wysoki</sup> była obecna tylko przy wejściu do pochwy, gdzie nadal można było zobaczyć mieszki włosowe. Komórki  $\gamma\delta$  TCR<sup>niski</sup> znaleziono tylko w obszarach pozbawionych mieszków włosowych, oddalonych od wejścia do pochwy o ok. 1-1,5 mm w stronę szyjki macicy (Ryc. 27). Współbarwienie przeciwciałem anty- $V\gamma 5$  ujawniło, że populacja  $\gamma\delta$  TCR<sup>wysoki</sup> była naskórkowymi komórkami  $T \gamma\delta$  z uwagi na jednoczesny, wysoki poziom sygnału łańcucha  $V\gamma 5$ . Komórki  $\gamma\delta$  TCR<sup>niski</sup> natomiast nie barwiły się przeciwciałem anty- $V\gamma 5$  (Ryc. 28), co sugerowało, że były to komórki  $T \gamma\delta$  pochwy  $V\gamma 6^+$  lub inne obwodowe komórki  $T \gamma\delta$ , które mogły przeniknąć do układu rozrodczego. W przypadku populacji komórek o niskim poziomie  $\gamma\delta$  TCR intensywność sygnału łańcucha  $V\gamma 5$  była na poziomie szumu tła. Potwierdziła to analiza korelacji Spearmana, za pomocą której zbadano zgodność sygnału przeciwciał anty- $\gamma\delta$  TCR i anty- $V\gamma 5$ , wiążących dwa antygeny

obecne w tym samym kompleksie białkowym (Ryc. 28, panel dolny). Dla komórek  $\gamma\delta$  TCR<sup>niski</sup> wykazano niskie wartości współczynnika korelacji  $r$  – brak współwystępowania obu antygenów, podczas gdy dla komórek  $\gamma\delta$  TCR<sup>wysoki</sup> współczynnik  $r$  był powyżej 0,8; co wskazywało na wysoką korelację i współwystępowanie obu antygenów.

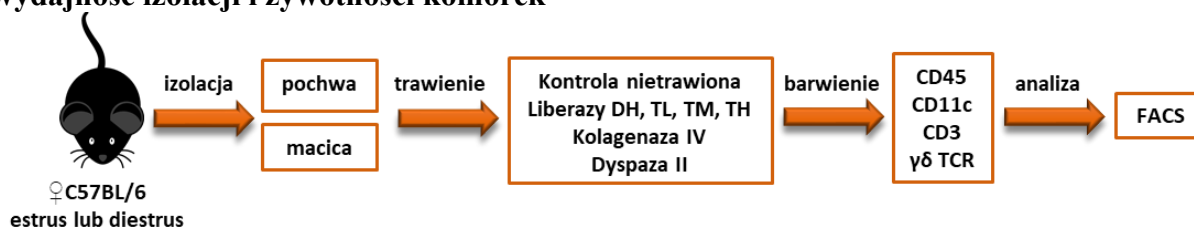


Ryc. 28. Analiza poziomu ekspresji  $\gamma\delta$  TCR i łańcucha  $V\gamma 5$  w limfocytach  $T \gamma\delta$  naskórkowych i pochwowych.

Obraz strefy przejściowej skóry i nabłonka pochwy zawierającej naskórkowe komórki  $T V\gamma 5^+ \gamma\delta$  TCR<sup>wysoki</sup> i pochwove komórki  $T V\gamma 5^- \gamma\delta$  TCR<sup>niski</sup>. Oryginalny i wzmocniony sygnał  $\gamma\delta$  TCR przedstawiono w celu zwiększenia widoczności  $\gamma\delta$  TCR w limfocytach  $T$  pochwy. Wykresy przedstawiają profile intensywności fluorescencji wzdłuż linii przerywanych narysowanych na scalonym obrazie: A – naskórkowe limfocyty  $T \gamma\delta$ , B – pochwove limfocyty  $T \gamma\delta$ . Linie  $\gamma\delta$  TCR i  $V\gamma 5$  pokazują oryginalny sygnał bez odejmowania tła. Sygnał GFP został znormalizowany w oparciu o najwyższą intensywność określaną jako 100%. Analizę korelacji Spearmana przeprowadzono dla linii  $\gamma\delta$  TCR i  $V\gamma 5$  w celu potwierdzenia współobecności antygenów i wykazania różnorodności populacji.

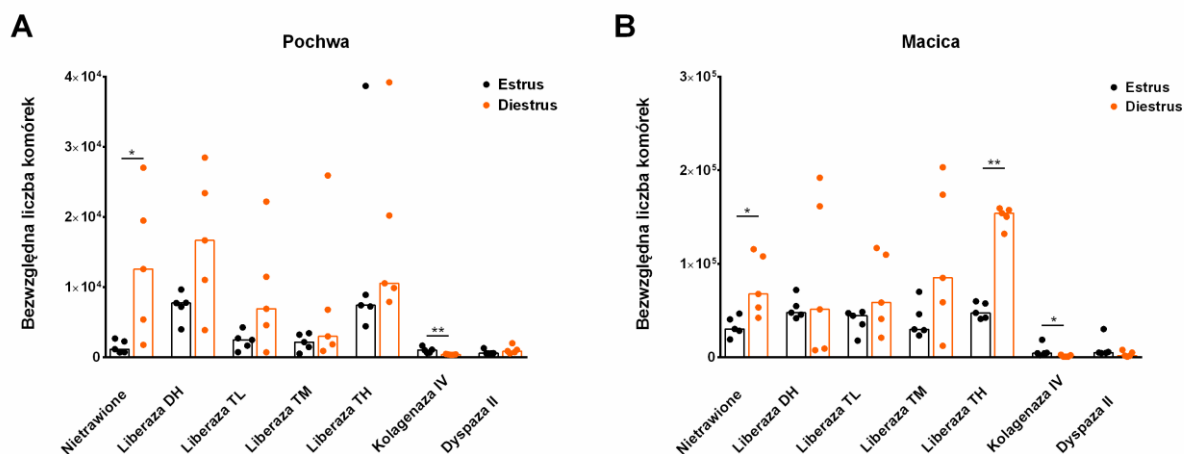
## 4.2. Ustalenie fizjologicznej dynamiki populacji limfocytów T $\gamma\delta$ w zależności od fazy cyklu (faza estrus i diestrus)

### 4.2.1. Optymalizacja metody trawienia enzymatycznego układu rozrodczego – wpływ na wydajność izolacji i żywotności komórek



Ryc. 29. Schemat przebiegu optymalizacji metody trawienia enzymatycznego układu rozrodczego.

W celu pełniejszej charakterystyki limfocytów T  $\gamma\delta$  i ich mikrośrodowiska podjęto próbę przeprowadzenia analiz za pomocą cytometrii przepływowej, która w odróżnieniu od mikroskopii pozwala na wysoce ilościową i wieloparametryczną ocenę komórek rezydujących w tkankach. Aby scharakteryzować komórki układu odpornościowego pochwy i macicy tą techniką, najpierw przeprowadzono optymalizację protokołu trawienia enzymatycznego, biorąc pod uwagę fazę cyklu rujowego. Hormony płciowe wpływają na grubość i liczbę warstw komórek nabłonkowych, co może zmieniać wydajność trawienia tkanek układu rozrodczego w różnych fazach cyklu. Pobrane pochwy i macice od myszy w fazie estrus i diestrus najpierw rozdrabniano mechanicznie nożyczkami, a następnie inkubowano z testowanymi enzymami lub bez nich, a na koniec przecierano przez sitko komórkowe o średnicy porów 40  $\mu\text{m}$  w celu usunięcia agregatów komórkowo-tkankowych. Zawiesiny komórek z nietrawionych i traktowanych enzymami tkanek zostały następnie porównane, analizując bezwzględną liczbę komórek uzyskanych z pojedynczej tkanki. Liczbę komórek w każdej próbce określono za pomocą kulek do określania bezwzględnej liczby obiektów CountBright™ Absolute Counting Beads.

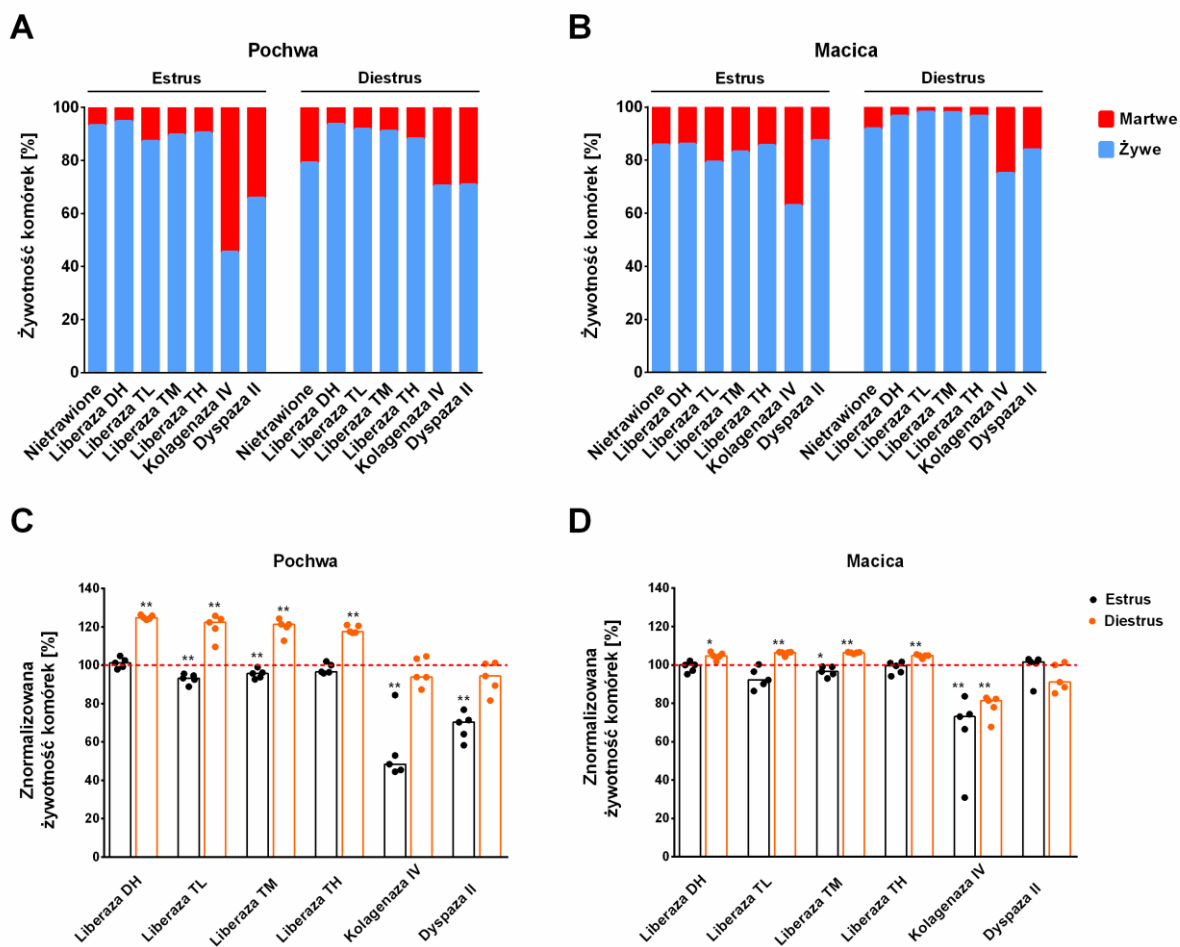


**Ryc. 30. Wydajność uwalniania żywych komórek przy użyciu różnych protokołów izolacji.** Wykres pokazuje bezwzględną liczbę komórek po trawieniu pochwy (A) i macicy (B). Każdy słupek reprezentuje medianę od 5 myszy w fazie estrus (czarne kropki) lub w fazie diestrus (pomarańczowe kropki). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya.

Jak pokazano na Ryc. 30, faza cyklu rujowego znacznie wpłynęła na liczbę izolowanych komórek. Z wyjątkiem kolagenazy IV i dyspazy II otrzymano więcej komórek w fazie diestrus niż w fazie estrus. Ponadto, trawienie macicy doprowadziło do uwolnienia większej liczby komórek w porównaniu z tkanką pochwy. Nieoczekiwanie sama obróbka mechaniczna bez zastosowania enzymów pozwoliła otrzymać więcej komórek niż trawienie kolagenazą IV i dyspazą II.

Trawienie tkanek może znacząco wpłynąć na żywotność komórek, dlatego porównano ilości żywych komórek, które uzyskano przy zastosowaniu różnych enzymów do trawienia. Za pomocą barwienia znacznikiem Fixable Viability Dye eFluor™ 780 utworzono bramkę żywotności, aby wykluczyć martwe – eFluor 780-pozytywne – komórki. Ryc. 31 pokazuje, że metoda przetwarzania tkanek silnie wpłynęła na odsetek żywych komórek, który wahał się od 52% do 95% w pochwie i od 56% do 98% w macicy.





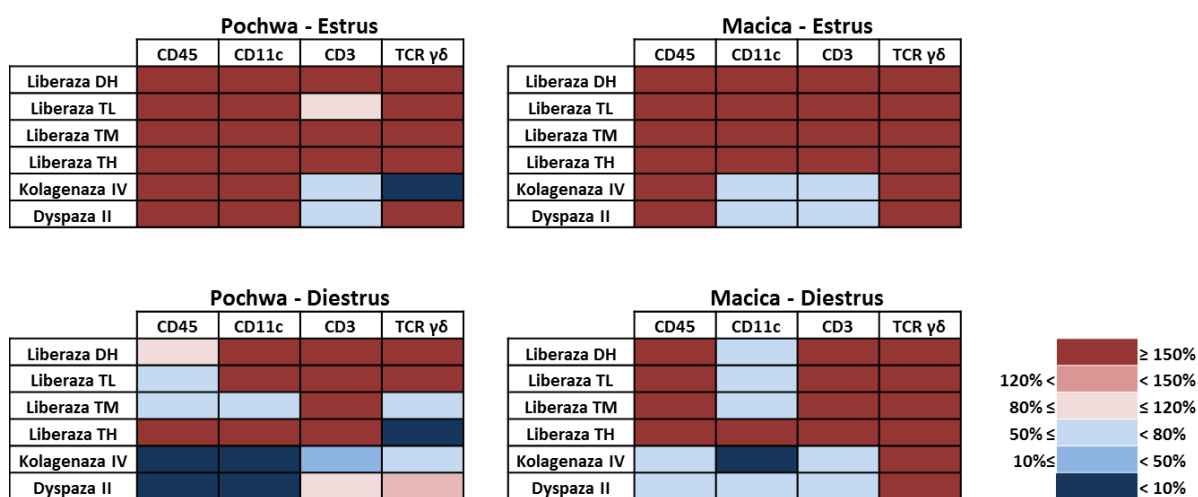
Ryc. 31. Wpływ protokołu izolacji i fazy cyklu na żywotność komórek.

Wykresy pokazują żywotność komórek w (A) pochwie i (B) macicy w oparciu o liczbę żywych pojedynczych komórek (bramka „żywe komórki”) w odniesieniu do liczby obiektów w bramce „komórki”. Każdy słupek przedstawia medianę z grupy 5 myszy. (C, D) Żywotność komórek znormalizowano do mechanicznie rozdrobnionych, nietrawionych próbek. Słupki przedstawiają medianę znormalizowanej liczby żywych pojedynczych komórek w pochwy i macicy w fazie estrus (czarne kropki) lub w fazie diestrus (pomarańczowe kropki). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya (porównania z odpowiednią nietrawioną próbką).

Komórki uzyskane z tkanek poddanych jedynie mechanicznemu rozdrobnieniu charakteryzowały się wysoką żywotnością (Ryc. 31, panele A i B). Aby lepiej zwizualizować wpływ enzymów na status izolowanych komórek, wyniki znormalizowano względem homogenizacji mechanicznej bez trawienia enzymami (Ryc. 31, panele C i D). Traktowanie pojedynczymi enzymami, kolagenazą IV i dyspazą II, znacznie zmniejszyło żywotność komórek, co było szczególnie widoczne w fazie estrus. Co ciekawe, trawienie pochwy i macicy za pomocą liberaz znacznie lepiej zachowywało żywotność izolowanych komórek niż mechaniczne rozdrabnianie tkanek. Efekt ten był widoczny jedynie w fazie diestrus.

#### 4.2.2. Wpływ trawienia enzymatycznego na skład komórkowy układu rozrodczego

Po obróbce enzymatycznej komórki barwiono na obecność markerów komórek odpornościowych, najliczniej występujących w układzie rozrodczym, takich jak: CD45 (leukocyty), CD3 $\epsilon$  (limfocyty T), CD11c (komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty),  $\gamma\delta$  TCR (komórki T  $\gamma\delta$ ). Na drodze analizy cytometrycznej liczbę izolowanych komórek z określonej populacji po traktowaniu enzymem porównano z odpowiadającą liczbą komórek z nietrawionych enzymatycznie tkanek, którą arbitralnie ustawiono na 100%. Mapa cieplna (Ryc. 32) pokazuje, że liberazy poprawiły dostępność antygenów na komórkach dla swoistych wobec nich przeciwciał, z pewnymi wyjątkami w fazie diestrus. Traktowanie kolagenazą IV i dyspazą II znacznie zmniejszyło liczbę wykrywanych leukocytów CD45<sup>+</sup> i ich subpopulacji, szczególnie w fazie diestrus a także w estrus – w przypadku markerów CD3 $\epsilon$  i  $\gamma\delta$  TCR.

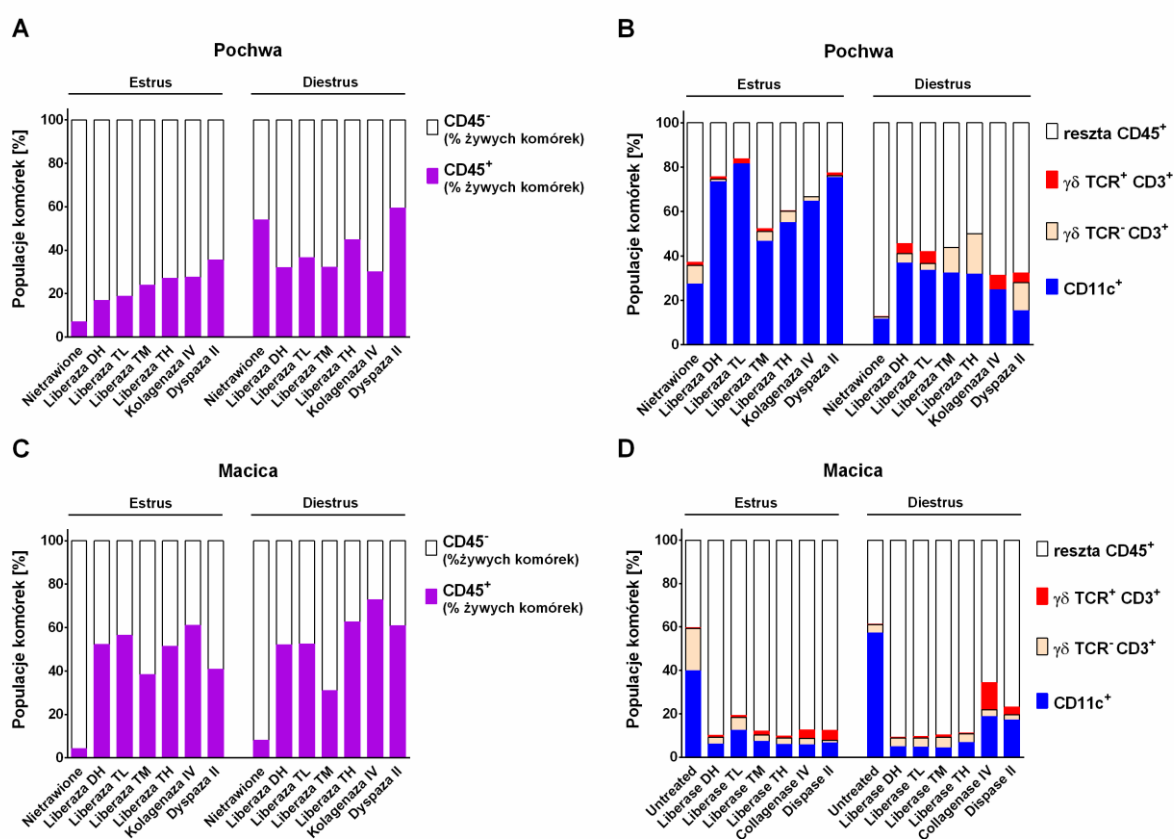


Ryc. 32. Wpływ enzymatycznego trawienia tkanek na liczbę uwolnionych żywych komórek odpornościowych z układu rozrodczego.

Pochwy i macice zostały trawione przy użyciu różnych protokołów. Izolowane komórki wybarwiono przeciwciałami swoistymi dla wybranych markerów powierzchniowych i analizowano za pomocą FACS. Liczbę komórek pozytywnych na wybrane antygeny po trawieniu enzymatycznym porównano z liczbą komórek uzyskanych z mechanicznie homogenizowanej pochwy lub macicy, której arbitralnie przypisano wartość 100%. Każdy blok na mapie jest średnią wartością z grupy 5 myszy. Czerwony odcień wskazuje na podwyższoną liczbę komórek z danym markerem powierzchniowym po trawieniu enzymatycznym, niebieski oznacza obniżoną liczbę komórek.

Następnie analizowano proporcję izolowanych leukocytów z wybranym markerem względem żywych komórek lub różnych subpopulacji leukocytów w bramce CD45<sup>+</sup>. Odsetek komórek CD45<sup>+</sup> był niższy w pochwie niż w macicy i zależał od fazy cyklu rujowego (Ryc. 33A i 33C). W pochwie odsetek ten zwiększył się w diestrusie, natomiast w macicy nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w odsetku leukocytów CD45<sup>+</sup> pomiędzy fazą estrus i diestrus. Analizując wybrane subpopulacje leukocytów wykazano, że komórki CD11c<sup>+</sup>

zdominowały populację komórek CD45<sup>+</sup> w pochwie podczas fazy estrus, a mniejszym stopniu w fazie diestrus (Ryc. 33B). Stwierdzono również, że w pochwie, w fazie diestrus nastąpił wyraźny wzrost odsetka limfocytów T  $\gamma\delta$  i innych komórek CD3<sup>+</sup>, niezależnie od rodzaju stosowanego enzymu (przynajmniej w przypadku markera CD3<sup>+</sup>). Nieoczekiwanie, po trawieniu Liberazą TM i TH w diestrusie i Liberazą TH i kolagenazą IV w estrusie, populacja limfocytów T  $\gamma\delta$  pochwy w ogóle nie była widoczna. W mechanicznie homogenizowanych macicach zaobserwowano dużą ilość komórek CD11c<sup>+</sup>, która zmniejszyła się po obróbce enzymatycznej, pozostawiając komórki CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> jako dominującą populację, niezależnie od fazy cyklu (Ryc. 33D).



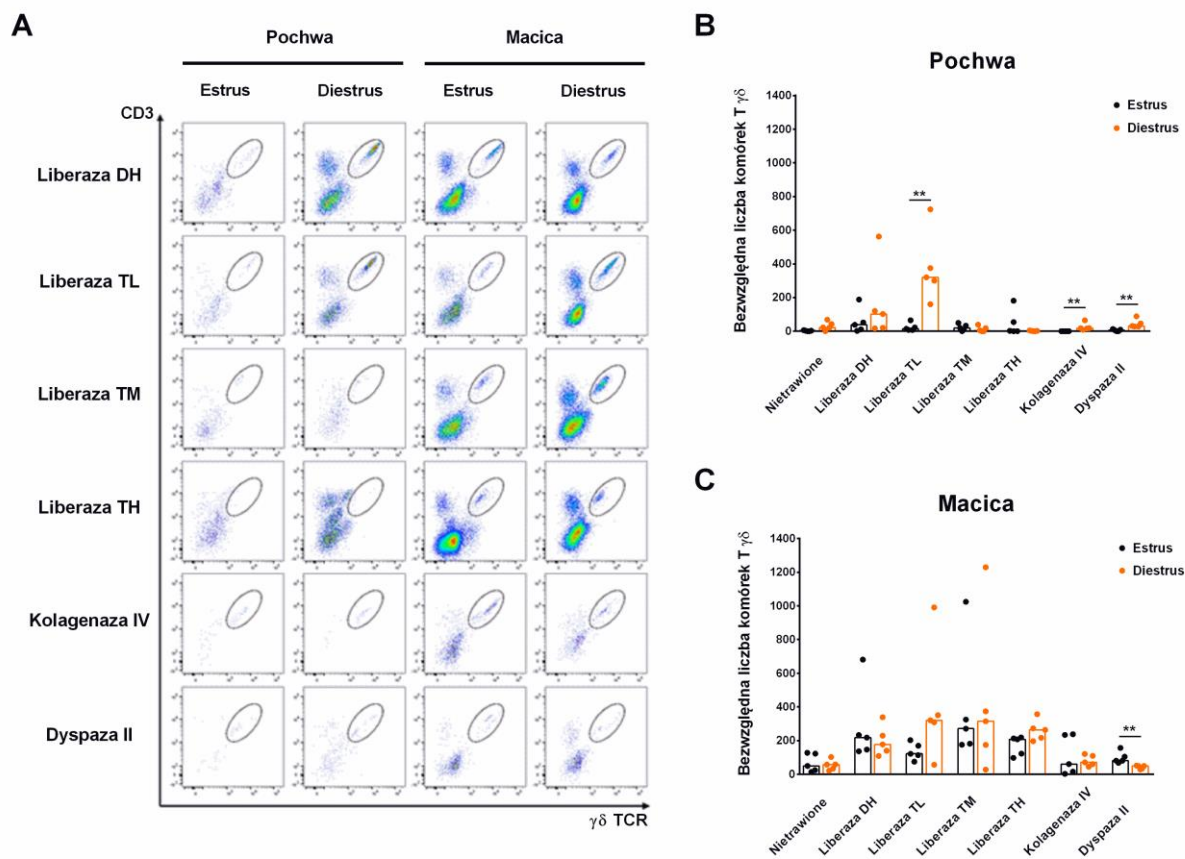
Ryc. 33. Skład komórkowy po trawieniu enzymatycznym pochwy i macicy.

Wykresy słupkowe (A) i (C) pokazują odpowiednio procent komórek CD45<sup>+</sup> z pochwy i macicy w bramce „żywe komórki”. Wykresy słupkowe (B) i (D) pokazują procent komórek CD11c<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> i  $\gamma\delta$  TCR<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> w bramce „CD45<sup>+</sup>”. Pokazano mediany z grupy 5 myszy dla każdego warunku trawienia.

#### 4.2.3. Wpływ trawienia enzymatycznego na analizę komórek T $\gamma\delta$ pochwy podczas cyklu rujowego

Zgodnie z ryciną 34 stwierdzono, że liczba wykrytych komórek T  $\gamma\delta$  w pochwie i macicy zmieniała się w zależności od zastosowanego enzymu do trawienia, jak i fazy cyklu rujowego. Wszystkie wykorzystane liberazy uwalniały te komórki z tkanki macicy znacznie lepiej niż

kolagenaza IV i dyspaza II, podczas gdy w pochwie tylko Liberaza TL była porównywalnie wydajna, jednak jedynie w fazie diestrus. Liczba limfocytów T  $\gamma\delta$  w pochwie wzrosła w fazie diestrus, co wykazała analiza statystyczna w przypadku Liberazy TL, kolagenazy IV i dyspazy II.

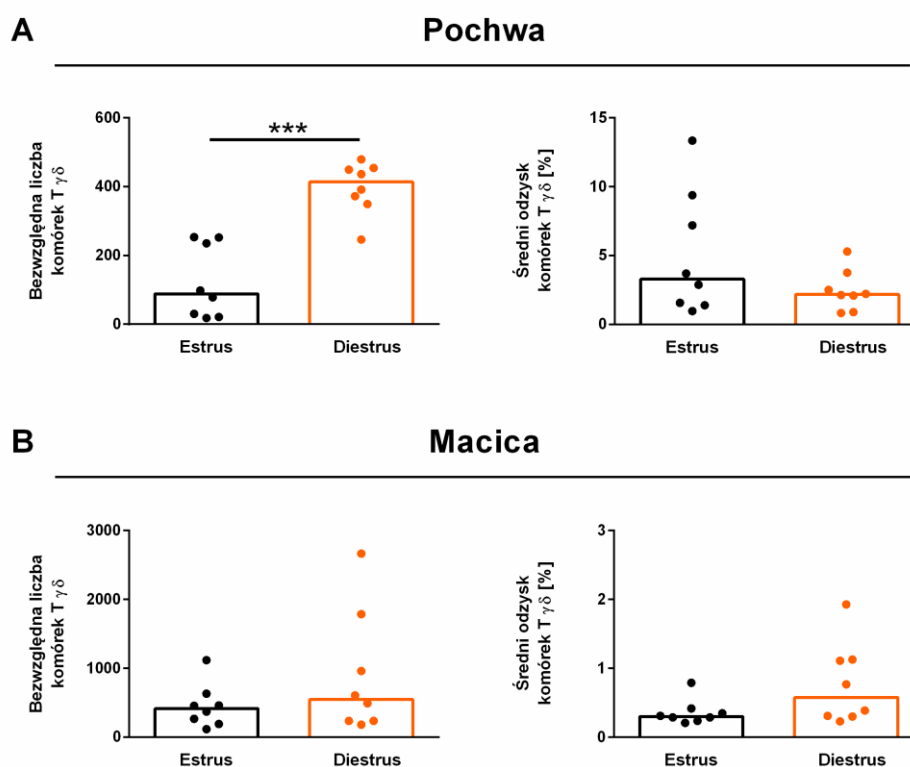


Ryc. 34. Zmiany liczbowe w populacji komórek T  $\gamma\delta$  w pochwie i macicy podczas cyklu rujowego po trawieniu enzymatycznym izolowanych tkanek.

(A) Reprezentatywne wykresy cytometryczne (dot plots) dla wszystkich badanych enzymów pokazujące populację komórek T  $\gamma\delta$ . Wykresy (B) i (C) pokazują bezwzględną liczbę komórek T  $\gamma\delta$  odpowiednio w pochwie i macicy.

Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Słupki przedstawiają medianę od myszy w fazie estrus (czarne kropki) lub w fazie diestrus (pomarańczowe kropki). \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya.

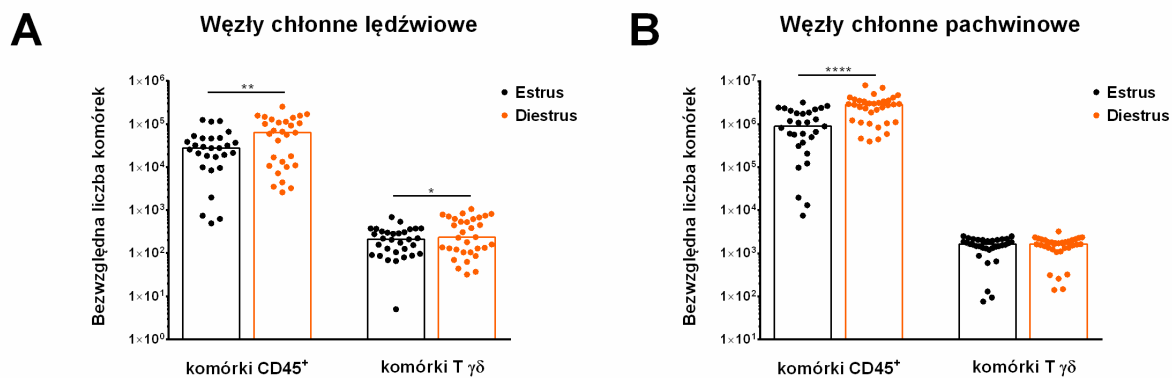
Liberaza TL okazała się najbardziej wydajną mieszanką enzymów do trawienia układu rozrodczego. Uzyskano 88 komórek T  $\gamma\delta$  (wartość mediany z zakresem percentylowym 25-75: 23-248) z jednej pochwy w fazie estrus i 414 komórek T  $\gamma\delta$  (wartość mediany z zakresem percentylowym 25-75: 355-453) w fazie diestrus (Ryc. 35A). W macicy po trawieniu Liberazą TL zaobserwowano podobny trend zmiany liczby komórek T  $\gamma\delta$ , ale różnica między fazami cyklu nie była istotna statystycznie (Ryc. 35B). Odzysk komórek T  $\gamma\delta$  był w zakresie od 0,3% do 4% wszystkich izolowanych żywych komórek.



*Ryc. 35. Porównanie populacji komórek  $T\gamma\delta$  w pochwie i macicy podczas cyklu rujowego po trawieniu Liberazą TL.*

*Słupki przedstawiają medianę bezwzględnej liczby komórek  $T\gamma\delta$  lub średniego odzysku komórek  $T\gamma\delta$  (procent komórek w bramce „żywe komórki”) w pochwie i macicy. Każdy punkt reprezentuje pojedynczą mysz w fazie estrus (czarne kropki) i w fazie diestrus (pomarańczowe kropki). \*\*\* $p < 0,001$ ; test U Manna-Whitneya.*

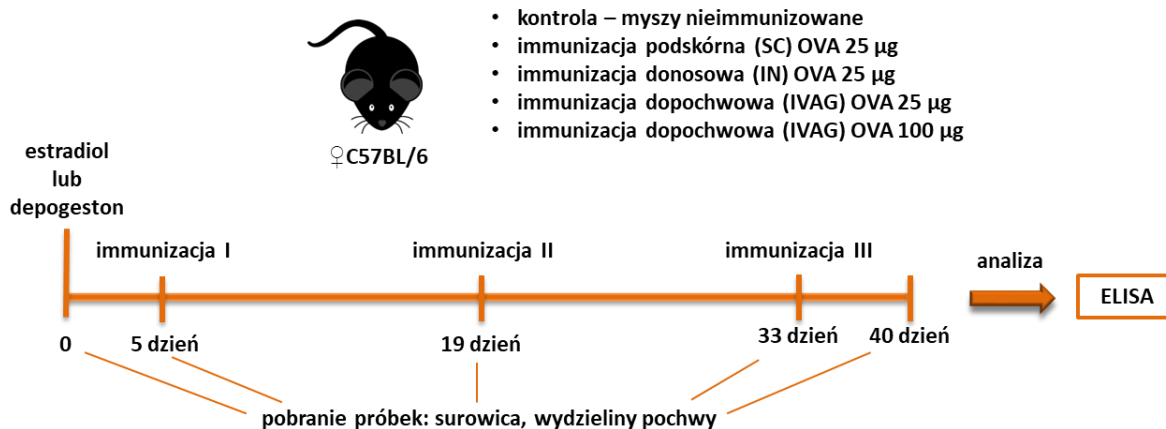
Aby zweryfikować, czy indukowane przez hormony zmiany liczby komórek  $T\gamma\delta$  dotyczą tylko układu rozrodczego, przeanalizowano również populacje komórek  $T\gamma\delta$  i  $CD45^+$  w pobliskich i odległych węzłach chłonnych (Ryc. 36). Na podstawie porównania węzłów chłonnych lędźwiowych, które drenują układ rozrodczy, oraz bardziej oddalonych węzłów pachwinowych, stwierdzono, że liczba limfocytów  $T\gamma\delta$  wzrosła nieznacznie w fazie diestrus jedynie w węzłach chłonnych lędźwiowych. Natomiast liczba leukocytów  $CD45^+$  wzrosła w obu lokalizacjach węzłów chłonnych w fazie diestrus.



Ryc. 36. Wpływ cyklu rujowego na bezwzględną liczbę komórek CD45<sup>+</sup> i komórek T  $\gamma\delta$  w węzłach chłonnych. Słupki przedstawiają medianę bezwzględnej liczby komórek w fazie estrus (czarne kropki) lub w fazie diestrus (pomarańczowe kropki), skala log<sub>10</sub>. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ; test U Manna-Whitneya.

### 4.3. Ustalenie roli limfocytów T $\gamma\delta$ w indukcji odpowiedzi odpornościowej na antygeny modelowe, w tym trójsacharyd z *Candida albicans*

#### 4.3.1. Porównanie przebiegu immunizacji owoalbuminą w zależności od fazy cyklu rujowego



Ryc. 37. Schemat eksperymentów porównujących przebieg immunizacji w zależności od fazy cyklu rujowego.

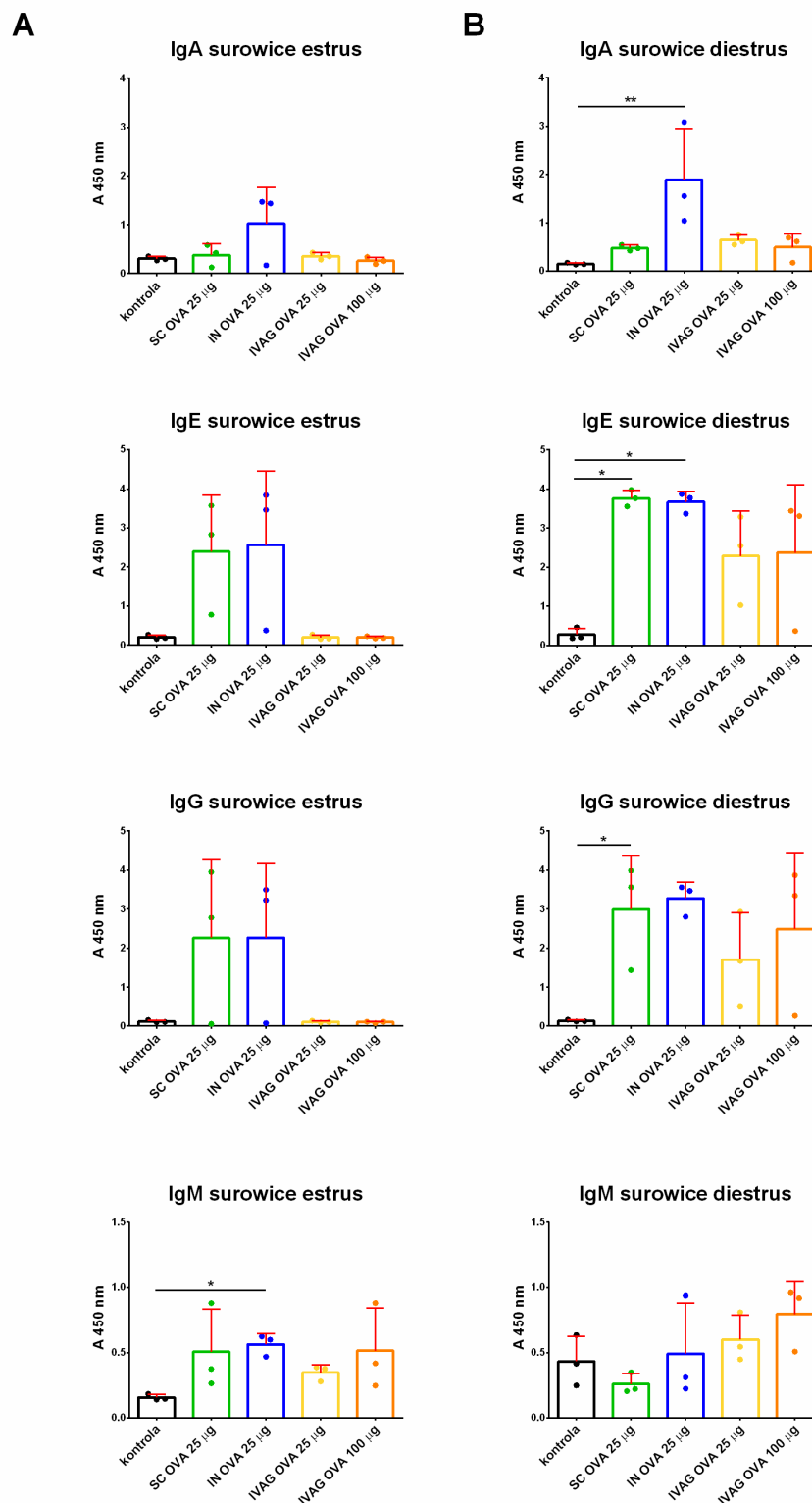
We wstępnym etapie badań porównano przebieg immunizacji owoalbuminą (OVA) w zależności od drogi podania i od fazy cyklu. Na małej liczbie osobników sprawdzono czy immunizacja dopochwowa wzbudza odpowiedź układu immunologicznego w porównaniu do alternatywnej śluzówkowej drogi podania (na błonę śluzową nosa) oraz do „klasycznej” immunizacji podskórnej. W badaniach wykorzystano myszy typu dzikiego C57BL/6 zsynchronizowane hormonalnie do fazy estrus lub diestrus. Antygen podawano w trzech dawkach i tydzień po ostatniej dawce pobierano surowicę i wydzielinę z pochwy w celu pomiaru skuteczności szczepienia wyrażonej indukcją antygenowo-swoistych przeciwciał. W surowicy badano poziom przeciwciał anti-OVA klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM, natomiast w wydzielinach z pochwy analizowane były przeciwciała anti-OVA klasy IgA i IgE. Schemat badań został przedstawiony na Ryc. 37.

Zgodnie z oczekiwaniami podanie podskórne owoalbuminy w adiuwancie (wodorotlenek glinu) wzbudziło produkcję swoistych przeciwciał anti-OVA klasy IgG i IgE, niezależnie od fazy cyklu (przy analizie surowicy odpowiedź 2 lub 3 myszy w grupie, przy  $n = 3$ ); przeciwciała klasy IgM były wykrywalne dla tej drogi podania tylko po immunizacji w fazie estrus. Podanie donosowe owoalbuminy z CpG jako adiuwantem było równie skuteczne jak podanie podskórne w przypadku surowicznych IgG, IgE i IgM, a dodatkowo spowodowało również wyraźną indukcję przeciwciał klasy IgA – dużo większą niż w przypadku drogi podskórnej. Podanie dopochwowe owoalbuminy w dawce 25  $\mu\text{g}$ , jak i 100  $\mu\text{g}$  z adiuwantem (CpG) spowodowało

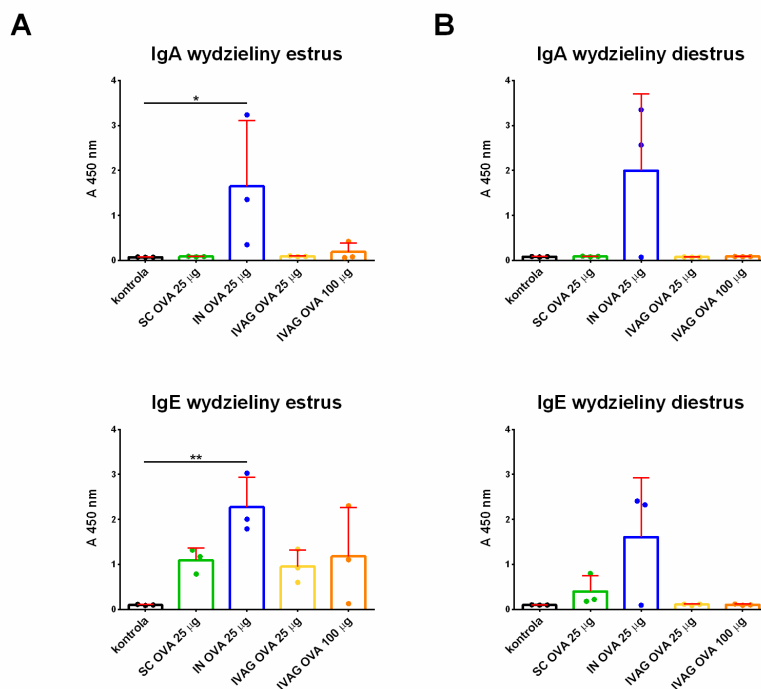
indukcję surowicznych przeciwciał anti-OVA klasy IgM niezależnie od fazy cyklu. Nie wykryto przeciwciał klasy IgA, IgG i IgE w surowicy dla obu dawek antygeny po podaniu dopochwowym myszom w estrusie – wartości OD na poziomie kontroli myszy nieimmunizowanych (Ryc. 38). W fazie diestrus podanie dopochwowe owoalbuminy w dawkach 25 i 100  $\mu$ g oprócz IgM wzbudziło również produkcję przeciwciał anti-OVA klasy IgA, IgE oraz IgG w surowicy (odpowieź 2 lub 3 myszy w grupie, n = 3).

Z uwagi na różne drogi podania badano również obecność antygenowo-swoistych przeciwciał w śluzówkach, będących potencjalnymi wrotami zakażeń dla organizmu. Immunizacja śluzówkowa prowadzi zwykle do pobudzenia produkcji przeciwciał w błonach śluzowych, głównie klasy IgA. Zgodnie z oczekiwaniami, w przypadku podania owoalbuminy donosowo w wydzielinach pochwy stwierdzono obecność przeciwciał anti-OVA klasy IgA (Ryc. 39), niezależnie od fazy cyklu. Żadna inna droga podania nie spowodowała indukcji przeciwciał tej klasy w błonie śluzowej pochwy. Dodatkowo, dla wszystkich dróg podania u myszy immunizowanych w fazie estrus zaobserwowano w wydzielinach pochwy obecność przeciwciał anti-OVA klasy IgE; natomiast w fazie diestrus, zaobserwowano indukcję przeciwciał tej klasy jedynie po podaniu owoalbuminy donosowo.





Ryc. 38. Poziom swoistych przeciwiacil anti-OVA klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w surowicach. Wykresy pokazujac poziom przeciwiacil w fazie estrus (A) oraz w fazie diestrus (B). Slupki przedstawiaja srednia wartosc OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozciezczenia surowicy. SC – podanie podskorne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Kazda kropka reprezentuje pojedyncza mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya, porownania wzgledem kontroli (myszy nieimmunizowane).

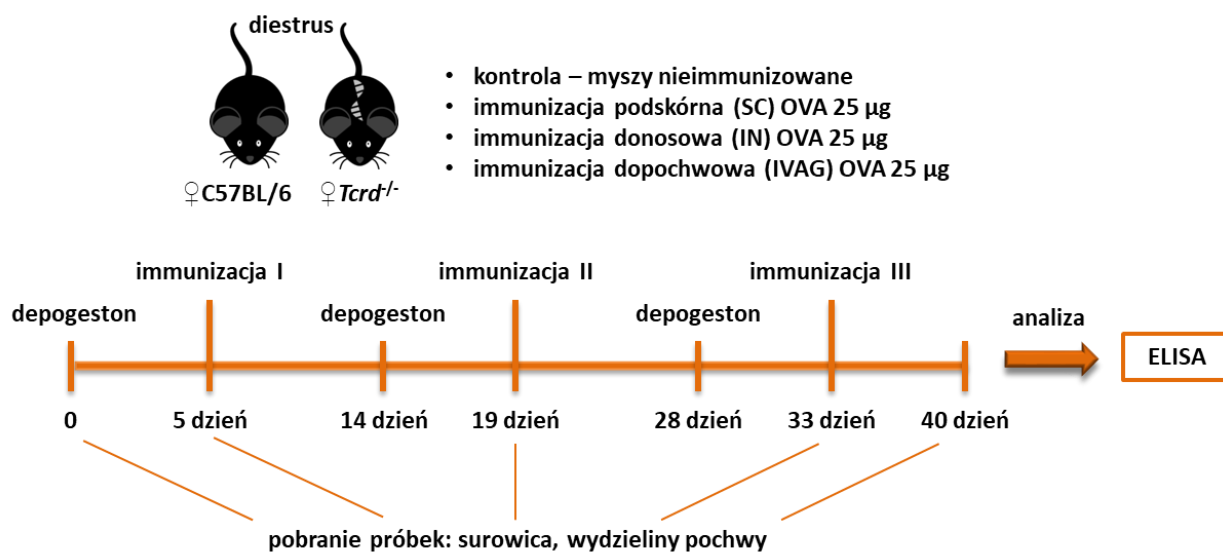


Ryc. 39. Poziom swoistych przeciwciał anty-OVA klasy IgA oraz IgE w wydzielinach pochwy.

Wykresy pokazują poziom przeciwciał w fazie estrus (A) oraz w fazie diestrus (B). Słupki przedstawiają średnią wartość OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcieńczenia wydzieliny. SC – podanie podskórne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya, porównania względem kontroli (myszy nieimmunizowane).

Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że immunizacja śluzówkową drogą donosową lub dopochwową w fazie diestrus prowadzi do indukcji wyższych poziomów swoistych przeciwciał w surowicy w porównaniu do estrusa. Tylko w diestrusie zaobserwowano indukcję IgA, IgG i IgE anty-OVA po podaniu dopochwowym. Droga donosowa była jednak bardziej skuteczna od dopochwowej we wzbudzeniu produkcji przeciwciał klasy IgA wydzielanych przez błony śluzowe.

### 4.3.2. Wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na indukcję odpowiedzi immunologicznej na immunizację owoalbuminą



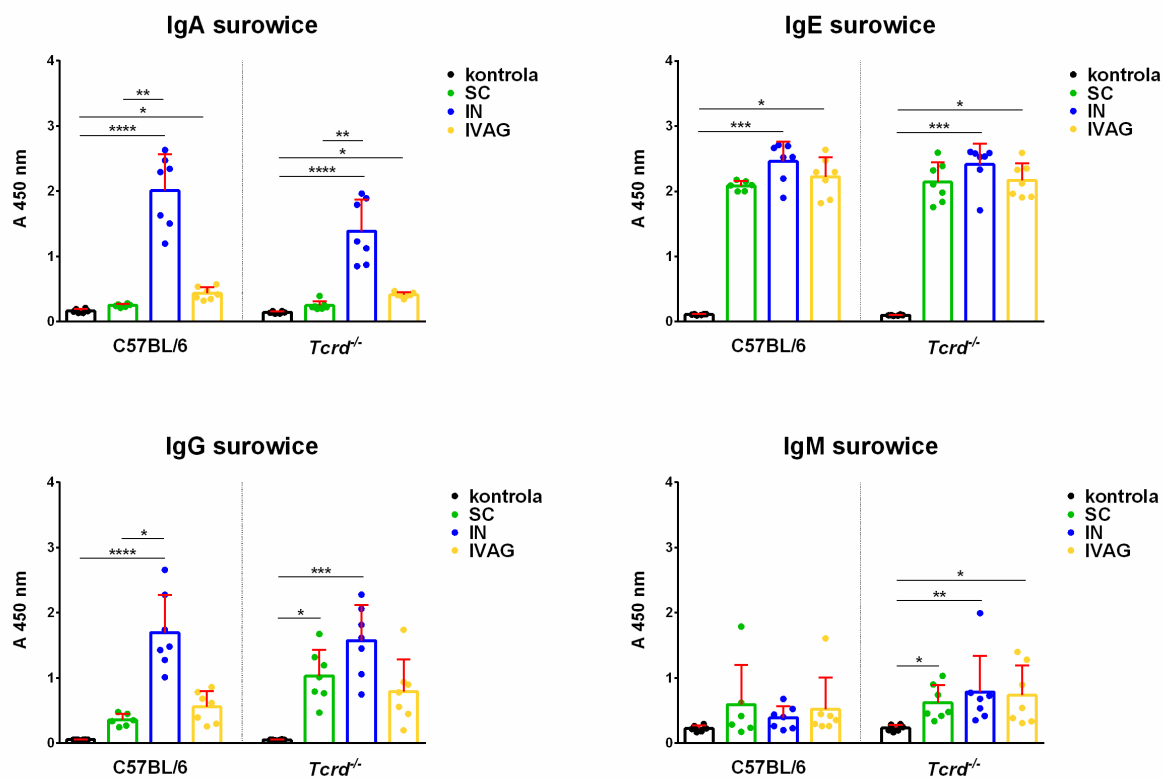
Ryc. 40. Schemat eksperymentów porównujących wpływ limfocytów T  $\gamma\delta$  na indukcję odpowiedzi immunologicznej po immunizacji owoalbuminą.

Po porównaniu wpływu fazy cyklu rujowego na przebieg immunizacji owoalbuminą do dalszych analiz wybrano fazę diestrus. W drugim etapie badań porównywano skuteczność immunizacji owoalbuminą w zależności od drogi podania i od obecności limfocytów T  $\gamma\delta$ . W badaniach wykorzystano myszy szczepu dzikiego C57BL/6 oraz myszy z delecją komórek T  $\gamma\delta$  (*Tcrd*<sup>-/-</sup>) zsynchronizowanych hormonalnie do fazy diestrus. Tak jak poprzednio, antygen podawano w trzech dawkach wraz z odpowiednimi adiuwantami i pięć dni przed każdą immunizacją myszom indukowano fazę diestrus za pomocą Depogestonu. Tydzień po ostatniej dawce antygeny pobierano krew w celu otrzymania surowicy i wydzielinę z pochwy w celu pomiaru skuteczności szczepienia wyrażonej indukcją antygenowo-swoistych przeciwciał. W surowicy i wydzielinach badano poziom przeciwciał anti-OVA klas IgA, IgE, IgG, IgM oraz podklas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c i IgG3. Schemat badań został przedstawiony na Ryc. 40.

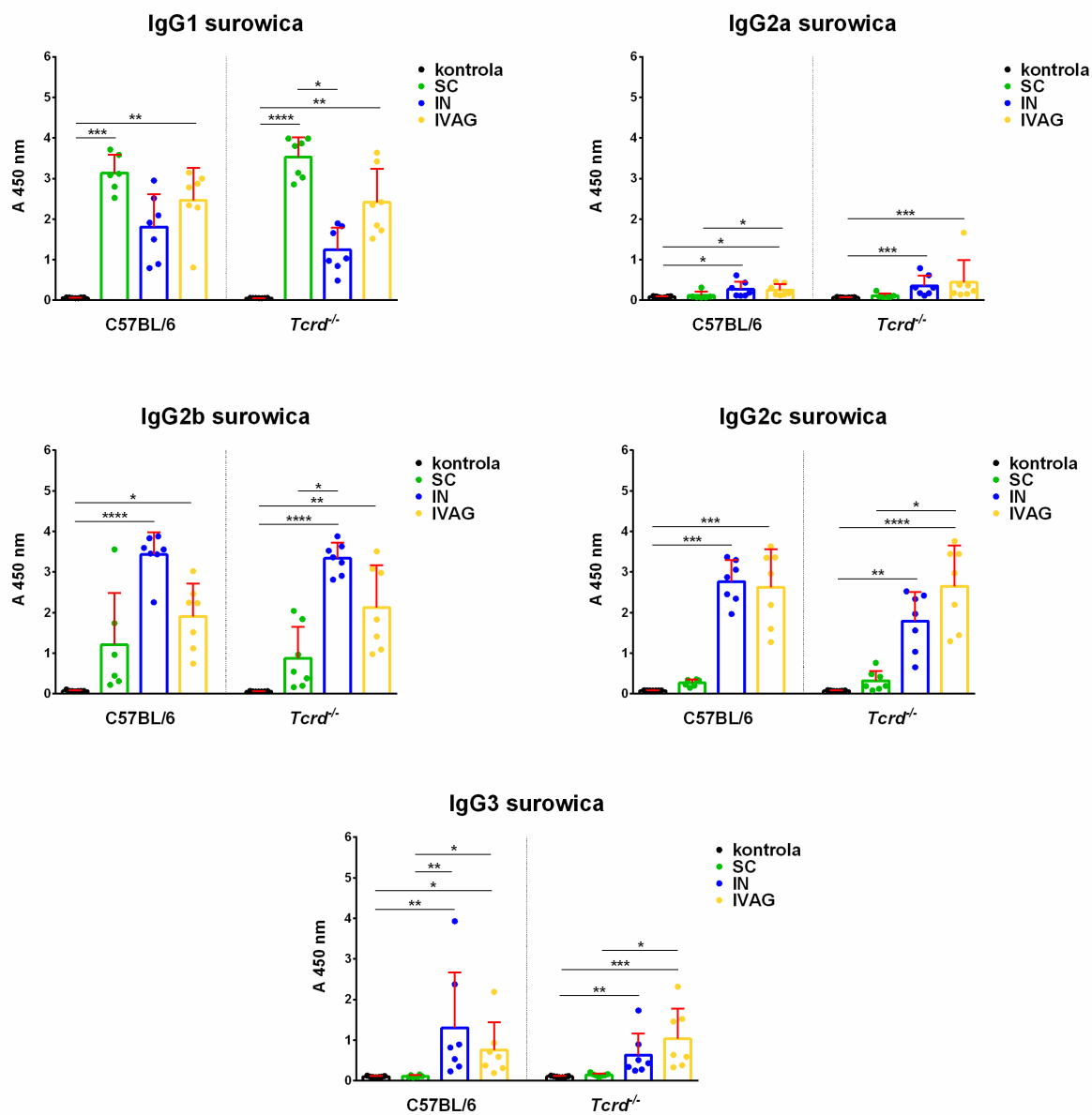
W przypadku analiz surowicznych przeciwciał stwierdzono, że szczepienie niezależnie od drogi podania i szczepu myszy wzbudziło produkcję przeciwciał klasy IgG i IgE. Co ciekawe, stężenie przeciwciał anti-OVA klasy IgG było większe w przypadku myszy *Tcrd*<sup>-/-</sup> po podaniu podskórnym antygeny. Ponadto, u tych myszy odnotowano też trend wyższych poziomów przeciwciał klasy IgM przy każdej drodze szczepienia, w porównaniu do myszy WT. Analizując stężenia IgA anti-OVA w surowicach wykazano, że tylko podanie antygeny na

śluzówki drogą donosową i dopochwową wzbudziło produkcję tej klasy przeciwciał porównywalnie w obu szczepach myszy. Immunizacja donosowa była jednak bardziej skuteczna niż dopochwowa w tym przypadku. Badania podklas surowiczych przeciwciał IgG pokazały, że poza IgG1, obie drogi dośluzówkowe prowadziły do większej indukcji przeciwciał IgG2a, IgG2b, IgG2c i IgG3 niż podanie podskórne. Nie zaobserwowano różnic w tych podklasach po szczepieniu pomiędzy myszami WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup>.

W analizach przeciwciał wydzielniczych w obrębie nabłonka pochwy stwierdzono, że obie drogi immunizacji śluzówkowej – donosowa i dopochwowa spowodowały produkcję swoistych przeciwciał anti-OVA klas IgE i IgG, zarówno u myszy typu dzikiego C57BL/6, jak i *Tcrd*<sup>-/-</sup> na podobnych poziomach. Wydzielnicze przeciwciała klasy IgA były indukowane właściwie tylko po podaniu donosowym, na podobnych poziomach w obu badanych szczepach myszy. Zmierzone stężenia IgM anti-OVA w wydzielinach pochwy były bardzo niskie – praktycznie na poziomie kontroli myszy nieszczepionych, pomimo stwierdzonych różnic za pomocą testów statystycznych. Spośród podklas przeciwciał IgG tylko IgG1, IgG2b i IgG2c były na oznaczalnych poziomach, bez znaczących różnic pomiędzy szczepami WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup>. W wydzielinach po immunizacji podskórnej owoalbuminą wykryto najwyższe ilości swoistych przeciwciał anti-OVA klasy IgG1 i najniższe po podaniu dopochwowym. Z kolei, tylko szczepienia przez podanie antygeny na śluzówkę pochwy i w mniejszym stopniu donosowe stymulowały IgG2b i IgG2c przy praktycznie braku efektu immunizacji podskórnej.

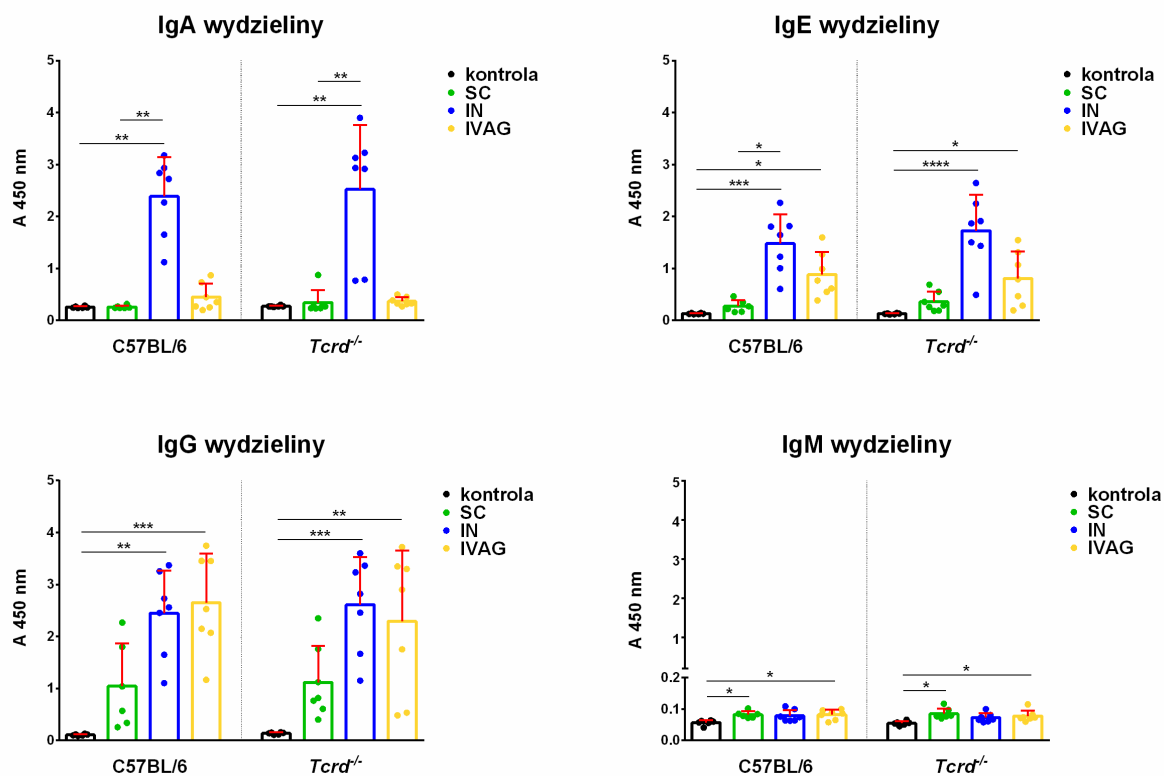


Ryc. 41. Poziom swoistych przeciwiac anty-OVA klasy IgA, IgE, IgG i IgM w surowicach. Slupki przedstawiaj $\acute{a}$  sredni $\acute{a}$  warto $\acute{s}$ c OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcie $\acute{n}$ czenia surowicy. SC – podanie podsk $\acute{o}$ rne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Ka $\acute{z}$ da kropka reprezentuje pojedyncz $\acute{a}$  mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; test Kruskala-Wallisa.

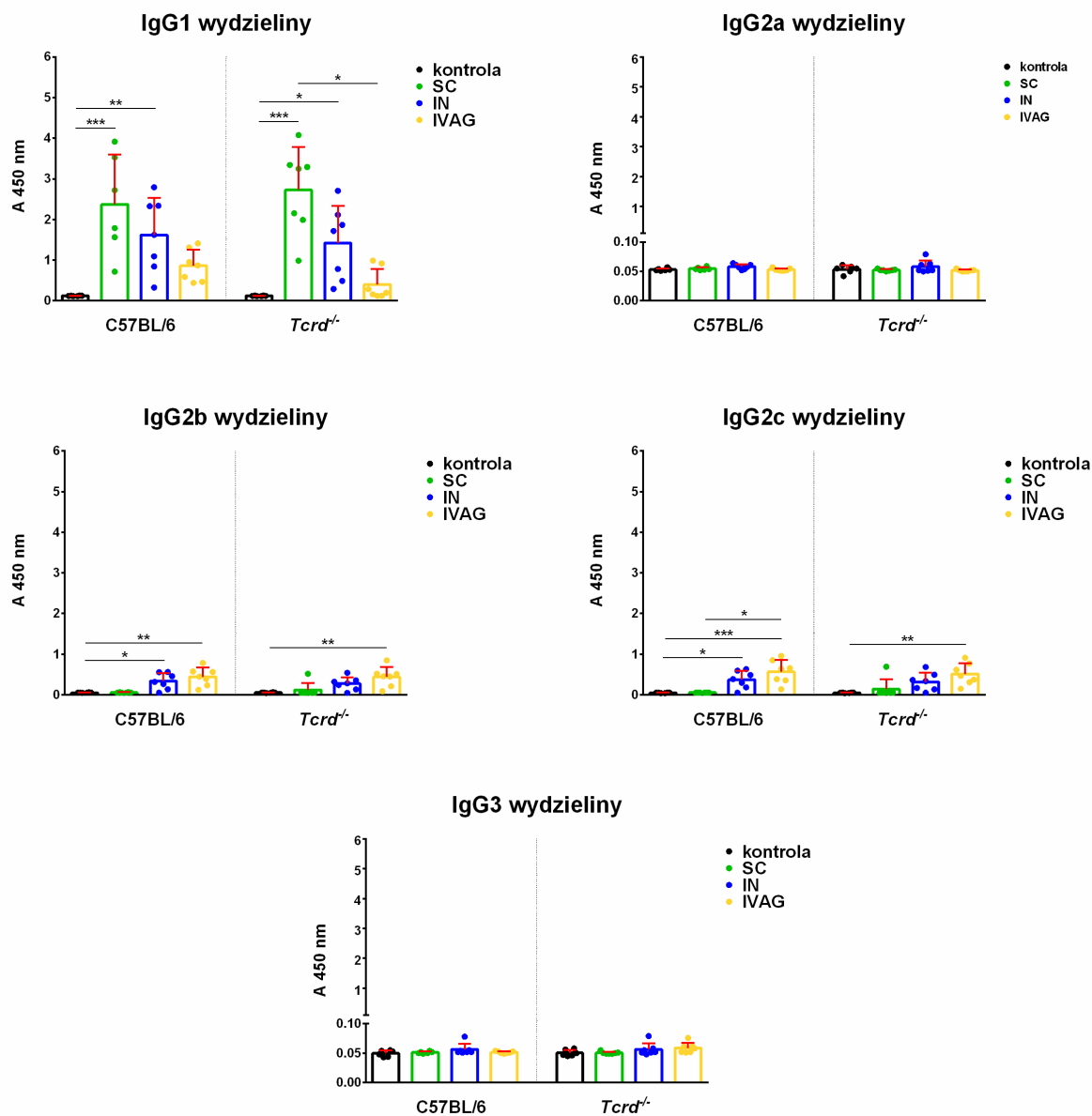


Ryc. 42. Poziom swoistych przeciwciał anty-OVA podklas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w surowicach.

Słupki przedstawiają średnią wartość OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcieńczenia surowicy. SC – podanie podskórne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; test Kruskala-Wallis.



Ryc. 43. Poziom swoistych przeciwciał anty-OVA klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w wydzielinach pochwy. Słupki przedstawiają średnią wartość OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcieńczenia wydzieliny. SC – podanie podskórne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; test Kruskala-Wallis.



Ryc. 44. Poziom swoistych przeciwiacil anti-OVA klasy IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w wydzielinach. Slupki przedstawiajq sredniq wartosc OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozciezczenia wydzielin. SC – podanie podskorne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Kazda kropka reprezentuje pojedyncza mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; test Kruskala-Wallis.

Rozne antygeny czesto prowadza do rozwoju odpowiedzi immunologicznej typu Th1 (komorkowej) badz Th2 (humoralnej). Stosunek IgG1/IgG2a zostal wykorzystany do wskazania dominacji odpowiedzi typu Th1 lub Th2. W odpowiedzi Th1 dominuje wytwarzanie IgG2a, podczas gdy IgG1 jest zwiqzane z odpowiedziq Th2 (217). Analizujac poziomy tych przeciwiacil w surowicy, po podaniu podskornym owoalbuminy przewazala zdecydowanie odpowiedz humoralna, niezaleznie od obecnoSci komorek T  $\gamma\delta$  z uwagi na wyzsze wartosci tego wskaznika przy tej drodze szczepienia niz po podaniu doSluzowkowym (Tabela 22).



Niższe wartości stosunku IgG1/IgG2a dla immunizacji przez błony śluzowe mogą wskazywać na rozwój również odpowiedzi Th1 przy tej drodze szczepienia.

Tabela 22. Wartości stosunku poziomu przeciwciał anti-OVA klasy IgG1 i IgG2a.

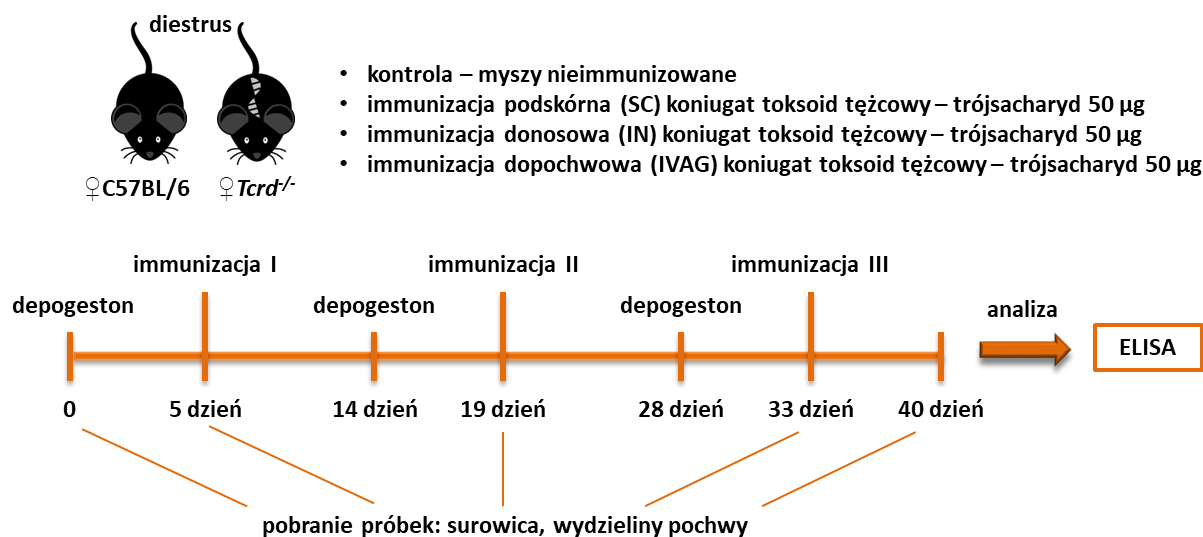
|                   | C57BL/6       | Tcrd <sup>-/-</sup> |
|-------------------|---------------|---------------------|
| podskórnice       | 35,34 ± 16,08 | 35,81 ± 10,13       |
| surowica donosowo | 9,65 ± 6,92   | 5,09 ± 3,64         |
| dopochwowo        | 11,43 ± 5,75  | 10,17 ± 7,14        |

Podsumowując analizę wpływu komórek T  $\gamma\delta$  na produkcję antygenowo-swoistych przeciwciał na antygen białkowy należy stwierdzić, że był on niewielki (Tabela 23). Różnice istotnie statystyczne zaobserwowano w przypadku podania owoalbuminy podskórnice i donosowo. Przy podaniu dopochwowym owoalbuminy komórki T  $\gamma\delta$  nie miały żadnego wpływu na odpowiedź immunologiczną wyrażoną stężeniem przeciwciał zarówno w surowicy, jak i w wydzielinach pochwy.

Tabela 23. Analiza statystyczna poziomu swoistych przeciwciał anti-OVA myszy szczepu dzikiego oraz z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w surowicy oraz w wydzielinach pochwy. Wyniki przedstawiono jako prawdopodobieństwo testowe (p), \*p<0,05; \*\*p<0,01; test U Manna-Whitneya.

|                   | Podanie podskórne<br>C57BL/6 vs. Tcrd <sup>-/-</sup> | Podanie donosowe<br>C57BL/6 vs. Tcrd <sup>-/-</sup> | Podanie dopochwowe<br>C57BL/6 vs. Tcrd <sup>-/-</sup> |         |
|-------------------|--|---|---|---------|
| Surowica          | IgA  | 0,3660  | 0,0973  | 0,3829  |
|                   | IgE  | 0,1375  | 0,0728  | 0,5350  |
|                   | IgG  | ** 0,0012   | >0,9999   | 0,3176  |
|                   | IgM  | 0,2949  | 0,0728  | 0,2593  |
|                   | IgG1   | * 0,0350  | 0,4557  | 0,9015  |
|                   | IgG2a  | 0,0670  | 0,2086  | 0,2593  |
|                   | IgG2b  | >0,9999   | * 0,0379  | 0,3829  |
|                   | IgG2c  | 0,9452  | 0,0728  | 0,5350  |
|                   | IgG3   | 0,2343  | 0,3176  | 0,5350  |
| Wydzieliny pochwy | IgA  | 0,8357  | >0,9999   | >0,9999 |
|                   | IgE  | 0,3660  | 0,3829  | 0,8048  |
|                   | IgG  | >0,9999   | 0,3829  | 0,3176  |
|                   | IgM  | 0,7028  | 0,8741  | 0,5350  |
|                   | IgG1   | 0,6282  | 0,6200  | 0,0530  |
|                   | IgG2a  | * 0,0181  | 0,3636  | 0,0973  |
|                   | IgG2b  | 0,5099  | 0,5350  | 0,9015  |
| IgG2c             | 0,6066   | 0,5350  | 0,7104  |         |
| IgG3              | 0,1696   | 0,4318  | 0,0664  |         |

### 4.3.3. Wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na indukcję odpowiedzi immunologicznej po immunizacji koniugatem toksoid tężcowy – trójsacharyd $\beta$ -mannanu z *Candida albicans*

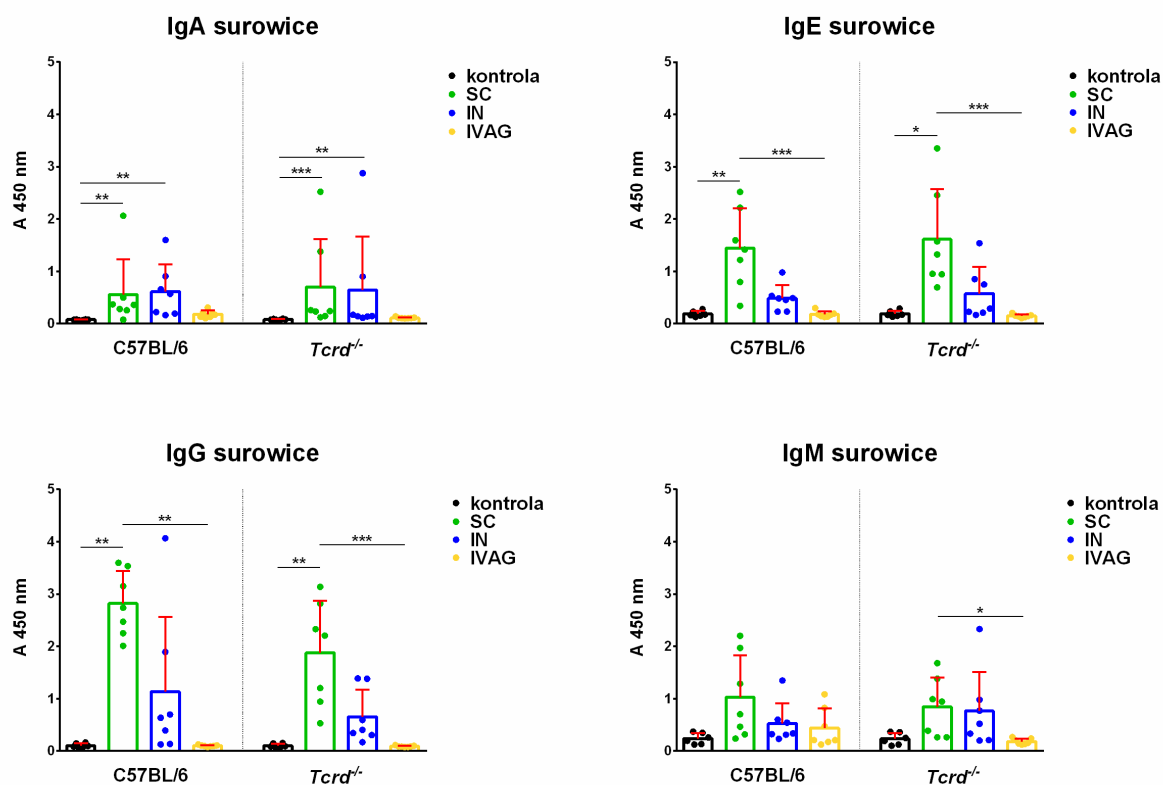


Ryc. 45. Schemat eksperymentów porównujących wpływ limfocytów T  $\gamma\delta$  na indukcję odpowiedzi immunologicznej po immunizacji koniugatem toksoid tężcowy – trójsacharyd.

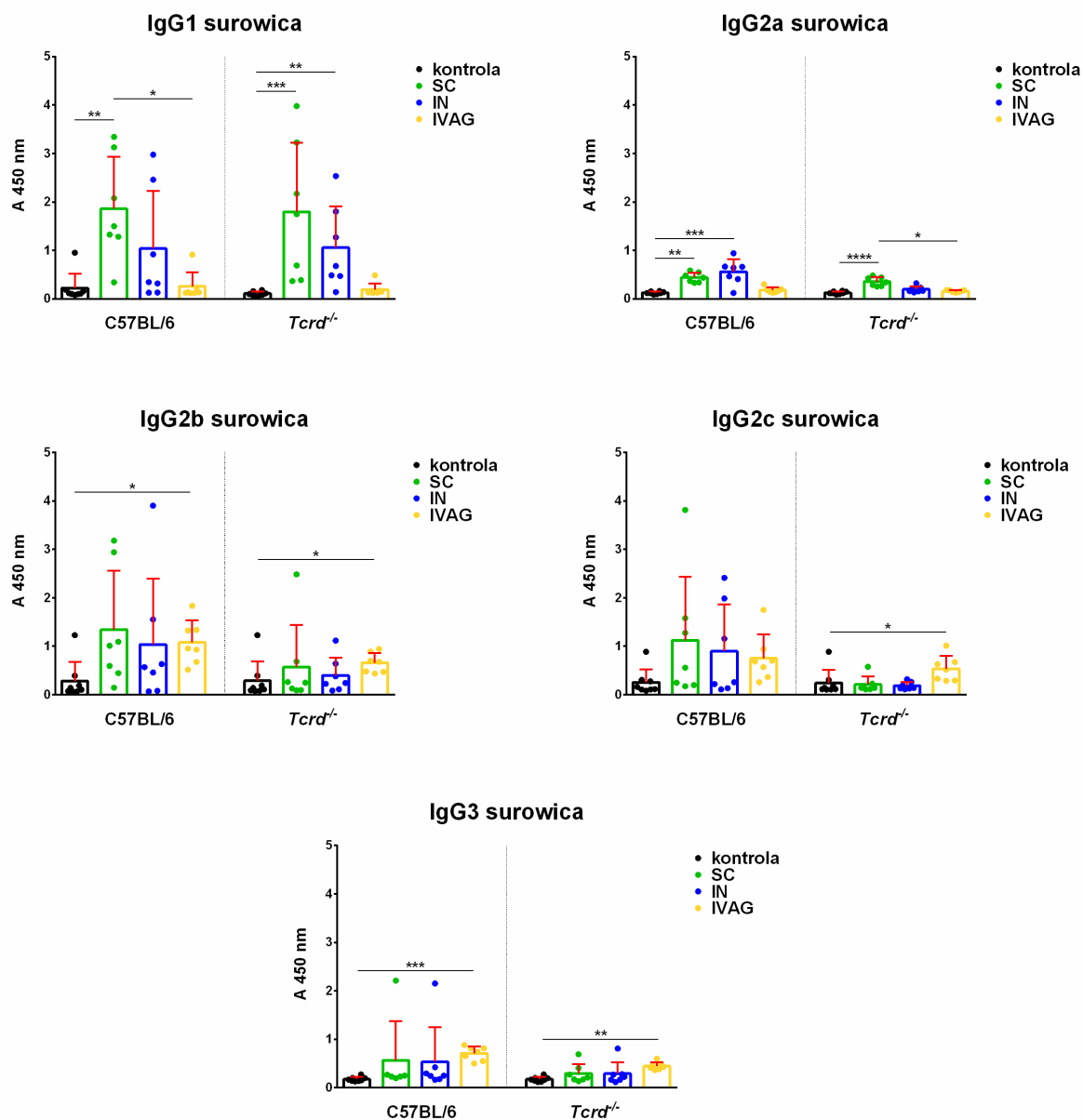
W kolejnym etapie badań porównywano efekty immunizacji innym typem antygeny - koniugatem syntetycznego trójsacharydu  $\beta$ -mannanu i toksoidu tężca. Dane literaturowe (213) wskazują, że koniugat ten jest zdolny do wywołania ochronnej odpowiedzi immunologicznej przy zakażeniach *C. albicans*, które bardzo często dotyczą nabłonka pochwy. Jako adiuwant wykorzystano  $\beta$ -glukan, który wzmacniał immunogeniczność konigatu we wcześniejszych badaniach (208). Schemat eksperymentów został przedstawiony na Ryc. 45.

Podanie koniugatu drogą podskórną i donosową (w mniejszym stopniu) wzbudziło produkcję swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd klas IgA, IgE, IgG i IgM w surowicach u myszy WT *Tcrd*<sup>-/-</sup> w podobnym stopniu. Droga dopochwowa, poza niewielką indukcją IgA, nie była skuteczna – nie odnotowano różnic w porównaniu do myszy nieszczepionych. Wyniki pomiarów surowicznych przeciwciał podklas IgG pokazały jednak, że podanie antygeny na błonę śluzową pochwy wywołało odpowiedź immunologiczną w postaci indukcji podklas IgG2b, IgG2c i IgG3. Immunizacja tą drogą była w niektórych przypadkach nawet bardziej efektywna niż podanie podskórne i donosowe. Limfocyty T  $\gamma\delta$  miały znaczenie w indukcji surowicznych przeciwciał podklasy IgG2c po podaniu podskórnym antygeny i podklasy IgG2a po podaniu donosowym – u myszy *Tcrd*<sup>-/-</sup> zaobserwowano zmniejszone poziomy tych immunoglobulin. W przypadku drogi dopochwowej odnotowano bardzo niewielki wzrost surowicznych IgA tylko u myszy WT a ponadto poziomy podklas IgG2b i IgG3 były również wyższe przy obecności komórek T  $\gamma\delta$  w tkance.

Szczepienia koniugatem miały niewielki wpływ na produkcję swoistych przeciwciał anty-trójsacharyd w wydzielinach pochwy. Nie zaobserwowano efektu komórek T  $\gamma\delta$  w tym względzie. Wszystkie drogi podania wzbudziły głównie przeciwciała anty-trójsacharyd klasy IgA – droga donosowa była nieznacznie bardziej skuteczna. Spośród podklas IgG odnotowano tylko IgG1 po podaniu podskórnym.

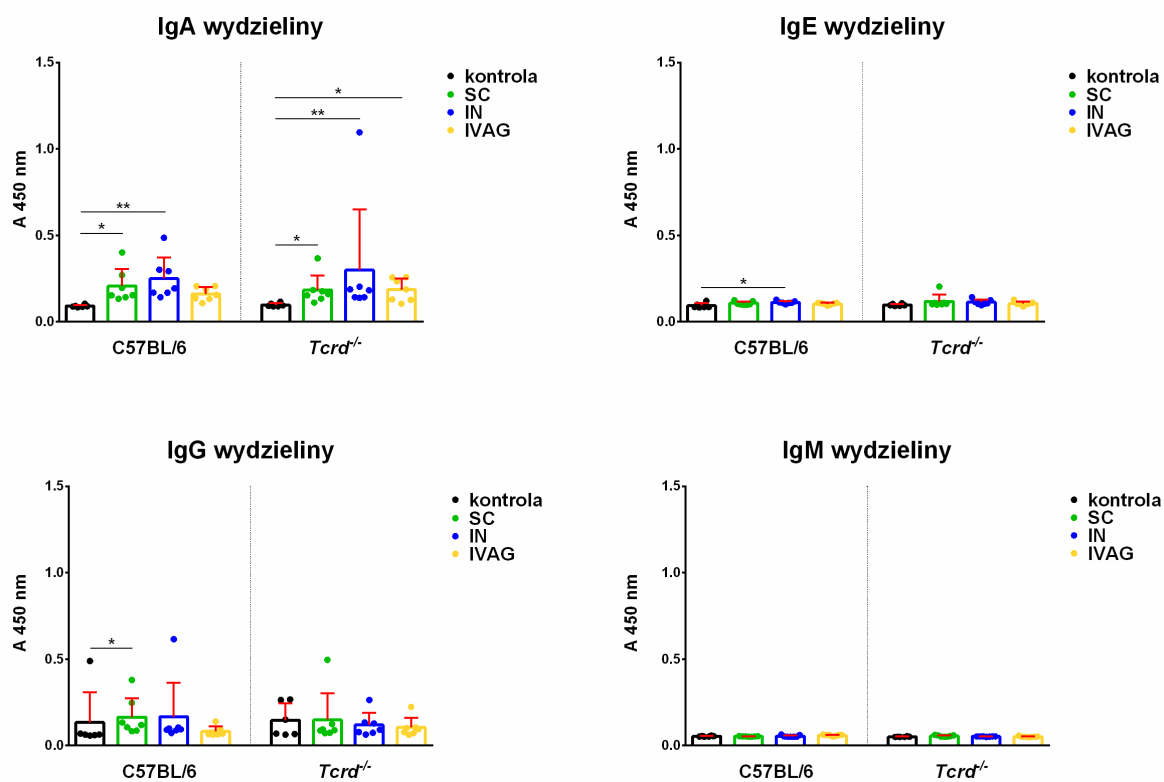


Ryc. 46. Poziom swoistych przeciwciał anty-trójsacharyd klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w surowicach. Słupki przedstawiają średnią wartość OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcieńczenia surowicy. SC – podanie podskórne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; test Kruskala-Wallisa.



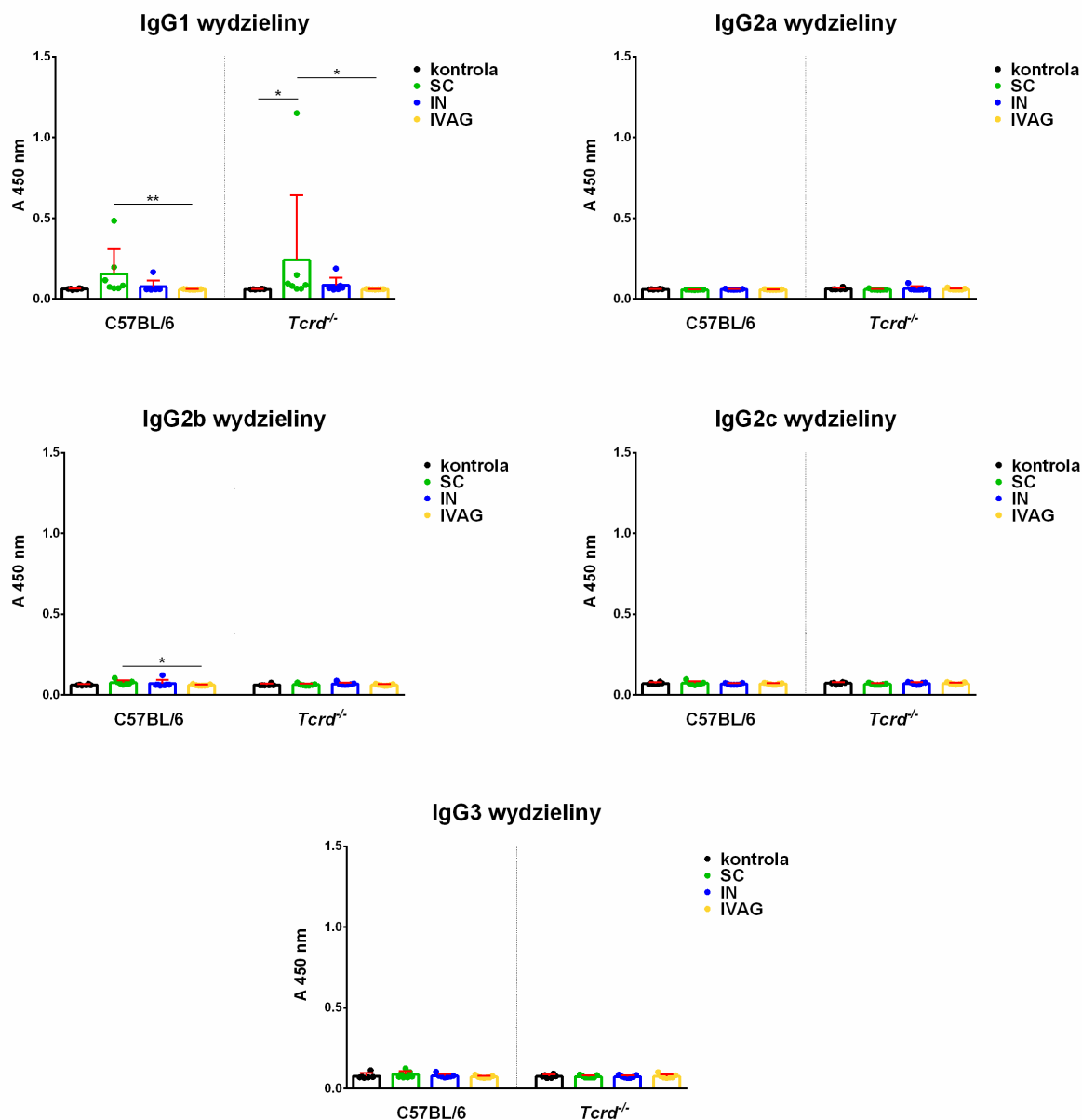
Ryc. 47. Poziom swoistych przeciwiac anty-trójsacharyd podklas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w surowicach.

Słupki przedstawiają średnią wartość OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcieńczenia surowicy. SC – podanie podskórne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; test Kruskala-Wallis.



Ryc. 48. Poziom swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w wydzielinach pochwy.

Słupki przedstawiają średnią wartość OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcieńczenia wydzieliny. SC – podanie podskórne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test Kruskala-Wallisa.



Ryc. 49. Poziom swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd podklas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w wydzielinach pochwy.

Słupki przedstawiają średnią wartość OD z odchyleniem standardowym dla wybranego rozcieńczenia wydzielin. SC – podanie podskórne, IN – podanie donosowe, IVAG – podanie dopochwowe. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test Kruskala-Wallis.

Po podaniu koniugatu, wartości stosunku IgG1/IgG2a dla surowic były wyższe przy immunizacji podskórnej w porównaniu do szczepień dośluzówkowych, podobnie jak dla owoalbuminy, przesuwając odpowiedź immunologiczną w kierunku Th2 dla tej drogi podania a dla immunizacji dośluzówkowych w stronę Th1 (Tabela 24). Po podaniu donosowym u myszy *Tcrd*<sup>-/-</sup> wartości analizowanego wskaźnika były zbliżone do wyników po podaniu podskórnym, co sugeruje rolę limfocytów T  $\gamma\delta$  w indukcji odpowiedzi typu Th1 (komórkowej).

Tabela 24. Wartości stosunku poziomu przeciwciał anti-trójsacharyd klasy IgG1 i IgG2a.

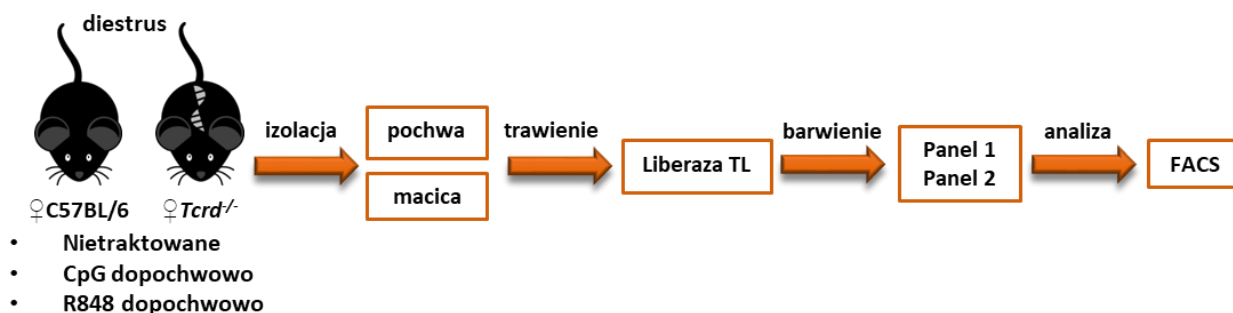
|                   | C57BL/6       | <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> |
|-------------------|---------------|----------------------------|
| podskórnice       | 3,96 ± 1,64   | 4,69 ± 3,23                |
| surowica donosowo | 1,68 ± 1,69   | 5,40 ± 4,58                |
| dopochwowo        | 1,532 ± 1,839 | 1,20 ± 0,71                |

Podsumowując, analiza szczepów myszy WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup> wykazała pozytywny wpływ pochwowych komórek T  $\gamma\delta$  na produkcję niektórych antygenowo-swoistych przeciwciał na antygen polisacharydowy po immunizacji drogą dopochwową (Tabela 25).

Tabela 25. Analiza statystyczna poziomu swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd myszy szczepu dzikiego oraz z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w surowicy oraz w wydzielinach pochwy. Wyniki przedstawiono jako prawdopodobieństwo testowe (p), \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; test U Manna-Whitneya.

|                   |       | Podanie<br>podskórne<br>C57BL/6 vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> | Podanie<br>donosowe<br>C57BL/6 vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> | Podanie<br>dopochwowe<br>C57BL/6 vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> |
|-------------------|-------|--|---|---|
| Surowica          | IgA   | 0,4557   | 0,1282  | <b>** 0,0041</b>  |
|                   | IgE   | >0,9999  | 0,7104  | 0,3176  |
|                   | IgG   | 0,1649   | 0,8048  | 0,2453  |
|                   | IgM   | 0,8048   | 0,8048  | 0,3176  |
|                   | IgG1  | 0,3176   | 0,1282  | <b>* 0,0175</b>   |
|                   | IgG2a | 0,2086   | <b>* 0,0262</b>   | 0,4557  |
|                   | IgG2b | 0,0728   | 0,5350  | <b>* 0,0262</b>   |
|                   | IgG2c | <b>* 0,0262</b>  | 0,3176  | 0,4557  |
|                   | IgG3  | 0,5338   | 0,4557  | <b>** 0,0023</b>  |
| Wydzieliny pochwy | IgA   | 0,4557   | 0,3013  | 0,8048  |
|                   | IgE   | 0,3631   | 0,3024  | 0,3024  |
|                   | IgG   | 0,0973   | 0,5350  | 0,7104  |
|                   | IgM   | <b>** 0,0099</b>   | 0,2401  | <b>* 0,0163</b>   |
|                   | IgG1  | 0,9015   | 0,0915  | 0,0699  |
|                   | IgG2a | 0,0600   | 0,0892  | 0,3805  |
|                   | IgG2b | <b>* 0,0239</b>  | 0,3648  | 0,8741  |
|                   | IgG2c | 0,2407   | 0,5962  | 0,7727  |
|                   | IgG3  | 0,3817   | 0,8765  | 0,3642  |

#### 4.3.4. Ocena wpływu limfocytów T $\gamma\delta$ na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy



Ryc. 50. Schemat przebiegu eksperymentów określających wpływ limfocytów T  $\gamma\delta$  na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy.

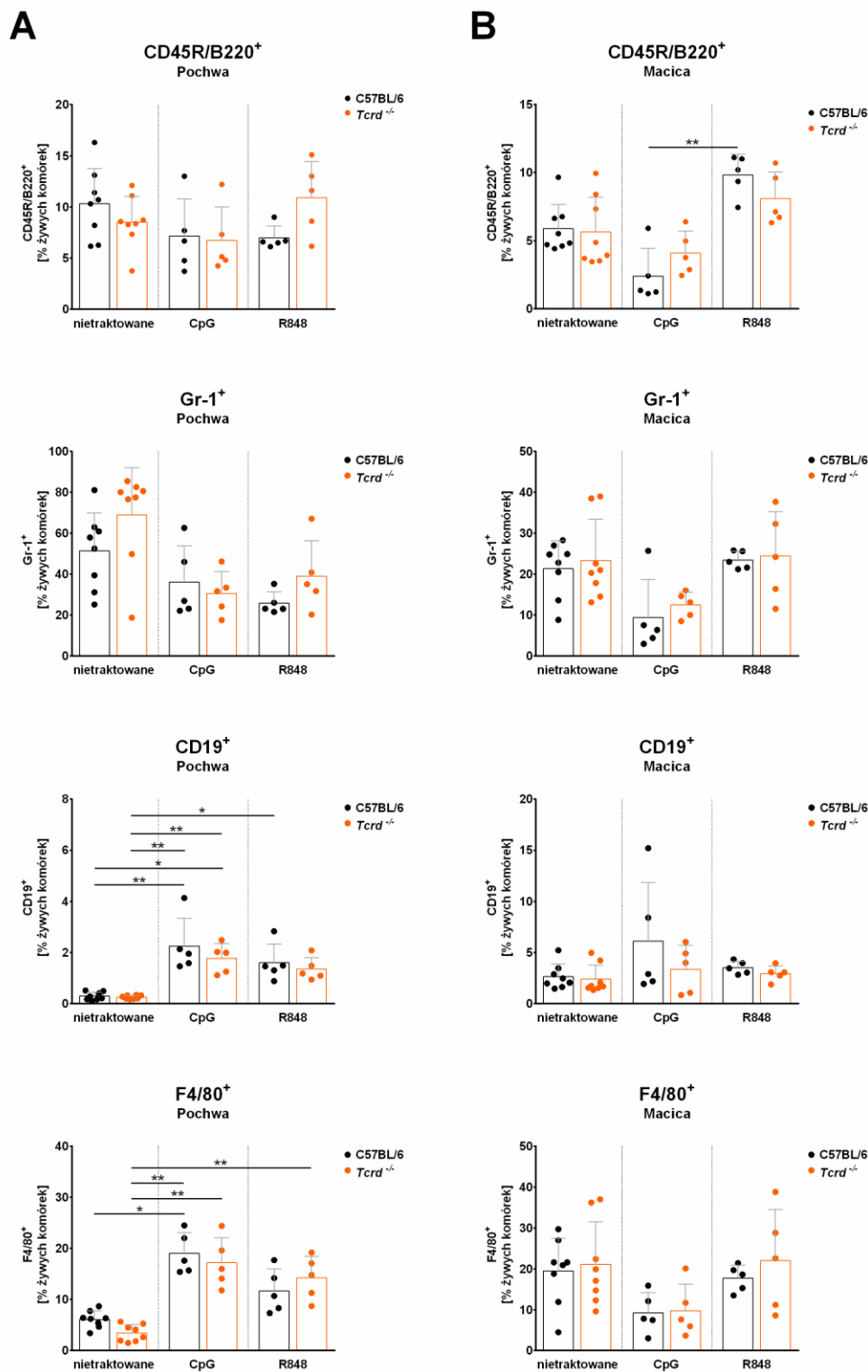
W celu oceny immunomodulującego wpływu limfocytów T  $\gamma\delta$  na inne komórki odpornościowe w obrębie układu rozrodczego przeprowadzono analizy składu komórkowego w stanie podstawowym (w zdrowej tkance) oraz po indukcji zapalenia nabłonka przez dopochwowe podanie ligandów receptorów TLR9 i TLR7 – CpG i R848, odpowiednio. Badano oddzielnie pochwę i macicę w myszach WT w porównaniu do szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup>. Za pomocą cytometrii przepływowej na komórkach wyizolowanych z narządów rozrodczych analizowano jedenaście markerów definiujących różne populacje leukocytów: **CD45R/B220**<sup>+</sup> (komórki B, subpopulacje komórek T i NK); **Gr-1**<sup>+</sup> (granulocyty, makrofagi); **CD19**<sup>+</sup> (komórki B, komórki dendrytyczne); **F4/80**<sup>+</sup> (makrofagi, komórki dendrytyczne); **CD11b**<sup>+</sup> (granulocyty, monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK, subpopulacje komórek T i B); **CD11c**<sup>+</sup> (komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty); **CD3 $\epsilon$** <sup>+</sup> (komórki T, komórki NK-T); **CD117**<sup>+</sup> (hematopoetyczne komórki macierzyste i komórki tuczne); **EpCAM/CD326**<sup>+</sup> (komórki tuczne i bazofile); **Fc $\epsilon$ RI $\alpha$** <sup>+</sup> (komórki tuczne i bazofile); **NK-1.1**<sup>+</sup> (komórki NK, komórki NK-T). Wyniki badań przedstawiono jako procent komórek pozytywnych wobec badanego markera w bramce „żywe komórki”.

W obu szczepach myszy podanie CpG spowodowało w pochwie podobny wzrost odsetka komórek CD19<sup>+</sup> (z około 0,3% do około 2%), komórek F4/80<sup>+</sup> (z około 5% do około 18%), komórek CD117<sup>+</sup> (z około 6% do około 16%) oraz komórek Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ <sup>+</sup> (z około 7% do około 22%). Opisanie zmiany były istotne statystycznie, aczkolwiek dodatkowo zaobserwowano również pewne trendy, wskazujące na modulację proporcji komórek układu odpornościowego w pochwie pod wpływem stymulacji TLR9: odnotowano przyrosty odsetka komórek CD11c<sup>+</sup> i Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ <sup>+</sup> oraz spadki Gr-1<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup>, co było szczególnie widoczne u myszy *Tcrd*<sup>-/-</sup>. W tych samych warunkach w macicy zwiększyła się proporcja komórek Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ <sup>+</sup> (z około 8% do około



20%), natomiast zaobserwowano spadki udziału procentowego komórek CD45R/B220<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> i CD11c<sup>+</sup>, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie.

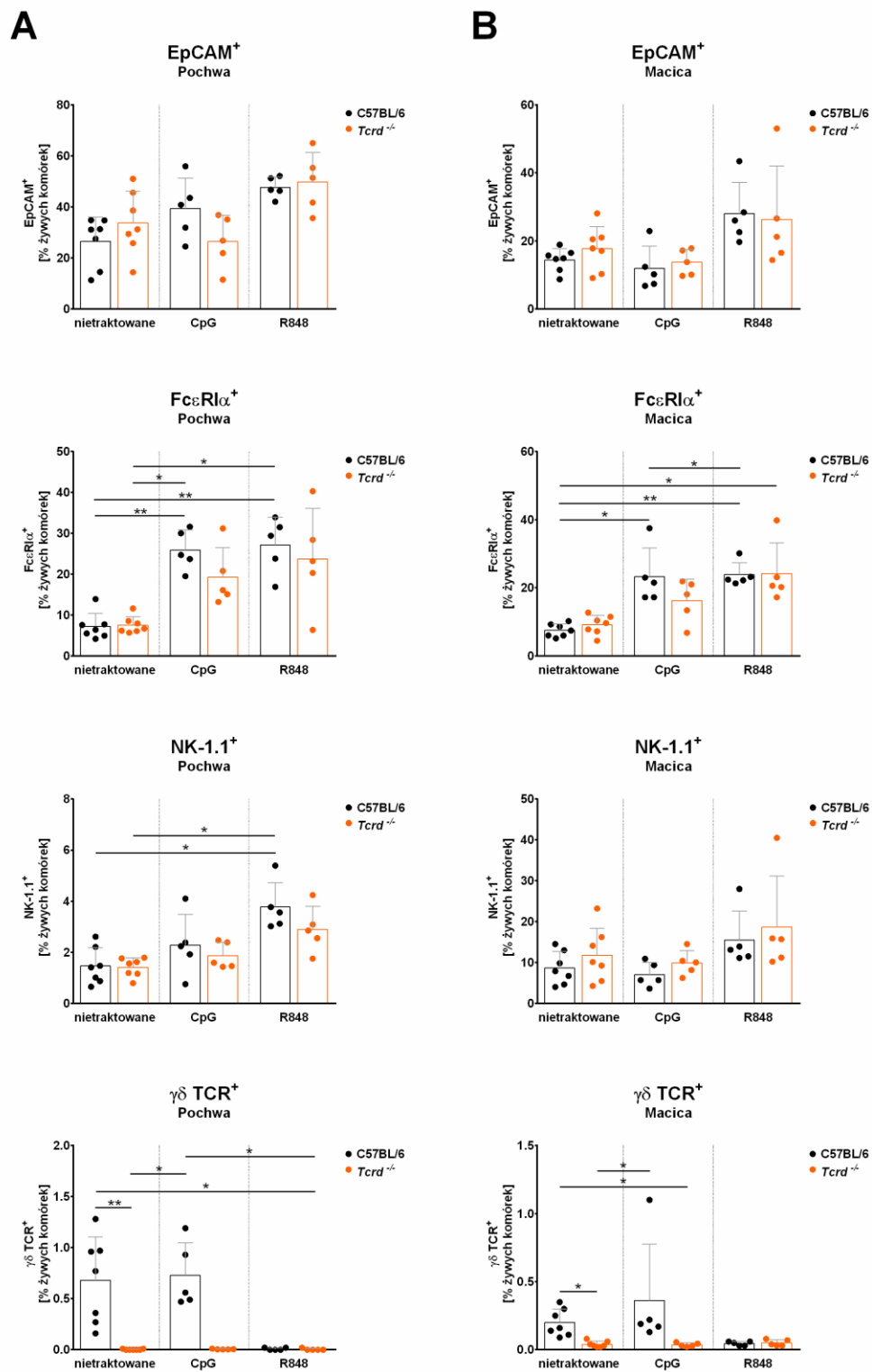
Po podaniu dopochwowym związku R848 w porównaniu do grupy kontrolnej w obu szczepach myszy stwierdzono w pochwie wzrost odsetka populacji komórek F4/80<sup>+</sup> (z około 5% do około 13%), komórek CD11c<sup>+</sup> (z około 1% do około 5%), komórek FcεRIα<sup>+</sup> (z około 7% do około 25%) oraz komórek NK-1.1<sup>+</sup> (z około 1,5% do około 3,3%). Odnotowano również tendencję wzrostową proporcji pochwowych komórek CD19<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> i EpCAM<sup>+</sup> oraz spadkową dla komórek CD11b<sup>+</sup>. Z kolei, w macicy zwiększył się udział procentowy komórek FcεRIα<sup>+</sup> (z około 8% do około 24%) a trendy wzrostu odsetka zaobserwowano w przypadku komórek CD45RB/B220<sup>+</sup> i EPCAM<sup>+</sup>. Porównując natomiast oba szczepy myszy między sobą, nie wykazano żadnych istotnych statystycznie zmian w liczebnościach badanych populacji ani w stanie podstawowym, ani pod wpływem indukcji zapalenia w obu lokalizacjach (pochwa i macica). Co ciekawe, stymulacja TLR7 spowodowała znaczny spadek udziału procentowego komórek T γδ zarówno w pochwie, jak i macicy.



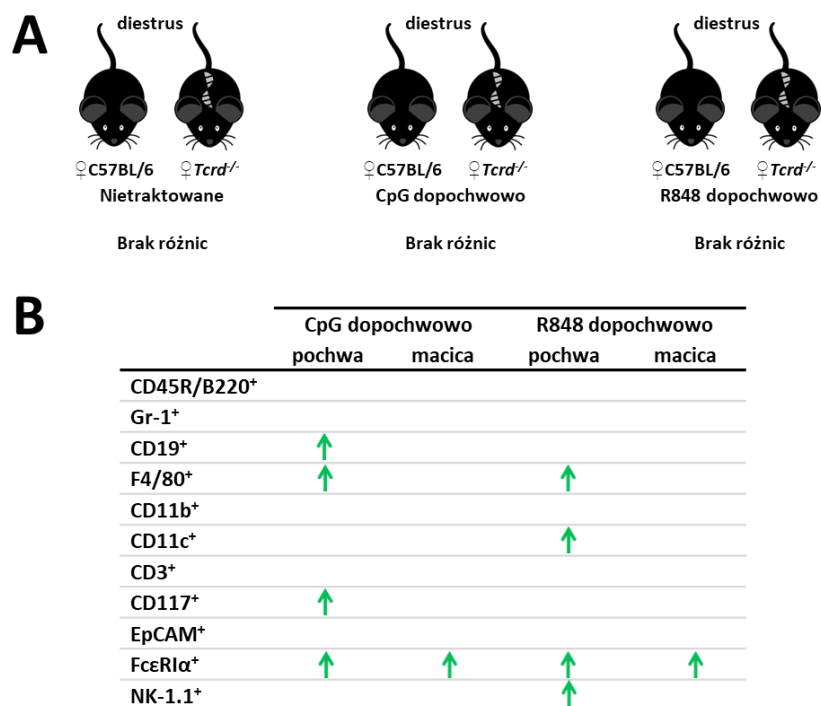
Ryc. 51. Wpływ limfocytów  $T\gamma\delta$  na populacje komórek  $CD45R/B220^+$ ,  $Gr-1^+$ ,  $CD19^+$ ,  $F4/80^+$  w pochwie i macicy.

Myszy WT (czarne kropki) i *Tcrd*<sup>-/-</sup> (pomarańczowe kropki) stymulowano dopochwowo CpG lub R848. Myszy kontrolne były nietraktowane. Pochwy i macice trawiono Liberazą TL i analizowano cytometrycznie. Kolumna (A) przedstawia analizy pochwy, kolumna (B) przedstawia analizy macicy. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Słupki przedstawiają średnią z odchyleniem standardowym. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Test Kruskala-Wallis.





Ryc. 53. Wpływ limfocytów  $T\gamma\delta$  na populację komórek  $EpCAM^+$ ,  $Fc\epsilon RI\alpha^+$ ,  $NK-1.1^+$  w pochwie i macicy. Myszy WT (czarne kropki) i  $Tcrd^{-/-}$  (pomarańczowe kropki) stymulowano dopochwowo CpG lub R848. Myszy kontrolne były nietraktowane. Pochwy i macice trawiono Liberazą TL i analizowano cytometrycznie. Kolumna (A) przedstawia analizy pochwy, kolumna (B) przedstawia analizy macicy. Każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. Słupki przedstawiają średnią z odchyleniem standardowym. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Test Kruskala-Wallis.

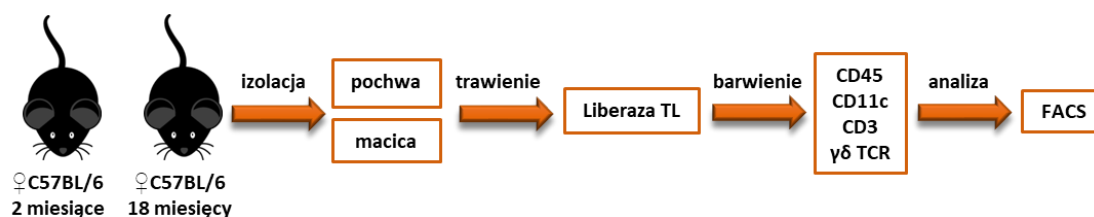


Ryc. 54. Podsumowanie wyników wpływu braku limfocytów  $T \gamma\delta$  na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy.

(A) Porównanie szczepów myszy C57BL/6 i  $Tcrd^{-/-}$  w grupie nietraktowanej oraz po podaniu dopochwowym CpG lub R848. (B) porównanie grup po podaniu dopochwowym CpG lub R848 do grupy kontrolnej – nietraktowanej.

#### 4.4. Wpływ wieku na populację limfocytów T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy

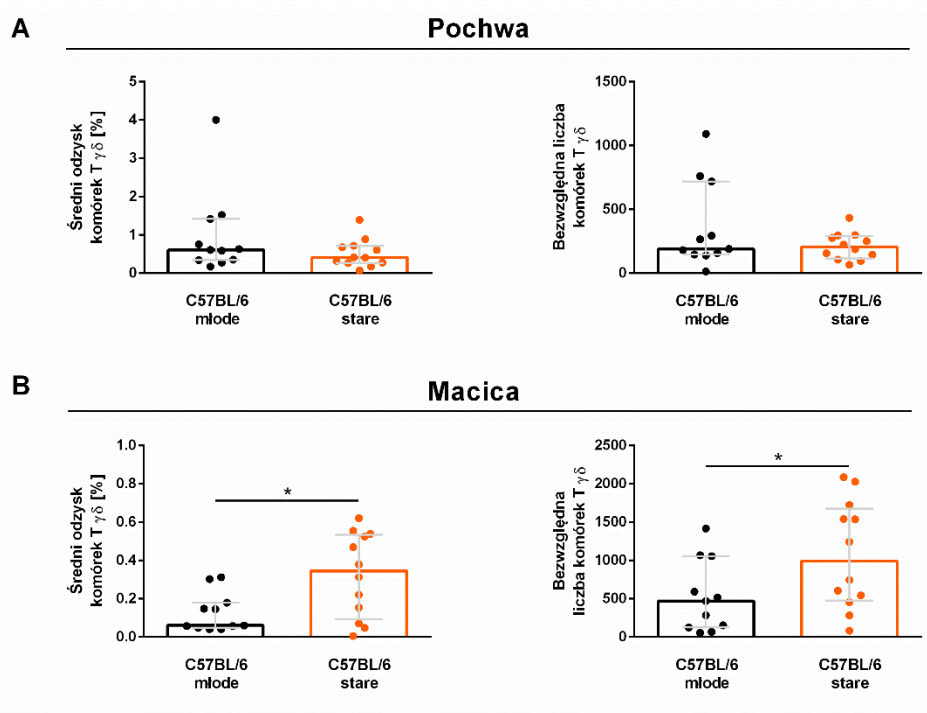
##### 4.4.1. Cytometryczna analiza ilości komórek T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy młodych i starych.



Ryc. 55. Schemat przebiegu eksperymentów określających cytometrycznie liczbę komórek T  $\gamma\delta$  w układzie rozrodczym myszy młodych i starych.

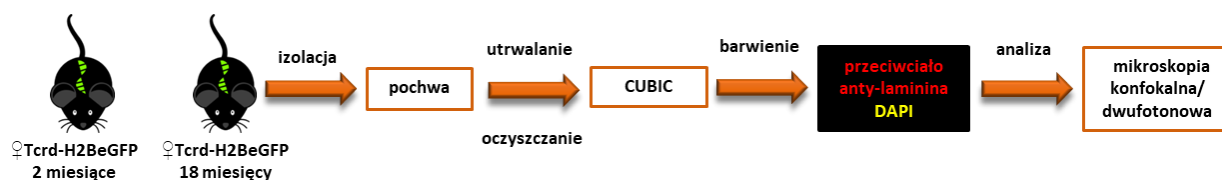
Celem eksperymentu było określenie wpływu wieku na obecność limfocytów T  $\gamma\delta$  w układzie rozrodczym myszy i porównanie liczby tych komórek w pochwie i macicy u myszy szczepu dzikiego C57BL/6. Porównano myszy młode (w wieku dwóch miesięcy, w wyindukowanej fazie diestrus) i stare (w wieku osiemnastu miesięcy). Wszystkie myszy stare były permanentnie w fazie diestrus, co zostało potwierdzone wymazem cytologicznym. Wyizolowane narządy rozrodcze były trawione liberazą TL zgodnie z wcześniej opracowanym protokołem. Następnie uzyskane komórki były badane na obecność receptora komórek T  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$  TCR), a także białek CD45 (leukocyty), CD3 $\epsilon$  (limfocyty T) i CD11c (komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty).

Nie wykazano różnic w liczbie komórek T  $\gamma\delta$  w pochwie w zależności od wieku myszy. Uzyskano 189 komórek T  $\gamma\delta$  (mediana, zakres percentylowy 25-75: 146-718) z jednej pochwy u myszy młodych i 205 komórek T  $\gamma\delta$  (mediana, zakres percentylowy 25-75: 115-291) u myszy starych (Ryc. 56A). W macicy u myszy starych nastąpił wzrost liczby komórek T  $\gamma\delta$ . Mediana bezwzględnej liczby komórek T  $\gamma\delta$  u myszy starych była ponad dwukrotnie większa (mediana 992, zakres percentylowy 25-75: 476-1677) niż w przypadku myszy młodych (mediana 468, zakres percentylowy 25-75: 122-1054) (Ryc. 56B). Udział komórek T  $\gamma\delta$  był w zakresie od 0,1% do 0,6% wszystkich izolowanych żywych komórek.



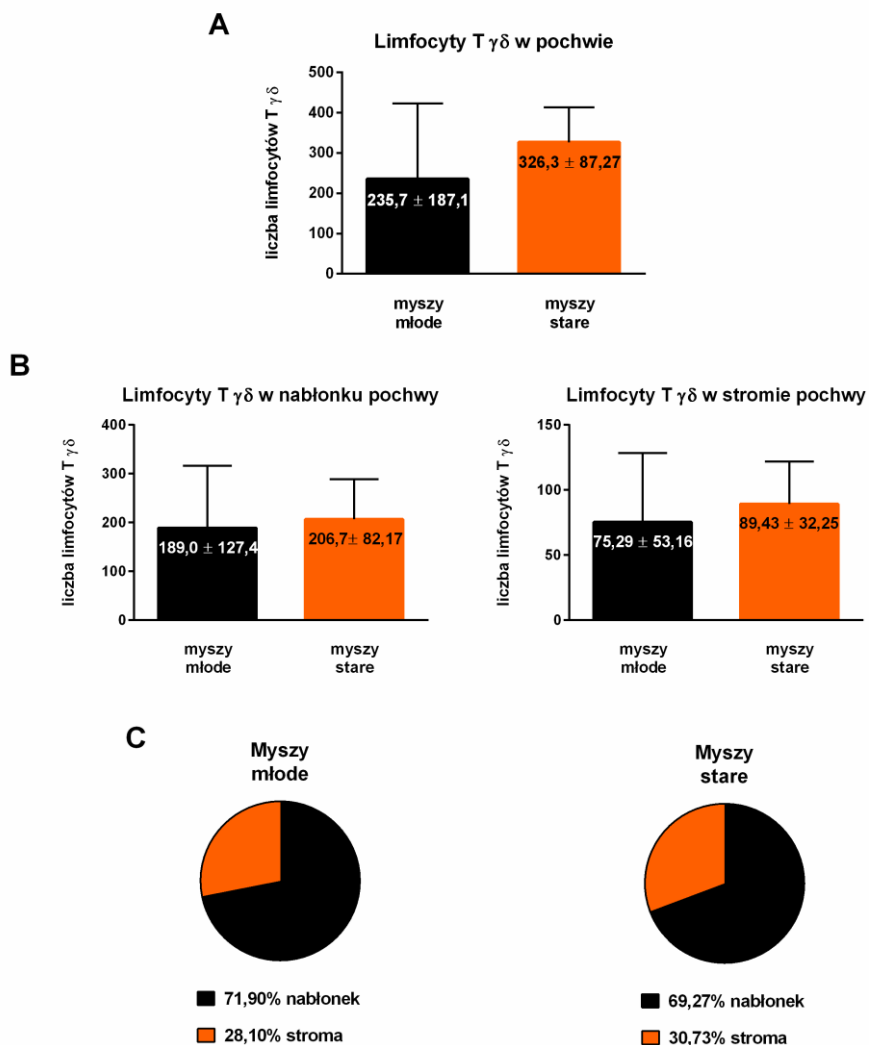
Ryc. 56. Porównanie populacji komórek T $\gamma\delta$  w pochwie i macicy u myszy C57BL/6 młodych i starych. Wyniki przedstawiono jako medianę (słupek z wąsami pokazującymi zakres percentylowy 25-75) udziału komórek T $\gamma\delta$  (procent komórek w bramce „żywe komórki”) lub bezwzględnej liczby komórek T $\gamma\delta$  w pochwie (A) i macicy (B). Każdy punkt reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; test U Manna-Whitneya.

#### 4.4.2. Mikroskopowa analiza liczby komórek T $\gamma\delta$ w pochwie myszy młodych i starych.



Ryc. 57. Schemat przebiegu eksperymentów określających mikroskopowo liczbę komórek T $\gamma\delta$  w pochwie myszy młodych i starych.

Celem eksperymentu była weryfikacja analizy cytometrycznej wpływu wieku na obecność limfocytów T $\gamma\delta$  w układzie rozrodczym myszy i porównanie liczby komórek T $\gamma\delta$  w pochwie u myszy w wieku dwóch i osiemnastu miesięcy za pomocą technik mikroskopowych. W tym celu wyizolowano pochwy myszy Tcrd-H2BeGFP, które następnie oczyszczano metodą CUBIC i analizowano zgodnie z opracowanym wcześniej protokołem.

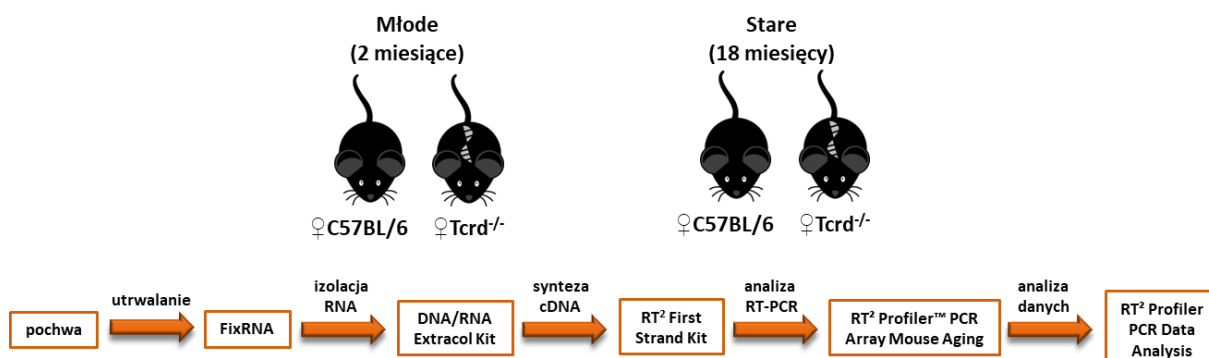


Ryc. 58. **Mikroskopowa analiza liczby komórek T  $\gamma\delta$  w pochwie myszy młodych i starych.** (A) Całkowita liczba limfocytów  $\gamma\delta$  w pochwie myszy młodych i starych (B) Liczba limfocytów T  $\gamma\delta$  w nabłonku i stromie pochwy u myszy młodych i starych. (C) Wykresy kołowe przedstawiają rozkład procentowy limfocytów T  $\gamma\delta$  w nabłonku i stromie pochwy u myszy młodych i starych. Słupki przedstawiają średnią z odchyleniem standardowym, 3 myszy na grupę, test U Manna-Whitneya.

Analiza mikroskopowa wykazała nieznaczny wzrost liczby komórek T  $\gamma\delta$  w pochwie, aczkolwiek różnica ta nie była istotna statystycznie (Ryc. 58A). W kolejnym etapie przeanalizowano dystrybucję limfocytów T  $\gamma\delta$  w nabłonku i stromie pochwy. Nie zaobserwowano zmiany liczby tych komórek w obu tych lokalizacjach w zależności od wieku myszy (Ryc. 58B). Stosunek liczby komórek T  $\gamma\delta$  zlokalizowanych w nabłonku do komórek znajdujących się w stromie pochwy pozostał stały, bliski 3:1, niezależnie od wieku myszy (Ryc. 58C).



#### 4.4.3. Analiza ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ .



Ryc. 59. Schemat przebiegu badań ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$ .

Dane przedstawione do tej pory nie wskazywały na znaczącą rolę limfocytów T  $\gamma\delta$  w kontroli immunologicznej nabłonka układu rozrodczego samic myszy. W badaniach porównawczych szczepu WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup> analizowane były jednak tylko myszy w młodym wieku. Bazując na informacji, że u myszy pozbawionych komórek T  $\gamma\delta$  w nabłonku może się pojawić zastępcza populacja limfocytów T  $\alpha\beta$ , która zanika z wiekiem (218), postanowiono poddać analizie myszy stare obu szczepów w poszukiwaniu różnic, świadczących o funkcji homeostatycznej nabłonkowych komórek T  $\gamma\delta$  w starzejącym się organizmie. W pierwszej kolejności oceniano ekspresję genów regulujących proces starzenia. Zbadano ekspresję 84 genów za pomocą zestawu RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Aging w pochwach myszy WT w porównaniu do szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup>. Porównywano myszy młode (dwumiesięczne) do myszy starych (osiemnastomiesięczne). Surowe dane (wartości Ct) otrzymane w wyniku reakcji PCR zaimportowano do programu RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis, za pomocą którego dokonano oceny profilu ekspresji genów w badanych grupach. Przyjęto poziom odcięcia tła równy 35 (Set Ct cut off = 35). Dane znormalizowano do średniej arytmetycznej genu *B2m* (najmniejsze odchylenie standardowe z pięciu genów kontrolnych). Jako granicę istotności zmian w ekspresji (tj. obniżenie lub podwyższenie jej poziomu względem grupy kontrolnej) przyjęto wartość 2 (ang. *fold regulation*, FR) oraz istotność statystyczną (test *t*-Studenta)  $p < 0,05$  (Tabela 26). Oznaczało to, że ekspresja genu musi różnić się co najmniej 2-krotnie, aby uznać, iż odbiega ona od ekspresji w grupie kontrolnej.

Tabela 26. Wyniki analizy ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$ . FR (ang. fold regulation, krotność regulacji), p – istotność statystyczna. Dane dla 3 myszy w grupie. Wytuszczone wartości dotyczą zmian  $FR > 2$  i  $< -2$ . Na czerwono zaznaczono geny, dla których  $FR > 2$  i  $p < 0,05$ . Na niebiesko zaznaczono geny, dla których  $FR < -2$  i  $p < 0,05$ .

| symbol genu    | C57BL/6 młode vs. C57BL/6 stare |       | C57BL/6 młode vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> młode |       | C57BL/6 młode vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> stare |              | C57BL/6 stare vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> młode |       | C57BL/6 stare vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> stare |       | <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> młode vs. <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> stare |              |
|----------------|---------------------------------|-------|--|-------|--|--------------|--|-------|--|-------|---|--------------|
|                | FR                              | p     | FR   | p     | FR   | p            | FR   | p     | FR   | p     | FR  | p            |
| <i>Angel2</i>  | <b>-49,64</b>                   | 0,374 | <b>-4,08</b>                                       | 0,745 | <b>-3,05</b>                                       | 0,791        | <b>12,15</b>                                       | 0,374 | <b>16,30</b>                                       | 0,374 | 1,34  | 0,992        |
| <i>Anxa3</i>   | <b>-8,48</b>                    | 0,370 | -1,03  | 0,829 | 1,52   | 0,667        | <b>8,21</b>  | 0,371 | <b>12,85</b>                                       | 0,372 | 1,57  | 0,720        |
| <i>Anxa5</i>   | <b>-6,09</b>                    | 0,368 | 1,15   | 0,625 | 1,89   | 0,435        | <b>6,98</b>  | 0,368 | <b>11,50</b>                                       | 0,366 | 1,65  | 0,634        |
| <i>Arid1a</i>  | <b>-7,21</b>                    | 0,370 | 1,13   | 0,973 | -1,32  | 0,176        | <b>8,13</b>  | 0,370 | <b>5,45</b>  | 0,372 | -1,49   | 0,422        |
| <i>Arl6ip6</i> | <b>-7,19</b>                    | 0,369 | 1,27   | 0,608 | -1,59  | 0,142        | <b>9,17</b>  | 0,368 | <b>4,53</b>  | 0,372 | <b>-2,02</b>  | 0,136        |
| <i>Bub1b</i>   | <b>-12,15</b>                   | 0,374 | -1,01  | 0,734 | 1,24   | 0,633        | <b>11,99</b>                                       | 0,374 | <b>15,03</b>                                       | 0,374 | 1,25  | 0,575        |
| <i>C1qa</i>    | <b>2,51</b>                     | 0,803 | -1,26  | 0,436 | <b>3,00</b>  | 0,160        | <b>-3,16</b>                                       | 0,956 | 1,19   | 0,400 | <b>3,78</b>   | 0,077        |
| <i>C1qb</i>    | <b>-17,43</b>                   | 0,372 | -1,91  | 0,401 | <b>2,19</b>  | 0,239        | <b>9,11</b>  | 0,373 | <b>38,23</b>                                       | 0,371 | <b>4,20</b>   | <b>0,048</b> |
| <i>C1qc</i>    | <b>-2,04</b>                    | 0,185 | -1,53  | 0,271 | <b>2,56</b>  | 0,083        | 1,33   | 0,384 | <b>5,22</b>  | 0,058 | <b>3,91</b>   | <b>0,014</b> |
| <i>C1s1</i>    | <b>-21,91</b>                   | 0,368 | -1,55  | 0,148 | -1,25  | 0,482        | <b>14,16</b>                                       | 0,369 | <b>17,47</b>                                       | 0,370 | 1,23  | 0,769        |
| <i>C3</i>      | <b>-3,65</b>                    | 0,376 | <b>-6,70</b>                                       | 0,142 | <b>-4,03</b>                                       | 0,578        | -1,84  | 0,388 | -1,10  | 0,382 | 1,66  | 0,474        |
| <i>C3ar1</i>   | <b>-30,55</b>                   | 0,374 | -1,95  | 0,199 | 1,49   | 0,281        | <b>15,63</b>                                       | 0,374 | <b>45,57</b>                                       | 0,374 | <b>2,91</b>   | <b>0,012</b> |
| <i>C4a</i>     | <b>-5,76</b>                    | 0,376 | -1,04  | 0,700 | -1,79  | 0,458        | <b>5,54</b>  | 0,375 | <b>3,23</b>  | 0,381 | -1,72   | 0,370        |
| <i>C4b</i>     | <b>-25,99</b>                   | 0,324 | -1,64  | 0,317 | -1,76  | 0,433        | <b>15,89</b>                                       | 0,326 | <b>14,76</b>                                       | 0,330 | -1,08   | 0,605        |
| <i>C5ar1</i>   | <b>-6,35</b>                    | 0,369 | <b>-2,61</b>                                       | 0,276 | <b>-3,82</b>                                       | 0,077        | <b>2,43</b>  | 0,403 | 1,66   | 0,407 | -1,46   | 0,892        |
| <i>Calb1</i>   | <b>-9,92</b>                    | 0,373 | 1,19   | 0,866 | <b>-4,39</b>                                       | 0,208        | <b>11,82</b>                                       | 0,373 | <b>2,26</b>  | 0,383 | <b>-5,23</b>  | 0,205        |
| <i>Casp1</i>   | <b>-2,14</b>                    | 0,280 | -1,06  | 0,884 | <b>-4,70</b>                                       | 0,258        | <b>2,02</b>  | 0,293 | <b>-2,20</b>                                       | 0,425 | <b>-4,45</b>  | 0,262        |
| <i>Ccr1</i>    | <b>-4,25</b>                    | 0,372 | -1,47  | 0,414 | <b>-3,45</b>                                       | 0,121        | <b>2,88</b>  | 0,412 | 1,23   | 0,457 | <b>-2,34</b>  | 0,514        |
| <i>Cd14</i>    | <b>-3,10</b>                    | 0,584 | -1,06  | 0,399 | <b>-7,53</b>                                       | 0,134        | <b>2,91</b>  | 0,645 | <b>-2,43</b>                                       | 0,250 | <b>-7,08</b>  | 0,531        |
| <i>Cd163</i>   | <b>-20,68</b>                   | 0,370 | -1,37  | 0,146 | -1,82  | 0,231        | <b>15,10</b>                                       | 0,370 | <b>11,39</b>                                       | 0,371 | -1,33   | 0,402        |
| <i>Cdkn1c</i>  | <b>-5,54</b>                    | 0,369 | -1,01  | 0,835 | <b>2,83</b>  | <b>0,036</b> | <b>5,48</b>  | 0,370 | <b>15,71</b>                                       | 0,360 | <b>2,87</b>   | 0,100        |
| <i>Cfh</i>     | <b>-3,68</b>                    | 0,089 | -1,55  | 0,131 | -1,19  | 0,562        | <b>2,38</b>  | 0,132 | <b>3,08</b>  | 0,105 | 1,30  | 0,356        |
| <i>Cfhr1</i>   | <b>-7,18</b>                    | 0,372 | 1,19   | 0,866 | <b>-4,39</b>                                       | 0,208        | <b>8,55</b>  | 0,371 | 1,64   | 0,400 | <b>-5,23</b>  | 0,205        |
| <i>Clu</i>     | 1,74                            | 0,385 | 1,06   | 0,833 | <b>4,41</b>  | <b>0,031</b> | -1,64  | 0,471 | <b>2,53</b>  | 0,316 | <b>4,15</b>   | <b>0,047</b> |
| <i>Cx3cl1</i>  | <b>-2,89</b>                    | 0,383 | -1,33  | 0,538 | <b>2,08</b>  | 0,134        | <b>2,17</b>  | 0,389 | <b>6,02</b>  | 0,372 | <b>2,77</b>   | 0,111        |
| <i>Cxcl16</i>  | -1,36                           | 0,592 | -1,56  | 0,357 | -1,10  | 0,743        | -1,15  | 0,802 | 1,23   | 0,921 | 1,41  | 0,763        |
| <i>Elavl1</i>  | <b>-3,11</b>                    | 0,242 | -1,14  | 0,636 | 1,01   | 0,626        | <b>2,73</b>  | 0,260 | <b>3,15</b>  | 0,285 | 1,15  | 0,817        |
| <i>Elp3</i>    | <b>-2,91</b>                    | 0,259 | 1,11   | 0,999 | 1,94   | 0,842        | <b>3,25</b>  | 0,261 | <b>5,66</b>  | 0,254 | 1,74  | 0,872        |
| <i>Em11</i>    | -1,82                           | 0,339 | <b>3,56</b>  | 0,271 | <b>2,04</b>  | 0,250        | <b>6,47</b>  | 0,284 | <b>3,71</b>  | 0,288 | -1,74   | 0,930        |
| <i>Ep300</i>   | <b>-3,04</b>                    | 0,322 | 1,41   | 0,704 | 1,64   | 0,917        | <b>4,30</b>  | 0,313 | <b>4,97</b>  | 0,328 | 1,16  | 0,760        |
| <i>Fbxl16</i>  | <b>-19,93</b>                   | 0,366 | 1,22   | 0,915 | <b>-3,30</b>                                       | 0,216        | <b>24,36</b>                                       | 0,366 | <b>6,03</b>  | 0,371 | <b>-4,04</b>  | 0,213        |
| <i>Fcer1g</i>  | <b>-8,17</b>                    | 0,371 | -1,16  | 0,610 | -1,72  | 0,254        | <b>7,01</b>  | 0,372 | <b>4,75</b>  | 0,374 | -1,48   | 0,417        |
| <i>Fcgbp</i>   | <b>2,78</b>                     | 0,727 | 1,29   | 0,480 | <b>8,24</b>  | 0,122        | <b>-2,16</b>                                       | 0,602 | <b>2,96</b>  | 0,427 | <b>6,41</b>   | 0,134        |
| <i>Fcgr1</i>   | <b>-7,80</b>                    | 0,373 | -1,15  | 0,632 | 1,47   | 0,437        | <b>6,79</b>  | 0,373 | <b>11,45</b>                                       | 0,372 | 1,69  | 0,277        |
| <i>Fcgr2b</i>  | 1,09                            | 0,421 | -1,61  | 0,099 | -1,02  | 0,686        | -1,75  | 0,491 | -1,11  | 0,465 | 1,57  | 0,747        |
| <i>Fcgr3</i>   | <b>-2,99</b>                    | 0,154 | -1,40  | 0,300 | -1,24  | 0,392        | <b>2,14</b>  | 0,241 | <b>2,41</b>  | 0,266 | 1,13  | 0,934        |
| <i>Foxo1</i>   | <b>-2,56</b>                    | 0,323 | 1,01   | 0,907 | -1,01  | 0,643        | <b>2,59</b>  | 0,327 | <b>2,54</b>  | 0,365 | -1,02   | 0,686        |
| <i>Gfap</i>    | <b>-4,94</b>                    | 0,310 | 1,10   | 0,936 | -1,82  | 0,328        | <b>5,43</b>  | 0,312 | <b>2,72</b>  | 0,348 | -2,00   | 0,388        |

|                 |               |              |              |       |                |              |              |       |               |              |               |              |
|-----------------|---------------|--------------|--------------|-------|----------------|--------------|--------------|-------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| <i>Gsta1</i>    | <b>-3,01</b>  | 0,150        | <b>2,44</b>  | 0,090 | <b>-2,96</b>   | 0,212        | <b>7,34</b>  | 0,126 | 1,02          | 0,353        | <b>-7,23</b>  | 0,140        |
| <i>Hsf1</i>     | <b>-4,55</b>  | 0,334        | 1,03         | 0,933 | 1,82           | 0,944        | <b>4,68</b>  | 0,334 | <b>8,26</b>   | 0,333        | 1,77          | 0,917        |
| <i>Jakmip3</i>  | <b>-20,49</b> | 0,373        | 1,19         | 0,866 | <b>-4,39</b>   | 0,208        | <b>24,42</b> | 0,373 | <b>4,67</b>   | 0,375        | <b>-5,23</b>  | 0,205        |
| <i>Lmna</i>     | <b>-2,04</b>  | 0,200        | 1,63         | 0,168 | <b>4,18</b>    | 0,990        | <b>3,32</b>  | 0,167 | <b>8,51</b>   | 0,218        | <b>2,57</b>   | 0,676        |
| <i>Lmnb1</i>    | -1,10         | 0,474        | 1,95         | 0,739 | <b>2,10</b>    | 0,734        | <b>2,15</b>  | 0,432 | <b>2,31</b>   | 0,431        | 1,08          | 0,993        |
| <i>Lmnb2</i>    | <b>-9,19</b>  | 0,370        | 1,05         | 0,966 | <b>-4,32</b>   | 0,210        | <b>9,65</b>  | 0,370 | <b>2,13</b>   | 0,390        | <b>-4,53</b>  | 0,212        |
| <i>Lsm5</i>     | -1,29         | 0,371        | 1,40         | 0,127 | <b>-3,21</b>   | 0,346        | 1,80         | 0,213 | <b>-2,50</b>  | 0,402        | <b>-4,50</b>  | 0,325        |
| <i>Ltf</i>      | 1,96          | 0,333        | -1,53        | 0,298 | <b>-2,20</b>   | <b>0,029</b> | <b>-3,00</b> | 0,098 | <b>-4,33</b>  | <b>0,009</b> | -1,44         | 0,221        |
| <i>Mbp</i>      | -1,79         | 0,284        | 1,38         | 0,230 | 1,83           | 0,823        | <b>2,47</b>  | 0,251 | <b>3,28</b>   | 0,276        | 1,33          | 0,798        |
| <i>Mrpl43</i>   | <b>-3,68</b>  | 0,375        | 1,01         | 0,959 | 1,19           | 0,640        | <b>3,71</b>  | 0,375 | <b>4,38</b>   | 0,382        | 1,18          | 0,652        |
| <i>Ndufb11</i>  | -1,29         | 0,415        | 1,09         | 0,613 | -1,75          | 0,061        | 1,40         | 0,347 | -1,36         | 0,942        | -1,90         | <b>0,027</b> |
| <i>Panx1</i>    | <b>-3,61</b>  | 0,241        | 1,04         | 0,981 | 1,54           | 0,975        | <b>3,73</b>  | 0,242 | <b>5,55</b>   | 0,247        | 1,49          | 0,984        |
| <i>Pdcd6</i>    | -1,36         | 0,428        | 1,30         | 0,491 | -1,11          | 0,583        | 1,76         | 0,359 | 1,22          | 0,692        | -1,44         | 0,453        |
| <i>Phf3</i>     | <b>-4,06</b>  | 0,340        | 1,01         | 0,874 | -1,00          | 0,657        | <b>4,10</b>  | 0,342 | <b>4,06</b>   | 0,350        | -1,01         | 0,736        |
| <i>Polrmt</i>   | 1,23          | 0,582        | 1,12         | 0,851 | 1,15           | 0,907        | -1,10        | 0,564 | -1,07         | 0,620        | 1,03          | 0,836        |
| <i>Pot1a</i>    | 1,80          | 0,437        | 1,16         | 0,788 | 1,62           | 0,988        | -1,56        | 0,430 | -1,11         | 0,439        | 1,40          | 0,887        |
| <i>Rap1a</i>    | <b>-3,43</b>  | 0,313        | 1,22         | 0,437 | -1,82          | 0,181        | <b>4,20</b>  | 0,304 | 1,89          | 0,372        | <b>-2,22</b>  | 0,135        |
| <i>Rnf144b</i>  | <b>2,20</b>   | 0,612        | 1,69         | 0,181 | 1,18           | 0,565        | -1,30        | 0,489 | -1,87         | 0,836        | -1,43         | 0,354        |
| <i>S100a8</i>   | <b>-7,08</b>  | 0,277        | <b>-2,00</b> | 0,386 | <b>-133,13</b> | 0,150        | <b>3,53</b>  | 0,410 | <b>-18,81</b> | 0,169        | <b>-66,41</b> | 0,155        |
| <i>S100a9</i>   | <b>-7,96</b>  | <b>0,045</b> | -1,63        | 0,421 | <b>-67,81</b>  | 0,156        | <b>4,88</b>  | 0,322 | <b>-8,51</b>  | 0,182        | <b>-41,55</b> | 0,166        |
| <i>Scn2b</i>    | <b>-4,51</b>  | 0,167        | -1,02        | 0,946 | <b>-2,06</b>   | 0,233        | <b>4,42</b>  | 0,163 | <b>2,19</b>   | 0,217        | <b>-2,01</b>  | 0,142        |
| <i>Sirt1</i>    | <b>-3,87</b>  | 0,297        | 1,14         | 0,544 | 1,28           | 0,995        | <b>4,41</b>  | 0,291 | <b>4,96</b>   | 0,298        | 1,13          | 0,808        |
| <i>Sirt3</i>    | <b>-2,80</b>  | 0,327        | -1,06        | 0,707 | 1,79           | 0,168        | <b>2,65</b>  | 0,337 | <b>5,00</b>   | 0,301        | 1,89          | 0,239        |
| <i>Sirt6</i>    | <b>-4,15</b>  | 0,316        | -1,00        | 0,987 | 1,17           | 0,881        | <b>4,14</b>  | 0,316 | <b>4,87</b>   | 0,320        | 1,18          | 0,875        |
| <i>Smad2</i>    | -1,03         | 0,558        | 1,33         | 0,557 | 1,11           | 0,742        | 1,37         | 0,496 | 1,14          | 0,672        | -1,19         | 0,582        |
| <i>Snap23</i>   | -1,56         | 0,293        | -1,08        | 0,648 | -1,08          | 0,590        | 1,45         | 0,347 | 1,45          | 0,557        | -1,00         | 0,708        |
| <i>Terf1</i>    | 1,69          | 0,881        | 1,11         | 0,908 | -1,07          | 0,702        | -1,53        | 0,856 | -1,82         | 0,997        | -1,19         | 0,703        |
| <i>Terf2</i>    | 1,08          | 0,628        | 1,07         | 0,969 | 1,69           | 0,873        | -1,01        | 0,645 | 1,57          | 0,611        | 1,58          | 0,875        |
| <i>Tfam</i>     | -1,99         | 0,198        | 1,10         | 0,891 | -1,37          | 0,260        | <b>2,18</b>  | 0,196 | 1,45          | 0,315        | -1,51         | 0,300        |
| <i>Tfb1m</i>    | <b>-2,80</b>  | 0,239        | -1,00        | 0,823 | 1,32           | 0,905        | <b>2,78</b>  | 0,246 | <b>3,69</b>   | 0,237        | 1,33          | 0,815        |
| <i>Tfb2m</i>    | <b>-2,96</b>  | 0,213        | 1,09         | 0,950 | 1,75           | 0,854        | <b>3,21</b>  | 0,213 | <b>5,18</b>   | 0,236        | 1,61          | 0,845        |
| <i>Tinf2</i>    | <b>-2,14</b>  | 0,232        | 1,08         | 0,951 | 1,88           | 0,681        | <b>2,32</b>  | 0,232 | <b>4,03</b>   | 0,214        | 1,74          | 0,744        |
| <i>Tlr2</i>     | <b>-18,64</b> | 0,345        | <b>-7,46</b> | 0,201 | <b>-7,18</b>   | 0,156        | <b>2,50</b>  | 0,389 | <b>2,60</b>   | 0,393        | 1,04          | 0,919        |
| <i>Tlr4</i>     | -1,07         | 0,633        | 1,08         | 0,967 | 1,32           | 0,694        | 1,16         | 0,638 | 1,41          | 0,951        | 1,22          | 0,697        |
| <i>Tmem135</i>  | <b>-4,52</b>  | 0,345        | 1,34         | 0,559 | <b>2,03</b>    | 0,701        | <b>6,08</b>  | 0,340 | <b>9,17</b>   | 0,340        | 1,51          | 0,995        |
| <i>Tmem33</i>   | -1,18         | 0,506        | -1,09        | 0,681 | <b>-2,95</b>   | 0,268        | 1,09         | 0,558 | <b>-2,50</b>  | 0,512        | <b>-2,71</b>  | 0,286        |
| <i>Tollip</i>   | <b>-4,43</b>  | 0,327        | 1,33         | 0,503 | 1,98           | 0,922        | <b>5,90</b>  | 0,322 | <b>8,77</b>   | 0,329        | 1,49          | 0,733        |
| <i>Tpp1</i>     | -1,31         | 0,471        | -1,03        | 0,792 | <b>2,10</b>    | 0,972        | 1,27         | 0,510 | <b>2,74</b>   | 0,508        | <b>2,15</b>   | 0,924        |
| <i>Txnip</i>    | <b>2,03</b>   | 0,776        | -1,05        | 0,747 | <b>2,11</b>    | 0,362        | <b>-2,13</b> | 0,667 | 1,04          | 0,822        | <b>2,22</b>   | 0,381        |
| <i>Vps13c</i>   | -1,68         | 0,240        | -1,06        | 0,728 | 1,32           | 0,679        | 1,58         | 0,345 | <b>2,21</b>   | 0,211        | 1,40          | 0,576        |
| <i>Vwa5a</i>    | -1,46         | 0,445        | -1,15        | 0,561 | 1,23           | 0,749        | 1,27         | 0,542 | 1,80          | 0,571        | 1,42          | 0,996        |
| <i>Wrn</i>      | <b>-4,59</b>  | 0,346        | -1,04        | 0,751 | 1,51           | 0,883        | <b>4,44</b>  | 0,348 | <b>6,93</b>   | 0,344        | 1,56          | 0,759        |
| <i>Zbtb10</i>   | 1,02          | 0,562        | -1,25        | 0,449 | -1,17          | 0,578        | -1,27        | 0,678 | -1,19         | 0,649        | 1,06          | 0,869        |
| <i>Zfp9</i>     | -1,37         | 0,436        | 1,02         | 0,936 | <b>2,08</b>    | 0,344        | 1,39         | 0,428 | <b>2,85</b>   | 0,312        | <b>2,04</b>   | 0,367        |
| <i>Zfr</i>      | <b>-2,10</b>  | 0,280        | 1,19         | 0,550 | <b>-2,92</b>   | 0,333        | <b>2,50</b>  | 0,250 | -1,39         | 0,604        | <b>-3,47</b>  | 0,319        |
| <i>Zmpste24</i> | -1,28         | 0,495        | -1,19        | 0,572 | <b>-3,96</b>   | 0,292        | 1,08         | 0,561 | <b>-3,10</b>  | 0,425        | <b>-3,33</b>  | 0,307        |

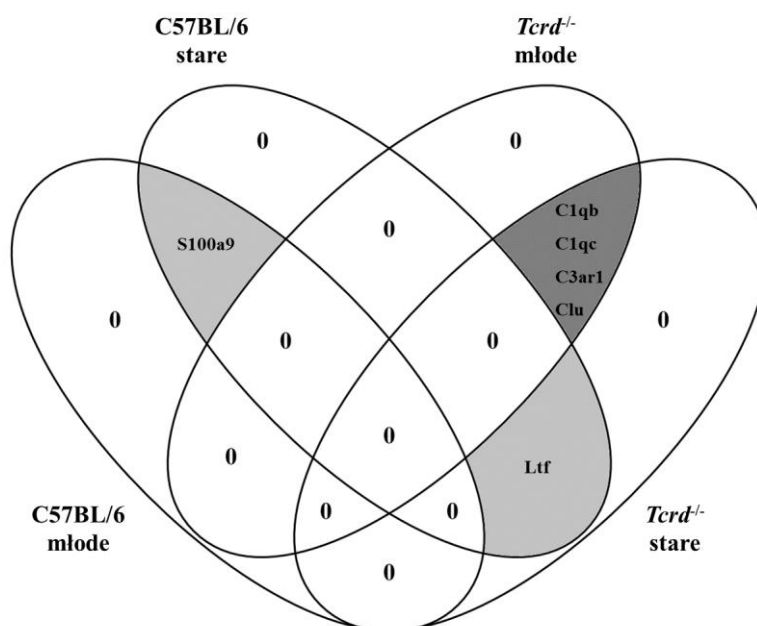
Tabela 27. Podsumowanie analizy ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$ . FR (ang. fold regulation, krotność regulacji), p – istotność statystyczna. Na czerwono zaznaczono geny, dla których  $FR > 2$  i  $p < 0,05$ . Na niebiesko zaznaczono geny, dla których  $FR < -2$  i  $p < 0,05$ .

| symbol genu   | C57BL/6 młode<br>vs.<br><i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> młode |       | C57BL/6 stare<br>vs.<br><i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> stare |              | C57BL/6 młode<br>vs.<br>C57BL/6 stare |              | <i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> młode<br>vs.<br><i>Tcrd</i> <sup>-/-</sup> stare |              |
|---------------|--|-------|--|--------------|---------------------------------------|--------------|---|--------------|
|               | FR   | p     | FR   | p            | FR                                    | p            | FR  | p            |
| <i>C1qb</i>   | -1,91  | 0,401 | <b>38,23</b>   | 0,371        | <b>-17,43</b>                         | 0,372        | <b>4,20</b>   | <b>0,048</b> |
| <i>C1qc</i>   | -1,53  | 0,271 | <b>5,22</b>  | 0,058        | <b>-2,04</b>                          | 0,185        | <b>3,91</b>   | <b>0,014</b> |
| <i>C3ar1</i>  | -1,95  | 0,199 | <b>45,57</b>   | 0,374        | <b>-30,55</b>                         | 0,374        | <b>2,91</b>   | <b>0,012</b> |
| <i>Clu</i>    | 1,06   | 0,833 | <b>2,53</b>  | 0,316        | 1,74                                  | 0,385        | <b>4,15</b>   | <b>0,047</b> |
| <i>Ltf</i>    | -1,53  | 0,298 | <b>-4,33</b>   | <b>0,009</b> | 1,96                                  | 0,333        | -1,44   | 0,221        |
| <i>S100a9</i> | -1,63  | 0,421 | <b>-8,51</b>   | 0,182        | <b>-7,96</b>                          | <b>0,045</b> | <b>-41,55</b>   | 0,166        |

Porównując myszy szczepu dzikiego do myszy z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w tym samych grupach wiekowych, u myszy młodych nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji badanych genów. Natomiast analizując myszy stare, wykazano spadek ekspresji genu *Ltf* (laktotransferyna) w szczepie *Tcrd*<sup>-/-</sup>.

W przypadku analiz w obrębie szczepu dzikiego wiek wpłynął na ekspresję jednego genu. U myszy starych wykazano spadek ekspresji genu kalgranuliny B (*S100a9*, S100 białko wiążące wapń A9).

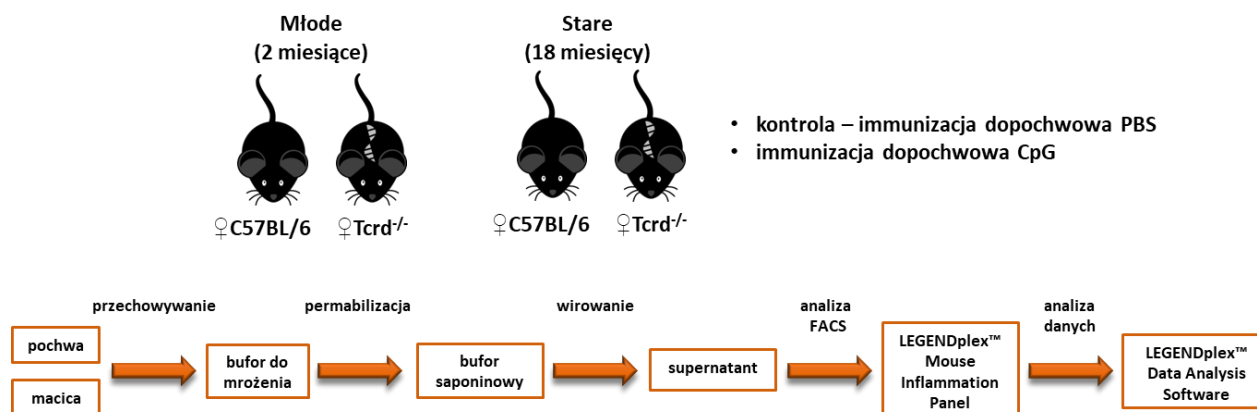
Proces starzenia u myszy z delecją komórek T  $\gamma\delta$  zmienił ekspresję czterech genów. Analiza wykazała podwyższenie poziomu ekspresji genów, które są składnikami układu dopełniacza: (*C1qb*, *C1qc* i *C3ar1*) oraz genu kodującego klasterynę (*Clu*).



Ryc. 60. Diagram Venna przedstawiający związek między ekspresją genów w pochwie regulujących proces starzenia u myszy WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup>.

Opracowano przy użyciu <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams).

#### 4.4.4. Pomiar zawartości cytokin w pochwach i macicach w zdrowej tkance oraz po indukcji zapalenia nabłonka w zależności od obecności T $\gamma\delta$ i wieku myszy.



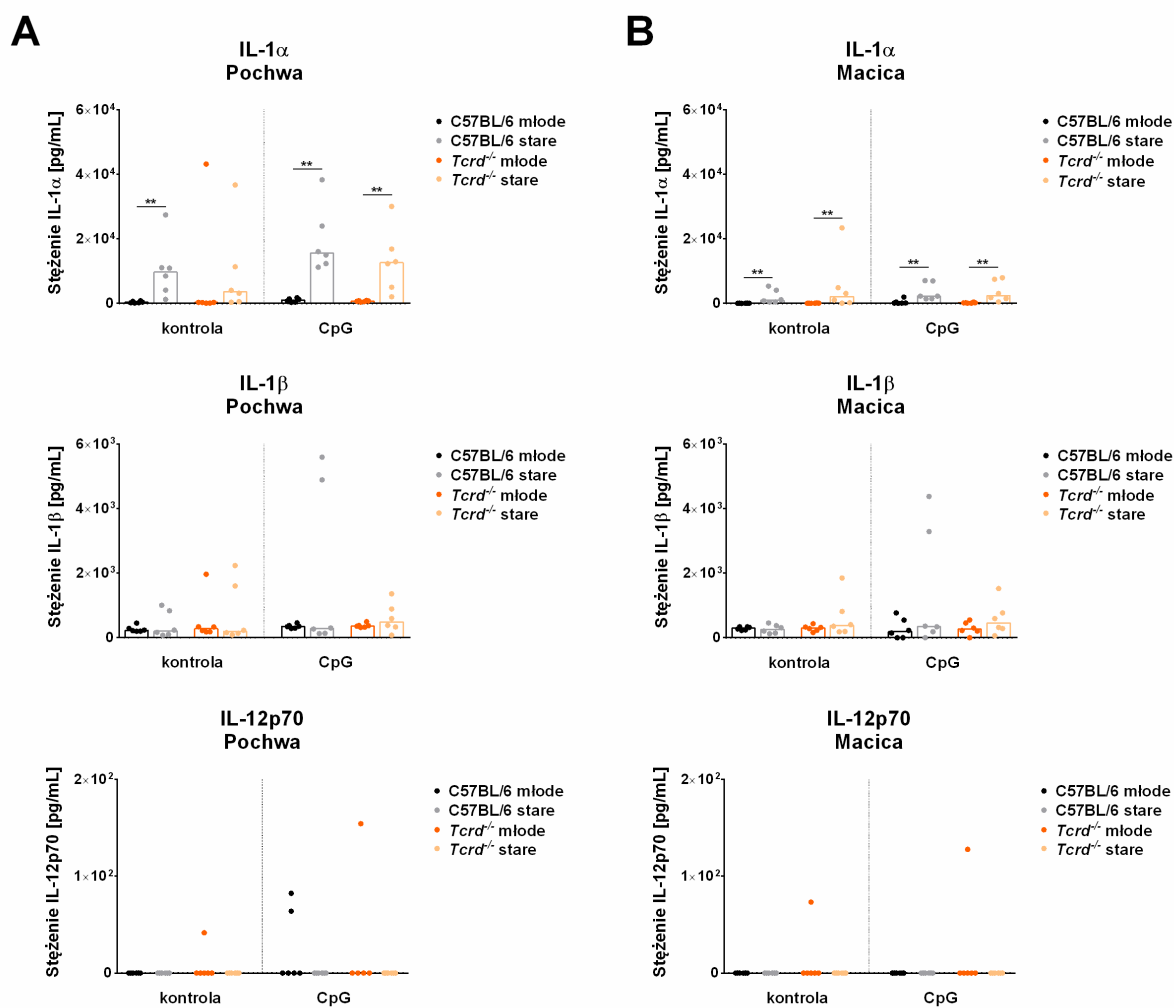
Ryc. 61. Schemat przebiegu eksperymentów określających poziom cytokin w pochwach i macicach w zdrowej tkance oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w zależności od wieku myszy.

W eksperymencie oceniano wpływ wieku oraz obecności komórek T  $\gamma\delta$  na stężenie cytokin odpowiadających za kontrolę procesów zapalnych, co miało wykazać potencjalną rolę tych limfocytów w regulacji zapalenia w procesie starzenia. Oddzielnie przebadano zdrową tkankę (stan podstawowy) oraz tkankę po wywołaniu zapalenia nabłonka po dopochwowym podaniu

agonisty receptora TLR9 – CpG. Po 24 godzinach od stymulacji CpG od myszy WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup> pobierano pochwy i macice, w których po permeabilizacji badano 13 cytokin za pomocą zestawu LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel. Próbki analizowano na cytometrze Canto II, a stężenia badanych cytokin obliczano w programie LEGENDplex™ Data Analysis Software dostarczonym przez producenta zestawu. Stężenia cytokin przedstawiono na kolejnych rycinach (Ryc. 62-65).

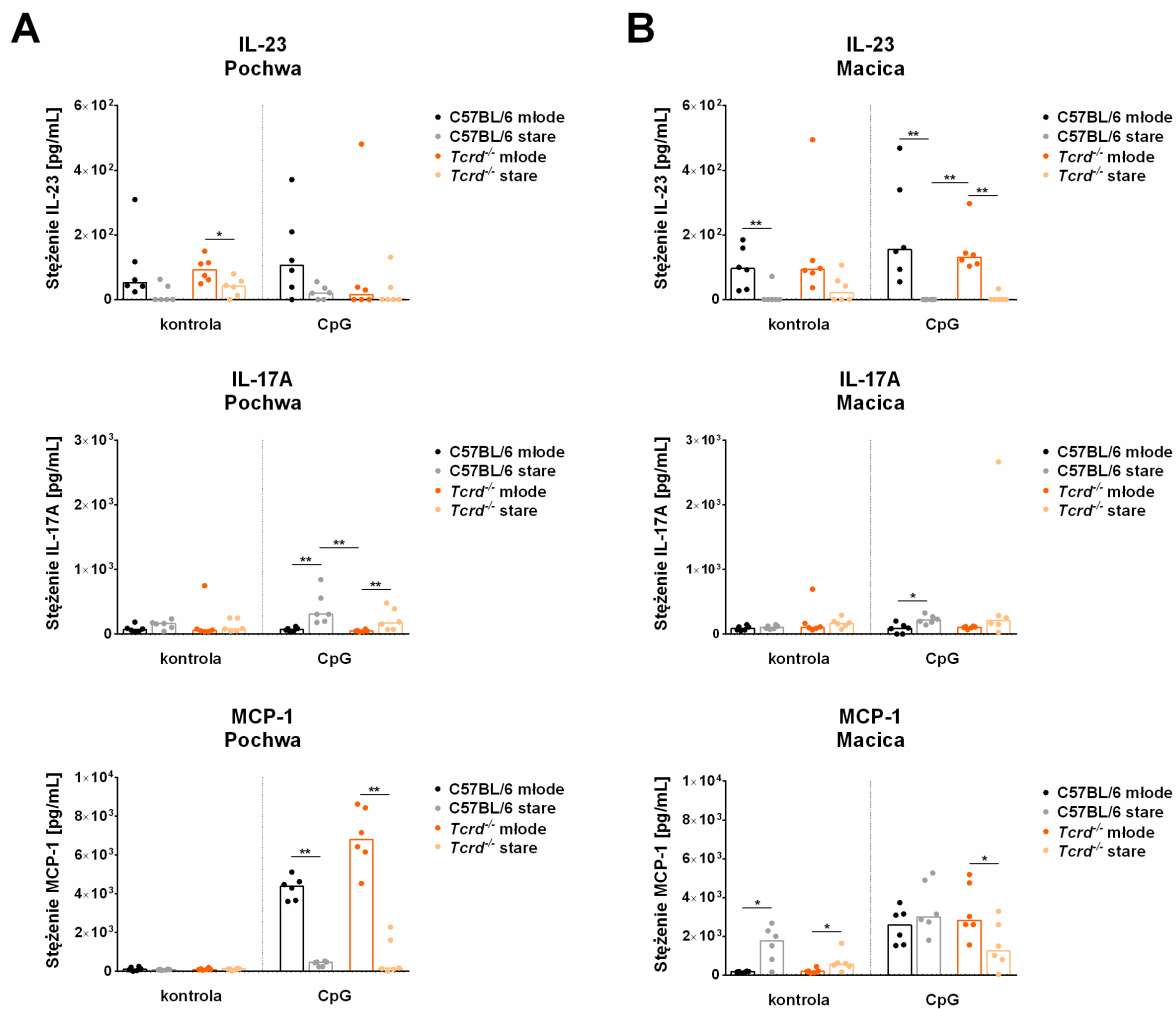
U myszy starych zaobserwowano wzrost stężenia IL-1 $\alpha$  i spadek IL-23 w pochwie w stanie podstawowym, a także po indukcji zapalenia nabłonka w porównaniu z myszami młodszymi. Brak limfocytów T  $\gamma\delta$  nie miał wpływu na obie cytokiny. Dodatkowo, u myszy starych obu szczepów w stanie podstawowym w pochwie nastąpił spadek stężenia IL-27 i IFN- $\beta$ , a po indukcji zapalenia wzrosło stężenie IL-17A i zmalał poziom IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10, IL-6 i IL-27. Tylko u starych myszy *Tcrd*<sup>-/-</sup> odnotowano zwiększone poziomy GM-CSF pod wpływem CpG. Z kolei u myszy WT stężenie tej cytokiny w tkance niestymulowanej malało wraz z wiekiem.

W macicy, podobnie jak w pochwie, wraz z wiekiem wykazano zwiększenie stężenia IL-1 $\alpha$  oraz obniżenie IL-10 i IL-23 w stanie podstawowym i po podaniu CpG w obu szczepach myszy. Pod wpływem zapalenia nieznacznie wzrosło stężenie IL-17A i spadł poziom IFN- $\gamma$  u starych myszy WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup>. Zaobserwowano również spadki poziomów IFN- $\beta$  i IL-27 pod wpływem wieku w stanie podstawowym, które pogłębiły się w tkance z zapaleniem, podczas gdy MCP-1 w tych samych warunkach uległo zwiększonej produkcji. Zmiany zależne od obecności komórek T  $\gamma\delta$  wykazano jedynie w przypadku indukcji zapalenia nabłonka w macicy: u starych myszy brak limfocytów T  $\gamma\delta$  spowodował spadek stężenia MCP-1 i wzrost GM-CSF. Stężenia pozostałych trzech badanych cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-12p70 i IL-1 $\beta$  zasadniczo nie zmieniały się.



Ryc. 62. Poziom stężenia cytokin IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-12p70 w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w zależności od wieku myszy.

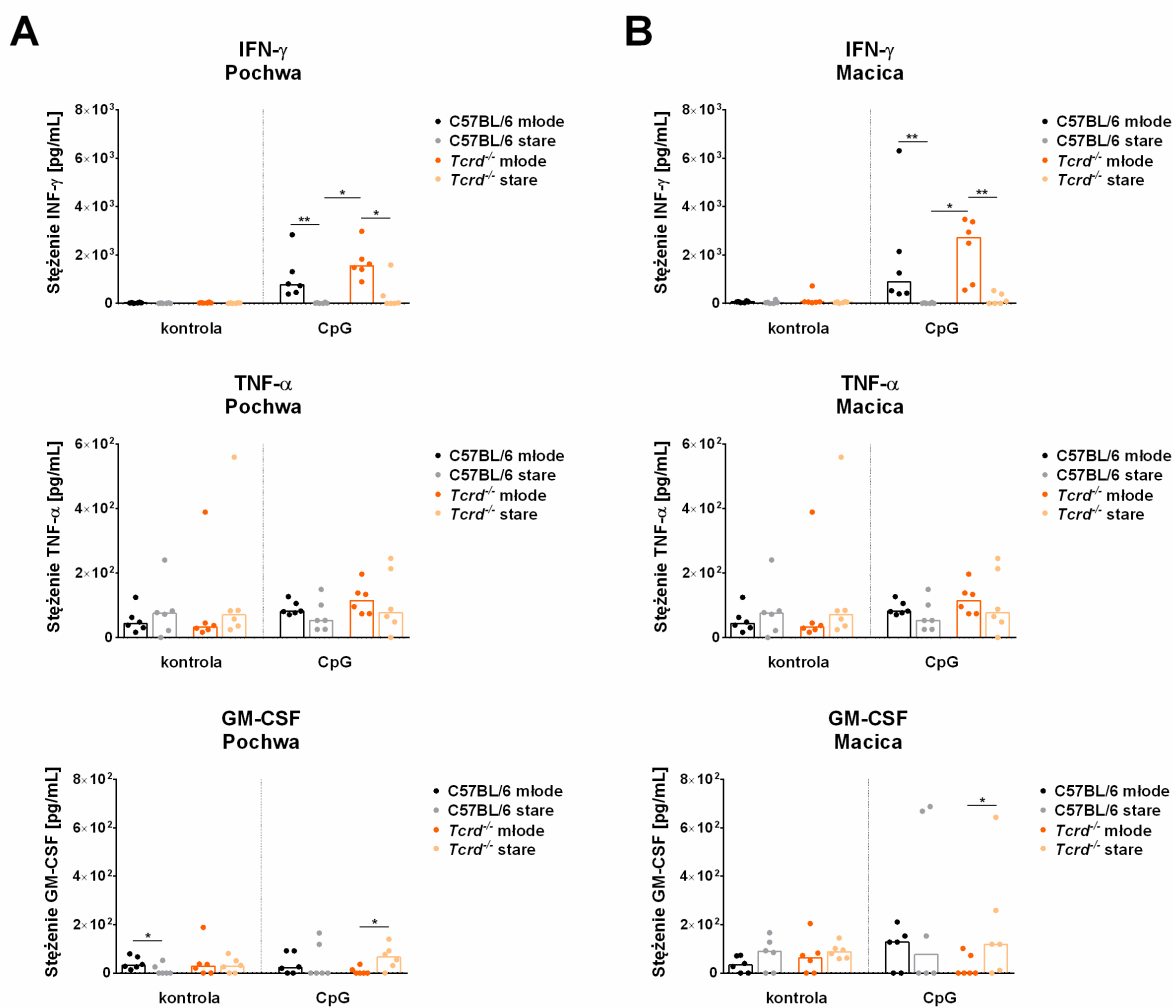
Słupki przedstawiają medianę, każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya.



Ryc. 63. Poziom stężenia cytokin IL-23, IL-17A i MCP-1 w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w zależności od wieku myszy.

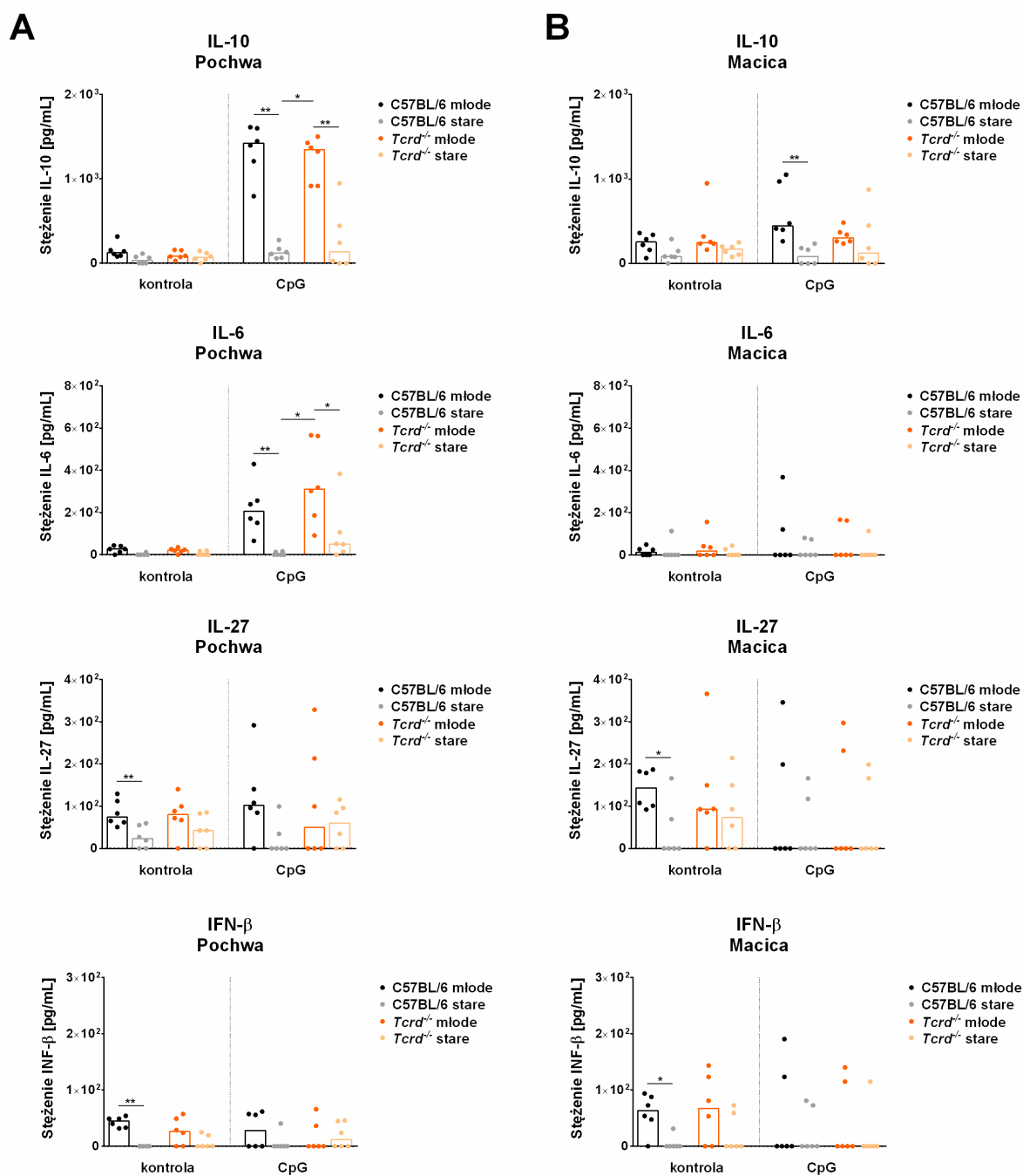
Słupki przedstawiają medianę, każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya.





Ryc. 64. Poziom stężenia cytokin IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i GM-CSF w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w zależności od wieku myszy.

Słupki przedstawiają medianę, każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya.



Ryc. 65. Poziom stężenia cytokin IL-10, IL-6, IL-27 i IFN- $\beta$  w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w zależności od wieku myszy.

Słupki przedstawiają medianę, każda kropka reprezentuje pojedynczą mysz. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; test U Manna-Whitneya.

## 5. Dyskusja

Układ immunologiczny jest jednym z najbardziej fascynujących, jak i skomplikowanych systemów, regulujących procesy życiowe w organizmie. Jego głównym zadaniem jest utrzymanie homeostazy poprzez odróżnianie tego, co własne i bezpieczne od tego, co obce i potencjalnie niebezpieczne. Do układu immunologicznego zaliczamy wiele typów komórek – tzw. immunocytów, które za pomocą różnego rodzaju receptorów monitorują otaczające je środowisko. Po połączeniu się określonego receptora ze swoistym ligandem komórki te ulegają aktywacji, dzięki czemu mogą neutralizować lub niszczyć czynniki potencjalnie chorobotwórcze. Część komórek układu odpornościowego, zaliczanych do odporności wrodzonej, od razu po kontakcie z „patogenem” wchodzi w tryb efektorowy. Do drugiej grupy zaliczamy komórki układu odporności nabytej, które przy pierwszym kontakcie „uczą się” rozpoznawać zagrożenie, by przy kolejnym kontakcie zareagować szybciej i precyzyjniej niż komórki odporności wrodzonej. Limfocyty T  $\gamma\delta$ , na których skupia się ta rozprawa, są określane często w literaturze jako „most” pomiędzy odpornością wrodzoną i nabytą a ich rozpowszechnienie w tkankach bogatych w nabłonek sugeruje, że tworzą pierwszą linię obrony przed patogenami. Z jednej strony ulegają one silnej i wczesnej aktywacji poprzez rozpoznanie konserwatywnych antygenów, co pozwala im reagować niemal natychmiast na zagrożenie. Z drugiej strony, limfocyty te wchodzi w interakcje z różnymi komórkami zaangażowanymi w przetwarzanie i reakcje na obce antygeny, dzięki czemu mogą regulować odpowiedź adaptacyjną.

Stosunkowo dużo uwagi poświęcono śródnabłonkowym limfocytom T  $\gamma\delta$  w naskórku i jelitach, które prowadzą nadzór immunologiczny w obrębie tych tkanek, reagując na szkodliwe działanie czynników pozaustrojowych. W żeńskim układzie rozrodczym to pochwa jest miejscem kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym i podobnie do innych organów pokrytych tkanką nabłonkową, kontrolowana jest przez analogiczną populację komórek T  $\gamma\delta$ . W odróżnieniu jednak od naskórka i jelit, nabłonek rozrodczy dodatkowo podlega regulacji przez hormony płciowe, które nie tylko wpływają na aktywność komórek epitelialnych, ale również modulują funkcje immunocytów. Złożoność tego układu, wynikająca również z samej jego budowy (pochwa, szyjka macicy i macica), sprawia, że jak dotąd niewiele wiadomo jest na temat roli homeostatycznej limfocytów T  $\gamma\delta$  w obrębie dróg rodnych. Celem niniejszej rozprawy była więc próba wyjaśnienia ich znaczenia dla żeńskiego układu rozrodczego w modelu mysim.

W pierwszym etapie pracy, ze względu na brak danych w literaturze, opracowałam metodykę analizy mikroskopowej i cytometrycznej mysiej pochwy. Głównym czynnikiem utrudniającym prace badawcze była grubość i zwarta struktura ściany pochwy, które stanowiły problem dla precyzyjnego i bezstratnego określenia statusu limfocytów T  $\gamma\delta$ . Dzięki zastosowaniu technik oczyszczania optycznego tkanek (ScaleS (189) i CUBIC (188)), przetwarzanych jako „*whole mount*”, byłam w stanie zobrazować nienaruszoną ścianę pochwy i przeprowadzić bardzo zaawansowane analizy ilościowe obrazów, określające liczebność tych komórek i zmiany ich dystrybucji w różnych stanach fizjologicznych. Były to całkowicie nowatorskie badania, ponieważ jak do tej pory żadna z metod oczyszczania tkanek nie została przetestowana na tym organie (176).

Wykazałam, że obie testowane metody oczyszczania były odpowiednie do analizy komórek z ekspresją GFP w ścianie pochwy i pozwoliły na wykrycie limfocytów T  $\gamma\delta$  na większych głębokościach niż w przypadku próbek kontrolnych bez oczyszczania. Taka preparatyka znajduje właśnie najlepsze zastosowanie do tkanek myszy reporterowych, w których poszczególne typy immunocytów, definiowane na podstawie białek powierzchniowych lub czynników transkrypcyjnych, wytwarzają i gromadzą duże ilości białka fluorescencyjnego (172). Myszy fluorescencyjne można ze sobą krzyżować w celu otrzymania wielokrotnych krzyżówek do jednoczesnej wizualizacji wielu populacji leukocytów w tkance (sygnał pochodzący z nawet trzech lub czterech białek fluorescencyjnych (np. mCer, GFP, YFP i DsRed) można rozdzielić spektralnie). Niestety, proces krzyżowania jest bardzo czasochłonny, kosztowny i mało wydajny, co zdecydowanie ogranicza stosowanie metod oczyszczania na szeroką skalę w takich modelach. Zarówno ScaleS, jak i CUBIC są jednak kompatybilne ze znakowaniem immunofluorescencyjnym (według danych literaturowych), dzięki czemu możliwa jest lepsza charakterystyka tkanek poprzez analizę dodatkowych markerów i struktur komórkowych. Reczywiście, obie metody oczyszczania tkanek pozwoliły na wizualizację lamininy, do barwienia której zastosowałam pierwszorzędowe przeciwciało anti-laminina 5 oraz znakowane fluorescencyjnie przeciwciało drugorzędowe. Zgodnie z literaturą metody oczyszczania są bardziej kompatybilne z barwieniami dwuetapowymi niż z barwieniami przeciwciałami skoniugowanymi bezpośrednio z fluorochromem (178). Być może taka procedura byłaby właśnie potrzebna do obrazowania TCR  $\gamma\delta$  w oczyszczonej ścianie pochwy i analiz dotyczących tożsamości komórek T  $\gamma\delta$  ( $V\gamma6^+$  czy  $V\gamma5^+$ ), widocznych w nabłonku na podstawie sygnału GFP. Do barwień oczyszczonych metodą CUBIC tkanek wykorzystałam bezpośrednio znakowane przeciwciała anti-TCR  $\gamma\delta$  i anti- $V\gamma5^+$ . Niestety

sygnał TCR  $\gamma\delta$  w obszarze pochwy praktycznie przestał być wykrywalny. Dopiero obrazowanie tkanek nieoczyszczonych, przy ograniczeniu do 100  $\mu\text{m}$  głębokości, pozwoliło wykryć TCR  $\gamma\delta$  w ścianie pochwy i wykazać, że komórki T  $\gamma\delta$  bez łańcucha  $V\gamma 5$  (potencjalnie  $V\gamma 6^+$ ) miały ok. 50-krotnie niższą ekspresję TCR. Najprawdopodobniej zastosowanie wieloetapowej i rozłożonej w czasie procedury oczyszczania spowodowało dalsze obniżenie ilości antygeny i było przyczyną braku jego detekcji. W tym wypadku użycie drugorzędowego przeciwciała w celu wzmocnienia sygnału mogłoby pomóc w wizualizacji TCR w oczyszczonej tkance. Podobnie można wytłumaczyć niepowodzenie w obrazowaniu cytoszkieletu z wykorzystaniem falloidyny – w wyniku barwienia otrzymałam jedynie rozmyty sygnał sugerujący rozpad F-aktyny w trakcie procedury oczyszczania.

Opracowanie metody wizualizacji błony podstawnej pochwy na drodze immunofluorescencji i wykorzystanie sygnału SHG oraz GFP pozwoliło mi na wykonanie analizy 3D limfocytów T  $\gamma\delta$  w zależności od fazy cyklu rujowego myszy. Zastosowanie techniki oczyszczania było szczególnie istotne w przypadku fazy estrus, w której nabłonek osiąga maksymalną grubość w trakcie cyklu rujowego - około 170 mikrometrów. Mogłam dzięki temu przeprowadzić analizy komórek zarówno w nabłonku, jak i w podścielisku, które byłoby niedostępne optycznie z uwagi na nieprzezroczystość i grubość tkanki. Typowa preparatyka histologiczna, prowadząca do wytworzenia seryjnych skrawków wzdłużnych lub poprzecznych w stosunku do ściany pochwy, uniemożliwiłaby wykonanie tak wyrafinowanych badań. Oprócz samego oczyszczania tkanki i wygenerowania serii obrazów, pokazujących lokalizację komórek T  $\gamma\delta$ , kolejnym nowatorskim aspektem tej pracy był rozwój algorytmów przetwarzania zdjęć mikroskopowych. We współczesnej mikroskopii kładzie się ogromny nacisk na analizę ilościową obrazów, przez co obrazowanie staje się pełnoprawną techniką analityczną, pozwalającą na zobiektywizowane i liczbowe porównywanie warunków eksperymentalnych. Dzięki rozwojowi oprogramowania do obróbki zdjęć i wykrywaniu w seriach obrazów różnych obiektów można obecnie tworzyć dodatkowe „wirtualne” kanały, w których intensywność sygnału koduje odległość od danego obiektu w trójwymiarowej przestrzeni. Tylko w ten sposób mogłam wykazać, że w diestrusie limfocyty T  $\gamma\delta$  znajdują się w większej odległości od kolagenu i błony podstawnej w porównaniu do fazy estrus. Takie odpowiedzi na pytania biologiczne, uzyskane dzięki innowacyjnym metodom obrazowania i analizy zdjęć, oczywiście rodzą kolejne pytania i nowe hipotezy do dalszej weryfikacji. Przykładowo, obecność tych komórek w górnych warstwach nabłonka, pomimo mniejszej ilości warstw i utraty zrogowaciałych komórek w fazie diestrus, może sugerować ich aktywną migrację w kierunku

światła pochwy, np. w celu lepszego monitorowania stanu nabłonka. Należałoby więc wykazać, czy limfocyty T  $\gamma\delta$  aktywnie penetrują warstwę szczytową nabłonka podczas fazy diestrus, czy też pasywnie przesuują się wraz z otaczającymi komórkami podczas procesu złuszczenia warstw terminalnie zróżnicowanych. Do sprawdzenia jest również, czy wzrost liczby komórek T  $\gamma\delta$  w fazie diestrus jest wynikiem ich proliferacji *in situ*, czy też migracji do ściany pochwy z krążenia lub innych tkanek. Żeby odpowiedzieć na te pytania, potrzebne jest opracowanie techniki obrazowania przyżyciowego limfocytów T  $\gamma\delta$  i rejestracja dynamiki ich ruchu w różnych fazach cyklu. Pilotażowe badania, w których uczestniczę, pokazują, że jest to możliwe.

Nowoczesne techniki mikroskopowe dają duże możliwości analizy tkanek w 3D, natomiast ograniczają się do monitorowania kilku populacji komórek w tym samym czasie i w wybranym polu widzenia. Alternatywną metodą badania komórek układu odpornościowego jest cytometria przepływowa, dzięki której można analizować wiele populacji komórek jednocześnie w skali całego organu lub większego fragmentu. Jest to potężne narzędzie stosowane do charakteryzowania rezydentnych komórek odpornościowych, jednak wymaga enzymatycznej degradacji tkanek w celu uwolnienia pojedynczych komórek do analizy. Dobranie odpowiedniego protokołu homogenizacji tkanki jest kluczowym elementem analizy, ponieważ musi jednocześnie skutecznie uwolnić komórki z tkanek oraz zapewnić ochronę markerów powierzchniowych przed degradacją. W moich badaniach okazało się, że faza cyklu rujowego miała duży wpływ na liczbę uzyskanych komórek po trawieniu. Po zastosowaniu liberaz otrzymałam więcej komórek w fazie diestrus niż w fazie estrus. Zaskakująco, powszechnie stosowane enzymy referencyjne (kolagenaza IV i dyspaza II) były mniej skuteczne niż sama obróbka mechaniczna. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że zrogowaciałe warstwy nabłonka mają silniejsze połączenia międzykomórkowe i są mniej wrażliwe na kolagenazę i dyspazę. Z powodu większej grubości nabłonka w fazie estrus, wydajność trawienia była znacznie niższa w porównaniu z fazą diestrus. Podczas fazy diestrus wydzielane są endogenne metaloproteinazy macierzy (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs) co może tłumaczyć otrzymanie większej liczby komórek w kontrolnej, nietrawionej macicy (219). Metoda opisana w pracy Itohara i in. z 1990 roku, w której do trawienia pochwy w diestrusie zastosowano 0,5% roztwór trypsyny i 30% gradient Percoll, pozwoliła na uzyskanie około  $1 \times 10^4$  komórek z każdej pochwy. Używając liberaz (w szczególności Liberazy DH i TH) uzyskałam średnio ponad  $1,5 \times 10^4$  komórek z pojedynczej pochwy w fazie diestrus, co stanowiło prawie dwa razy więcej komórek niż otrzymanych w fazie estrus.

Oprócz ilości otrzymanych komórek w zależności od zastosowanego enzymu sprawdziłam ich żywotność. Traktowanie pojedynczymi enzymami: kolagenazą IV i dyspazą II, znacznie zmniejszyło żywotność komórek, co było szczególnie widoczne w fazie estrus. Zgodnie z oczekiwaniami trawienie pochwy i macicy za pomocą liberaz znacznie lepiej zachowało żywotność izolowanych komórek niż mechaniczne rozdrabnianie tkanek. Ponadto, enzymy proteolityczne mogą wpływać na uwalnianie różnych populacji komórek a także na degradację antygenów powierzchniowych. Również w tym przypadku liberazy były bardziej efektywne niż kolagenaza IV i dyspaza II, które znacznie zmniejszyły liczbę wykrytych leukocytów CD45<sup>+</sup> w obu badanych przedziałach układu rozrodczego, zwłaszcza w fazie diestrus. Wyniki te są zgodne z poprzednimi doniesieniami, w których trawienie dyspazą ośrodkowego układu nerwowego szczura (220) i śledziony myszy (202) znacznie obniżyło poziom wykrywalności wielu markerów powierzchniowych leukocytów.

W badaniach cytometrycznych nie zaobserwowałam istotnych zmian odsetka leukocytów wśród komórek macicy w fazie estrus i diestrus. Jest to przeciwstawny wynik do pracy Dienera i in. (100), w której pokazano, że populacja leukocytów w macicy zmienia się liczebnie podczas cyklu rujowego, przy czym najwięcej leukocytów zaobserwowano w fazie estrus. Natomiast w innym badaniu, wykazano że odsetek limfocytów T  $\gamma\delta$  w macicy myszy nie będących w ciąży, jest większy w fazie diestrus niż proestrus (101). Różnice między tymi badaniami prawdopodobnie wynikają z różnych protokołów izolacji opartych na kolagenazie D (101) i kolagenazie I (100). Ponadto proporcja pochwowych komórek CD11c<sup>+</sup> zmniejszyła się w diestrusie. Można to wytłumaczyć napływem niezidentyfikowanych jeszcze subpopulacji komórek CD45<sup>+</sup> lub migracją CD11c<sup>+</sup> z pochwy do pobliskiego drenującego węzła chłonnego, co mogłoby zmienić proporcje komórek w tkance. W porównaniu do fazy estrus, zauważyłam również wzrost zawartości limfocytów T  $\gamma\delta$  w diestrusie, a ich najwyższą bezwzględną liczbę stwierdziłam po zastosowaniu do trawienia Liberazy TL o niskiej zawartości termolizyny. Co zaskakujące, liberazy o średniej i wysokiej zawartości termolizyny były znacznie mniej skuteczne w uwalnianiu limfocytów T  $\gamma\delta$  lub w zachowaniu kompleksu TCR  $\gamma\delta$  na powierzchni komórek. Wrażliwość tego markera na degradację proteolityczną pod wpływem termolizyny należałoby potwierdzić w oddzielnych badaniach. Zmiany liczebności limfocytów T  $\gamma\delta$  wywołane hormonami płciowymi zaobserwowałam również w węzłach chłonnych lędźwiowych, które drenują układ rozrodczy. W fazie diestrus stwierdziłam zwiększenie liczby tych komórek. Nie jest jednak jasne, czy wzrost ten wynika z miejscowej proliferacji, migracji z pochwy czy nagromadzenia limfocytów T  $\gamma\delta$  z krwi obwodowej. Przygotowanie węzłów do

analizy cytometrycznej nie wymagało obróbki enzymatycznej, zatem można wykluczyć jakiegokolwiek potencjalne trawienie markerów powierzchniowych.

Opracowanie technik analizy mikroskopowej i cytometrycznej tkanek układu rozrodczego umożliwiło mi kontynuację prac badawczych, skupiających się na ocenie funkcji komórek T  $\gamma\delta$  rezydujących w nabłonku rozrodczym. Dane literaturowe pokazują, że limfocyty te mogą być zaangażowane w prezentację antygenów oraz stymulację limfocytów B i T, wpływając na odpowiedź układu immunologicznego na patogeny i pochodzące z nich antygeny. Kolejny etap pracy polegał więc na sprawdzeniu potencjalnej roli limfocytów T  $\gamma\delta$  obecnych w układzie rozrodczym we wzbudzeniu reakcji odpornościowych po immunizacji antygenami aplikowanymi na błonę śluzową pochwy. Badania te służyły jednocześnie ocenie skuteczności immunizacji dopochwowej w porównaniu z alternatywnymi drogami, takimi jak podskórna i donosowa. Przeanalizowałam stymulację antygenowo-swoistych przeciwciał, stosując dwa antygeny T-zależne (białko owoalbumina i koniugat toksoidu tężca z trójsacharydem obecnym w  $\beta$ -mannanie z *C. albicans*) w obecności różnych adiuwantów, stosowanych w zależności od drogi podania i typu antygeny. Sprzężenie antygeny cukrowego *C. albicans* z toksoidem tężca było podyktowane dążeniem do zwiększenia immunogenności polisacharydu i orientacji odpowiedzi immunologicznej na zależną od limfocytów T.

We wstępnym etapie badań sprawdziłam indukcję produkcji swoistych przeciwciał na owoalbuminę w zależności od fazy cyklu (estrus i diestrus). Zgodnie z dostępną literaturą przeprowadzona przeze mnie immunizacja dopochwowa była zależna od cyklu hormonalnego i praktycznie nieskuteczna w fazie estrus w przypadku indukcji ochronnych przeciwciał klas IgG i IgA (141). Przypuszczalnie właśnie w fazie zdominowanej przez estrogeny indukowana jest tolerancja, aby zapobiec reakcjom zapalnym przeciwko plemnikom i bakteriom komensalnym. Estradiol wpływa na zwiększenie grubości nabłonka pochwy i zwiększoną produkcję śluzu (211,221) oraz wyraźnie reguluje odpowiedź immunologiczną w macicy i pochwie, hamując zdolność komórek pochwy do prezentowania antygeny i indukowania proliferacji limfocytów T (222). Faza cyklu rujowego nie miała natomiast znaczenia przy immunizacji podskórnej i donosowej, co również zostało pokazane przez innych badaczy (223).

Moje badania wykazały, że podanie dopochwowe owoalbuminy nie było tak efektywne jak podanie donosowe w indukcji przeciwciał IgA w wydzielinach pochwy, co jest kluczowym mechanizmem odpornościowym w błonach śluzowych (144). Faza cyklu rujowego nie miała znaczenia przy podaniu owoalbuminy donosowo, co dodatkowo podkreśla przewagę



immunizacji donosowej nad dopochwową. Z drugiej strony, błona śluzowa pochwy ma niską aktywność enzymatyczną i stosunkowo dużą powierzchnię do penetracji antygenów, co sprawia, że droga dopochwowa mogłaby być alternatywą dla drogi donosowej w przypadku samodzielnego podania potencjalnej szczepionki (224). Dodatkową korzyścią tej drogi podania, w porównaniu do drogi donosowej, była większa stymulacja produkcji przeciwciał podklasy IgG2b i IgG2c w obrębie nabłonka pochwy. Przeciwciała te są związane z indukcją odpowiedzi komórkowej i mechanizmu cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ang. *antibody-dependent cell cytotoxicity*, ADCC). Lokalne wzbudzenie ADCC może skutecznie ograniczać infekcje błony śluzowej układu rozrodczego. Efekt ten był jednak niewidoczny w przypadku szczepienia koniugatem, co może wynikać częściowo z innej aktywności adiuwantowej  $\beta$ -glukanu niż CpG, zastosowanych do wzmocnienia indukowanej odpowiedzi immunologicznej. Oligodeoksynukleotyd CpG, będąc agonistą receptora TLR9, jest opisany w literaturze jako stymulator reakcji Th1 (225). Z kolei  $\beta$ -glukan, stosowany wcześniej jako skuteczny adiuwant dla koniugatu trójsacharydowego i toksoidu tężca, będąc aktywatorem dektyny-1, pobudza odpowiedź typu Th1 i Th17 (154,208), aczkolwiek inne opublikowane dane z badań *in vitro* pokazują również indukcję cytokin Th2 pod jego wpływem (226).

Rola adiuwantów była również zauważalna przy różnych drogach szczepienia. Zarówno po podaniu owoalbuminy, jak i koniugatu drogą podskórną z wodorotlenkiem glinu jako adiuwantem w surowicach przeważała zdecydowanie odpowiedź humoralna, co było zgodne z profilem wzbudzanych reakcji typu Th2, opisanych dla tej substancji (143). Natomiast wykorzystanie CpG i  $\beta$ -glukanu razem z antygenami spowodowało obniżenie stosunku IgG1/IgG2a, co wskazuje na zmianę kierunku indukcji odpowiedzi w stronę Th1 (komórkowej).

Z uwagi na większą skuteczność immunizacji dopochwowej w fazie diestrus, wpływ komórek T  $\gamma\delta$  układu rozrodczego na produkcję przeciwciał badałam jedynie w tej fazie cyklu rujowego. Prace eksperymentalne pokazały, że udział limfocytów T  $\gamma\delta$  w indukcji antygenowo-swoistych przeciwciał był niewielki. Przy podaniu dopochwowym owoalbuminy komórki T  $\gamma\delta$  nie miały żadnego wpływu na odpowiedź immunologiczną zarówno w surowicy, jak i w wydzielinach pochwy. Zmierzone poziomy przeciwciał anti-OVA były podobne w szczepie WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup>. Komórki T  $\gamma\delta$  odegrały jednak nieznaczną rolę w stymulacji swoistych przeciwciał po immunizacji dopochwowej koniugatem toksoidu tężca z trójsacharydem *C. albicans*. U myszy z delecją limfocytów T  $\gamma\delta$  zaobserwowałam obniżenie poziomu przeciwciał IgA, IgG2b i IgG3

w surowicy, co może sugerować aktywny udział tych komórek w procesach prezentacji określonego typu antygeny. Co ciekawe, w przypadku szczepienia owoalbuminą drogą podskórną zaobserwowałam efekt hamujący i obniżenie produkcji IgG anti-OVA w obecności komórek T  $\gamma\delta$ . Wynik ten wskazuje na immunoregulacyjną rolę tych limfocytów, jednak konieczne byłyby dalsze badania w celu wykazania, jaka populacja limfocytów T  $\gamma\delta$  – skórna czy zrekrutowana z krwiobiegu – jest odpowiedzialna za supresję indukcji odpowiedzi na ten antygen w tej lokalizacji.

Poszukując wyjaśnienia niewielkich różnic we wzbudzeniu antygenowo-swoistych przeciwciał u myszy szczepu WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup>, sprawdziłam status pozostałych komórek odpornościowych w obrębie układu rozrodczego. Założyłam, że immunizacja drogą dopochwową z wykorzystaniem adiuwantów powinna prowadzić do zmian dystrybucji immunocytów w obrębie nabłonka pochwy w wyniku aktywacji receptorów PRR i wywołanego przez nie stanu zapalnego. Miałoby to bezpośrednie przełożenie na pobudzenie odpowiedzi na podane antygeny. W związku z tym przeanalizowałam tkanki obu szczepów myszy po indukcji zapalenia modelowanego przez dopochwowe podanie adiuwantów – agonistów receptorów TLR9 i TLR7 – CpG i R848, odpowiednio. Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowałam w pochwie wzrost liczby komórek dendrytycznych i makrofagów (F4/80<sup>+</sup>) oraz komórek tucznych i bazofili (FcεRIα<sup>+</sup>), które są podstawowymi komórkami odporności wrodzonej, działającymi lokalnie, aby zmniejszyć obciążenie patogenami i zainicjować odporność adaptacyjną (19). Dodatkowo CpG spowodowało zwiększenie odsetka komórek z markerem CD19<sup>+</sup> (komórki B, komórki dendrytyczne) i CD117<sup>+</sup> (hematopoetyczne komórki macierzyste i komórki tuczne), a R848 zwiększyło udział komórek CD11c<sup>+</sup> (komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty) oraz NK-1.1<sup>+</sup> (komórki NK, komórki NK-T). Pokazało to silną odpowiedź układu odpornościowego w pochwie, skierowaną na zapobieganie zakażeniom przez drobnoustroje chorobotwórcze (227). W macicy odpowiedź na oba stymulatory była zdecydowanie mniejsza niż w pochwie i spowodowała jedynie wzrost frekwencji komórek tucznych i bazofili (FcεRIα<sup>+</sup>). Wykazane różnice w obrębie obu przedziałów układu rozrodczego mogą wynikać z izolacji macicy od lokalnego zapalenia w pochwie a także z innej struktury komórkowej, prowadzącej do odrębnych funkcji pełnionych przez te organy, szczególnie widocznych w czasie ciąży (31). Porównując oba szczepy myszy, nie zaobserwowałam jednak znaczących różnic pomiędzy nimi, co może tłumaczyć wyniki analiz przeciwciał i brak wyraźnego wpływu obecności komórek T  $\gamma\delta$  na aktywację i/lub rekrutację innych immunocytów w układzie rozrodczym. Niewykluczone, że przy braku limfocytów T  $\gamma\delta$

ich niszę wypełniają komórki T  $\alpha\beta$ , które pełnią podobną funkcję regulatorową, tak jak to się dzieje w naskórku myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> (218).

Brak różnic pomiędzy szczepami mógł także wynikać z młodego wieku badanych myszy (2 miesiące), kiedy funkcje układu odpornościowego są plastyczne i niezaburzone przez proces starzenia. Przeprowadziłam w związku z tym szereg badań, porównując myszy młode obu szczepów do myszy starych – w wieku 18 miesięcy. U myszy zmiany reprodukcyjne zaczynają się w wieku 13-14 miesięcy, a po 17 miesiącach u około 80% samic cykl rujowy jest nieregularny (228). U myszy szczepu dzikiego nie zaobserwowałam zmian ilościowych limfocytów T  $\gamma\delta$  w pochwie – ich całkowita liczba i rozkład procentowy w nabłonku i podścielisku pochwy były stałe, niezależnie od wieku myszy. Badając macice myszy starych, zaobserwowałam dwukrotny wzrost liczby komórek T  $\gamma\delta$  w porównaniu do myszy młodych. Nie jest jasne czy spadek produkcji hormonów płciowych w podeszłym wieku może za to odpowiadać, ponieważ ich wpływ na populację limfocytów T  $\gamma\delta$  w macicy nie jest jednoznaczny. Część badaczy twierdzi, że najwięcej tych leukocytów występuje w zdominowanej przez estradiol fazie estrus (100), natomiast inni zauważają, że odsetek limfocytów T  $\gamma\delta$  w macicy jest większy w fazie diestrus niż proestrus (101). U kobiet po menopauzie w endometrium stwierdza się spadek ilości leukocytów w porównaniu do młodych kobiet – nie wiadomo jednak jak menopauza wpływa na liczbę komórek T  $\gamma\delta$  (37). Badania na myszach wykazały, że ilość limfocytów T z V $\gamma$ 1.1<sup>+</sup>  $\delta$ 6.3<sup>+</sup> TCR wzrasta około stukrotnie w układzie rozrodczym w okresie ciąży (głównie w obszarze łożyska) i zależnie od fazy rozwoju płodu mogą mieć one działanie abortogenne lub ochronne dzięki ekspresji TNF- $\alpha$  lub TGF- $\beta$ , odpowiednio (94,229). Kolejne analizy fenotypowe komórek z uwzględnieniem profilu produkowanych przez nie cytokin byłyby niezbędne, aby zweryfikować tożsamość komórek T  $\gamma\delta$  w macicy u starych myszy i sprawdzić czy wraz z wiekiem nie przyrasta abortogenna populacja V $\gamma$ 1.1<sup>+</sup>  $\delta$ 6.3<sup>+</sup> TCR TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>.

Niezmienna liczba pochwoowych limfocytów T  $\gamma\delta$  niezależnie od wieku jest zgodna z danymi dotyczącymi skóry. Analogiczna populacja komórek T  $\gamma\delta$  w naskórku (DETC) również pozostaje na stałym poziomie wraz z wiekiem (218). Jednakże liczba zastępczych komórek  $\alpha\beta$  DETC w skórze myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> zmniejsza się o prawie 50% w ciągu 1 roku życia (218). Zakładając, że podobny mechanizm dotyczy również nabłonka pochwy należałoby oczekiwać, że u myszy starych pozbawionych limfocytów T  $\gamma\delta$  kontrola immunologiczna pochwy ulegnie osłabieniu, co wpłynie bezpośrednio na kondycję tej tkanki.

Wraz z wiekiem w wielu narządach gromadzone są komórki, które wykazują oznaki uszkodzenia DNA oraz mają niską zdolność proliferacji. Akumulacja starzejących się komórek prowadzi do dysfunkcji narządów, stanu zapalnego i może leżeć u podstaw wielu chorób związanych z wiekiem (230). Wiek wpływa na poziom ekspresji wielu genów, dlatego zbadalam poziom ekspresji 84 genów w pochwach u myszy młodych i starych szczepu dzikiego oraz myszy z brakiem limfocytów T  $\gamma\delta$ . Pomiędzy testowanymi grupami znalazłam jedynie sześć genów o zmienionym poziomie ekspresji. Badania można potraktować jako badania wstępne ze względu na małą liczbę osobników w grupach ( $n = 3$ ). Dla trzech genów istotność statystyczna wynosiła prawie 0,05; dlatego należałoby powtórzyć analizę wybranych sześciu genów na większej grupie zwierząt.

Nie zaobserwowałam żadnych statystycznie istotnych różnic w ekspresji genów między młodymi myszami obu szczepów. Natomiast poziom genu laktotransferyny (*Ltf*) uległ obniżeniu u starszych myszy z delecją komórek T  $\gamma\delta$  w porównaniu z myszami szczepu dzikiego w tym samym wieku. Laktotransferyna (*Ltf*), znana również jako laktoferyna (*Lf*), jest glikoproteiną wiążącą żelazo, obecną w mleku, ślinie i innych wydzielinach zewnątrzwydzielniczych (231). Pełni ona wiele funkcji biologicznych, w tym wywiera działanie przeciwbakteryjne i immunomodulujące (232). *Ltf* bierze udział w ochronie przeciwko powszechnym infekcjom dróg rodnych, absorbując jony żelaza, które są niezbędnym składnikiem odżywczym dla wielu bakterii narządów płciowych (233). Ponadto *Ltf* wiąże lipopolisacharyd enterobakterii (LPS), zwiększa przepuszczalność bakterii poprzez destabilizację ściany komórkowej i zapobiega aktywacji receptora TLR4 (234). Stężenie *Ltf* wzrasta podczas infekcji narządów płciowych z powodu jej uwalniania z neutrofilii infiltrujących miejsce zakażenia (235,236). Wszystkie główne subpopulacje limfocytów wytwarzają *Ltf* po aktywacji. Co ważne, odsetek aktywowanych limfocytów T  $\gamma\delta$ , wykazujących ekspresję *Ltf*, jest znacznie większy niż aktywowanych limfocytów  $\alpha\beta$  (237). Poziom *Ltf* wzrasta wraz ze wzrostem stężenia estradiolu we krwi (238). Otrzymane wyniki są więc zgodne z literaturą – brak limfocytów T  $\gamma\delta$  i niski poziom estrogenu u starych samic mogą być razem odpowiedzialne za obniżoną ekspresję *Ltf* u myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> w podeszłym wieku, potencjalnie prowadząc u nich do słabszych odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowych.

U myszy szczepu dzikiego jedynie ekspresja genu *S100a9* uległa obniżeniu wraz z wiekiem. Porównując stare myszy szczepu WT ze starymi myszami szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> zauważyłam podobny trend, jednakże nie osiągnął on istotności statystycznej. *S100a9* to białko wiążące wapń o małej masie cząsteczkowej z rodziny S100, znane również jako kalgranulina B (239). Razem

z S100a8 (kalgranulina A) oba białka należą do podgrupy struktur molekularnych związanych z uszkodzeniem (ang. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs), zwanych „alarminami” (240). S100a8 i S100a9 tworzą przeciwbakteryjny kompleks heterodimerski nazywany kalprotektyną, który działa głównie poprzez wiązanie z receptorem TLR4 i receptorem końcowych produktów zaawansowanej glikacji (ang. *receptor for advanced glycation endproducts*, RAGE) (241). Kalgranulina B ma właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec różnych patogenów, w tym przeciwko *C. albicans* (242). S100a8/9 zmniejszają adaptacyjną odpowiedź immunologiczną komórek T, zapobiegając różnicowaniu i rozwojowi komórek dendrytycznych. Co więcej, S100a9 jest w stanie promować sekrecję IL-8 i proces degranulacji przez ludzkie neutrofile, jak również produkcję cytokin prozapalnych przez monocyty i makrofagi (243). Na podstawie analizy ekspresji genów *S100a9* i *Ltf* można wyciągnąć wniosek, że mechanizmy odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowych ulegają osłabieniu podczas starzenia, co może ulec dalszemu pogorszeniu u myszy z niedoborem limfocytów T  $\gamma\delta$ .

Porównanie ekspresji genów w tkankach młodych i starych myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> wykazało podwyższenie poziomu ekspresji czterech genów: *C1qb*, *C1qc*, *C3ar1* i *Clu*. Porównując stare myszy szczepu WT ze starymi myszami szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup>, obserwowałam podobny trend w zmianach profilu genów.

Pierwsze trzy geny kodują białka należące do układu dopełniacza, tradycyjnie uważanego za element odporności wrodzonej. Nowe badania wskazują jednak na szerszą rolę dopełniacza jako pomostu między odpornością wrodzoną i nabytą (244). C1q jest głównym białkiem klasycznej kaskady dopełniacza i składa się z trzech podobnych, ale odrębnych podjednostek, tj. A, B i C (245). C3 jest dominującym białkiem alternatywnego szlaku dopełniacza, ale także ważnym w klasycznej kaskadzie i sygnalizacji lektynowej. Za jego funkcje odpowiada receptor – C3ar1, kodowany przez gen *C3ar1*. Ostatecznie wszystkie szlaki dopełniacza prowadzą do powstania kompleksu atakującego błonę (ang. *membrane attack complex*, MAC), który jest niezbędny do obrony przeciwdrobnoustrojowej i usuwania komórek apoptotycznych przy wsparciu fagocytów (246). Białka kodowane przez te geny mogą być produkowane przez szereg różnych komórek, takich jak makrofagi, fibroblasty, komórki śródbłonna, komórki T i APCs (247,248). Oprócz zaangażowania w aktywację kaskady dopełniacza, białka C1q i C3ar1 indukują również dojrzewanie komórek dendrytycznych i modulują dalszy rozwój odpowiedzi efektorowych komórek T (249,250). Ponadto, wzmożona sygnalizacja C3ar1 odgrywa rolę w wywoływaniu zapalenia naczyń i błon śluzowych (251,252). Wykazano także,

że poziom C3ar1 jest podwyższony w różnych podtypach nowotworów dotyczących tkanki nabłonkowej (253). Nadmierna aktywacja układu dopełniacza jest również zaangażowana w patofizjologię ciąży (254,255) i endometriozę (256,257). Nadekspresja trzech genów dopełniacza w pochwach u starych myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> może wskazywać, że limfocyty T  $\gamma\delta$  bezpośrednio lub pośrednio regulują wiele reakcji immunologicznych w obrębie układu rozrodczego, kontrolując procesy zapalne, kancerogenezę, zdolność reprodukcji i regeneracji u starzejących się osobników (258).

Klasteryna (CLU), znana również jako apolipoproteina J (apoJ), jest szeroko rozpowszechniona w tkankach i płynach ustrojowych (259). *Clu* jest genem reagującym na estrogen, w obecności którego produkcja CLU w macicy jest zmniejszona (260). Nadekspresja genu *Clu* podczas starzenia jest zgodna z opublikowanymi danymi na temat ludzi (261) i moimi obserwacjami u starszych samic myszy, które mają niski poziom estrogenów. Ostatnie badania wykazują, że zwiększone wytwarzanie CLU ma silny związek z nowotworami ginekologicznymi: rakiem jajnika (262), rakiem szyjki macicy (263) oraz rakiem endometrium (264). Zaobserwowano, że wydzielnicza forma CLU (ang. *secretory CLU*, sCLU), jako część MAC, wywiera działanie przeciwapoptotyczne, czyniąc go nieaktywnym cytolitycznie (265), przez co przyczynia się do progresji nowotworu (266). Otrzymany wynik zwiększonej ekspresji *Clu* u starych myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> może być zgodny z wyższą podatnością tego szczepu na karcynogenezę (267).

Proces starzenia charakteryzuje się długotrwałym utrzymywaniem stanu zapalnego, który ostatecznie prowadzi do zaburzenia homeostazy tkanek. W moich badaniach potwierdziłam to zjawisko w obrębie układu rozrodczego, analizując poziomy 13 cytokin, które odgrywają ważną rolę w regulacji procesów zapalnych. Stan podstawowy tkanek skonstrastowałam ze stanem zapalnym po podaniu oligodeoksynukleotydu CpG, który po podaniu na błonę śluzową pochwy powoduje rozległe miejscowe zapalenie, co było potwierdzone analizą histologiczną (146). Uzyskane dane wskazują na nasilenie procesów zapalnych w pochwach starych myszy. Było to jednak niezależne od obecności limfocytów T  $\gamma\delta$ .

Zarówno u myszy szczepu WT, jak i szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> zaobserwowałam zwiększenie produkcji cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$  i IL-17A) oraz zmniejszenie ilości IL-10 i IFN- $\beta$ , które mają działanie przeciwzapalne. IL-1 składa się z dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , które wiążą się z tym samym receptorem błony komórkowej, IL-1R. IL-1 $\alpha$  jest „alarminą” działającą miejscowo, natomiast IL-1 $\beta$  jest wydzielana do krwi i ma działanie ogólnoustrojowe (268). Ekspresja IL-1 $\alpha$  podwyższa się podczas infekcji i stanu zapalnego (269). Zarówno wiek, jak i brak

limfocytów T  $\gamma\delta$  nie miały wpływu na zmiany stężenia IL-1 $\beta$  w badanych tkankach. Wytwarzanie kilku cytokin (IL-6, IL-23, IL-27), które w zależności od kontekstu mikrośrodowiskowego wykazują działanie zarówno pro-, jak i przeciwzapalne, zostało zahamowane u starych myszy obu szczepów, co wskazuje na postępującą dysfunkcję odpowiedzi immunologicznych wraz z wiekiem. Mimo, że różnice w niektórych stężeniach cytokin nie były istotne statystycznie, miały one podobny trend zmian związany z wiekiem.

Po podaniu CpG u myszy starych, białko MCP-1, które rekrutuje monocyty, limfocyty T pamięci i komórki dendrytyczne do miejsc zapalenia, uległo znacznemu zmniejszeniu produkcji, sugerując mniejszy napływ komórek odpowiedzialnych za odporność przeciwzakaźną nabłonka. Dodatkowo pomiary stężeń IFN- $\gamma$  wykazały niższe poziomy tej cytokiny w tkankach starych myszy, co wskazuje, że polaryzacja komórek Th1, odporność przeciwwirusowa i procesy prezentacji antygeny mogą być mniej skuteczne w starszym wieku.

Zasadniczą różnicą między myszami szczepu WT i *Tcrd*<sup>-/-</sup> była pochwowa ekspresja GM-CSF, który stymuluje tworzenie granulocytów i monocytów oraz dojrzewanie komórek dendrytycznych (58,270). GM-CSF produkowany jest przez komórki T, ale także przez wiele innych typów komórek, takich jak makrofagi, komórki tuczne, komórki NK, komórki śródbłonka oraz fibroblasty. U myszy szczepu dzikiego w zdrowej tkance pochwy zaobserwowałam spadek produkcji tej cytokiny wraz z wiekiem, co było zgodne z ogólną tendencją osłabienia procesów hematopoetycznych u osobników w podeszłym wieku. Stan zapalny wywołany CpG oraz brak limfocytów T  $\gamma\delta$  spowodował jednak wzrost stężenia GM-CSF, wskazując na hamującą rolę komórek T  $\gamma\delta$  w zakresie stymulacji tej cytokiny lub aktywację innych mechanizmów, być może zależnych od komórek „zastępczych”, które mogą pojawić się w nabłonku pochwy, podobnie do limfocytów T  $\alpha\beta$  w naskórku myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> (218).

Równolegle do analiz pochwy, badałam profile cytokin obecnych w macicy w stanie podstawowym i po stymulacji CpG. Podobnie jak w pochwie, zaobserwowałam zmiany stężeń IL-1 $\alpha$ , IL-23, IL-17A, IFN- $\gamma$  oraz IL-10, co potwierdzało niezależny od komórek T  $\gamma\delta$  wpływ procesu starzenia na dysfunkcje reakcji immunologicznych w podeszłym wieku. Oba przedziały żeńskiego układu rozrodczego różniły się jednak znacząco produkcją chemokiny MCP-1. Już w zdrowej tkance macicy nastąpił wzrost stężenia MCP-1 u myszy starych, podczas gdy w pochwie chemokina ta była nieoznaczalna, najprawdopodobniej z uwagi na inny skład komórkowy w obu lokalizacjach. Indukcja stanu zapalnego spowodowała dalsze

zwiększenie produkcji MCP-1, ale tylko u myszy szczepu dzikiego – u starych myszy szczepu *Tcrd*<sup>-/-</sup> zaobserwowałam spadek stężenia tej chemokiny, co sugeruje aktywny wpływ limfocytów T  $\gamma\delta$  na wydzielanie MCP-1 w mikrośrodowisku macicy, podobnie do ich funkcji w wątrobie (271). W tym kontekście różnice między macicą a pochwą, gdzie u starych osobników szczepu dzikiego wykazałam spadek ilości MCP-1, można tłumaczyć obecnością komórek T  $\gamma\delta$  innych niż V $\gamma$ 6<sup>+</sup>, wrażliwych na efekty stymulacji TLR9 przez CpG. IL-6, która jest jedną z najbardziej wielokierunkowo działających cytokin, pojawiła się jedynie w pochwie myszy młodych po indukcji stanu zapalnego. Natomiast w macicy poziom stężenia IL-6 był nieoznaczalny, co również można tłumaczyć innym składem komórkowym w obu lokalizacjach. Porównanie profilu cytokin macicy z pochwą pozwoliło po raz kolejny podkreślić specyfikę obu przedziałów żeńskiego układu rozrodczego.



## 6. Wnioski

- Opracowana metoda oczyszczania optycznego pochwy oparta na technice CUBIC wraz z barwieniem błony podstawnej nabłonka pochwy pozwala na wizualizację 3D limfocytów T  $\gamma\delta$  oraz określenie ich dystrybucji.
- Zoptymalizowana metoda trawienia układu rozrodczego z wykorzystaniem Liberazy TL umożliwia przeprowadzenie ilościowych analiz cytometrycznych w skali całego organu.
- Opracowane metody badawcze pozwoliły wykazać, że cykl hormonalny reguluje liczbę limfocytów T  $\gamma\delta$  zarówno w pochwie, jak i w macicy.
- Analizy mikroskopowe wykazały, że podczas fazy diestrus w całej ścianie pochwy następuje prawie trzykrotny wzrost liczby komórek T  $\gamma\delta$  w porównaniu do fazy estrus.
- W fazie diestrus limfocyty T  $\gamma\delta$  występują bliżej światła pochwy, oddalając się od obecnego w podścielisku kolagenu, co sugeruje poprawę właściwości ochronnych tych komórek.
- Niezależnie od fazy cyklu stosunek liczby limfocytów T  $\gamma\delta$  zlokalizowanych w nabłonku do komórek obecnych w podścielisku pochwy pozostaje stały i wynosi około 3:1.
- 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 po stymulacji receptorów Toll-podobnych (TLR7 i TLR9), zarówno w pochwie, jak i w macicy.
- Skuteczność immunizacji dopochwowej jest skorelowana z cyklem hormonalnym – dużo mniej skuteczna w fazie estrus niż w fazie diestrus.
- Limfocyty T  $\gamma\delta$  nie wpływają na indukcję swoistych przeciwciał na antygen białkowy – owoalbuminę, podaną dośluzówkowo.
- Limfocyty T  $\gamma\delta$  wzmagają produkcję niektórych typów przeciwciał na antygen polisacharydowy – koniugat toksoidu tężca z trójsacharydem  $\beta$ -mannanu grzyba *Candida albicans*, po podaniu dopochwowym, co sugeruje stymulację swoistych mechanizmów cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał.
- Liczba limfocytów T  $\gamma\delta$  w pochwie jest stała niezależnie od wieku myszy, natomiast u myszy starych następuje dwukrotny wzrost liczby limfocytów T  $\gamma\delta$  w macicy.
- Proces starzenia zmienia odpowiedź immunologiczną w żeńskim układzie rozrodczym, orientując ją na typ prozapalny bez wyraźnego wpływu limfocytów T  $\gamma\delta$ .
- Limfocyty T  $\gamma\delta$  regulują selektywnie ekspresję genów i produkcję cytokin w obrębie żeńskiego układu rozrodczego u starzejących się myszy, modulując reakcje przeciwwzakaźne i inne elementy odpowiedzi wrodzonej i nabytej.

## 7. Literatura

1. Cunha GR, Sinclair A, Ricke WA, Robboy SJ, Cao M, Baskin LS. Reproductive tract biology: Of mice and men. *Differentiation*. 2019;110:49–63.
2. Rosa FD, Basso L, Valdora F, Neumaier CE, Baio G. Normal mouse anatomy on 3 T MRI. 2014 Dostępne na: /paper/Normal-mouse-anatomy-on-3-T-MRI-Rosa-Basso/21a569c46353cbdb00587033779a8e13db712746
3. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(4):217–30.
4. Kaushic C, Frauendorf E, Rossoll RM, Richardson JM, Wira CR. Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. *Am J Reprod Immunol*. 1998;39(3):209–16.
5. Nguyen PV, Kafka JK, Ferreira VH, Roth K, Kaushic C. Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(5):410–27.
6. Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, i in. Mucin Genes Expressed by Human Female Reproductive Tract Epithelia1. *Biology of Reproduction*. 1997;56(4):999–1011.
7. Domino SE, Hurd EA, Thomsson KA, Karnak DM, Holmén Larsson JM, Thomsson E, i in. Cervical Mucins Carry  $\alpha(1,2)$ Fucosylated Glycans that Partly Protect from Experimental Vaginal Candidiasis. *Glycoconj J*. 2009;26(9):1125–34.
8. Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(2):334–40.
9. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update*. 2000;6(3):225–36.
10. Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6).
11. Hodgins MB, Spike RC, Mackie RM, MacLean AB. An immunohistochemical study of androgen, oestrogen and progesterone receptors in the vulva and vagina. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1998;105(2):216–22.
12. Gebhart JB, Rickard DJ, Barrett TJ, Lesnick TG, Webb MJ, Podratz KC, i in. Expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta messenger RNA in vaginal tissue of premenopausal and postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185(6):1325–30.
13. Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy*. 1922;30(3):297–371.
14. Rodriguez I, Araki K, Khatib K, Martinou JC, Vassalli P. Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev Biol*. 1997;184(1):115–21.

15. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS One*. 2012;7(4).
16. Bertolin K, Murphy BD. 7 - Reproductive Tract Changes During the Mouse Estrous Cycle. W: Croy BA, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Boston: Academic Press; 2014 s. 85–94.
17. Mikolajewicz K, Chodaczek G. Going deeper: three-dimensional study of  $\gamma\delta$  T cells in mouse reproductive tract using tissue clearing methods. *Immunol Cell Biol*. 2019;97(1):104-111.
18. Huang Y, Daneshgari F, Liu G. Successful Induction of Stress Urinary Incontinence in Mice by Vaginal Distension Does Not Depend on the Estrous Cycle. *Urology*. 2014;83(4):958.e1-958.e6.
19. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev*. 2005;206:306–35.
20. Fichorova RN, Tucker LD, Anderson DJ. The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis*. 2001;184(4):418–28.
21. Gregorczyk KP, Krzyżowska M. [Innate immunity to infection in the lower female genital tract]. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013;67:388–401.
22. Hickey D, Patel M, Fahey J, Wira C. Innate and adaptive immunity at Mucosal Surfaces of the Female Reproductive Tract: Stratification and Integration of Immune Protection against the Transmission of Sexually Transmitted Infections. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):185–94.
23. Iijima N, Thompson JM, Iwasaki A. Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol*. 2008;1(6):451–9.
24. Starkey PM, Clover LM, Rees MC. Variation during the menstrual cycle of immune cell populations in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1991;39(3):203–7.
25. Iijima N, Linehan MM, Zamora M, Butkus D, Dunn R, Kehry MR, i in. Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J Exp Med*. 2008;205(13):3041–52.
26. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):10–6.
27. Zhao X, Deak E, Soderberg K, Linehan M, Spezzano D, Zhu J, i in. Vaginal Submucosal Dendritic Cells, but Not Langerhans Cells, Induce Protective Th1 Responses to Herpes Simplex Virus-2. *J Exp Med*. 2003;197(2):153–62.
28. Iijima N, Linehan MM, Saeland S, Iwasaki A. Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *PNAS*. 2007;104(48):19061–6.
29. Pena-Cruz V, Agosto LM, Akiyama H, Olson A, Moreau Y, Larrieux J-R, i in. HIV-1 replicates and persists in vaginal epithelial dendritic cells. *J Clin Invest*. 2018;128(8):3439–44.
30. Rivera J, Fierro NA, Olivera A, Suzuki R. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol*. 2008;98:85–120.
31. Lee SK, Kim CJ, Kim D-J, Kang J. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. *Immune Netw*. 2015;15(1):16–26.

32. Jeziorska M, Salamonsen LA, Woolley DE. Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod.* 1995;53(2):312–20.
33. Woidacki K, Jensen F, Zenclussen AC. Mast cells as novel mediators of reproductive processes. *Front Immunol.* 2013;4:29.
34. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003;102(7):2660–9.
35. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010;33(5):657–70.
36. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest.* 2000;80(5):617–53.
37. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, i in. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol.* 1997;38(5):350–9.
38. Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci.* 2007;85(13 Suppl):E36-44.
39. Murphy SP, Hanna NN, Fast LD, Shaw SK, Berg G, Padbury JF, i in. Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(3):308.e1-9.
40. Mselle TF, Meadows SK, Eriksson M, Smith JM, Shen L, Wira CR, i in. Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clin Immunol.* 2007;124(1):69–76.
41. Yarbrough VL, Winkle S, Herbst-Kralovetz MM. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Human Reproduction Update.* 2015;21(3):353–77.
42. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):710–20.
43. Wira C, Ghosh M, Smith J, Shen L, Connor R, Sundstrom P, i in. Epithelial Cell Secretions from the Human Female Reproductive Tract Inhibit Sexually Transmitted Pathogens and *Candida albicans* but not *Lactobacillus*. *Mucosal Immunol.* 2011;4(3):335–42.
44. Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. *Semin Reprod Med.* 2007;25(6):437–44.
45. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(4):213–21.
46. Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1439–46.
47. Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol.* 2005;174(2):992–1002.

48. Eriksson M, Meadows SK, Wira CR, Sentman CL. Endogenous transforming growth factor-beta inhibits toll-like receptor mediated activation of human uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol.* 2006;56(5–6):321–8.
49. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39(6):1003–18.
50. Markert UR, Morales-Prieto DM, Fitzgerald JS. Understanding the link between the IL-6 cytokine family and pregnancy: implications for future therapeutics. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7(5):603–9.
51. Rallis KS, Corrigan AE, Dadah H, George AM, Keshwara SM, Sideris M, i in. Cytokine-based Cancer Immunotherapy: Challenges and Opportunities for IL-10. *Anticancer Res.* 2021;41(7):3247–52.
52. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13(8):722–8.
53. Li J, Casanova J-L, Puel A. Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):581–9.
54. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006;27(1):17–23.
55. Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:417–43.
56. Kasper LH, Reder AT. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2014;1(8):622–31.
57. Burke JD, Young HA. IFN- $\gamma$ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol.* 2019;43:101280.
58. Lee KMC, Achuthan AA, Hamilton JA. GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity. *Immunotargets Ther.* 2020;9:225–40.
59. Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.* 2021;107598.
60. El-Harith E-HA. The cytokine TNF-alpha. Genetics and suitability for prenatal risks assessment. *Saudi Med J.* 2004;25(2):135–40.
61. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):361–70.
62. Iijima N, Linehan MM, Zamora M, Butkus D, Dunn R, Kehry MR, i in. Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J Exp Med.* 2008;205(13):3041–52.
63. Johansson EL, Rudin A, Wassén L, Holmgren J. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology.* 1999;96(2):272–7.
64. White HD, Crassi KM, Givan AL, Stern JE, Gonzalez JL, Memoli VA, i in. CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J Immunol.* 1997;158(6):3017–27.

65. Kutteh WH, Mestecky J. Secretory immunity in the female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol.* 1994;31(1):40–6.
66. Lamm ME, Mazaneca MB, Nedrud JG, Kaetzel CS. New functions for mucosal IgA. *Adv Exp Med Biol.* 1995;371A:647–50.
67. Wang Y-Y, Kannan A, Nunn KL, Murphy MA, Subramani DB, Moench T, i in. IgG in cervicovaginal mucus traps HSV and prevents vaginal Herpes infections. *Mucosal Immunol.* 2014;7(5):1036–44.
68. Rebello R, Green FH, Fox H. A study of the secretory immune system of the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol.* 1975;82(10):812–6.
69. Kutteh WH, Prince SJ, Hammond KR, Kutteh CC, Mestecky J. Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretions around the time of ovulation. *Clin Exp Immunol.* 1996;104(3):538–42.
70. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):336–45.
71. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):88–100.
72. Chien Y, Meyer C, Bonneville M.  $\gamma\delta$  T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:121–55.
73. Chodaczek G, Papanna V, Zal MA, Zal T. Body barrier surveillance by epidermal gammadelta TCR. *Nat Immunol.* 2012;13(3):272–82.
74. Witherden DA, Havran WL. Cross-talk between intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells and epithelial cells. *J Leukoc Biol.* 2013;94(1):69–76.
75. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* 2005;175(4):2144–51.
76. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science.* 2005;309(5732):264–8.
77. Holtmeier W. Compartmentalization gamma/delta T cells and their putative role in mucosal immunity. *Crit Rev Immunol.* 2003;23(5–6):473–88.
78. Sciammas R, Johnson RM, Sperling AI, Brady W, Linsley PS, Spear PG, i in. Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. *The Journal of Immunology.* 1994;152(11):5392–7.
79. Wang L, Das H, Kamath A, Bukowski JF. Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. *J Immunol.* 2001;167(11):6195–201.
80. Dalton JE, Howell G, Pearson J, Scott P, Carding SR. Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol.* 2004;173(6):3660–7.

81. Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan P-L, i in. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J Infect Dis.* 2009;200(6):858–65.
82. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, i in. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Blood.* 2011;118(1):129–38.
83. Casetti R, Agrati C, Wallace M, Sacchi A, Martini F, Martino A, i in. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol.* 2009;183(6):3574–7.
84. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol.* 2001;212(2):110–7.
85. Abate G, Eslick J, Newman FK, Frey SE, Belshe RB, Monath TP, i in. Flow-cytometric detection of vaccinia-induced memory effector CD4(+), CD8(+), and gamma delta TCR(+) T cells capable of antigen-specific expansion and effector functions. *J Infect Dis.* 2005;192(8):1362–71.
86. Schild H, Mavaddat N, Litzenberger C, Ehrich EW, Davis MM, Bluestone JA, i in. The nature of major histocompatibility complex recognition by  $\gamma\delta$  T cells. *Cell.* 1994;76(1):29–37.
87. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature.* 1986;322(6082):836–40.
88. Rakasz E, Sandor M, Hagen M, Lynch RG. Activation features of intraepithelial gamma delta T-cells of the murine vagina. *Immunol Lett.* 1996;54(2–3):129–34.
89. Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, i in. Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature.* 1990;343(6260):754–7.
90. Itohara S, Tonegawa S. Selection of gamma delta T cells with canonical T-cell antigen receptors in fetal thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(20):7935–8.
91. Fidel Jr. PL, Wolf NA, KuKuruga MA. T lymphocytes in the murine vaginal mucosa are phenotypically distinct from those in the periphery. *Infection and Immunity.* 1996;64(9):3793–9.
92. Nandi D, Allison JP. Phenotypic analysis and  $\gamma\delta$ -T cell receptor repertoire of murine T cells associated with the vaginal epithelium. *J Immunol.* 1991;147(6):1773–8.
93. Mincheva-Nilsson L. Pregnancy and gamma/delta T cells: Taking on the hard questions. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:120.
94. Arck PC, Ferrick DA, Steele-Norwood D, Egan PJ, Croitoru K, Carding SR, i in. Murine T Cell Determination of Pregnancy Outcome: II. Distinct Th1 and Th2/3 Populations of V $\gamma$ 1+ $\delta$ 6+ T Cells Influence Success and Failure of Pregnancy in CBA/J  $\times$  DBA/2J Matings. *Cellular Immunology.* 1999;196(2):71–9.
95. Heyborne K, Fu YX, Nelson A, Farr A, O'Brien R, Born W. Recognition of trophoblasts by gamma delta T cells. *J Immunol.* 1994;153(7):2918–26.

96. Ohno H, Ono S, Hirayama N, Shimada S, Saito T. Preferential usage of the Fc receptor gamma chain in the T cell antigen receptor complex by gamma/delta T cells localized in epithelia. *J Exp Med.* 1994;179(1):365–9.
97. Park SY, Arase H, Wakizaka K, Hirayama N, Masaki S, Sato S, i in. Differential contribution of the FcR gamma chain to the surface expression of the T cell receptor among T cells localized in epithelia: analysis of FcR gamma-deficient mice. *Eur J Immunol.* 1995;25(7):2107–10.
98. Love PE, Shores EW, Johnson MD, Tremblay ML, Lee EJ, Grinberg A, i in. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science.* 1993;261(5123):918–21.
99. Monin L, Ushakov DS, Arnesen H, Bah N, Jandke A, Muñoz-Ruiz M, i in.  $\gamma\delta$  T cells compose a developmentally regulated intrauterine population and protect against vaginal candidiasis. *Mucosal Immunol.* 2020;13(6):969–81.
100. Diener KR, Robertson SA, Hayball JD, Lousberg EL. Multi-parameter flow cytometric analysis of uterine immune cell fluctuations over the murine estrous cycle. *Journal of Reproductive Immunology.* 2016;113:61–7.
101. Pinget GV, Corpuz TM, Stolp J, Lousberg EL, Diener KR, Robertson SA, i in. The majority of murine  $\gamma\delta$  T cells at the maternal–fetal interface in pregnancy produce IL-17. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(7):623–30.
102. Rakasz E, Rigby S, de Andres B, Mueller A, Hagen M, Dailey MO, i in. Homing of transgenic gammadelta T cells into murine vaginal epithelium. *Int Immunol.* 1998;10(10):1509–17.
103. Rakasz E, Mueller A, Perlman S, Lynch RG.  $\gamma\delta$  T cell response induced by vaginal Herpes simplex 2 infection. *Immunology Letters.* 1999;70(2):89–93.
104. Nalbandian G, Kovats S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res.* 2005;31(2):91–106.
105. Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;38(1):13–22.
106. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007;28(5):521–74.
107. Zang YCQ, Halder JB, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Regulatory effects of estriol on T cell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF-kappa B. *J Neuroimmunol.* 2002;124(1–2):106–14.
108. Enomoto LM, Kloberdanz KJ, Mack DG, Elizabeth D, Weinberg A. Ex vivo effect of estrogen and progesterone compared with dexamethasone on cell-mediated immunity of HIV-infected and uninfected subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(2):137–43.
109. Wira CR, Rossoll RM, Kaushic C. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of estradiol on antigen presentation by vaginal cells. *Endocrinology.* 2000;141(8):2877–85.
110. Kaushic C, Ashkar AA, Reid LA, Rosenthal KL. Progesterone increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. *J Virol.* 2003;77(8):4558–65.



111. Cherpes TL, Busch JL, Sheridan BS, Harvey SAK, Hendricks RL. Medroxyprogesterone acetate inhibits CD8+ T cell viral specific effector function and induces herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Immunol.* 2008;181(2):969–75.
112. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, i in. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol.* 1995;155(1):128–33.
113. Inoue T, Kanzaki H, Imai K, Narukawa S, Katsuragawa H, Watanabe H, i in. Progesterone stimulates the induction of human endometrial CD56+ lymphocytes in an in vitro culture system. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(4):1502–7.
114. Hughes GC, Clark EA. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. *Autoimmunity.* 2007;40(6):470–81.
115. Lund JM, Linehan MM, Iijima N, Iwasaki A. Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. *J Immunol.* 2006;177(11):7510–4.
116. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol.* 2017;595(2):451–63.
117. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis.* 1999;180(6):1950–6.
118. Bradford LL, Ravel J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence.* 2017;8(3):342–51.
119. Auriemma RS, Sciarati R, del Vecchio G, Liccardi A, Verde N, Pirchio R, i in. The Vaginal Microbiome: A Long Urogenital Colonization Throughout Woman Life. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:686167.
120. Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *J Fungi (Basel).* 2020;6(1):27.
121. Rosati D, Bruno M, Jaeger M, ten Oever J, Netea MG. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective. *Microorganisms.* 2020;8(2):144.
122. Yano J, Lilly E, Barousse M, Fidel PL. Epithelial Cell-Derived S100 Calcium-Binding Proteins as Key Mediators in the Hallmark Acute Neutrophil Response during *Candida* Vaginitis. *Infect Immun.* 2010;78(12):5126–37.
123. Richardson JP, Willems HME, Moyes DL, Shoaie S, Barker KS, Tan SL, i in. Candidalysin Drives Epithelial Signaling, Neutrophil Recruitment, and Immunopathology at the Vaginal Mucosa. *Infect Immun.* 2018;86(2):e00645-17.
124. Nomanbhoy F, Steele C, Yano J, Fidel PL. Vaginal and oral epithelial cell anti-*Candida* activity. *Infect Immun.* 2002;70(12):7081–8.
125. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2013;190(8):4136–48.

126. Yano J, Noverr MC, Fidel PL. Vaginal Heparan Sulfate Linked to Neutrophil Dysfunction in the Acute Inflammatory Response Associated with Experimental Vulvovaginal Candidiasis. *mBio*. 2017;8(2):e00211-17.
127. Hayashi K, Hayashi M, Boutin E, Cunha GR, Bernfield M, Trelstad RL. Hormonal modification of epithelial differentiation and expression of cell surface heparan sulfate proteoglycan in the mouse vaginal epithelium. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Lab Invest*. 1988;58(1):68–76.
128. Fidel PL, Yano J, Esher SK, Noverr MC. Applying the Host-Microbe Damage Response Framework to Candida Pathogenesis: Current and Prospective Strategies to Reduce Damage. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(1):35.
129. Wormley FL, Steele C, Wozniak K, Fujihashi K, McGhee JR, Fidel PL. Resistance of T-Cell Receptor  $\delta$ -Chain-Deficient Mice to Experimental *Candida albicans* Vaginitis. *Infect Immun*. 2001;69(11):7162–4.
130. Yano J, Kolls JK, Happel KI, Wormley F, Wozniak KL, Fidel PL. The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal *Candida* infections is independent of the Th17-pathway. *PLoS One*. 2012;7(9):e46311.
131. Peters BM, Coleman BM, Willems HME, Barker KS, Aggor FEY, Cipolla E, i in. The Interleukin (IL) 17R/IL-22R Signaling Axis Is Dispensable for Vulvovaginal Candidiasis Regardless of Estrogen Status. *J Infect Dis*. 2020;221(9):1554–63.
132. Fidel PL. Caution regarding interpretations of intrauterine  $\gamma/\delta$  T cells in protection against experimental vaginal candidiasis. *Mucosal Immunol*. 2021;14(3):774–5.
133. Monin L, Hayday A. Response to “caution regarding interpretations of intrauterine  $\gamma/\delta$  T cells in protection against experimental vaginal candidiasis”. *Mucosal Immunol*. 2021;14(3):776–7.
134. Brotman RM, Ravel J, Bavoil PM, Gravitt PE, Ghanem KG. Microbiome, Sex Hormones, and Immune Responses in the Reproductive Tract: Challenges for Vaccine Development Against Sexually Transmitted Infections. *Vaccine*. 2014;32(14):1543–52.
135. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):592–605.
136. Gallichan WS, Rosenthal KL. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J Exp Med*. 1996;184(5):1879–90.
137. Wright PF. Inductive/Effector Mechanisms for Humoral Immunity at Mucosal Sites. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;65(3):248–52.
138. Wright PF, Kozlowski PA, Rybczyk GK, Goepfert P, Staats HF, Vancott TC, i in. Detection of Mucosal Antibodies in HIV Type 1-Infected Individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2002;18(17):1291–300.
139. Li M, Wang Y, Sun Y, Cui H, Zhu SJ, Qiu H-J. Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunology Letters*. 2020;217:116–25.
140. Kozlowski PA, Williams SB, Lynch RM, Flanigan TP, Patterson RR, Cu-Uvin S, i in. Differential Induction of Mucosal and Systemic Antibody Responses in Women After Nasal, Rectal, or Vaginal Immunization: Influence of the Menstrual Cycle. *The Journal of Immunology*. 2002;169(1):566–74.

141. Black CA, Rohan LC, Cost M, Watkins SC, Draviam R, Alber S, i in. Vaginal Mucosa Serves as an Inductive Site for Tolerance. *The Journal of Immunology*. 2000;165(9):5077–83.
142. Harandi AM, Davies G, Olesen OF. Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(3):293–8.
143. Mbow ML, De Gregorio E, Ulmer JB. Alum’s adjuvant action: grease is the word. *Nat Med*. 2011;17(4):415–6.
144. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. 2005;11(4):S45–53.
145. Pulendran B, S. Arunachalam P, O’Hagan DT. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(6):454–75.
146. Ashkar AA, Rosenthal KL. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr Mol Med*. 2002;2(6):545–56.
147. Ichikawa HT, Williams LP, Segal BM. Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. *J Immunol*. 2002;169(5):2781–7.
148. Kwant A, Rosenthal KL. Intravaginal immunization with viral subunit protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protective immunity against HSV-2. *Vaccine*. 2004;22(23–24):3098–104.
149. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, i in. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *PNAS*. 2004;101(15):5598–603.
150. van Aalst S, Jansen MAA, Ludwig IS, van der Zee R, van Eden W, Broere F. Routing dependent immune responses after experimental R848-adjuvated vaccination. *Vaccine*. 2018;36(11):1405–13.
151. McKay PF, Mann JFS, Pattani A, Kett V, Aldon Y, King D, i in. Intravaginal immunisation using a novel antigen-releasing ring device elicits robust vaccine antigen-specific systemic and mucosal humoral immune responses. *J Control Release*. 2017;249:74–83.
152. Brown GD, Gordon S. Fungal  $\beta$ -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity*. 2003;19(3):311–5.
153. Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. *Cellular Microbiology*. 2005;7(4):471–9.
154. Berner VK, Sura ME, Hunter KW. Conjugation of protein antigen to microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;80(6):1053–61.
155. Borgoni S, Kudryashova KS, Burka K, de Magalhães JP. Targeting immune dysfunction in aging. *Ageing Res Rev*. 2021;101410.
156. Szymański JK, Słabuszewska-Józwiak A, Jakiel G. Vaginal Aging—What We Know and What We Do Not Know. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(9).
157. Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact*. 2020;19:203.

158. Tucker KM, Godha K, Mirkin S, Archer DF. Vaginal pH: a simple assessment highly correlated with vaginal morphology and symptoms in postmenopausal women. *Menopause*. 2018;25(7):762–6.
159. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Shen Z, Wira CR. The impact of aging on innate and adaptive immunity in the human female genital tract. *Aging Cell*. 2021;20(5):e13361.
160. Jais M, Younes N, Chapman S, Cu-Uvin S, Ghosh M. Reduced levels of genital tract immune biomarkers in postmenopausal women: implications for HIV acquisition. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(3):324.e1-324.e10.
161. Chappell CA, Isaacs CE, Xu W, Meyn LA, Uranker K, Dezzutti CS, i in. The effect of menopause on the innate antiviral activity of cervicovaginal lavage. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(2):204.e1-6.
162. Rodriguez-Garcia M, Barr FD, Crist SG, Fahey JV, Wira CR. Phenotype and Susceptibility to HIV-infection of CD4+ Th17 Cells in the Human Female Reproductive Tract. *Mucosal Immunol*. 2014;7(6):1375–85.
163. McKinnon LR, Nyanga B, Chege D, Izulla P, Kimani M, Huibner S, i in. Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J Immunol*. 2011;187(11):6032–42.
164. Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Fortier JM, Wira CR. Differential Cytotoxic Function of Resident and Non-resident CD8+ T Cells in the Human Female Reproductive Tract Before and After Menopause. *Front Immunol*. 2020;11:1096.
165. Hazeldine J, Lord JM. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev*. 2013;12(4):1069–78.
166. Rodriguez-Garcia M, Fortier JM, Barr FD, Wira CR. Aging impacts CD103+ CD8+ T cell presence and induction by dendritic cells in the genital tract. *Aging Cell*. 2018;17(3):e12733.
167. Thurman AR, Yousefieh N, Chandra N, Kimble T, Asin S, Rollenhagen C, i in. Comparison of Mucosal Markers of Human Immunodeficiency Virus Susceptibility in Healthy Premenopausal Versus Postmenopausal Women. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017;33(8):807–19.
168. Safwat MDE-D, Habib FA, Oweiss NY. Distribution of macrophages in the human fallopian tubes: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Folia Morphol (Warsz)*. 2008;67(1):43–52.
169. Jalanti R, Isliker H. Immunoglobulins in human cervico-vaginal secretions. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1977;53(5):402–8.
170. Marx V. Microscopy: Seeing through tissue. *Nature Methods*. 2014;11(12):1209–14.
171. Lee E, Kim HJ, Sun W. See-through technology for biological tissue: 3-dimensional visualization of macromolecules. *International Neurourology Journal*. 2016;20:S15–22.
172. Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell*. 2015;162(2):246–57.
173. Tainaka K, Kuno A, Kubota SI, Murakami T, Ueda HR. Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2016;32(1):713–41.

174. Spalteholz W. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung. S. Hirzel; 1914.
175. Silvestri L, Costantini I, Sacconi L, Pavone FS. Clearing of fixed tissue: A review from a microscopist's perspective. *Journal of Biomedical Optics*. 2016;21(8).
176. Ariel P. A beginner's guide to tissue clearing. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2017;84:35–9.
177. Feuchtinger A, Walch A, Dobosz M. Deep tissue imaging: a review from a preclinical cancer research perspective. *Histochem Cell Biol*. 2016;146(6):781–806.
178. Seo J, Choe M, Kim and S-Y. Clearing and Labeling Techniques for Large-Scale Biological Tissues. *Molecules and Cells*. 2016;39(6):439–46.
179. Neckel PH, Mattheus U, Hirt B, Just L, Mack AF. Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure. *Scientific Reports* 2016;6.
180. Lee H, Park J-H, Seo I, Park S-H, Kim S. Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine. *BMC Dev Biol*. 2014;14.
181. Olson E, Levene MJ, Torres R. Multiphoton microscopy with clearing for three dimensional histology of kidney biopsies. *Biomedical Optics Express*. 2016;7(8):3089–96.
182. Jing D, Yi Y, Luo W, Zhang S, Yuan Q, Wang J, i in. Tissue Clearing and Its Application to Bone and Dental Tissues. *J Dent Res*. 2019;98(6):621–31.
183. Hafez SA, Freeman LE, Caceci T, Smith BJ. Study of the vasculature of the caprine reproductive organs using the tissue-clearing technique, with special reference to the angioarchitecture of the utero-ovarian vessels and the adaptation of the ovarian and/or vaginal arteries to multiple pregnancies. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007;290(4):389–405.
184. Malki S, Tharp ME, Bortvin A. A whole-mount approach for accurate quantitative and spatial assessment of fetal oocyte dynamics in mice. *Biology of Reproduction*. 2015;93(5).
185. Arora R, Fries A, Oelerich K, Marchuk K, Sabeur K, Giudice LC, i in. Insights from imaging the implanting embryo and the uterine environment in three dimensions. *Development*. 2016;143(24):4749–54.
186. Kagami K, Shinmyo Y, Ono M, Kawasaki H, Fujiwara H. Three-dimensional visualization of intrauterine conceptus through the uterine wall by tissue clearing method. *Scientific Reports*. 2017;7(1):5964.
187. Kagami K, Shinmyo Y, Ono M, Kawasaki H, Fujiwara H. Three-dimensional evaluation of murine ovarian follicles using a modified CUBIC tissue clearing method. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):72.
188. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, i in. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*. 2014;157(3):726–39.
189. Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, i in. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*. 2015;18(10):1518–29.

190. Prinz I, Sansoni A, Kissenpfennig A, Ardouin L, Malissen M, Malissen B. Visualization of the earliest steps of  $\gamma\delta$  T cell development in the adult thymus. *Nature Immunology*. 2006;7(9):995.
191. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014;2014(10):1042–65.
192. Shuman H, Murray JM, DiLullo C. Confocal microscopy: an overview. *BioTechniques*. 1989;7(2):154–63.
193. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 2012;132(12):e3.
194. Rubart M. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res*. 2004;95(12):1154–66.
195. Cahalan MD, Parker I, Wei SH, Miller MJ. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):872–80.
196. Diaspro A, Robello M. Two-photon excitation of fluorescence in three-dimensional microscopy. *Eur J Histochem*. 1999;43(3):169–78.
197. Liu Z, Meng J, Quinn KP, Georgakoudi I. Tissue Imaging and Quantification Relying on Endogenous Contrast. W: Wei X, Gu B. *Optical Imaging in Human Disease and Biological Research*. Singapore: Springer; 2021 s. 257–88.
198. Mohler W, Millard AC, Campagnola PJ. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods*. 2003;29(1):97–109.
199. Campagnola PJ, Loew LM. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol*. 2003;21(11):1356–60.
200. Loken MR, Stall AM. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. *J Immunol Methods*. 1982;50(3):R85-112.
201. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1-5.1.11.
202. Autengruber A, Gereke M, Hansen G, Hennig C, Bruder D. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012;2(2):112–20.
203. White HD, Prabhala RH, Humphrey SL, Crassi KM, Richardson JM, Wira CR. A Method for the Dispersal and Characterization of Leukocytes from the Human Female Reproductive Tract. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2000;44(2):96–103.
204. Blaisdell A, Erlebacher A. 53 - Flow Cytometric Analysis of Myometrial and Decidual Cell Suspensions. W: Croy BA, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Boston: Academic Press; 2014 s. 619–28.
205. Linetsky E, Selvaggi G, Bottino R, Kong SS, Qian T, Alejandro R, i in. Comparison of collagenase type P and Liberase during human islet isolation using the automated method. *Transplant Proc*. 1995;27(6):3264.
206. Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J Mol Med*. 1999;77(1):118–20.

207. Lakey JR, Cavanagh TJ, Zieger MA, Albertson TE, Dwulet F, Wright MJ, i in. Evaluation of a purified enzyme blend for the recovery and in vitro function of isolated canine islets. *Transplant Proc.* 1998;30(2):590–1.
208. Lipinski T, Fiteih A, Pierre JS, Ostergaard HL, Bundle DR, Touret N. Enhanced Immunogenicity of a Tricomponent Mannan Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Targeted to Dendritic Cells via Dectin-1 by Incorporating  $\beta$ -Glucan. *The Journal of Immunology.* 2013;190(8):4116–28.
209. Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, Iacomini J, Nelson A, Clarke AR, i in. T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell.* 1993;72(3):337–48.
210. Lanza SR, Menin Á, Ertl HCJ, Báfica A, Pinto AR. Simian recombinant adenovirus delivered by the mucosal route modulates  $\gamma\delta$  T cells from murine genital tract. *Vaccine.* 2010;28(29):4600–8.
211. O'Brien JE, Peterson TJ, Tong MH, Lee E-J, Pfaff LE, Hewitt SC, i in. Estrogen-induced Proliferation of Uterine Epithelial Cells Is Independent of Estrogen Receptor  $\alpha$  Binding to Classical Estrogen Response Elements. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26683–92.
212. Luci C, Hervouet C, Rousseau D, Holmgren J, Czerkinsky C, Anjuère F. Dendritic cell-mediated induction of mucosal cytotoxic responses following intravaginal immunization with the nontoxic B subunit of cholera toxin. *J Immunol.* 2006;176(5):2749–57.
213. Wu X, Bundle DR. Synthesis of glycoconjugate vaccines for *Candida albicans* using novel linker methodology. *J Org Chem.* 2005;70(18):7381–8.
214. Nojima S, Susaki E, Yoshida K, Takemoto H, Tsujimura N, Iijima S, i in. CUBIC pathology: Three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Scientific Reports.* 2017;7.
215. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy.* 2006;224(3):213–32.
216. Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods.* 2000;233(1–2):47–56.
217. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology.* 1989;7(1):145–73.
218. Jameson JM, Cauvi G, Witherden DA, Havran WL. A Keratinocyte-Responsive  $\gamma\delta$  TCR Is Necessary for Dendritic Epidermal T Cell Activation by Damaged Keratinocytes and Maintenance in the Epidermis. *The Journal of Immunology.* 2004;172(6):3573–9.
219. Curry TE Jr, Osteen KG. Cyclic Changes in the Matrix Metalloproteinase System in the Ovary and Uterus1. *Biology of Reproduction.* 2001;64(5):1285–96.
220. Ford AL, Foulcher E, Goodsall AL, Sedgwick JD. Tissue digestion with dispase substantially reduces lymphocyte and macrophage cell-surface antigen expression. *J Immunol Methods.* 1996;194(1):71–5.
221. Haas GG, Nicosia SV, Wolf DP. Influence of estrogens on vascular transudation and mucus production in the rabbit endocervix. *Fertil Steril.* 1987;48(6):1036–42.

222. Wira CR, Rossoll RM. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of the estrous cycle on antigen presentation by uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinology*. 1995;136(10):4526–34.
223. Seavey MM, Mosmann TR. Estradiol-induced vaginal mucus inhibits antigen penetration and CD8+ T cell priming in response to intravaginal immunization. *Vaccine*. 2009;27(17):2342–9.
224. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):148–58.
225. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants that Switch on T Helper 1 (Th1) Immunity. *J Exp Med*. 1997;186(10):1623–31.
226. Chen Y, Dong L, Weng D, Liu F, Song L, Li C, i in. 1,3- $\beta$ -glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro. *Mol Med Rep*. 2013;8(2):708–12.
227. Monin L, Whettlock EM, Male V. Immune responses in the human female reproductive tract. *Immunology*. 2020;160(2):106–15.
228. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982;27(2):327–39.
229. Heyborne KD, Cranfill RL, Carding SR, Born WK, O'Brien RL. Characterization of gamma delta T lymphocytes at the maternal-fetal interface. *J Immunol*. 1992;149(9):2872–8.
230. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685–705.
231. Drago-Serrano ME, Campos-Rodríguez R, Carrero JC, De la Garza M. Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(3):501.
232. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(1):1–6.
233. Valenti P, Rosa L, Capobianco D, Lepanto MS, Schiavi E, Cutone A, i in. Role of Lactobacilli and Lactoferrin in the Mucosal Cervicovaginal Defense. *Front Immunol*. 2018;9:376.
234. Drago-Serrano ME, de la Garza-Amaya M, Luna JS, Campos-Rodríguez R. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int Immunopharmacol*. 2012;12(1):1–9.
235. Novak RM, Donoval BA, Graham PJ, Boksa LA, Spear G, Hershov RC, i in. Cervicovaginal levels of lactoferrin, secretory leukocyte protease inhibitor, and RANTES and the effects of coexisting vaginoses in human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative women with a high risk of heterosexual acquisition of HIV infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(9):1102–7.
236. Spear GT, Kendrick SR, Chen HY, Thomas TT, Bahk M, Balderas R, i in. Multiplex immunoassay of lower genital tract mucosal fluid from women attending an urban STD clinic shows broadly increased IL1 $\beta$  and lactoferrin. *PLoS One*. 2011;6(5):e19560.
237. Mincheva-Nilsson L, Hammarström S, Hammarström ML. Activated human gamma delta T lymphocytes express functional lactoferrin receptors. *Scand J Immunol*. 1997;46(6):609–18.



238. Kelder ME, Kaul A, Nowicki B, Findley WE, Hutchens TW, Nagamani M. Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36(5):243–7.
239. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*. 1995;37(4):417–29.
240. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):557–66.
241. Wang L, Luo H, Chen X, Jiang Y, Huang Q. Functional Characterization of S100A8 and S100A9 in Altering Monolayer Permeability of Human Umbilical Endothelial Cells. *PLoS One*. 2014;9(3):e90472.
242. Yano J, Noverr MC, Fidel PL. Cytokines in the host response to *Candida vaginitis*: Identifying a role for non-classical immune mediators, S100 alarmins. *Cytokine*. 2012;58(1):118–28.
243. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:1298.
244. Heeger PS, Kemper C. Novel roles of complement in T effector cell regulation. *Immunobiology*. 2012;217(2):216–24.
245. Sellar GC, Blake DJ, Reid KB. Characterization and organization of the genes encoding the A-, B- and C-chains of human complement subcomponent C1q. The complete derived amino acid sequence of human C1q. *Biochemical Journal*. 1991;274(2):481–90.
246. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010;20(1):34–50.
247. Kwan W, van der Touw W, Heeger PS. Complement regulation of T cell immunity. *Immunol Res*. 2012;54(0):247–53.
248. Richani K, Soto E, Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Nien JK, i in. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2005;17(4):239–45.
249. Kouser L, Madhukaran SP, Shastri A, Saraon A, Ferluga J, Al-Mozaini M, i in. Emerging and Novel Functions of Complement Protein C1q. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:317.
250. Sheen J-H, Strainic M, Lui J, Zhang W, Yi Z, Medof ME, i in. Toll like receptor-induced murine dendritic cell activation requires dendritic cell-intrinsic complement. *J Immunol*. 2017;199(1):278–91.
251. Jun SW, Kim TH, Lee HM, Lee SH, Kim WJ, Park SJ, i in. Overexpression of the anaphylatoxin receptors, complement anaphylatoxin 3a receptor and complement anaphylatoxin 5a receptor, in the nasal mucosa of patients with mild and severe persistent allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(1):119–25.
252. Propson NE, Roy ER, Litvinchuk A, Köhl J, Zheng H. Endothelial C3a receptor mediates vascular inflammation and blood-brain barrier permeability during aging. *J Clin Invest*. 2021;131(1):140966.

253. Lawal B, Tseng S-H, Olugbodi JO, Iamsaard S, Ilesanmi OB, Mahmoud MH, i in. Pan-Cancer Analysis of Immune Complement Signature C3/C5/C3AR1/C5AR1 in Association with Tumor Immune Evasion and Therapy Resistance. *Cancers*. 2021;13(16):4124.
254. Livson S, Jarva H, Kalliala I, Lokki AI, Heikkinen-Eloranta J, Nieminen P, i in. Activation of the Complement System in the Lower Genital Tract During Pregnancy and Delivery. *Front Immunol*. 2021;11.
255. Teirilä L, Heikkinen-Eloranta J, Kotimaa J, Meri S, Lokki AI. Regulation of the complement system and immunological tolerance in pregnancy. *Semin Immunol*. 2019;45:101337.
256. Agostinis C, Balduit A, Mangogna A, Zito G, Romano F, Ricci G, i in. Immunological Basis of the Endometriosis: The Complement System as a Potential Therapeutic Target. *Front Immunol*. 2021;11.
257. Rahal D, Andrade F, Nisihara R. Insights into the role of complement system in the pathophysiology of endometriosis. *Immunol Lett*. 2021;231:43–8.
258. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu M-L, Higo T, Nakagawa A, i in. Complement C1q Activates Canonical Wnt Signaling and Promotes Aging-Related Phenotypes. *Cell*. 2012;149(6):1298–313.
259. Falgarone G, Chiocchia G. Chapter 8: Clusterin: A multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Adv Cancer Res*. 2009;104:139–70.
260. Diel P, Schulz T, Smolnikar K, Strunck E, Vollmer G, Michna H. Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000;73(1–2):1–10.
261. Trougakos IP, Petropoulou C, Franceschi C, Gonos ES. Reduced Expression Levels of the Senescence Biomarker Clusterin/Apolipoprotein J in Lymphocytes from Healthy Centenarians. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1067(1):294–300.
262. Park DC, Yeo SG, Shin EY, Mok SC, Kim DH. Clusterin confers paclitaxel resistance in cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):996–1000.
263. Watari H, Ohta Y, Hassan MK, Xiong Y, Tanaka S, Sakuragi N. Clusterin expression predicts survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy and systematic lymphadenectomy. *Gynecol Oncol*. 2008;108(3):527–32.
264. Ahn HJ, Bae J, Lee S, Ko JE, Yoon S, Kim SJ, i in. Differential expression of clusterin according to histological type of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2008;110(2):222–9.
265. French LE, Polla LL, Tschopp J, Schifferli JA. Membrane attack complex (MAC) deposits in skin are not always accompanied by S-protein and clusterin. *J Invest Dermatol*. 1992;98(5):758–63.
266. Rodríguez-Rivera C, Garcia MM, Molina-Álvarez M, González-Martín C, Goicoechea C. Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;134:111174.
267. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, i in. Regulation of Cutaneous Malignancy by  $\gamma\delta$  T Cells. *Science*. 2001;294(5542):605–9.

268. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(1):43–64.
269. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):89–102.
270. Wei XX, Chan S, Kwek S, Lewis J, Dao V, Zhang L, i in. Systemic GM-CSF recruits effector T cells into the tumor microenvironment in localized prostate cancer. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(11):948–58.
271. DiTirro J, Rhoades ER, Roberts AD, Burke JM, Mukasa A, Cooper AM, i in. Disruption of the Cellular Inflammatory Response to *Listeria monocytogenes* Infection in Mice with Disruptions in Targeted Genes. *Infection and Immunity.* 1998;66(5):2284–9.

## 8. Spis Rycin

|   |    |
|---|----|
| Ryc. 1. Budowa układu rozrodczego myszy. ....   | 11 |
| Ryc. 2. Fazy cyklu rujowego myszy. ....   | 14 |
| Ryc. 3. Funkcje komórek T $\gamma\delta$ . ....   | 22 |
| Ryc. 4. Działanie limfocytów T $\gamma\delta$ . ....  | 24 |
| Ryc. 5. Rozwój limfocytów T $\gamma\delta$ u myszy w trakcie rozwoju embrionalnego. ....  | 24 |
| Ryc. 6. Podział metod oczyszczania tkanek. ....   | 35 |
| Ryc. 7. Porównanie mikroskopii jedno- i dwufotonowej. ....  | 38 |
| Ryc. 8. Porównanie zakresu głębokości analizowanej tkanki bez oczyszczania i po oczyszczeniu z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej lub dwufotonowej. .... | 40 |
| Ryc. 9. Strategia bramkowania subpopulacji komórek w układzie rozrodczym i węzłach chłonnych. ....  | 60 |
| Ryc. 10. Strategia bramkowania do fenotypowania komórek GFP <sup>+</sup> izolowanych od myszy Tcrd-H2BeGFP. ....  | 62 |
| Ryc. 11. Strategia bramkowania w panelu 1. ....   | 63 |
| Ryc. 12. Strategia bramkowania w panelu 2. ....   | 64 |
| Ryc. 13. Schemat przebiegu eksperymentów porównujących podstawowe protokoły oczyszczania metodami ScaleS i CUBIC. ....                                      | 71 |
| Ryc. 14. Oczyszczanie węzłów chłonnych za pomocą podstawowych protokołów CUBIC i ScaleS. ....   | 72 |
| Ryc. 15. Oczyszczanie pochwy za pomocą podstawowych protokołów CUBIC i ScaleS. ....   | 73 |
| Ryc. 16. Porównanie masy pochwy przed i po oczyszczeniu za pomocą podstawowych protokołów CUBIC i ScaleS. ....  | 74 |
| Ryc. 17. Schemat przebiegu eksperymentów porównujących kompatybilność metod AbScale i CUBIC z barwieniem cytoszkieletu. ....                                | 74 |
| Ryc. 18. Porównanie kompatybilności metod ScaleS i CUBIC z barwieniem cytoszkieletu. ....   | 75 |
| Ryc. 19. Schemat przebiegu eksperymentów porównujących kompatybilność metod AbScale i CUBIC z barwieniem błony podstawnej. ....                             | 75 |
| Ryc. 20. Wizualizacja immunofluorescencyjna lamininy w ścianie pochwy. ....   | 76 |
| Ryc. 21. Schemat analizy in situ limfocytów T $\gamma\delta$ z wykorzystaniem metody CUBIC. ....  | 77 |
| Ryc. 22. Cytologia pochwy po podaniu hormonów. ....   | 77 |
| Ryc. 23. Analiza grubości nabłonka pochwy oczyszczonej metodą CUBIC podczas cyklu rujowego. ....  | 80 |
| Ryc. 24. Analiza ilościowa limfocytów T $\gamma\delta$ w pochwie oczyszczonej metodą CUBIC podczas cyklu rujowego. ....                                     | 79 |
| Ryc. 25. Analiza ilościowa limfocytów T $\gamma\delta$ w nabłonku i stromie pochwy podczas cyklu rujowego. ....   | 80 |
| Ryc. 26. Analiza lokalizacji limfocytów T $\gamma\delta$ w pochwie oczyszczonej metodą CUBIC podczas cyklu rujowego. ....                                   | 81 |
| Ryc. 27. Wizualizacja limfocytów T $\gamma\delta$ skóry i pochwy od wejścia pochwy w kierunku szyjki macicy. ....   | 82 |
| Ryc. 28. Analiza poziomu ekspresji $\gamma\delta$ TCR i łańcucha V $\gamma$ 5 w limfocytach T $\gamma\delta$ naskórkowych i pochwowych. ....                | 83 |
| Ryc. 29. Schemat przebiegu optymalizacji metody trawienia enzymatycznego układu rozrodczego. ....   | 84 |
| Ryc. 30. Wydajność uwalniania żywych komórek przy użyciu różnych protokołów izolacji. ....  | 85 |
| Ryc. 31. Wpływ protokołu izolacji i fazy cyklu na żywotność komórek. ....   | 86 |

|   |     |
|---|-----|
| Ryc. 32. Wpływ enzymatycznego trawienia tkanek na liczbę uwolnionych żywych komórek odpornościowych z układu rozrodczego.....   | 87  |
| Ryc. 33. Skład komórkowy po trawieniu enzymatycznym pochwy i macicy.....  | 90  |
| Ryc. 34. Zmiany liczbowe w populacji komórek T $\gamma\delta$ w pochwie i macicy podczas cyklu rujowego po trawieniu enzymatycznym izolowanych tkanek.....                          | 89  |
| Ryc. 35. Porównanie populacji komórek T $\gamma\delta$ w pochwie i macicy podczas cyklu rujowego po trawieniu Liberazą TL.....  | 90  |
| Ryc. 36. Wpływ cyklu rujowego na bezwzględną liczbę komórek CD45 <sup>+</sup> i komórek T $\gamma\delta$ w węzłach chłonnych.....   | 91  |
| Ryc. 37. Schemat eksperymentów porównujących przebieg immunizacji w zależności od fazy cyklu rujowego.....  | 92  |
| Ryc. 38. Poziom swoistych przeciwciał anti-OVA klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w surowicach.....   | 94  |
| Ryc. 39. Poziom swoistych przeciwciał anti-OVA klasy IgA oraz IgE w wydzielinach pochwy.....  | 95  |
| Ryc. 40. Schemat eksperymentów porównujących wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na indukcję odpowiedzi immunologicznej po immunizacji owoalbuminą.....                               | 96  |
| Ryc. 41. Poziom swoistych przeciwciał anti-OVA klasy IgA, IgE, IgG i IgM w surowicach.....  | 100 |
| Ryc. 42. Poziom swoistych przeciwciał anti-OVA podklas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w surowicach.....  | 99  |
| Ryc. 43. Poziom swoistych przeciwciał anti-OVA klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w wydzielinach pochwy.....  | 100 |
| Ryc. 44. Poziom swoistych przeciwciał anti-OVA klasy IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w wydzielinach pochwy.....   | 101 |
| Ryc. 45. Schemat eksperymentów porównujących wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na indukcję odpowiedzi immunologicznej po immunizacji koniugatem toksoid tężcowy – trójsacharyd..... | 103 |
| Ryc. 46. Poziom swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w surowicach.....  | 104 |
| Ryc. 47. Poziom swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd podklas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w surowicach.....   | 105 |
| Ryc. 48. Poziom swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd klasy IgA, IgE, IgG oraz IgM w wydzielinach pochwy.....   | 106 |
| Ryc. 49. Poziom swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd podklas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c oraz IgG3 w wydzielinach pochwy.....  | 107 |
| Ryc. 50. Schemat przebiegu eksperymentów określających wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy.....          | 109 |
| Ryc. 51. Wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na populacje komórek CD45R/B220 <sup>+</sup> , Gr-1 <sup>+</sup> , CD19 <sup>+</sup> , F4/80 <sup>+</sup> w pochwie i macicy.....        | 111 |
| Ryc. 52. Wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na populacje komórek CD11b <sup>+</sup> , CD11c <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> , CD117 <sup>+</sup> w pochwie i macicy.....             | 112 |
| Ryc. 53. Wpływ limfocytów T $\gamma\delta$ na populacje komórek EpCAM <sup>+</sup> , FcεRIα <sup>+</sup> , NK-1.1 <sup>+</sup> w pochwie i macicy.....                              | 113 |
| Ryc. 54. Podsumowanie wyników wpływu braku limfocytów T $\gamma\delta$ na inne populacje komórek układu odpornościowego w układzie rozrodczym myszy.....                            | 114 |
| Ryc. 55. Schemat przebiegu eksperymentów określających cytometrycznie liczbę komórek T $\gamma\delta$ w układzie rozrodczym myszy młodych i starych.....                            | 115 |
| Ryc. 56. Porównanie populacji komórek T $\gamma\delta$ w pochwie i macicy u myszy C57BL/6 młodych i starych.....  | 116 |

|  |     |
|--|-----|
| Ryc. 57. Schemat przebiegu eksperymentów określających mikroskopowo liczbę komórek T $\gamma\delta$ w pochwie myszy młodych i starych. ....  | 116 |
| Ryc. 58. Mikroskopowa analiza liczby komórek T $\gamma\delta$ w pochwie myszy młodych i starych. ....  | 117 |
| Ryc. 59. Schemat przebiegu badań ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ . ....  | 118 |
| Ryc. 60. Diagram Venna przedstawiający związek między ekspresją genów w pochwie regulujących proces starzenia u myszy WT i Tcrd <sup>-/-</sup> . ....  | 122 |
| Ryc. 61. Schemat przebiegu eksperymentów określających poziom cytokin w pochwach i macicach w zdrowej tkance oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ w zależności od wieku myszy. ....                | 122 |
| Ryc. 62. Poziom stężenia cytokin IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ i IL-12p70 w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ w zależności od wieku myszy. .... | 124 |
| Ryc. 63. Poziom stężenia cytokin IL-23, IL-17A i MCP-1 w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ w zależności od wieku myszy. ....                   | 125 |
| Ryc. 64. Poziom stężenia cytokin IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ i GM-CSF w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ w zależności od wieku myszy. ....  | 126 |
| Ryc. 65. Poziom stężenia cytokin IL-10, IL-6, IL-27 i IFN- $\beta$ w pochwach (A) i macicach (B) w stanie podstawowym oraz po indukcji zapalenia nabłonka w myszach typu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ w zależności od wieku myszy. ....       | 127 |

## 9. Spis Tabel

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1. Działanie wybranych cytokin analizowanych w rozprawie doktorskiej.....  | 19  |
| Tabela 2. Techniki oczyszczania stosowane w oczyszczaniu układu rozrodczego.....  | 37  |
| Tabela 3. Antygeny i adiuwanty używane do immunizacji. ....   | 47  |
| Tabela 4. Procedura podstawowego oczyszczania pochwy metodą ScaleS.....   | 50  |
| Tabela 5. Procedura oczyszczania pochwy metodą AbScale.....   | 49  |
| Tabela 6. Skład odczynników używanych w metodzie ScaleS i AbScale.....  | 50  |
| Tabela 7. Procedura oczyszczania pochwy metodą CUBIC.....   | 50  |
| Tabela 8. Procedura oczyszczania pochwy metodą CUBIC z immunofluorescencją. ....  | 51  |
| Tabela 9. Skład odczynników używanych w metodzie CUBIC.....   | 51  |
| Tabela 10. Przeciwciała do analizy ekspresji $\gamma\delta$ TCR i V $\gamma$ 5 w limfocytach T $\gamma\delta$ naskórka i ściany pochwy.....   | 52  |
| Tabela 11. Enzymy użyte do trawienia układu rozrodczego.....  | 56  |
| Tabela 12. Specyfikacja cytometru przepływowego LSR Fortessa. ....  | 57  |
| Tabela 13. Przeciwciała do analizy subpopulacji komórek w układzie rozrodczym i węzłach chłonnych. ....   | 60  |
| Tabela 14. Przeciwciała do fenotypowania komórek GFP <sup>+</sup> izolowanych od myszy Tcrd-H2BeGFP.....  | 60  |
| Tabela 15. Przeciwciała w panelu 1. ....  | 62  |
| Tabela 16. Przeciwciała w panelu 2. ....  | 62  |
| Tabela 17. Specyfikacja cytometru przepływowego Canto II. ....  | 65  |
| Tabela 18. Cytokiny mierzone zestawem Mouse Inflammation Panel. ....  | 66  |
| Tabela 19. Geny RT <sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Aging. ....   | 67  |
| Tabela 20. Przeciwciała poliklonalne używane w testach ELISA.....   | 69  |
| Tabela 21. Skład roztworów używanych w metodzie ELISA.....  | 70  |
| Tabela 22. Wartości iloczynu poziomu przeciwciał anti-OVA klasy IgG1 i IgG2a.....   | 102 |
| Tabela 23. Analiza statystyczna poziomu swoistych przeciwciał anti-OVA myszy szczepu dzikiego oraz z delecją komórek T $\gamma\delta$ w surowicy oraz w wydzielinach pochwy.....          | 102 |
| Tabela 24. Wartości iloczynu poziomu przeciwciał anti-trójsacharyd klasy IgG1 i IgG2a.....  | 108 |
| Tabela 25. Analiza statystyczna poziomu swoistych przeciwciał anti-trójsacharyd myszy szczepu dzikiego oraz z delecją komórek T $\gamma\delta$ w surowicy oraz w wydzielinach pochwy..... | 108 |
| Tabela 26. Wyniki analizy ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ . ....                        | 119 |
| Tabela 27. Podsumowanie analizy ekspresji genów regulujących proces starzenia u myszy szczepu dzikiego w porównaniu do szczepu z delecją komórek T $\gamma\delta$ . ....                  | 121 |

## 10. Publikacje i doniesienia

### 10.1. Publikacje

1. **Mikołajewicz K**, Chodaczek G. (2019) Going deeper: three-dimensional study of  $\gamma\delta$  T cells in mouse reproductive tract using tissue clearing methods. *Immunol Cell Biol* 97(1):104-111
2. **Skulska K**, Węgrzyn AS, Chełmońska-Soyta A, Chodaczek G. (2019) Impact of tissue enzymatic digestion on analysis of immune cells in mouse reproductive mucosa with a focus on  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol Methods* 474:112665

### 10.2. Prace opublikowane w materiałach konferencyjnych

1. **Mikołajewicz K**, Chełmońska-Soyta A, Chodaczek G. Nowa metoda analizy ilościowo-jakościowej komórek układu odpornościowego w obrębie układu rozrodczego myszy.  
*I Wrocławskie Spotkania Naukowe*, Wrocław, 03.03.2017 – prezentacja ustna
2. **Mikołajewicz K**, Chełmońska-Soyta A, Chodaczek G. New method of quantitative and qualitative analysis of immune cells of reproductive mucosa with a focus on  $\gamma\delta$  T cells.  
*III International Conference of Cell Biology - Krakow 2017*, Kraków, 26-27.05.2017 – prezentacja plakatu
3. **Mikołajewicz K**, Chełmońska-Soyta A, Chodaczek G. Going deeper: 3D visualization of  $\gamma\delta$  T cells in mouse reproductive tract by tissue clearing CUBIC method.  
*Ist International Meeting „See more” Imaging Methods in Medicine, Biology and Archaeology*, Wrocław, 8-9.12.2017 – prezentacja ustna
4. **Mikołajewicz K**, Chełmońska-Soyta A, Chodaczek G. 3D visualization of gamma delta T cells in mouse vagina using tissue clearing methods.  
*Focus on Microscopy 2018*, Singapur, 25-28.03.2018 – prezentacja plakatu
5. **Skulska K**, Chodaczek G. The impact of age on the vaginal  $\gamma\delta$  T cell population in mice.  
*The 9th International  $\gamma\delta$  T Cell Conference*, Zhuhai, Chiny 5-8.11.2021 – prezentacja plakatu
6. Chodaczek G, **Skulska K**, Toporkiewicz M, Maczynska J, Żal MA, Żal T. In situ dynamics of vaginal  $\gamma\delta$  T cells revealed by intravital microscopy.  
*The 9th International  $\gamma\delta$  T Cell Conference*, Zhuhai, Chiny 5-8.11.2021 – plakat