

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL DAVILA”,
BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Conf. Univ. Dr. Alexandru Filipescu

Student-doctorand:

Dr. Nicoleta Mureanu

București

2024

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL DAVILA”,
BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**



**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
ROLUL SUBSETURILOR DE CELULE T ÎN SARCINA CU
REZULTATE ADVERSE**

Conducător de doctorat:

Conf. Univ. Dr. Alexandru Filipescu

Student-doctorand:

Dr. Nicoleta Mureanu

București

2024

Cuprins

MULȚUMIRI	4
Lista de lucrări științifice publicate.....	5
Abrevieri	7
I. PARTEA GENERALĂ.....	8
Introducere	8
1. O scurtă introducere în diabetul zaharat (definiție, factori de risc, patogeneză).....	9
1.1 Definiție.....	9
1.2 Subtipuri (T1/T2DZ)	9
2. DZG (Diabetul zaharat gestațional)	10
2.1 Privire de ansamblu	10
2.2 Definiție, prevalență și factori de risc	11
2.3 Rezultatul în ceea ce privește mama și copilul.....	12
2.4 Screening, diagnostic și management	13
2.5 Asemănări și diferențe față de T2DZ	13
2.6 Fiziopatologia DZG: rolul celulelor imune	14
3. Celulele T reglatoare.....	19
3.1 Privire de ansamblu asupra sistemului imunitar.....	19
3.2 Sistemul imunitar – rolul celulelor Treg	21
3.2.1 Sistemul imunitar adaptativ; celule T, subseturi și citokine.....	21
3.3 Descoperire și caracterizare (definiție).....	23
3.4 Celulele T reglatoare în sarcină.....	25
3.4.1 Celulele T în sarcina normală	25
3.4.2 Mecanismul de acțiune	26
3.4.3 Rolul celulelor T în DZG.....	30
3.4.4 Rolul Th17 în DZG.....	33
3.4.5 Celulele T în tratament și implicații terapeutice.....	35
4. Cercetări recente despre celulele Treg în DZG.....	38
4.1 Context	38
4.2 Obiective	39

II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	40
PRIMUL STUDIU: Izolarea și înghețarea celulelor mononucleare din sângele periferic uman la pacientele gravide	40
5. Materiale și metode	40
5.1 Recrutarea femeilor însărcinate (paciente și recoltare de sânge)	40
5.2 Pregătirea generală	41
5.3 Materiale si echipamente.....	42
5.4 Detalii despre metodă pas cu pas	43
5.4.1 Izolarea PBMC-urilor din sângele periferic	43
5.4.2 Înghețarea PBMC-urilor.....	44
6. Rezultatele așteptate.....	46
7. Limitări și discuții	49
CEL DE-AL DOILEA STUDIU: Reexprimarea celulelor T cu memorie naive și efectoare, a celulelor T CD45RACD4+ și a celulelor CD8+ naive, dar nu și a celulelor T reglatoare, care sunt modificate la femeile însărcinate, cu DZG, la dietă, în comparație cu un subset unic de femei însărcinate sănătoase	50
8. Materiale și metode	50
8.1 Optimizarea izolării celulelor mononucleare din sângele periferic	50
8.2 Imunofenotiparea PBMC (izolarea celulelor mononucleare din sângele periferic)	52
8.2.1 Pregătirea probelor PBMC	52
8.2.2 Anticorpi specifici citometriei în flux	53
8.2.3 Consemnarea citometriei în flux	55
8.2.4 Analiza statistică	57
9. Rezultate	57
9.1 Optimizarea izolării celulelor mononucleare din sângele periferic (PBMC)....	57
9.1.1 Tuburile SepMate nu cresc semnificativ numărul de PBMC-uri izolat în cazul femeilor însărcinate.....	57
9.1.2 Număr scăzut de celule T CD4+, CD8+ și Treg izolate de la participantele însărcinate sănătoase care folosesc tuburi SepMate	58
9.1.3 Adăugarea de EDTA la PBS crește numărul de celule Treg viabile obținute din probe de sânge complete	59
9.2 Date demografice ale pacientelor	61
9.3 Caracterizarea celulelor T reglatoare din probe ale pacientelor care	

utilizează citometria în flux using	63
9.3.1 Nu există nicio diferență între gravidele care au avut diabet gestațional și cele sănătoase referitoare la procentul celulelor Treg	63
9.3.2 Participantele sănătoase pot fi împărțite în două grupuri distincte marcate prin diferențe între populațiile de celule T CD4+ și CD8+	67
9.3.3 Împărțirea participantelor sănătoase în două grupuri a evidențiat: un procent semnificativ mai mare de celule Treg în cazul participantelor sănătoase (alternativ) față de cele sănătoase	69
10. Discuție.....	71
10.1 Optimizarea procesului de izolare a celulelor mononucleare din sângele periferic	72
10.2 Caracterizarea celulelor Treg și T de memorie în DZG și în cazul participantelor sănătoase.....	75
CEL DE-AL TREILEA STUDIU: Transcriptomica unicelulară dezvăluie markeri ai disfuncției celulei T în diabetul gestațional	86
11. Materiale și metode.....	86
11.1 Izolarea PMBC și FACS (alegerea celulelor activate prin fluorescență).....	86
11.2 Secvențierea ARN-ului unicelular	88
11.3 Prelucrarea datelor și controlul calității	88
11.4 Detectarea și vizualizarea subpopulației de celule T	89
11.5 Abundența diferențială	90
11.6 Expresie diferențială.....	90
11.7 Analiza îmbogățirii setului de gene.....	90
11.8 Analiza factorilor de risc DZG.....	91
11.9 Clasificarea DZG din ARN-seq	91
12. Rezultate	92
12.1 ARN-seq-ul unicelular identifică subseturile de celule Treg în DZG și în cazul participantelor sănătoase	92
12.2 DZG este asociat cu expresia diferențială în subseturile de celule Treg	98
12.3 Dereglarea celulelor Treg identifică markeri ai DZG.....	100
13. Discuție.....	105
14. Concluzii	110
14.1 Limitări ale cercetării și sugestii pentru studii ulterioare	111
Referințe.....	114

Introducere

Diabetul zaharat gestațional (DZG) este o afecțiune caracterizată prin intoleranță la glucoză care se dezvoltă în timpul sarcinii. Acesta prezintă riscuri semnificative atât pentru mamă, cât și pentru făt, ducând la diverse rezultate adverse. Înțelegerea acestor riscuri este esențială pentru gestionarea și prevenirea eficientă.

Motivația care a stat la baza alegerii temei de cercetare doctorală constă în faptul că diabetul zaharat gestațional (DZG) afectează aproximativ 13% din sarcinile la nivel mondial, ceea ce îl transformă într-o preocupare semnificativă pentru sănătatea publică (Zhang et al., 2016) și este asociat cu complicații pe termen scurt și lung pentru mamă și copil.

Diabetul zaharat gestațional (DZG) este definit în general ca hiperglicemie recunoscută pentru prima dată în timpul sarcinii (McIntyre, H. D. et al. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 5, 47 (2019).

DZG este una dintre cele mai frecvente complicații în timpul sarcinii, afectând 9-26% din sarcinile din întreaga lume, cu o incidență globală în creștere rapidă (Jiang, L. et al. A global view of hypertensive disorders and diabetes mellitus during pregnancy. *Nat. Rev. Endocrinol.* 18, 760-775 (2022), Sweeting, A., Wong, J., Murphy, H. R. & Ross, G. P. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr. Rev.* 43, 763-793 (2022). Diagnosticul de DZG este legat de factori de risc clinic, cum ar fi obezitatea, vârsta, ascendența și istoricul familial de diabet de tip 2. Cu toate acestea, niciun prag de diagnostic nu a fost adoptat la nivel mondial (McIntyre, H. D. et al. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 5, 47 (2019). În plus, hiperglicemia poate rămâne nediagnosticată la pacienții care nu îndeplinesc pragurile specifice (American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 43, S14-S31 (2020). DZG este asociat cu un risc crescut de diabet de tip 2 postpartum (Bellamy, L., Casas, J.-P., Hingorani, A. D. & Williams, D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 373, 1773-1779 (2009), Noctor, E. & Dunne, F. P. Type 2 diabetes after gestational diabetes: The influence of changing diagnostic criteria. *World J. Diabetes* 6, 234-244 (2015), un risc crescut de tulburări cardiovasculare (Sweeting, A., Wong, J., Murphy, H. R. & Ross, G. P. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr. Rev.* 43, 763-793 (2022) și un risc mai mare de sindrom metabolic la descendenți (Ornoy, A., Becker, M., Weinstein-Fudim, L. & Ergaz, Z. Diabetes during Pregnancy: A Maternal Disease Complicating the Course of Pregnancy with Long-Term

Deleterious Effects on the Offspring. A Clinical Review. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021). Prin urmare, DZG reprezintă o provocare continuă pentru sănătatea mondială.

Depistarea precoce, gestionarea eficientă și modificarea stilului de viață sunt esențiale pentru reducerea acestor riscuri și promovarea unor sarcini mai sănătoase. Cercetările în curs privind mecanismele și efectele pe termen lung ale DZG vor îmbunătăți în continuare înțelegerea și capacitatea noastră de a atenua impactul acestuia.

Teza de doctorat este structurată în două părți. Prima parte include cele mai recente date privind epidemiologia, factorii de risc, subtipurile, screening-ul, diagnosticul și managementul, precum și impactul diabetului gestațional în sarcină și potențialul său rezultat advers. Partea specială include metodologia, analiza și rezultatele studiilor pe care le-am realizat, cu accent pe izolarea și congelarea celulelor mononucleare din sângele periferic uman la pacientele gravide, optimizarea izolării celulelor mononucleare din sângele periferic (PBMC) și citometria în flux. Peste 2 000 de participante gravide au fost recrutate la 36 de săptămâni de gestație și și-au oferit consimțământul în cunoștință de cauză pentru participarea la studiu și donarea de sânge și analiza acestuia.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Prezentare generală - definiție, prevalență și factori de risc

Diabetul zaharat este un grup de afecțiuni metabolice care implică niveluri crescute de glucoză legate de probleme de secreție și/sau rezistență a insulinei, un hormon produs de celulele pancreatice al cărui rol este de a regla absorbția celulară a glucozei din sânge ("2. ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021" 2021). Principalele categorii de DZ includ diabetul zaharat autoimun de tip 1 (T1DZ), diabetul zaharat de tip 2 (T2DZ), care apare de obicei pe fondul rezistenței la insulină, alte tipuri (diabetul datorat pancreatitei sau diabetul indus chimic) și diabetul zaharat gestațional (DZG) ("2. ("2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021" 2021).

Nivelurile ridicate de zahăr din sânge (hiperglicemie) în timpul sarcinii, fie că rezultă din diabetul de tip 1 sau de tip 2 preexistent sau din diabetul gestațional, pot duce la rezultate nefavorabile atât pentru mamă, cât și pentru copil (Egan et al., 2015). Din punct de vedere istoric, înainte de descoperirea insulinei la începutul secolului al XX-lea, femeile cu diabet erau adesea sfătuite să nu rămână însărcinate din cauza riscurilor semnificativ ridicate de mortalitate maternă și neonatală (aproximativ 50% pentru ambele) (Gabbe, 1992).

Diabetul zaharat gestațional (DZG) afectează aproximativ 13% din sarcinile la nivel mondial, ceea ce îl transformă într-o problemă semnificativă de sănătate publică (Zhang et al., 2016) și este asociat cu complicații pe termen scurt și lung pentru mamă și copil.

Diabetul zaharat gestațional (DZG) se caracterizează prin incapacitatea organismului de a face față cerințelor crescute de insulină tipice unei sarcini normale, ceea ce duce la creșterea rezistenței la insulină, intoleranță la glucoză și inflamație sistemică de grad scăzut (Kampmann, 2015).

Diabetul zaharat gestațional (DZG) se poate dezvolta în timpul sarcinii din cauza diferiților factori de risc. Înțelegerea acestor factori este esențială pentru identificarea și gestionarea precoce. Principalii factori de risc asociați cu diabetul gestational sunt următorii:

- Obezitatea: excesul de greutate sau obezitatea (un indice de masă corporală [IMC] de 30 sau mai mare) înainte de sarcină crește semnificativ riscul de a dezvolta DZG.
- Vârsta: femeile cu vârsta de peste 25 de ani prezintă un risc mai mare, riscul crescând și mai mult pentru cele de peste 35 de ani.
- Antecedentele familiale: un istoric familial de diabet, în special diabet de tip 2, poate crește probabilitatea de a dezvolta DZG.

- Diabetul gestațional anterior: femeile care au avut diabet gestațional într-o sarcină anterioară prezintă un risc mai mare de a-l dezvolta din nou în sarcinile ulterioare, sau un istoric familial de diabet și apartenența la un grup etnic cu un risc ridicat de diabet.
- Etnicitatea: anumite grupuri etnice, inclusiv populațiile afro-americană, hispanică/latină, amerindiană, asiatică și insulară din Pacific, au o prevalență mai mare a DMG.
- Sindromul ovarelor polichistice (PCOS): femeile cu PCOS, o afecțiune caracterizată prin dezechilibre hormonale și rezistență la insulină, prezintă un risc crescut de a dezvolta DZG.
- Stilul de viață sedentar: lipsa de activitate fizică și un stil de viață sedentar pot contribui la obezitate și la rezistența la insulină, crescând riscul de DMG.
- Dieta nesănătoasă: dietele bogate în carbohidrați rafinați, zaharuri și grăsimi nesănătoase pot duce la creșterea în greutate și rezistență la insulină, crescând riscul de DMG.
- Sarcinile multiple: femeile care au sarcini multiple (gemeni, tripleți etc.) prezintă un risc mai mare din cauza solicitărilor sporite asupra organismului și a potențialului de creștere în greutate mai mare.
- Hipertensiune arterială: un istoric de hipertensiune arterială sau tensiune arterială ridicată poate crește riscul de apariție a diabetului gestațional.
- Istoric de macrosomie: dacă un copil anterior s-a născut cu o greutate mai mare de 4,5 kg, riscul de DZG în sarcinile ulterioare este mai mare.
- Anumite afecțiuni medicale precum hipertensiunea gestațională sau preeclampsia în sarcinile anterioare pot crește, de asemenea, riscul de DZG.

Persoanele cu risc ridicat sunt diagnosticate oficial cu DZG pe baza unor criterii precum un nivel de glucoză plasmatică pe perioada de post de $\geq 5,6$ mmol/L sau un nivel de glucoză plasmatică la două ore de $\geq 7,8$ mmol/L într-un test de toleranță la glucoză de 75 g-2 ore efectuat între 24-28 săptămâni de gestație (NICE 2015).

2. Rezultatele negative ale diabetului gestațional pentru mamă și copil

Hiperglicemia în timpul sarcinii, fie că este cauzată de diabetul de tip 1 sau de tip 2 preexistent, fie de diabetul gestațional, prezintă riscul unor rezultate nefavorabile atât pentru mamă, cât și pentru copil (Egan et al., 2015). De fapt, înainte de descoperirea insulinei la

începutul secolului al XX-lea, femeile cu diabet erau în general avertizate să nu rămână însărcinate din cauza riscului incredibil de ridicat de deces matern și neonatal (aproximativ 50% pentru ambele) (Gabbe, 1992). Există implicații semnificative pe termen scurt și lung atât pentru mamă, cât și pentru copil, după cum au fost raportate de marele studiu Hyperglycaemia and adverse pregnancy outcome (HAPO) și de alte câteva studii ("Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes", 2008). În timpul sarcinii, femeile cu DZG au un risc crescut de a dezvolta hipertensiune gestațională (28%) și preeclampsie (3,3%) (Kvetny & Poulsen, 2003); (Östlund et al., 2004) După sarcină, există un risc considerabil ca femeile să dezvolte diabet de tip 2 (9,5%) (Vounzoulaki et al., 2020), (Shostrom et al., 2017). Există și alte riscuri, cum ar fi probabilitatea mai mare de naștere prin cezariană. DZG poate duce la o dimensiune mai mare a fătului (macrosomie), ceea ce poate necesita o operație cezariană pentru a naște copilul în siguranță. După naștere, sugarii mamelor cu DZG pot prezenta niveluri scăzute de zahăr în sânge, ceea ce poate duce la convulsii și alte probleme de sănătate dacă nu sunt tratate cu promptitudine. Aceștia pot avea un risc mai mare de probleme respiratorii din cauza dezvoltării imature a plămânilor, în special dacă se nasc prematur. Este bine cunoscut că sugarii mamelor cu DZG au un risc crescut de a dezvolta tulburări metabolice, atât T1DZ, cât și T2DZ, iar mamele au un risc crescut de a dezvolta DZG I în sarcinile ulterioare (Murray & Reynolds, 2020). Prin urmare, este esențial ca screeningul pentru DZG și intervențiile de gestionare să fie implementate cât mai devreme posibil pentru a optimiza sănătatea maternă, fetală și a copilului și pentru a intercepta ciclul transgenerațional al bolilor netransmisibile.

3. Fiziopatologia DZG: rolul celulelor imune

Fiziopatologia diabetului zaharat gestațional (DZG) este complexă și nu este pe deplin înțeleasă, cu dovezi care sugerează că se poate dezvolta pe o perioadă foarte mare de timp. Cercetările efectuate (Lekva et al., 2016) indică faptul că dezvoltarea DZG poate să nu fie acută, ci mai degrabă dependentă de factori materni pe termen lung. În multe cazuri, eșecul celulelor beta pancreatice de a compensa în mod adecvat un exces cronic de combustibil poate duce în cele din urmă la rezistență la insulină și hiperglicemie (Plows et al., 2018). Acest eșec al funcției celulelor beta de a ține pasul cu cerințele impuse de rezistența crescută la insulină este un factor cheie în patogeneza DZG. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru a elucida pe deplin mecanismele implicate în dezvoltarea și progresia DZG, precum și pentru a identifica strategii eficiente de prevenire și gestionare.

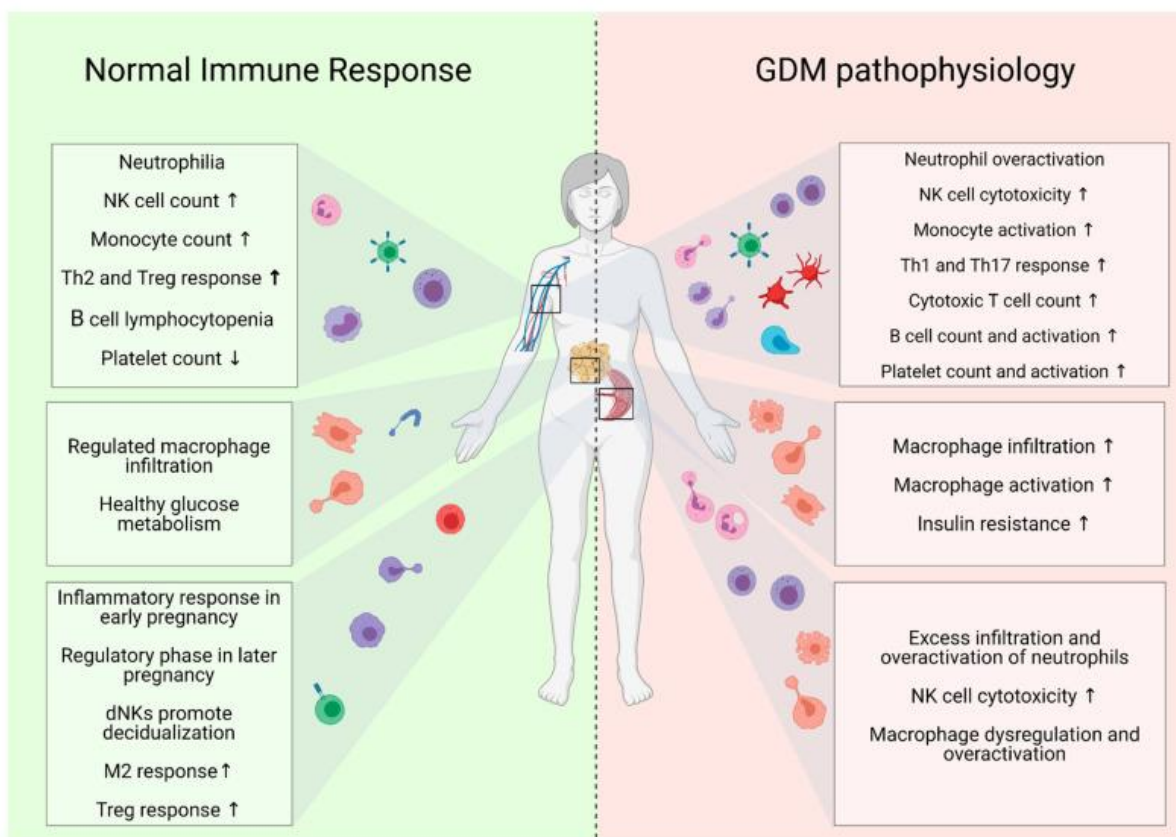


Figura 1. Rezumatul și compararea modificărilor celulelor imunitare care apar în DZG cu modificările în răspunsul imun normal. După cum se observă, deși există un răspuns al celulelor Treg crescut în răspunsul imun normal, răspunsul celulelor Treg în DZG este necunoscut. Preluat și adaptat (McElwain et al., 2021a)

4. Celulele T reglatoare (Tregs) și diabetul gestațional

Într-o sarcină normală, sistemul imunitar este supus unei adaptări sporite pentru a se acomoda fătului în dezvoltare (McElwain et al., 2021b). Cu toate acestea, în cazul diabetului zaharat gestațional (DZG), caracterizat printr-o inflamație sistemică de grad scăzut, răspunsul imunitar încearcă să facă față cerințelor sporite, deviind de la profilul imun tipic observat în cazul sarcinilor sănătoase. Studiile recente s-au axat pe modificări ale distribuției celulelor T în sângele periferic, potențial legate de progresia DZG. Această cercetare urmărește să delimiteze profilul imun al subseturilor de celule T asociate cu DZG, subliniind cadrul imun al acestei afecțiuni (SIFNAIOS et al., 2019). În sarcinile sănătoase, celulele Treg împiedică respingerea fătului de către sistemul imunitar matern - Krop, J., Heidt, S., Claas, F. H. J. & Eikmans, M. Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3. *Front. Immunol.* 11, 1182 (2020). Au fost observate procente mai mici de celule Treg cu rezultate adverse specifice ale sarcinii, cu toate acestea, literatura existentă privind rolul celulelor Treg în DZG este

contradictorie. Mai multe studii au evaluat procentele de celule Treg la pacientele cu DZG în raport cu loturile de control de paciente sănătoase, cu concluzii contradictorii. O meta-analiză a șapte publicații concluzionează că celulele Treg sunt semnificativ mai scăzute la femeile cu DZG, însă mecanismul acestei asocieri rămâne neclar. Testele funcționale sugerează că celulele Treg la pacientele cu DZG pot regla ineficient răspunsurile imune. De exemplu, celulele DZG Treg sunt mai puțin eficiente în suprimarea producției de IFN- γ și TNF- α în celulele T efectoare și a activității celulelor T CD4 +. Prin urmare, rețelele transcripționale pot fi modificate în celule Treg ca urmare a DZG.

Există un profil imun distinct al celulelor T (Th1/Th2/Th17/Tregs) care suferă fluctuații în diferite etape ale gestației. Acest profil include niveluri crescute de celule Th1 și Treg pentru a răspunde nevoilor fătului semialogenic, asigurând toleranța și prevenind respingerea. Spre sfârșitul sarcinii, sistemul imunitar se adaptează pentru a facilita declanșarea travaliului, ceea ce duce la o scădere a celulelor Treg.

Cu toate acestea, în cazul DZG, caracterizat prin intoleranță la glucoză și inflamație sistemică, răspunsul imun se abate de la norma observată în cazul sarcinilor sănătoase. În locul suprareglementării așteptate a celulelor T, există o subreglementare care poate împiedica capacitatea sistemului imunitar de a contracara factorii proinflamatori precum celulele Th1 și Th17. Cercetările privind rolul celulelor T în DZG sunt variate și lipsite de coerență în proiectare, contribuind la înțelegerea eterogenă actuală a acestui aspect. Această analiză examinează în mod critic cercetările existente pentru a îmbunătăți înțelegerea profilului imun al celulelor T în DZG.

II. PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚII PERSONALE

PRIMUL STUDIU

5. Ipoteză și obiective generale

Înțelegerea incompletă a DZG împiedică dezvoltarea unui tratament preventiv sau a unui remediu. Dovezi recente publicate sugerează că dereglarea celulelor T reglatoare (Tregs) poate cauza DZG. Cu toate acestea, rezultatele intră în conflict unele cu altele. Prin urmare, ne-am propus să investigăm rolul celulelor Treg în DZG și să optimizăm protocolul pentru a izola un număr mare de celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) din probele de sânge ale femeilor însărcinate. Pentru a optimiza izolarea PBMC, a fost comparată frecvența PBMC-urilor obținute după izolarea manuală sau cu ajutorul tuburilor SepMate și diluarea sângelui în PBS sau PBS conținând 1mM EDTA. Combinarea adaosului de EDTA la diluarea sângelui cu tuburi SepMate a crescut numărul de celule T viabile fără a crește semnificativ frecvența generală a PBMC izolate. Citometria în flux a fost utilizată pentru a investiga celulele Treg la participantele sănătoase și DZG la cele care erau la dietă. Am găsit două grupuri distincte de participante sănătoase, caracterizate prin diferențe în ceea ce privește celulele T CD4+, CD8+ cu memorie și celulele Treg CCR7+ și CD150+. Participantele la DZG au prezentat un procent semnificativ mai mic de celule T naive CD4+ și CD8+ și celule T TEMRA CD4+ mai mari decât participantele sănătoase (alternativ), dar nicio diferență față de participantele sănătoase. În concluzie, celulele Naive și TEMRA și nu celulele Treg au fost modificate de prezența DZG la participantele aflate la dietă. Astfel, participantele sănătoase pot prezenta răspunsuri distincte care afectează rezultatul comparațiilor. Cu toate acestea, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a înțelege motivul pentru care a avut loc acest lucru.

Ipoteza noastră este că frecvența celulelor Treg de la femeile gravide care au dezvoltat DZG și care urmează o dietă este semnificativ mai scăzută în comparație cu femeile gravide sănătoase.

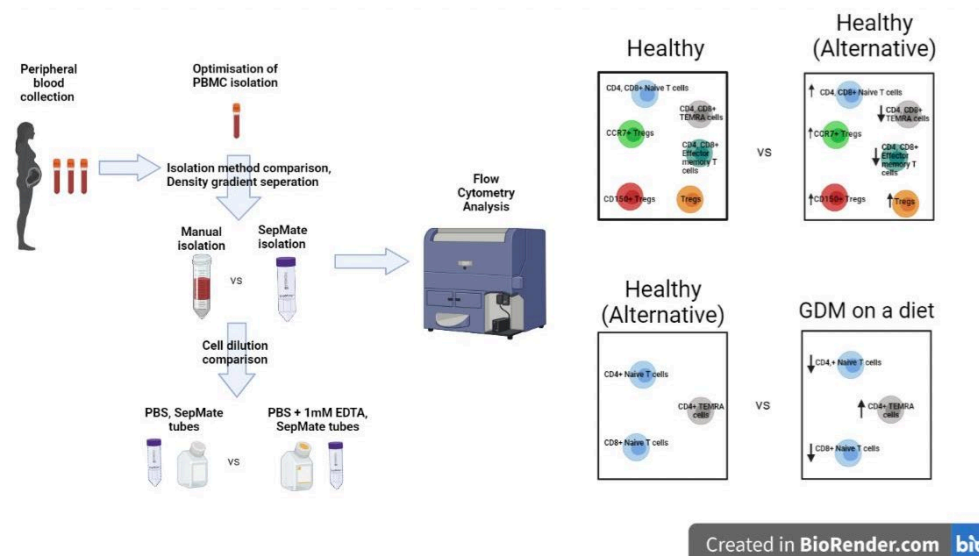


Figura 2. Analiza citometriei în flux

Obiectivele studiului sunt:

- Optimizarea izolării celulelor mononucleare din sângele periferic (PBMC) și asigurarea unei frecvențe ridicate a celulelor T din probele de sânge integral obținute de la femeile gravide (număr de celule).
- Caracterizarea celulelor Treg și a altor populații de celule T în PBMC prelevate de la gravide sănătoase sau gravide cu diabet zaharat gestațional care urmează o dietă (citometrie în flux).
- Analiza diferențelor în cadrul participantelor sănătoase, identificând dacă diferențele pentru celulele T CD4, atunci când se utilizează expresia CD45RA și CCR7, sunt semnificative pentru a justifica împărțirea participantelor sănătoase în două grupuri (citometrie în flux).
- Caracterizarea celulelor Treg, a celulelor T CD4+ și CD8+, comparând cele două grupuri de participante sănătoase identificate și femeile însărcinate cu DZG care urmează o dietă (citometrie în flux).
- Analiza următorului aspect: dacă diferențele demografice subiacente contribuie la diferențele dintre participantele sănătoase (citometrie în flux).

6. Metode. Protocol

Studiul prospectiv este de a analiza cu exactitate populațiile de celule imune, un număr mare de celule mononucleare din sângele periferic (PBMC) trebuie să fie obținut din probe de sânge. Izolarea manuală tradițională și izolarea SepMate™ a PBMC produc în mod constant

straturi plasmatic colorate de sânge și un număr scăzut de celule CD4+ și CD8+. Aici, descriem un protocol optimizat, utilizând PBS cu EDTA pentru a crește randamentul PBMC de la pacientele gravide. Acest protocol permite analiza celulelor CD4+, CD8+ și a celulelor T reglatoare și poate fi aplicat la orice populație de celule imune.

Optimizarea izolării PBMC din probe de sânge integral a fost realizată pe parcursul a două teste. Primul studiu a comparat izolarea manuală a PBMC (protocol manual) sau utilizarea tuburilor de izolare SepMate PBMC (StemCell Technologies).

Protocolul de mai jos descrie etapele specifice pentru izolarea și congelarea PBMC de la pacientele gravide. Provocarea stării procoagulante a sarcinii (Sanches et al., 2020) (inclusiv o creștere a factorilor de coagulare, reducerea activității anticoagulante și fibrinolitice) a făcut dificilă centrifugarea densității, deoarece stratul de plasmă a fost colorat cu sânge. Am constatat că utilizarea EDTA în PBS pentru sânge, înainte de centrifugare, a îmbunătățit separarea și randamentul. Deși sângele este colectat în tuburi căptușite cu EDTA în mod standard, fără diluarea suplimentară cu EDTA, stratul de plasmă a rămas colorat. Acest protocol a fost elaborat pentru a analiza populațiile CD4+, CD8+ și celulele T reglatoare (Tregs), deși protocolul poate fi util pentru analiza oricărei linii de celule imune în timpul sarcinii.

6.1 Recrutarea femeilor însărcinate (paciente și recoltarea de sânge)

⌚Timp: 10-15 minute pentru fiecare probă

- 1. Colectați sânge venos în tuburi BD Vacutainer® EDTA (10 ml)
 - a. Măsurați volumul de sânge integral utilizabil la cel mai apropiat punct de 0,5 ml
- 2. Țineți tuburile de sânge la temperatura camerei (18°C-22°C), mixându-le ușor cu ajutorul unui agitator orbital (90-100 rpm) până la procesare, deoarece acest lucru îmbunătățește viabilitatea PBMC-urilor obținute. Proba de sânge trebuie prelucrată cât mai curând posibil după prelevare, în mod ideal în decurs de 8-12 ore.

⚠FOARTE IMPORTANT: Probele pacientelor ar trebui colectate în conformitate cu normele comisiei internaționale, recrutarea trebuie să fie adecvată și trebuie obținut consimțământul pacientei. Acest studiu a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării al King's College Hospital, numărul 02-03-033, din data de 01/04/2003. Toate experimentele sunt conforme cu standardele de reglementare relevante. Un total de 18 ml de sânge în tuburi EDTA 2 × 9 ml au fost prelevate de la femeile gravide la 35-36 săptămâni de gestație.

6.2 Pregătire generală

- 3. Păstrați Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Pharmacia, Cat No: 17144003) la temperatura camerei (18°C-22°C)
- 4. Aduceți PBS/EDTA cu 2% FBS la temperatura camerei (18°C-22°C)

Tabel 1. Resurse importante

REAGENT sau RESURSĂ	SURSĂ	IDENTIFICATOR
Probe biologice		
18 ml de sânge în tuburi EDTA	Femei gravide, 36 săptămâni, vârstă medie 32 ani	n/a
Produce chimice, peptide și proteine recombinante		
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Pharmacia	Cat No: 17144003
Phosphate Buffer Saline (PBS) with 1 mM EDTA	Lonza	Cat No: BE02-017F
Fetal Bovine Serum, qualified, heat-inactivated,	Gibco™, Fisher Scientific	Thermo Cat No: 26140087
Cell Freezing Medium-DMSO	Sigma-Aldrich	Cat No: 6164
RPMI 1640 WITHOUT L-GLUTAMINE	LONZA	Cat No: 733-1690
Corning CoolCell	CORNING	Cat No: CLS432001-1EA
Cryovial, 2 mL, external thread, natural cap, 14 × 14 predefined datamatrix code, barcode and human readable code	Greiner Bio-One Ltd.	126263-2DG
CountBright Absolut counting beads	Thermo Scientific	Fisher Cat No: C36950
Software și algoritmi		

REAGENT sau RESURSĂ	SURSĂ	IDENTIFICATOR	
Software BD FACSDiva™	BD Biosciences	Software	BD FACSDiva™
Software ELabNext	Inventar Elab	ElabNext	Eppendorf Group
Altele			
Tuburi SepMate™ de 50 ml	Tehnologii privind celulele stem	Cat No:154500	
Tuburi BD Vacutainer® EDTA (10 ml)	Fisher Scientific Ltd	Cat No: 10331254	
Falcon 50 mL Conical Centrifuge Tubes	Thermo Scientific	Fisher	Cat No:10788561
Tuburi conice de centrifugare Falcon 50 mL	Thermo Scientific	Fisher	Cat No: 11507411
Sistemul BD LSRFortessa™	BD Biosciences	Sistemul	BD LSRFortessa™

6.3 Materiale și echipamente

PBS/EDTA cu 2% FBS: PBS cu 1 mM EDTA (Lonza Cat No: BE02-017F)) + 2% FBS (Thermo Fisher Scientific Nr. cat: 26140087). 10 ml de FBS în 500 ml PBS/EDTA. Când se adaugă FBS, se păstrează la 4°C, timp de maximum 5 zile și se utilizează la temperatura camerei.

Tabel 2. Reactiv și concentrație finală

Reactiv	Concentrație finală	Cantitate
PBS/EDTA	PBS cu 1 mM EDTA	490 ml
FBS	2%	10 ml

Mediu de congelare celulară-DMSO: (Sigma Aldrich Cat No: 6164) se păstrează la -20°C și la +4°C când este deschis (se păstrează la gheață în timpul izolării)

Corning CoolCell Freezing 1°C/min container de criocongelare (poate conține 12 flacoane de criocongelare) (CAT No: CLS432001-1EA)

Alternative: Tuburile SepMate™- 50 (Stemcell Technologies, nr. cat: 154500) au fost utilizate pentru eficiență și economie de timp, deși am constatat că utilizarea lor nu a crescut semnificativ numărul de PBMC izolate. Se poate efectua separarea manuală, prin care stratificarea sângelui diluat și îndepărtarea învelișului leucocitar se realizează manual. Este necesară o tehnică adecvată pentru a preveni contaminarea în timpul stratificării și pentru a evita perturbarea gradientului atunci când se izolează manual stratul de înveliș leucocitar după centrifugare.

6.4 Detaliile metodei pas cu pas

Izolarea PBMC din sângele periferic

⌚Timp: 1 h

Acest pas descrie modul de izolare a PBMC din sângele integral utilizând tuburile SepMate™ (BIBlood et al., 2016):

1. Inversați Ficoll-Paque PLUS de mai multe ori.
2. Introduceți 17 ml de mediu Ficoll-Paque PLUS în tubul SepMate™-50 prin pipetarea cu atenție prin orificiul central al inserției SepMate™-50 (Ficoll trebuie să fie chiar deasupra inserției).
3. Se transferă sângele într-un tub Falcon separate, de 50 ml, în mod steril, adică lucrând cu cască de protecție și folosind o tehnică de pipetare sterilă.
4. Se diluează sângele 1:1 în PBS-EDTA cu 2% FBS, se închide tubul și se amestecă prin inversare atentă
 - a. (În studiul nostru): adăugați 16,5 ml de sânge + 16,5 ml PBS-EDTA 2% FBS pentru a ajunge la un total de 33 ml; dacă aveți la dispoziție mai puțin de 16,5 ml de sânge, îl puteți amesteca cu PBS-EDTA într-un raport 1:1
 - b. SepMate™-50 este proiectat pentru a procesa 4-17 ml dintr-o probă inițială de sânge.
5. Păstrând tubul SepMate™ vertical, adăugați proba diluată prin pipetare pe partea laterală a tubului. Proba se va amesteca cu mediul de gradient de densitate de deasupra inserției. *Aveți grijă să nu pipetați proba diluată direct prin orificiul central.*
6. Centrifugați la $1200 \times g$ timp de 20 min la temperatura camerei, cu pauză la 7 rotiri (din 9).

Notă: Fiecare tub conține patru straturi după centrifugare: stratul galben de plasmă în partea superioară, stratul alb MNC (celule mononucleare), stratul Ficoll și stratul de celule roșii în partea inferioară.

7. Îndepărtați o parte din stratul de plasmă fără a îndepărta interfața cu PBMC, pentru a permite o spălare mai bună a celulelor.
8. Se toarnă stratul superior, care conține MNC îmbogățite, într-un nou tub Falcon de 50 ml. Nu țineți tubul SepMate™ în poziție inversată mai mult de 2 s, deoarece acest lucru poate perturba filtrul din interiorul tubului SepMate™, care asigură menținerea Ficoll-ului și a stratului de celule roșii în partea inferioară.
9. Înregistrați recipientele de criogenie folosind codul de bare, ca PBMC.
10. Umpleți tubul falcon de 50 ml cu mediu RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, nr. cat: 733-1690) și amestecați cu atenție.
11. Se centrifughează la 300×g la 20°C timp de 8 minute și se aruncă supernatantul.
12. Repetați pașii 10 și 11 folosind 5-10 ml PBS-EDTA cu 2% FBS.
13. Centrifugați timp de 8 minute la 300×g la 20°C și îndepărtați cât mai mult posibil din PBS-EDTA cu 2%FBS prin turnare rapidă, fără a deranja peletul.

6.5 Congelarea PBMC-urilor

⌚Timp: ~ 24 h

Crioconservarea PBMC este vitală pentru a se asigura integritatea celulelor după decongelare, susținând o viabilitate celulară ridicată și asigurând reprezentativitatea datelor eșantionului pentru donatori.

14. Numărați și resuspendați celulele în 1 ml de mediu de congelare DMSO: (Sigma Aldrich Cat No: 6164).
15. Asigurați-vă că recipientele de criogenie (Greiner Bio-One Ltd Nr. cat.: 126263-2DG) sunt așezate la gheață sau într-o cutie frigorifică.
16. Se alicotează celulele într-un recipient de criogenie cu cod de bare, ținându-l la gheață umedă până la începerea congelării (în 5 minute).
17. Înghețați celulele în camera Corning CoolCell (nr. cat.: CLS432001-1EA) la o temperatură sub -70°C.
18. După cel puțin 12 ore, transferați celulele în cutii criogenice și înregistrați poziția lor.
19. Lăsați cutiile criogenice într-un congelator la -80°C timp de 12-24 h (maximum patru zile), apoi transferați recipientele de criogenie în rezervorul de azot lichid.

7. Rezultate preconizate

Protocolul descris oferă o metodă reproductibilă pentru izolarea PBMC, inclusiv a limfocitelor (celule T, celule B și celule Natural Killer), monocitelor și celulelor dendritice la pacientele gravide. După decongelare, numărul de PBMC obținute a fost calculate cu ajutorul CountBright Absolute counting beads (Thermo Fisher Scientific, C36950), conform instrucțiunilor producătorului, utilizând analizorul de celule BD Fortessa - BD Biosciences combinat cu software-ul BD FACSDiva (BD Biosciences). Protocolul nostru a produs o medie de 53×10^6 PBMC-uri per pacientă gravidă sănătoasă, deși va exista o variabilitate biologică la fiecare individ.

Protocoalele pentru izolarea PBMC au fost optimizate la pacientele care nu sunt gravide și nu există nicio metodă standard actuală pentru izolarea PBMC la pacientele gravide. Protocolul standard de diluare a sângelui recoltat doar cu PBS a produs un număr scăzut de celule T CD4+ și CD8+ în populația noastră gravidă. După centrifugarea densității, am observat că stratul de plasmă a fost colorat cu sânge, indicând o contaminare potențială a PBMC-urilor. Acest lucru poate fi observat în Figura 3, care demonstrează o comparație a probelor de sânge diluate cu PBS fără EDTA (Figura 3A) și adăugarea a 1 mM de EDTA (Figura 3 B). Am luat în considerare diferențele în profilul hemostatic la femeile gravide față de controalele sănătoase - în timpul sarcinii, creșterea semnificativă a factorilor de coagulare, cantitatea redusă de anticoagulanți și activitatea fibrinolică redusă creează o stare de hipercoagulabilitate (Sanches et al., 2020). Acest lucru face probabil centrifugarea densității mai complicată și motivul pentru care anticoagulantul EDTA a contribuit la reducerea contaminării sângelui. PBMC-urile obținute au fost numărate cu ajutorul mărgelilor CountBright Absolute și comparate între cele două condiții. În cazul nostru, adăugarea EDTA la PBS a crescut numărul de PBMC viabile obținute cu o medie de 15×10^6 celule (PBS: $38 \times 10^6 \pm 16 \times 10^6$, EDTA + PBS: $53 \times 10^6 \pm 8 \times 10^6$ celule) (Figura 4). Diferența nu a fost semnificativă ($p = 0,2208$), deși în urma analizei cu citometrie în flux, adăugarea de EDTA la PBS a permis izolarea unei frecvențe mai mari de celule T CD4+ și celule T CD8+ comparativ cu PBS singur (Figura 5).

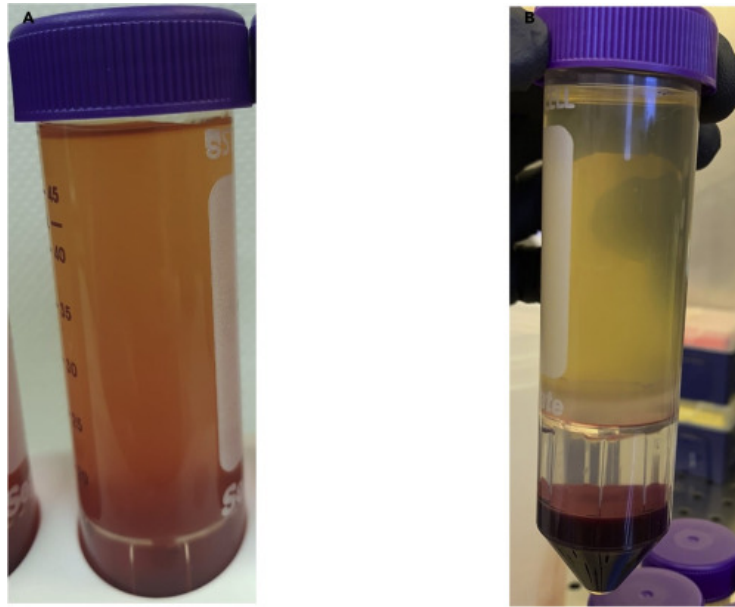


Figura 3. Comparație între separarea celulelor utilizând PBS și PBS EDTA
Comparativ cu diluarea probelor de sânge în PBS fără EDTA (A), adăugarea de PBS/EDTA
1 mM a eliminat sângele care colorează stratul de plasmă (B)

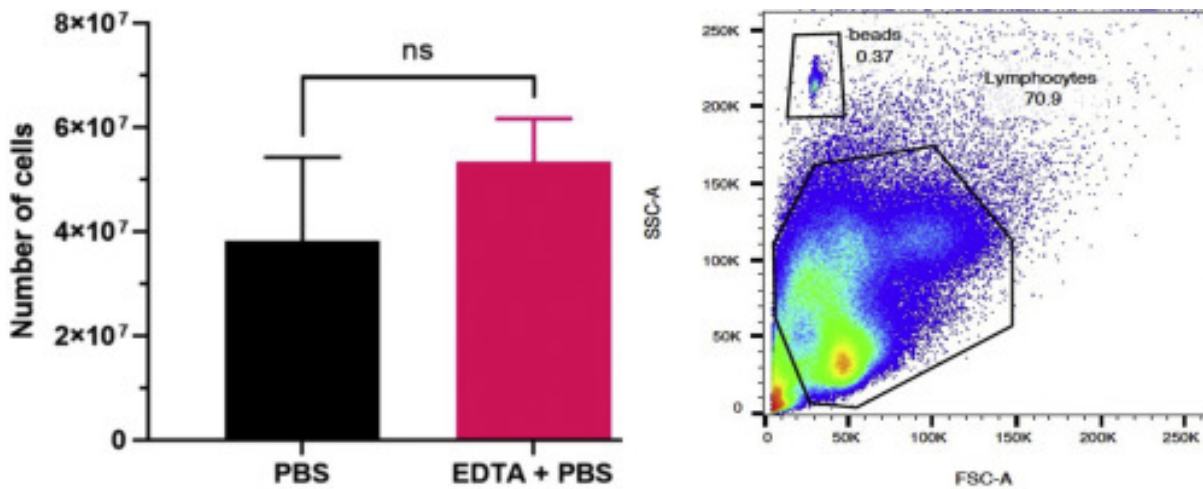


Figura 4. Analiza citometrică în flux a celulelor T utilizând PBS și PBS/EDTA 1 mM
Figura din stânga: PBMC au fost izolate din probe de sânge integral prelevate de la voluntare
gravide sănătoase. Sângele a fost diluat în PBS steril (PBS) sau PBS conținând 1 mM EDTA
(PBS + EDTA). Adăugarea de EDTA la PBS a crescut numărul de PBMC viabile obținute cu
o medie de 15×10^6 celule (medie \pm eroarea standard a mediei, PBS: $38 \times 10^6 \pm 16 \times 10^6$,
EDTA + PBS: $53 \times 10^6 \pm 8 \times 10^6$ celule) Centrifugarea densității a fost finalizată utilizând
tuburile SepMate™. Numărul de PBMC obținute a fost socotit cu ajutorul mărgelilor
CountBright Absolute (figura din dreapta) și comparat între cele două situații

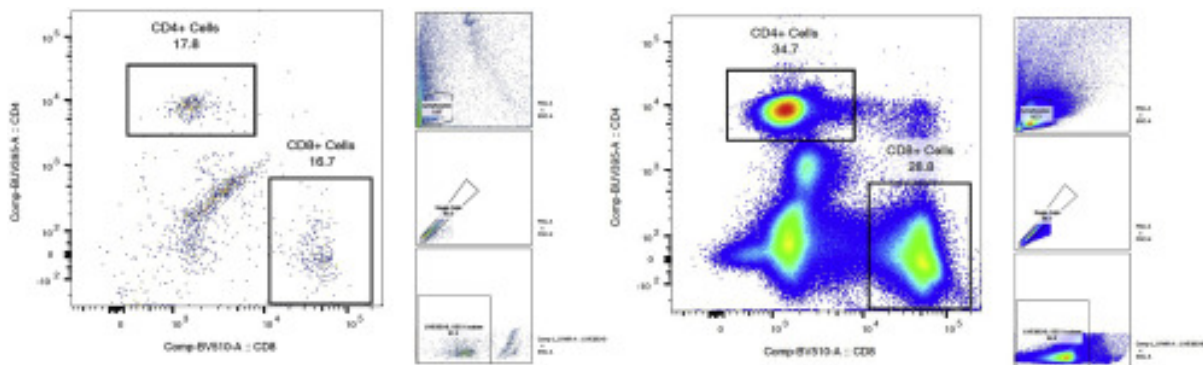


Figura 5. PBMC au fost izolate din probe de sânge integral prelevate de la voluntare gravide sănătoase

8. Rezolvarea problemelor

Problema 1

Separarea incompletă a sângelui total în straturi (etapa 6).

Soluție posibilă

Asigurați-vă că sângele integral este proaspăt și necoagulat (utilizarea de tuburi EDTA, agitare corespunzătoare și depozitare la temperatura camerei)

Reduceți viteza de ejecție a pipetei și înclinați tubul SepMate™. Acest lucru va ajuta la stratificarea lentă a sângelui total pe Ficoll.

Problema 2

Scăderea viabilității după congelarea celulelor (etapa 14)

Soluție posibilă

Atunci când crioconserveți celule, asigurați-vă că lucrați rapid și eficient

Lucrați întotdeauna cu gheață și evitați să lăsați celulele în mediul de congelare la temperatura camerei după resuspensie.

Utilizați întotdeauna celule crioconserve la $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ utilizând camera Corning CoolCell (nr. cat: CLS432001-1EA).

Problema 3

Scăderea viabilității după decongelarea celulelor (la utilizarea protocolului propriu)

Soluție posibilă

Atunci când dezghețați, asigurați-vă că lucrați rapid și eficient.

Se scufundă recipientul de criogenie cu flaconul cu PBMC într-o baie de apă la 37°C timp de aproximativ 1 min.

Folosind mediul pe care îl alegeți, adăugați 1 ml de lichid încălzit (37°C) în recipientul de criogenie cu PBMC decongelate utilizând o pipetă de transfer.

PBMC decongelate pot fi turnate într-un tub conic Falcon™ de 15 ml (număr de catalog 11507411) cu 5 ml de lichid încălzit (37°C).

Clătiți recipientele de criogenie o dată cu 1 ml de lichid.

Incubați timp de 5 minute, în tub conic Falcon™ de 15 ml (număr de catalog 11507411), în baie de apă la 37°C.

Centrifugați timp de 5 minute la 300×g la temperatura camerei.

Se toarnă supernatantul și se încep alte manevre.

CEL DE-AL DOILEA STUDIU

9. Metode și protocol

Următoarele modificări au fost efectuate în cel de-al doilea studiu: 16,6 ml de sânge au fost diluați în DPBS steril sau DPBS care conține 1mM de acid etilendiaminotetraacetic Ultrapure 0,5M (EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Ref.15575-038). Alte modificări ale protocolului includ schimbarea tuturor etapelor de spălare la 300xg timp de 8 minute. Probele au fost resuspendate în 1mL de mediu de congelare celulară de recuperare DMSO. Numărarea celulelor în timpul celui de-al doilea experiment a fost efectuată cu ajutorul bilelor de numărare CountBright Absolute (Thermo Fisher Scientific, C36950), conform instrucțiunilor producătorului, utilizând analizorul de celule BD Fortessa (BD Biosciences) combinat cu software-ul BD FACSDiva (BD Biosciences). Datele produse în timpul experimentelor au fost analizate utilizând software-ul FlowJo, versiunea 10.7.2 (Tree Star), pentru a crea diagrame de dispersie și a înregistra evenimentele celulare ale bilelor de numărare și ale limfocitelor vii.

Probele de sânge au fost obținute de la gravide sănătoase și gravide cu DZG. Probele de sânge au fost stocate timp de 10 ore la temperatura RT pe un agitator orbital (Grant-Bio) înainte de finalizarea izolării PBMC. Protocolul utilizat este cel descris în secțiunea anterioară, probele fiind diluate 1:1 în DPBS, conținând 1mM de EDTA (PBS-EDTA, Lonza BE02-017F) înainte de centrifugarea densității în tuburi SepMate. Probele au fost congelate în camera Corning CoolCell și ulterior transferate într-un rezervor de azot lichid pentru depozitare înainte de a fi analizate.

a. Citometrie în flux

Citometria în flux a fost utilizată pentru a caracteriza celulele Tregs și pentru a analiza diferențele dintre femeile însărcinate cu sau fără DZG.

Mai jos este prezentat un rezumat al protocolului de pregătire și analiză a probelor PBMC congelate prin citometrie în flux:

1. Dezghețarea și pregătirea inițială:

- Dezghețați probele PBMC congelate într-o baie de apă la 37°C timp de 1 minut.
- Se transferă în tuburi falcon cu 8 ml de mediu RPMI complet cald și se incubează timp de 5 minute la 37°C.

2. Centrifugarea:

- Se centrifughează la 300xg timp de 10 minute la temperatura camerei, se aruncă supernatantul și se resuspendă în 1 ml de RPMI complet.

3. Blocarea:

- Incubați în tampon FCS cu un reactiv de blocare timp de 10 minute pentru a preveni legarea nespecifică.

4. Colorarea viabilității:

- Se spală celulele și se incubează cu colorant fixabil de viabilitate (FVD) eFluor® 780 timp de 30 de minute la 2-8°C, apoi se spală din nou.

5. Colorarea markerilor de suprafață:

- Se incubează cu un cocktail de anticorpi pentru markerii de suprafață timp de 30 de minute la 4°C, urmat de o spălare.

6. Colorare intracelulară:

- Se fixează celulele cu tamponul de fixare IC, se permeabilizează și apoi se incubează cu un cocktail de anticorpi intracelulari timp de 30 de minute la temperatura camerei.

7. Obținerea datelor: au fost analizate utilizând software-ul FlowJo pentru a înregistra procentele de limfocite cu scopul de a identifica populațiile care exprimă receptorii țintă și moleculele intracelulare. Datele au fost apoi exportate și analizate utilizând software-ul GraphPad Prism (versiunea 9, GraphPad Software).

b. Concluzii finale și perspective viitoare

Studiul nostru a demonstrat că ar putea exista diferențe între femeile însărcinate sănătoase, care pot afecta rezultatul comparațiilor cu condițiile patologice. Acesta este un aspect important de luat în considerare la proiectarea și finalizarea experimentelor pentru

studierea răspunsurilor în timpul sarcinii. Am evidențiat că, atunci când se studiază populațiile de celule T de memorie și Treg, există diferențe semnificative între cele două grupuri de femei însărcinate sănătoase.

Nu am putut găsi o cauză a existenței acestor diferențe. Prin urmare, rezultatele noastre susțin continuarea investigațiilor privind aceste populații, inclusiv CCR7 sau CD150+ Tregs și celulele TEMRA care nu au fost îndeajuns cercetate în ceea ce privește implicarea în sarcină. Investigațiile în acest sens ar putea fi finalizate mai întâi in vitro pentru a analiza efectul asupra altor populații de celule imune. Aceasta ar putea include utilizarea testelor de suprimare pentru a compara adăugarea de CCR7+ sau CD150+ Tregs la celulele prelevate din deciduă sau din sângele cordonului ombilical și compararea acestora cu lotul de control negativ. De asemenea, am putea analiza diferențele dintre citokinele produse de aceste celule utilizând un test imunisorbent enzimatic. În plus, am putea să subsetăm aceste celule în sarcina umană sau animală și să utilizăm transcriptomica pentru a investiga modul în care aceste celule diferă de alte celule Treg și de celulele T convenționale.

Metoda actuală, care utilizează citometria în flux, permite, de asemenea, doar analiza celulelor care utilizează până la 18 markeri. Spectrometria de masă ar putea îmbunătăți acest aspect, deoarece permite analiza expresiei a 33 de markeri. Am putea utiliza spectrometria de masă pentru a investiga legătura cu alte populații de celule imune, permițându-ne să aflăm dacă ceea ce am descoperit în rezultatele noastre se reflectă și în alte populații de celule imune. Am putea, de asemenea, să o folosim pentru a identifica dacă mai multe pacienți prezintă același răspuns ca participantele sănătoase (alternativ) pentru a dovedi dacă rezultatele sunt replicabile sau nu. Pentru a analiza în profunzime populațiile specifice și modificările funcționale cauzate de DZG, am putea utiliza, de asemenea, un genom 10X, deoarece acesta ar putea fi mai sensibil la detectarea modificărilor pe care citometria în flux nu le-ar putea detecta și am analiza modificările funcționale pe care nu le-am putea investiga altfel.

Din cauza diferențelor dintre rezultatele noastre și constatările anterioare, se sugerează o evaluare suplimentară a efectului dietei asupra celulelor Treg și a modului în care dieta mediază modificările. Prin compararea diferitelor diete, inclusiv în ceea ce privește compoziția de carbohidrați, grăsimi și proteine, am putea înțelege mai bine modul în care dieta afectează răspunsurile celulelor imune și care sunt cele mai bune părți ale dietei unei persoane. Aceasta ar putea deveni o formă de tratament care reglează indirect sistemul imunitar fără a provoca efecte secundare grave. De asemenea, ar putea fi implementată în viitor, alături de tratamentele oficiale, pentru a contribui la îmbunătățirea eficacității tratamentului prin reducerea sau îmbunătățirea indirectă a răspunsurilor imunitare la pacienții care nu răspund pozitiv.

În concluzie, combinația dintre diluarea sângelui în PBS, care conține 1mM EDTA, și centrifugarea densității în tuburi SepMate, crește viabilitatea celulelor T din PBMC pentru analiza prin citometrie în flux prin eliminarea contaminării cu granulocite. Deși nu știm de ce am avut două grupuri de participante sănătoase, s-ar putea sugera că răspunsul este legat de cât de aproape este mama de naștere. Acesta este un domeniu care ar putea fi cercetat și corelat cu nivelurile de celule T de memorie sau Treg și ar putea contribui la o mai bună înțelegere a mecanismului travaliului. În cele din urmă, dieta poate reduce efectul DZG prin creșterea indirectă a frecvenței celulelor Treg. Cu toate acestea, aceasta este doar o sugestie și sunt necesare cercetări suplimentare pentru a studia potențialul utilizării schimbărilor în dietă pentru a trata sau preveni DZG.

CEL DE-AL TREILEA STUDIU

10. Scopuri și obiective

Acest studiu a urmărit să investigheze peisajul transcripțional al celulelor Treg în DZG prin scRNA-seq. Am identificat gene exprimate diferențiat în cadrul subseturilor celulelor Treg de la pacientele cu DZG și am detectat seturi de gene modificate în celulele DZG Treg. Explorăm potențialul acestor semnale specifice tipului de celule de a servi ca biomarkeri clinici prin modelarea expresiei genelor și a statutului DZG în cohorte. Această lucrare oferă un compendiu de gene dereglate în cadrul FOXP3 + Tregs și extinde înțelegerea noastră cu privire la contribuția lor la fiziopatologia DZG.

11. Metode

Disfuncția celulelor T de reglementare trebuie să stea la baza patologiei diabetului zaharat gestațional (DZG). Am prezentat transcriptomele unicelulare ale celulelor Treg și ale celulelor CD4 + T izolate din PBMCs aparținând femeilor cu DZG și femeilor însărcinate sănătoase. Analiza noastră a identificat subseturi moleculare naive și efectoare în celulele Treg cu o creștere semnificativă a celulelor CD4 + T de memorie de la pacientele cu DZG, sugerând o suprimare imună afectată. Analiza expresiei diferențiale a evidențiat o scădere a subunităților factorului de transcripție AP-1 în grupul Naive-2, iar analiza căilor a indicat o semnalizare NF- κ B redusă. În plus, celulele efectoare-2 Treg au reglat genele implicate în angieneză. Am evaluat potențialul translațional al markerilor de expresie derivați din scRNA-seq din populațiile de celule CD4 + T și am validat potențialul lor predictiv în celulele CD4 + T pseudobulk și în cohorte independente de validare. Se observă că procentul de celule Treg la

pacientele cu DZG este redus la femeile cu DZG (Szabo, P. A. et al. Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease). Am identificat celulele FOXP3 + în cadrul celulelor CD4 + T alese, care ne așteptam să conțină celule Treg; cu toate acestea, proporția lor nu a fost diferită semnificativ între cazuri. Celulele FOXP3 + reprezintă o proporție scăzută a rezervei de celule T CD4 +. Prin urmare, este posibil să nu putem observa efectul la nivelul unei singure celule. Ceea ce este de remarcat este faptul că am observat grupuri de celule Humanin + și MALAT1 + în ambele populații de celule Treg și CD4 + T. Aceste celule au fost raportate anterior în celulele Treg alese de la pacientele cu spondilită anchilozantă profilate cu platforma 10X scRNA-seq (Simone, D. și colab. Single cell analysis of spondyloarthritis regulatory T cells identifies distinct synovial gene expression patterns and clonal fates). Am observat, de asemenea, că Humanin + CD4 + celule T au fost raportate în contextul artritei reumatoide (Argyriou, A. et al. Single cell sequencing reveals expanded cytotoxic CD4+ T cells and two states of peripheral helper T cells in synovial fluid of ACPA+ RA patients). Din cunoștințele noastre, aceasta este prima raportare a celulelor Humanin- pozitive în DZG. Concentrațiile modificate de umanină au fost propuse ca biomarker pentru afecțiunile diabetice, deoarece umanina este protectoare în condiții de stres oxidativ, dar care poate apărea din generarea excesivă de ROS din hiperglicemia diabetică (Boutari, C., Pappas, P. D., Theodoridis, T. D. & Vavilis, D. Humanin and diabetes mellitus: A review of in vitro and in vivo studies.), Rochette, L., Meloux, A., Zeller, M., Cottin, Y. & Vergely, C. Role of humanin, a mitochondrial-derived peptide, in cardiovascular disorders.

Sunt necesare cercetări suplimentare privind fenotipurile acestor subseturi de celule Treg pentru a înțelege rolul lor în DZG.

12. Rezultate și concluzii

Deși studiul nostru subliniază mediul transcripțional al celulelor Treg în DZG, accentul pus pe celulele CD4 + izolate prezintă limitări. Mai multe subtipuri imune care nu au fost studiate sunt asociate cu fiziopatologia DZG, cum ar fi neutrofilele, macrofagele și monocitele (48). Studiile funcționale în modele de DZG pot descoperi în continuare rolul celulelor imune în atenuarea activității celulelor Treg. De exemplu, am observat subexprimarea JUNB, factorul de transcripție AP-1, despre care s-a demonstrat că reglează dezvoltarea celulelor Treg intestinale, iar ablația sa este asociată cu creșterea acumulării T helper și a inflamației Wheaton, J. D. & Ciofani, M. JunB Controls Intestinal Effector Programs in Regulatory T Cells.

Cu toate că RNA-seq unicelular permite descoperirea expresiei specifice tipului de celulă, această analiză rămâne limitată la ARN-urile codificatoare de proteine. În schimb, mai

multe ARN-uri necodificatoare, cum ar fi microARN-urile (Fan, W., Pang, H., Xie, Z., Huang, G. & Zhou, Z. Circular RNAs in diabetes mellitus and its complications and circular RNAs (Guarino, E. et al. Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Gestational Diabetes Mellitus: Updates and Perspectives, au fost propuse ca biomarkeri circulanți candidați pentru DZG. Studiul efectului ARN-urilor necodificatoare asupra subtipurilor de celule reglatoare T poate dezvălui informații despre patologia DZG.

În concluzie, acest studiu identifică subseturile de celule Treg cu programe transcripționale modificate la pacientele cu DZG și propune markeri genetici cu potențial translational, care rezultă din dereglarea celulelor Treg. Inflamația cronică, care conduce la dereglarea metabolică, este un factor de cuplare care determină asocierea dintre obezitate, boli cardiovasculare și diabet (Hotamisligil, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders).

Lucrările viitoare, care vor investiga acești markeri moleculari ai disfuncției celulelor Treg, vor îmbunătăți înțelegerea stării imunometabolice complexe observate în DZG.

Bibliografie selectivă

1. McIntyre, H. D. *et al.* Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 47 (2019).
2. Jiang, L. *et al.* A global view of hypertensive disorders and diabetes mellitus during pregnancy. *Nat. Rev. Endocrinol.* **18**, 760–775 (2022).
3. Sweeting, A., Wong, J., Murphy, H. R. & Ross, G. P. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr. Rev.* **43**, 763–793 (2022).
4. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* **43**, S14–S31 (2020).
5. Bellamy, L., Casas, J.-P., Hingorani, A. D. & Williams, D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **373**, 1773–1779 (2009).
6. Noctor, E. & Dunne, F. P. Type 2 diabetes after gestational diabetes: The influence of changing diagnostic criteria. *World J. Diabetes* **6**, 234–244 (2015).
7. Ornoy, A., Becker, M., Weinstein-Fudim, L. & Ergaz, Z. Diabetes during Pregnancy: A Maternal Disease Complicating the Course of Pregnancy with Long-Term Deleterious Effects on the Offspring. A Clinical Review. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
8. Krop, J., Heidt, S., Claas, F. H. J. & Eikmans, M. Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3. *Front. Immunol.* **11**, 1182 (2020).
9. Hotamisligil, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* **542**, 177–185 (2017).
10. Wheaton, J. D. & Ciofani, M. JunB Controls Intestinal Effector Programs in Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* **11**, 444 (2020).
11. C. Zhang *et al.*, 2016a
12. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of “Medical Care in Diabetes—2021” 2021.
13. Egan, A. M., Murphy, H. R., & Dunne, F. P. (2015). The management of type 1 and type 2 diabetes in pregnancy. *QJM*, **108**(12), 923–927. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcv060>.
14. Landon MB, Langer O, Gabbe SG, Schick C, Brustman L. Fetal surveillance in pregnancies complicated by insulin dependent diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1992; **167**:617–21.
15. Sanches, S. M. V., Cerqueira, M. M. B. da F., Junqueira, P. L., & Gomez, M. T. (2020). Thromboprophylaxis during the Pregnancy-Puerperal Cycle - Literature Review. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*, **42**(04), 218–227. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1708096>.
16. Blood *et al.*, 2016

17. Szabo, P. A. *et al.* Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. *Nat. Commun.* **10**, 4706 (2019).
18. Simone, D. *et al.* Single cell analysis of spondyloarthritis regulatory T cells identifies distinct synovial gene expression patterns and clonal fates. *Commun Biol* **4**, 1395 (2021).
19. Boutari, C., Pappas, P. D., Theodoridis, T. D. & Vavilis, D. Humanin and diabetes mellitus: A review of in vitro and in vivo studies. *World J. Diabetes* **13**, 213–223 (2022).
20. Rochette, L., Meloux, A., Zeller, M., Cottin, Y. & Vergely, C. Role of humanin, a mitochondrial-derived peptide, in cardiovascular disorders. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **113**, 564–571 (2020).

List of scientific papers published

1. Isolation and freezing of human peripheral blood mononuclear cells in pregnant patients - protocol paper published *STAR PROTOCOLS Volume 3, Issue 1, 18 March 2022, 101204*- within the thesis the information can be found in chapter 2, pages 40-50 Athina Efthymiou,^{1*} **Nicoleta Mureanu**,^{1*} Rebecca Pemberton², Sarah Tai-MacArthur², Daniela Mastronicola², Cristiano Scotta², Giovanna Lombardi², Kypros H Nicolaides¹ and Panicos Shangaris^{1,2}. *shared co-authors.
DOI: [10.1016/j.xpro.2022.101204](https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101204)
2. Regulatory T Cells in Pregnancy adverse Outcomes - (Rutepo): A Systematic Review & Meta-Analysis published in *Frontiers Immunology Editorial Office Oct 2021* Samantha GREEN^{1*}, Marina POLITIS^{2*}, Kathrine S RALLIS^{3*}, Alba Saenz de Villaverde CORTABARRIA⁴, Athina EFTHYMIIOU⁵, **Nicoleta MUREANU**⁵, Kathryn DALRYMPLE⁵, Cristiano SCOTTA⁵, Giovanna LOMBARDI⁵, Rachel M TRIBE⁵, Kypros H NICOLAIDES⁵, Panicos SHANGARIS.
DOI: [10.3389/fimmu.2021.737862](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.737862)
3. The role of T Cells in Gestational Diabetes and their therapeutic potential, a literature review
Vienna Hubbard¹, Athina Efthymiou^{2,3}, **Nicoleta Mureanu**^{2,3}, Ffion Harris⁴, Daniela Mastronicola⁴, Cristiano Scotta⁴, Giovanna Lombardi⁴, Timothy Tree⁴, Kypros H Nicolaides^{2,3} and Panicos Shangaris^{2,4}
Volume 14 - 2023 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1226617>
4. Regulatory T cells (Tregs) in the peripheral blood of women with gestational diabetes; a systematic review and meta-analysis published in *Frontiers in Immunology December 2023*
Hania Arain¹, Tina Patel¹, **Nicoleta Mureanu**^{1,2}, Athina Efthymiou^{1,2}, Giovanna Lombardi³, Timothy Tree³, Kypros H Nicolaides^{1,2} and Panicos Shangaris^{1,3} Within the thesis the information can be found in chapter 2, pages 37-38, respectively 107-108
DOI: [10.3389/fimmu.2023.1226617](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1226617)
5. Single-cell transcriptomics reveals markers of regulatory T cell dysfunction in Gestational Diabetes Mellitus under review at *Nature portofolio journal December 2023*.

Nana E. Mensah*, Athina Efthymiou*, **Nicoleta Mureanu***, Shichina Kannambath, Heli Vaikkinen, Amanda Bowman, Athul Menon, Tim Tree, Cristiano Scotta, Giovanna Lombardi, Pawan Dhami, Kypros H Nicolaides and Panicos Shangaris. *shared co-authors. *Within the thesis the information can be found in chapter 2, pages 90-107*
DOI: [10.21203/rs.3.rs-3773991/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3773991/v1)

6. The immunomodulatory role of regulatory T cells in preterm birth and associated pregnancy outcomes

Nicoleta Mureanu^{1**}, Amanda M. Bowman^{1**}, Imogen A. Porter-Wright^{2**}, Priya Verma^{**}, Athina Efthymiou, Kypros H. Nicolaides, Cristiano Scotta, Giovanna Lombardi^{**}, Rachel M. Tribe^{**}, Panicos Shangaris^{**} - in process of being published (accepted by Nature portofolio journal)