



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ

**«ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΣΤΟ
ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΚΑΘΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΝΕΞΗΓΗΤΗ
ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ»**

Γεωργοπούλου Ελένη Ραφαηλία του Αντωνίου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Καλαλά Φανή, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπουσα
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

*Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού
Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής*

Λάρισα, Φεβρουάριος 2024



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

THESIS TITLE:

**CHARACTERISATION OF THE LYMPHOCYTIC POPULATIONS IN THE
PERIPHERAL BLOOD OF WOMEN WITHOUT FERTILITY PROBLEMS AND
OF WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGES AND UNEXPLAINED
INFERTILITY**

Georgopoulou Eleni Rafailia

Examining Committee:

- Kalala Fani, Assistant Professor of Medical Immunology
- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases

*Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in
partial fulfillment of the requirements for the Master's degree in Clinical Applications
of Molecular Medicine*

Larissa, February 2024

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίο για την δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής, για την συγκατάθεσή του να αποτελέσει μέλος της τριμελούς επιτροπής μου καθώς και για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές και την βοήθειά του σε οποιοδήποτε εμπόδιο που παρουσιάστηκε.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου την Καθηγήτρια κ. Καλαλά Φανή για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της πτυχιακής μου εργασίας, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο καινοτόμο πρότζεκτ και για τις συμβουλές αλλά και την κατανόησή της προς το πρόσωπό μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπουρνούδη Ιωάννα, Γυναικολόγο-Μαιευτήρα και επιμελήτρια Β' Μαιευτικής Γυναικολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας για τη συνεργασία και την παροχή των δειγμάτων.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια και το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον. Ιδίως ευχαριστώ τις παρασκευάστριες-τεχνολόγους κ. Φουσίκα Αθανασία και Γιαννιού Μιχαέλα με τις οποίες και συνεργάστηκα περισσότερο καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου και με βοήθησαν να αποκτήσω νέες και εμπειριστατωμένες γνώσεις πάνω στο τεχνικό κομμάτι της διπλωματικής μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους ανθρώπους που με στήριξαν ψυχολογικά όλο αυτό το διάστημα του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
A. Γενικό Μέρος	8
A.1. Εισαγωγή	8
A.1.1 Η σημαντικότητα του ανοσιακού συστήματος κατά την κύηση	8
A.1.2. Το ενδομήτριο	9
A.1.3. Φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου	10
A.1.4. Υπογονιμότητα και φραγμοί στη συνέχεια της κύησης	12
A.1.5. Ανοσορυθμιστικές θεραπείες	15
A.2.Κυτταρικοί πληθυσμοί του ανοσιακού συστήματος άμεσα συσχετιζόμενοι με την κύηση	15
A.2.1. Φυσικά Κυτταροκτόνα Κύτταρα (natural killer cells,NKs)	15
A.2.2 Β λεμφοκύτταρα (B cells)	17
A.2.3 Τ λεμφοκύτταρα (T cells)	19
A.2.4 Διπλά Αρνητικά Τ λεμφοκύτταρα (Double Negative T cells, DNTs)	21
A.3 Σκοπός	26
 B. Ειδικό Μέρος	 27
B.1 Δείγματα που μελετήθηκαν	27
B.2 Κριτήρια Έρευνας	28
B.3 Μεθοδολογία Έρευνας	28
B.3.1. Κυτταρομετρία Ροής	28
B.3.2. Υλικά και Πειραματική Διαδικασία	30

Γ. Αποτελέσματα	33
Γ.1. Κυτταρομετρική ανάλυση αποτελεσμάτων	33
Γ.2. Στατιστική Ανάλυση και απεικόνιση αποτελεσμάτων	39
Δ. Συμπεράσματα	41
Ε. Συζήτηση	42
Βιβλιογραφία	44

Περίληψη

Κατά την περίοδο της κύησης συμβαίνουν πολύ σημαντικές αλλαγές στον οργανισμό μιας γυναίκας, τόσο ανατομικές όσο και σε επίπεδο κυττάρων. Ιδιαίτερος είναι ο ρόλος που διαδραματίζει το ανοσιακό σύστημα κατά την εγκυμοσύνη αλλά και πριν αυτή επιτευχθεί, ρυθμίζοντας το μικροβίωμα του ενδομητρίου αλλά πραγματοποιώντας και τις κατάλληλες αλλαγές και ανακατατάξεις των εκάστοτε κυττάρων με σκοπό την εμφύτευση και την ομαλή έκβαση μιας κύησης. Το ενδομήτριο μιας μητέρας πρέπει να επέλθει σε μια δεκτική κατάσταση έτσι ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η εμφύτευση, διαδικασία η οποία όμως σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι εφικτή και έχει ως αποτέλεσμα η μητέρα να οδηγείται σε καθέξιν αποβολές ή στην περίπτωση της εξωσωματικής γονιμοποίησης σε αποτυχία εμφύτευσης. Ακόμη ιδιαίτερη διερεύνηση υπάρχει όσον αφορά το ρόλο των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος στην υπογονιμότητα και συγκεκριμένα στην κατηγορία της ανεξήγητης υπογονιμότητας.

Σημαντικότεροι πληθυσμοί των κυττάρων του ανοσιακού οι οποίοι εμπλέκονται στις διαδικασίες αυτές αποτελούν τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα NKs και συγκεκριμένα τα uNKs της μήτρας, τα B λεμφοκύτταρα και τα T λεμφοκύτταρα, με ιδιαίτερη σημασία τα τελευταία χρόνια να αποδίδεται στα διπλά αρνητικά T λεμφοκύτταρα. Τα B, τα T και τα διπλά αρνητικά T λεμφοκύτταρα λοιπόν ήταν και οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν στο περιφερικό αίμα γυναικών με καθέξιν αποβολές και ανεξήγητη υπογονιμότητα και σε φυσιολογικά δείγματα στην παρούσα μελέτη.

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε κάποια σημαντική διαφορά στους πληθυσμούς των κυττάρων αυτών στο περιφερικό αίμα ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα παθολογικά δείγματα και είναι ύψιστης σημασίας η περαιτέρω μελέτες τους πληθυσμούς αυτούς αλλά και τους υποπληθυσμούς τους τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στους ιστούς οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με την κύηση όπως τον ιστό του ενδομητρίου.

Abstract

During pregnancy, very important changes occur in a woman's body, both anatomically and at the cellular level. The immune system plays a special role during pregnancy and before pregnancy, regulating the microbiome of the endometrium, but also carrying out the appropriate changes and rearrangements of the cells in order to ensure the implantation and the smooth outcome of a pregnancy. A mother's endometrium must be brought into a receptive state so that implantation can be achieved, a process which in many cases is not possible and results in the mother suffering a miscarriage or, in the case of IVF, in the failure of implantation. Furthermore, there is particular research into the role of immune cells in infertility and specifically in the category of unexplained infertility.

The most important immune cell populations involved in these processes are the natural killer cells, NKs and especially the NKs of the uterus, B lymphocytes and T lymphocytes, with particular importance in recent years being attributed to double negative T lymphocytes, DNs. B lymphocytes, T lymphocytes and double negative T lymphocytes were therefore the populations mostly studied in the peripheral blood of women with recurrent miscarriages and unexplained infertility and in normal samples in the present study.

In conclusion, it was found that there was no significant difference in the populations of these cells in peripheral blood between normal and pathological samples and it is of the utmost importance to further study these populations and their subpopulations both in peripheral blood and in tissues directly related to pregnancy such as endometrial tissue.

A. Γενικό Μέρος

A.1 Εισαγωγή

A.1.1 Η σημαντικότητα του ανοσιακού συστήματος κατά την κύηση

Σε αντίθεση με όσα πιστεύονταν παλαιότερα, το ανοσιακό σύστημα της μητέρας στην περίοδο της κύησης δεν είναι κατεσταλμένο. Αντίθετα είναι ενεργό και λειτουργικό και διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στα διάφορα στάδια της εγκυμοσύνης, από την εμφύτευση του εμβρύου έως τον τοκετό. Ιδιαίτερα έχει υπογραμμιστεί η σημασία του σε ομάδες γυναικών οι οποίες πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα , αλλεργίες και ανοσοανεπάρκειες , στις οποίες ο κίνδυνος λοιμώξεων αλλά και αποβολών κατά την περίοδο της κύησης παρατηρείται αυξημένος. Πρόκειται για μια κατάσταση ανοσιακής ανοχής προς το ημι-αλλογενές έμβρυο. Πέρα από την πραγματοποίηση της αναπαραγωγής, το ανοσιακό σύστημα συνεισφέρει και στην προστασία ενάντια σε λοιμώξεις από παθογόνα και ασθένειες τόσο για τη μητέρα όσο και για το έμβρυο. Το περιβάλλον του ανοσιακού συστήματος στην κύηση μεταβάλλεται και προσαρμόζεται συνεχώς (1).

Ακόμη παλαιότερα υπήρχε η αντίληψη ότι κατά τα στάδια της εγκυμοσύνης το ημι-αλλογενές έμβρυο, το οποίο είναι κατά 50% αντιγονικά διαφορετικό από τη μητέρα θα πρέπει να γίνει αποδεκτό από αυτή και το ανοσιακό σύστημα να γίνει ανεκτικό προς αυτό, γεγονός το οποίο βέβαια καταρρίπτουν πρόσφατες μελέτες. Κάποιος θα μπορούσε να παρομοιάσει την κατάσταση αυτή με εκείνη των μεταμοσχεύσεων όπου το ανοσιακό σύστημα είτε απορρίπτει ένα μόσχευμα είτε το αποδέχεται έπειτα από την επίδραση ανοσοκατασταλτικής θεραπείας (2)(3)(4).

Το φαινόμενο της εγκυμοσύνης παρομοιάζεται με αυτό της δημιουργίας ενός όγκου από την πλευρά του ανοσιακού . Τα αρχικά στάδια, κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, χαρακτηρίζονται από μια φλεγμονώδη κατάσταση κατά την οποία πραγματοποιείται η εμφύτευση της βλαστοκύστης και η δημιουργία του πλακούντα, ενός οργάνου το οποίο είναι απαραίτητο για την προστασία και ανάπτυξη του εμβρύου καθώς

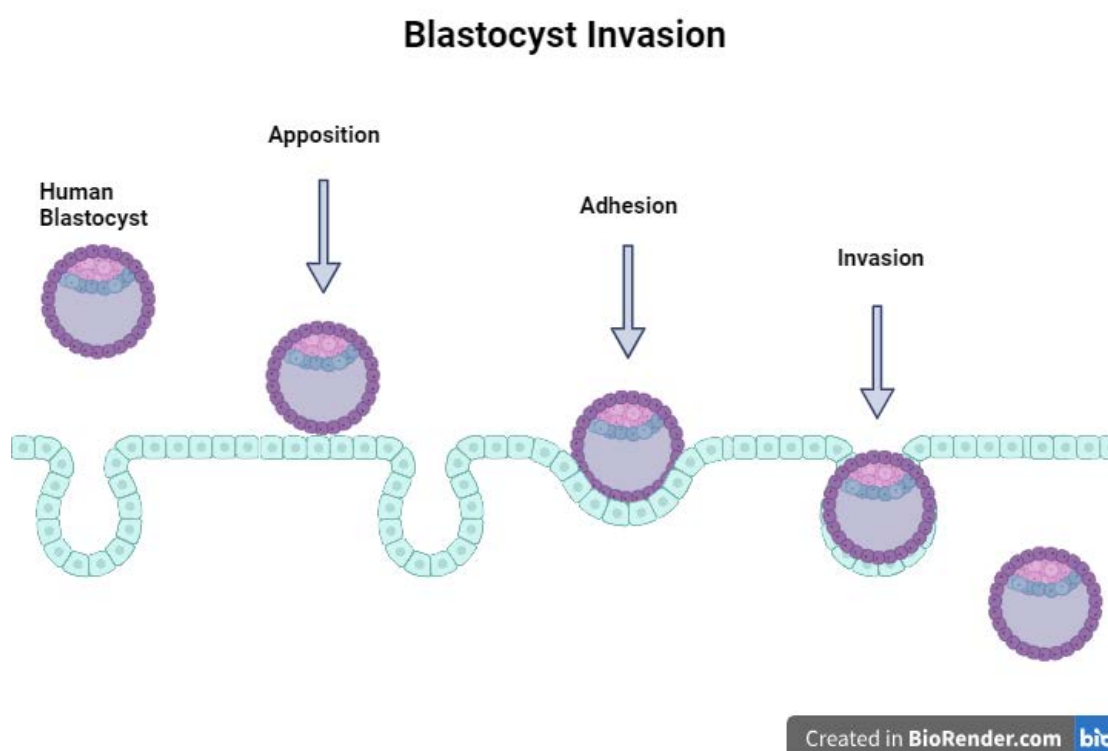
μέσω αυτού διαπερνούν οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία προς το έμβρυο. Έπειτα κατά το δεύτερο τρίμηνο μετατρέπεται σε ένα αντιφλεγμονώδες στάδιο στο οποίο επιτυγχάνεται η ανάπτυξη και επιβίωση του εμβρύου και τέλος επέρχεται ξανά φλεγμονή που οδηγεί στον τοκετό (5). Η επιτυχής ωορρηξία, γονιμοποίηση και κύηση, βασίζεται σε έναν επαρκή ρυθμιστικό μηχανισμό ο οποίος αποτρέπει τις ανοσολογικές απαντήσεις έναντι κυττάρων του σπέρματος, του πλακούντα και των ωοθηκών, τα οποία εκφράζουν αντιγόνα (6).

Πολύ σημαντικός είναι και ο ρόλος που διαδραματίζει το μικροβίωμα των διάφορων ιστών και συγκεκριμένα του πλακούντα και του ενδομητρίου. Η μήτρα θεωρούνταν ένα όργανο στείρο μέχρις ότου μελέτες απέδειξαν πως αποικίζεται από διάφορους μικροοργανισμούς και κυρίως από αυτούς του γένους *Lactobacillus*. Αν το ποσοστό των βακτηρίων αυτών είναι μεγαλύτερο από 90% τότε υπάρχει μεγαλύτερη επιτυχία εμφύτευσης ή πετυχημένης κύησης. Αν το ποσοστό είναι μικρότερο και υπάρχει και εμφάνιση *Gardenerella* ή *Streptococcus* τότε το αποτέλεσμα είναι η αποτυχία εμφύτευσης και ο κίνδυνος αποβολής (7)(8). Σε έρευνα έχει βρεθεί ότι το τροποποιημένο περιβάλλον του μικροβιώματος στις γυναίκες με ενδομητρίωση συμβάλλει στο αποτέλεσμα της εξωσωματικής γονιμοποίησης IVF (9)(10). Έχειδειχθεί ότι στην περίπτωση μικροβιακής λοίμωξης λόγω διαταραχής του μικροβιώματος του ενδομητρίου οι συνέπειες μπορεί να είναι θανατηφόρες για το έμβρυο καθώς μπορεί να επέλθει από πρόωρο τοκετό που καταλήγει σε μη επιβίωση του εμβρύου έως και εμβρυακή σήψη (11).

A.1.2 Το ενδομήτριο

Το ενδομήτριο αποτελεί την εσωτερική μεμβράνη (ιστό) της μήτρας η οποία έρχεται σε επαφή με την τροφοβλάστη, την εξωτερική στοιβάδα της βλαστοκύστης και επομένως με το έμβρυο. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση, την επιβίωση και την ανάπτυξη του εμβρύου. Στην στοιβάδα του ενδομητρίου συμβαίνει η αποκαλούμενη «φθαρτοποίηση», μια διαδικασία κατά την οποία επέρχεται μια σειρά σημαντικών αλλαγών και αναπρογραμματισμού των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου λαμβάνοντας σήματα από διάφορες κυτταροκίνες. Οι αλλαγές συμβαίνουν πριν την γονιμοποίηση λόγω των ορμονών της μητέρας. Κατά τη φθαρτοποίηση, σχηματίζεται ο φθαρτός

υμένας, δηλαδή το τμήμα του ενδομητρίου το οποίο έρχεται σε επαφή με την εμβρυική τροφοβλάστη και πραγματοποιείται η εισχώρηση αυτής (12) (Εικόνα 1). Οι ορμόνες της κύησης επιστρατεύουν τα κύτταρα του ανοσιακού σε διαδικασίες που αφορούν την αναπαραγωγή με τα λευκοκύτταρα να βρίσκονται σε ένα ποσοστό 10-20% στο ενδομήτριο (5)(13)(14). Στην περίπτωση που δεν συμβεί γονιμοποίηση το ενδομήτριο αποβάλλεται φυσιολογικά κάθε μήνα με την έμμηνο ρύση και γίνεται από την αρχή η αναδιαμόρφωσή του (15).



Εικόνα 1: Η εισχώρηση της βλαστοκύστης διαμέσου του ενδομητρίου η οποία αποτελείται από 3 διακριτές φάσεις: τη φάση της παράθεσης, της προσκόλλησης και της εισβολής (Biorender.com).

A.1.3 Φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου

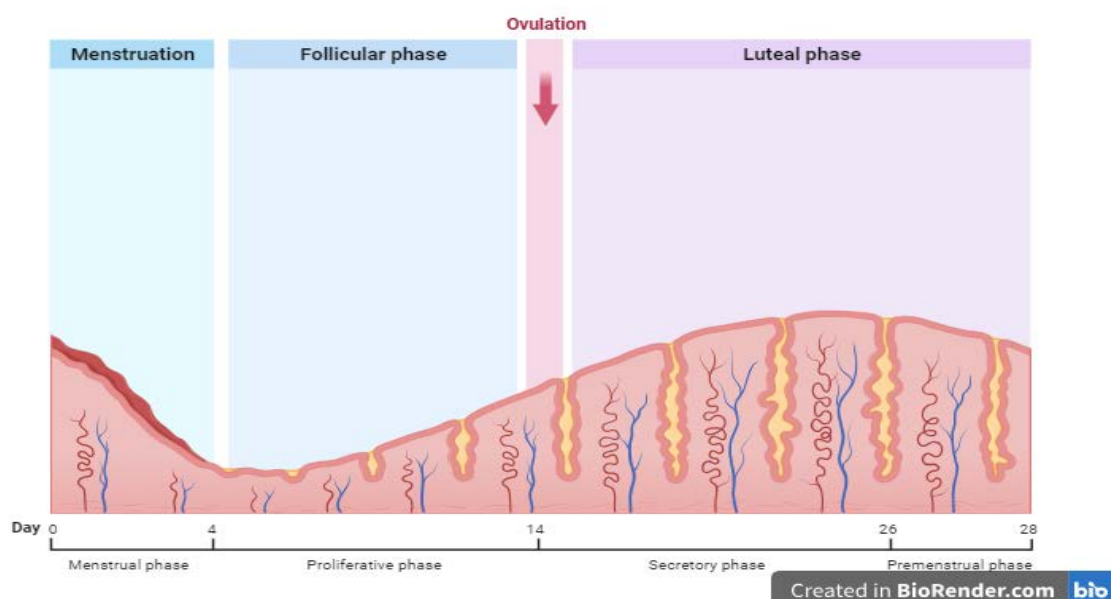
Τρεις είναι οι φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου της γυναίκας και αυτές είναι οι παρακάτω:

1. Αιμορραγική φάση -εμμηνορρυσία . Κατά τη φάση αυτή γίνεται αποβολή αίματος και υπολειμμάτων του ενδομητρίου και

αντικατάσταση αυτού. Συμπίπτει με το τέλος της ωχρινικής φάσης στις ωοθήκες.

2. Παραγωγική φάση, η οποία είναι η φάση πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ενδομητρίου και η παραγωγή νέου ιστού.
3. Εκκριτική φάση ή προεμμηνορρυσιακή φάση. Συμπίπτει χρονικά με την ωχρινική φάση στις ωοθήκες και κατά τη φάση αυτή απελευθερώνονται διάφορες ορμόνες της κύησης όπως η προγεστερόνη.

Η μέση διάρκεια του κύκλου είναι 28 μέρες. Κατά την εκκριτική φάση υπάρχει αυθόρμητος μετασχηματισμός του ενδομητρίου έτσι ώστε να προβεί σε μια δεκτική κατάσταση έπειτα από τη δράση οιστρογόνων ανεξαρτήτως από το αν θα υπάρξει γονιμοποίηση ή όχι. Η διαδικασία κατά την οποία το ενδομήτριο καθίσταται δεκτικό είναι ύψιστης σημασίας για την επιτυχία της εμφύτευσης. Το ενδομήτριο είναι πλήρως δεκτικό κατά τη 19^η έως 23^η μέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο εσωτερικό της μητρικής κοιλότητας (7)(16)(17). Όταν συμβεί η γονιμοποίηση η βλαστοκύστη αλληλεπιδρά με το φθαρτό υμένα του ενδομητρίου με διάφορα μόρια προσκόλλησης όπως ολιγοσακχαρίτες, ιντεγκρίνες, συνδέτες L-σελεκτίνης και επιτυγχάνεται η εμφύτευση (7).



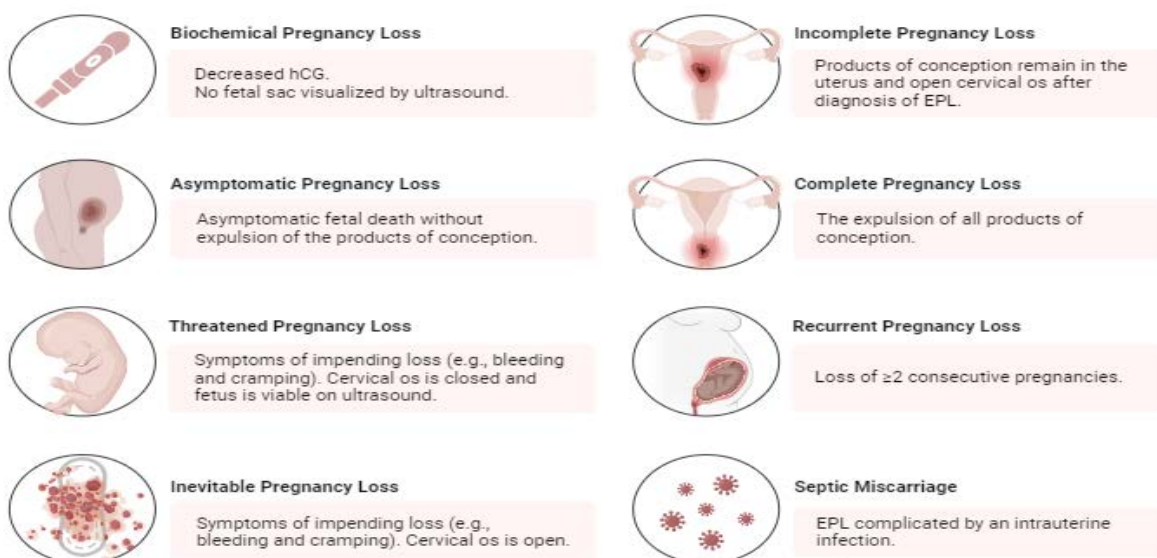
Εικόνα 2: Αλλαγές που υφίσταται ο ιστός του ενδομητρίου κατά τις διάφορες φάσεις του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Biorender.com).

Στην περίπτωση που δεν προκύψουν οι απαραίτητες αλλαγές από πλευράς ανοσιακού συστήματος κατά την περίοδο της κύησης το αποτέλεσμα είναι να υπάρξουν επιπλοκές ή υπογονιμότητα και αυτό είναι ακόμη πιθανότερο να συμβεί σε γυναίκες με αυτοάνοσα νοσήματα ή ανοσοανεπάρκειες (13). Για παράδειγμα σε περιπτώσεις γυναικών με ερυθματώδη λύκο υπάρχει 3 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα πρόωρου τοκετού καθώς και μολύνσεων μετά τον τοκετό σε σχέση με υγιείς γυναίκες (1)(18). Η μη προσαρμογή του ανοσιακού, η υπερλειτουργικότητα ή και η υπολειτουργικότητά του μπορεί να οδηγήσει σε προεκλαμψία, υπέρταση λόγω κύησης, καθέξιν αποβολές, αποτυχία εμφύτευσης, πρόωρη γέννα κ.α (3)(16)(19).

A.1.4 Υπογονιμότητα και φραγμοί στη συνέχεια της κύησης

Υπάρχουν πολλοί λόγοι και παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε μη συνέχεια της κύησης ή ανεξήγητη υπογονιμότητα. Οι παράγοντες αυτοί συνιστούν τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, διάφορες μολύνσεις που προκαλούν σηπτικό σοκ και αποβολή, ορμονικά προβλήματα, θρόμβοι, ενδομητρίωση, προεκλαμψία, ανεπαρκώς ανεπτυγμένο ενδομήτριο και έτσι προκαλούνται οι καθέξιν αποβολές ή στην περίπτωση της εξωσωματικής γονιμοποίησης η επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (5)(16).

Classification of Early Pregnancy Loss (EPL)



Created in BioRender.com bio

Εικόνα 3: Κατηγορίες αποβολών και διακοπής κύησης (Biorender.com).

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η ανικανότητα σύλληψης έπειτα από 12 μήνες σεξουαλικής επαφής χωρίς προφύλαξη. Η υπογονιμότητα εμφανίζεται σε ένα ποσοστό περί 15% σε γυναίκες αλλά και σε άνδρες και ένα 10-17% των γυναικών με προβλήματα γονιμότητας εμφανίζουν ανεξήγητη υπογονιμότητα. Στις ανεπτυγμένες χώρες εμφανίζεται το πρόβλημα της υπογονιμότητας σε ποσοστό 3,5-16,7% και 6,9-9,3% στις ανεπτυσσόμενες χώρες (20). Έχει βρεθεί πως αυτοάνοσα νοσήματα όπως συστηματικός ερυθματώδης λύκος (SLE) και αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS) συμβάλλουν στην εμφάνιση υπογονιμότητας (3)(17). Άλλες αιτίες υπογονιμότητας και στα δυο φύλα αποτελεί το γενετικό υπόβαθρο, η ηλικία, οι ορμονικές διαταραχές, ο τρόπος ζωής καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Προεκλαμψία

Η προεκλαμψία συνδέεται με την διείσδυση της τροφοβλάστης (εξωτερική στοιβάδα της βλαστοκύστης) στο ενδομήτριο ,τον αποτυχημένο σχηματισμό της σπειροειδούς αρτηρίας, τη δημιουργία προβλημάτων στον πλακούντα, την αύξηση της αρτηριακής πίεσης , τη δημιουργία οιδημάτων (21). Έτσι προκαλείται πρόωρος τοκετός ή διακοπή της κύησης , όμως υπάρχουν ενδείξεις για το φαινόμενο αυτό από τον υπέρηχο Α επιπέδου κατά την 12^η εβδομάδα της κύησης. Συνήθως γίνεται χορήγηση ασπιρίνης στην περίπτωση που υπάρχουν ενδείξεις προεκλαμψίας ή για μείωση πιθανοτήτων αυτής (22).

Ενδομητρίωση

Ως ενδομητρίωση χαρακτηρίζεται μια χρόνια φλεγμονώδης γυναικολογική ασθένεια στην οποία δημιουργείται ιστός στην εξωτερική επιφάνεια της μήτρας, στις ωοθήκες, στις σάλπιγγες και σε άλλα σημεία της πυέλου, ιστός με κύτταρα του ενδομητρίου. Η ενδομητρίωση έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό 10-15% των γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία και μπορεί να προκαλέσει μείωση της γονιμότητας , πόνο , βαριές και μακράς διάρκειας εμμηνορρυσίες ακόμη και γαστρεντερικά προβλήματα. Το εξωτερικό αυτό ενδομήτριο δημιουργείται όταν ιστός κατά την έμμηνο ρύση παλινδρομεί μέσω των φαλοπιανών σαλπίγγων, προσκολλάται σε εκτοπικά σημεία και το ανοσιακό σύστημα αποτυγχάνει

στην εξάλειψή του. Έχει βρεθεί σε έρευνες πως το 30-50% των γυναικών με ενδομητρίωση δεν είναι γόνιμες ή είναι μερικώς γόνιμες (17)(23)(24)(25).

Ανεπαρκώς ανεπτυγμένο ενδομήτριο

Ως ανεπαρκώς ανεπτυγμένο ενδομήτριο χαρακτηρίζεται η ανεπιτυχής μετατροπή των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου σε κύτταρα του φθαρτού τα οποία θα συμβάλλουν στην σωστή εμφύτευση και ανάπτυξη του εμβρύου. Το ενδομήτριο χαρακτηρίζεται ως ένας βιοαισθητήρας για την ποιότητα του εμβρύου. Το ενδομήτριο σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές επιτρέπει την εμφύτευση εμβρύων τα οποία δεν είναι ικανά να αναπτυχθούν σωστά και τα οποία θα απορριφθούν σε μετέπειτα στάδιο κάτι που αποφεύγεται εξ αρχής στις φυσιολογικές γυναίκες με τη μη εμφύτευση (5).

Επαναλαμβανόμενη Αποτυχία Εμφύτευσης (recurrent implantation failure, RIF)

Ως επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης ορίζονται οι περισσότερες από 2 αποτυχημένες εμφυτεύσεις κατά τη διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης (21). Η RIF προκύπτει λόγω παραγόντων που οφείλονται στη μητέρα (στο ενδομήτριο) είτε στο έμβρυο είτε σε συνδυασμό παραγόντων και από τις δύο πλευρές (26). 1 στα 6 ζευγάρια τα οποία αντιμετωπίζουν αποτυχία εμφύτευσης χαρακτηρίζονται ως μη γόνιμα. (17).

Επαναλαμβανόμενη (καθ'έξιν) αποβολή (recurrent miscarriage, RM ή recurrent pregnancy loss, RPL)

Χαρακτηρίζεται από 2 ή περισσότερες αποβολές πριν το πέρας των 24 εβδομάδων και αφορά το 1-5% των γυναικών (13). Τα αίτια των αποβολών αφορούν είτε τη μητέρα όπως η ηλικία, η ύπαρξη αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, οι ανωμαλίες στη μήτρα, τα ινομυώματα, ανωμαλίες στο ενδοκρινικό σύστημα, είτε το έμβρυο με την κύρια αιτία κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία. Το 50% των περιπτώσεων αυτών αποτελεί ανεξήγητες αποβολές (5)(21). Ως θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους λόγω των αντιπηκτικών της ιδιοτήτων. Ίσως ρυθμίζει κάποιες διαδικασίες στο σημείο επαφής μητέρας εμβρύου όπως ανορρυθμιστικές διαδικασίες που θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν την

προφλεγμονώδη απάντηση που εμπλέκεται στην παθογένεια των RPLs (4)(26).

A.1.5 Ανοσορρυθμιστικές Θεραπείες

Με σκοπό τη θετική μεταρρύθμιση του ανοσιακού συστήματος της μητέρας ή την ελαχιστοποίηση μιας επιβλαβούς ανοσιακής απάντησης γίνεται χρήση ανοσορρυθμιστικών φαρμάκων όπως γλυκοκορτικοειδή (Prednisolone) στις καθ'εξιν αποβολές για τη μείωση των uNKs, ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη και αντι-TNFα φάρμακα. Μεγάλος είναι ο αριθμός των λευκοκυττάρων που απαρτίζουν το ανθρώπινο ενδομήτριο και είναι διαφορετικά κατανεμημένα σύμφωνα με τα διάφορα στάδια του εμμήνου κύκλου. Γι αυτό το λόγο και για όσα αναφέραμε παραπάνω οι θεραπείες αυτές μπορεί να αποδεικνύονται ιδιαίτερα χρήσιμες και απαραίτητες σε γυναίκες με προβλήματα γονιμότητας ή προβλήματα κατά την περίοδο της κύησης (21).

A.2 Κυτταρικοί πληθυσμοί του ανοσιακού συστήματος άμεσα συσχετιζόμενοι με την κύηση.

A.2.1 Φυσικά Κυτταροκτόνα Κύτταρα (natural killer cells, NKs)

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα βρίσκονται στον μυελό των οστών, το συκώτι, τον σπλήνα, τη μήτρα, τους πνεύμονες, τα δευτερογενή λεμφοκυτταρικά όργανα και τον θύμο. Προέρχονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα HSCs (hematopoietic stem cells) μέσω της διαδικασίας έκφρασης διαφόρων επιφανειακών δεικτών και υποδοχέων (21). Τα NKs είναι υποσύνολο μεγάλων κοκκιωδών λεμφοκυττάρων και αποτελούν το 15% των κυκλοφορόντων λεμφοκυττάρων. Αποτελούν κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα της φυσικής ανοσίας. Παρέχουν μια άμεση μη ειδική προστασία έναντι κυττάρων μολυσμένων από ιούς και καρκινικών κυττάρων και αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές του ανοσιακού εκκρίνοντας μεταξύ άλλων κυτταροκινών ιντερφερόνη γ και TNFα και επάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις (1)(21)(27).

Στο περιφερικό αίμα συναντώνται δυο κύριες κατηγορίες NK κυττάρων: τα pNKs με φαινότυπο $CD16^+CD56^{dim (low)}$ τα οποία είναι κυτταροτοξικά έναντι όγκων και κυττάρων μολυσμένων από ιούς και σε μικρότερο ποσοστό τα pNKs με φαινότυπο $CD16^-CD56^{bright (high)}$ τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες και ο ρόλος τους είναι ρυθμιστικός. Επίσης συναντάται και ένας πληθυσμός $CD3^+CD16^-CD56^{dim}$ ο οποίος χαρακτηρίζεται ως NK-T κύτταρα (1)(5)(16).

Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα της μήτρας (uterine Natural Killers, uNKs)

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα της μήτρας και συνεπώς και του ενδομητρίου αποκαλούνται uNKs (uterine NKs) ή dNKs (decidual NKs). Αποτελούν τον μεγαλύτερο σε ποσοστό πληθυσμό και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης, στα αρχικά στάδια δημιουργίας του πλακούντα και βρίσκονται τοποθετημένα κυρίως γειτονικά με τροφοβλαστικά κύτταρα. Πρόκειται για κύτταρα ανώριμα των οποίων το ποσοστό υπολογίζεται περί το 5% κατά τα αρχικά στάδια της κύησης αλλά στα μετέπειτα στάδια ανέρχεται στο 50-70% (14)(16). Συμβάλλουν στην αγγειογένεση (εκφράζοντας VEGF και αγγειοποιητίνη 1,2), τη μετανάστευση κυττάρων τροφοδοτούν την τροφοβλάστη με αίμα και έχουν σημαντική συμμετοχή στην ανοσιακή ανοχή. Στη μήτρα ο σχηματισμός και η ωρίμανση των uNKs συνάδει με αυτή των άλλων ιστών και συμμετέχουν στο σχηματισμό των δομικών αλλαγών που προκύπτουν στο σημείο που έρχεται σε επαφή μητέρα και έμβρυο (1)(14)(21).

Στο ενδομήτριο ως uNKs χαρακτηρίζονται τα κύτταρα που είναι $CD3^-CD16^-CD56^{bright (high)}$. Τα uNKs είναι λιγότερο κυτταροτοξικά από τα pNKs της περιφέρειας, δηλαδή δεν επιτίθενται σε τροφοβλαστικά κύτταρα παρά μόνο είναι τοξικά προς κάποιες συγκεκριμένες καρκινικές σειρές. Στο ενδομήτριο είναι ελάχιστα τα NK-T και τα pNKs κύτταρα που συναντώνται με τα τελευταία να αυξάνονται στις παθολογικές περιπτώσεις και άρα να είναι δυνητικά τοξικά (16)(21)(28).

Στην κύηση έχουν βρεθεί 450 συσχετιζόμενα με τα $CD56^+$ γονίδια που έχουν διαφορετική έκφραση σε σχέση με τη μη κύηση. Φυσιολογικά αυξάνονται όσο προχωράει ο κύκλος με μελέτες να υποστηρίζουν πως οι ορμόνες του φύλου όπως η προγεστερόνη συμμετέχουν στη μετανάστευση των NKs στο ενδομήτριο

Κατά τις καθ'εξιν αποβολές έχουν παρατηρηθεί αυξήσεις στα pNKs, στα B κύτταρα και στα CD4 και στα CD8 T κύτταρα. Στις περιπτώσεις αποτυχίας εμφύτευσης και αναπαραγωγής έχουν παρατηρηθεί αυξημένα τα uNKs τα οποία όμως έχουν μειωμένη κυτταρολυτική ικανότητα και μειωμένα τα NK-T κύτταρα και τα CD8. Ακόμη υπάρχει εξάπλωση των uNKs στις παθολογικές περιπτώσεις και πιθανολογείται να μετατρέπονται σε περισσότερο τοξικά (16)(29). Έρευνα έχει δείξει πως η σωστή λειτουργία των uNKs διασφαλίζει μια υγιή κύηση όμως μειώνοντας τον αριθμό των uNKs έχει ως αποτέλεσμα αποτυχία κύησης (14)(21)(28).

Σε περιπτώσεις προεκλαμψίας ,επαναλαμβανόμενης αποτυχίας εμφύτευσης και καθέξιν αποβολών έχει βρεθεί ο αριθμός των uNKs να είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τις φυσιολογικές κυήσεις έχοντας αυξημένα επίπεδα IL12, IL-18 κυτταροκινών (21). Άλλες κυτταροκίνες που εκφράζουν τα uNKs αποτελούν οι IL-2 αλλά και η IL-15.

Όσον αφορά το περιφερικό αίμα στις περισσότερες έρευνες δεν έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε στα CD56^{dim} ούτε στα CD56^{bright} ή στα NK-T κύτταρα ανάμεσα σε εγκύους και μη (30).

A.2.2 B λεμφοκύτταρα (B cells)

Τα B λεμφοκύτταρα αποτελούν μέρος της επίκτητης ανοσίας και συγκεκριμένα της χυμικής ανοσίας καθώς είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα και προσδένονται σε αντιγόνα ξένων παθογόνων με σκοπό την εξουδετέρωσή του. Τα B κύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στον μυελό των οστών είτε στην πλειοψηφία τους σε πλασματοκύτταρα είτε ένα μικρό ποσοστό σε B κύτταρα μνήμης. Τα πλασματοκύτταρα ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα τους BCR (B cell receptor) και είναι αυτά που παράγουν αντισώματα, τα οποία ενισχύουν σημαντικά τις έμφυτες ανοσολογικές απαντήσεις. Τα κύτταρα μνήμης είναι αδρανή αλλά πολλαπλασιάζονται στην περίπτωση που το άτομο επανεκτεθεί σε ένα αντιγόνο έτσι ώστε να υπάρξει ταχύτερη και πιο άμεση παραγωγή αντισωμάτων. Κατά την κύηση τα αντισώματα της μητέρας είναι η μόνη προστασία του νεογνού ακριβώς μετά τη γέννα (1).

Έρευνα σε σχέση με την κύηση έχει δείξει ότι τα μη τοξικά αντισώματα τα οποία παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα της μητέρας ενάντια στα πατρικά αντιγόνα υπάρχουν σε κάθε γυναίκα που διανύει μια φυσιολογική εγκυμοσύνη, κάτι που απουσιάζει σε γυναίκες με καθέξιν αποβολές (31).

Η κύηση έχει επίσης συσχετιστεί με αλλαγές στους υποπληθυσμούς των Β κυττάρων και κυρίως των πλασματοκυττάρων τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των IgM ανοσοσφαιρινών , οι οποίες παίζουν σημαντικό προστατευτικό ρόλο για το έμβρυο μετά την κύηση και τη γέννα (31)(32)(33)(34).

Τα Β κύτταρα μειώνονται φυσιολογικά κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μια Β λεμφοπενία λόγω αυξημένων επιπέδων οιστρογόνων. Αυτή η πτώση αποδίδεται και στην μετανάστευση κυττάρων η οποία συμβαίνει έντονα κατά τις τελευταίες εβδομάδες της κύησης . Η λειτουργία των Β κυττάρων μειώνεται κατά την πρόοδο της εγκυμοσύνης. Όσο αυτή προχωρά χάνουν την ταχύτητα ανταπόκρισής τους σε μιτογόνα και λοιμογόνους παράγοντες (1).

Β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα

Τα Β ρυθμιστικά κύτταρα (B regulatory cells, Bregs) έχουν μελετηθεί κυρίως στην αυτοανοσία , στον καρκίνο και στις μεταμοσχεύσεις λόγω του σημαντικού τους ρόλου στην ανοσοκαταστολή. Μελέτες έχουν δείξει τον πιθανό ρόλο τους στην κύηση κυρίως λόγω της παραγωγής από αυτά της ιντερλευκίνης IL-10 (αντιφλεγμονώδης δράση). Ορμόνες της κύησης προκαλούν την εξάπλωση των Bregs, τα οποία προάγουν και την διατήρηση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων, και τη δημιουργία πλασματοκυττάρων τα οποία παράγουν προστατευτικά για την εγκυμοσύνη αντισώματα. Στην περίπτωση αυθορμητών αποβολών έχει παρατηρηθεί μείωση των Bregs και γενικά των Β κυττάρων (35).

A.2.3 T λεμφοκύτταρα (T cells)

Τα T λεμφοκύτταρα αποτελούν μέρος της επίκτητης ανοσίας και συγκεκριμένα της κυτταρικής ανοσίας. Ο ρόλος τους είναι να προσδένονται στα κύτταρα στόχους τους με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους που ονομάζονται TCR υποδοχείς (T cell receptors) και να προκαλούν την καταστροφή τους. Κατά την διαδικασία ωρίμανσης και διαφοροποίησής τους τα ανώριμα T κύτταρα μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών στο θύμο αδένα όπου και ωριμάζουν αρχικά με την αναδιάταξη του υποδοχέα TCR και μέσω θετικής και αρνητικής επιλογής ώστε να αποκτήσουν ανοχή στα διαφορετικά εαυτά αντιγόνα (36). Ορισμένα T κύτταρα έπειτα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και εγκαθίσταται στους διάφορους ιστούς όπου και όταν υπάρχει διέγερση της ανοσιακής απάντησης πολλαπλασιάζονται και δημιουργούνται νέα T κύτταρα. Στην κύηση τα T κύτταρα αποτελούν ένα ποσοστό 3-10% με κύρια υποσύνολα με σημαντικό ρόλο τα T βοηθητικά, τα κυτταροτοξικά T κύτταρα, τα T ρυθμιστικά και τα διπλά αρνητικά T κύτταρα (17). Ακόμη υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν μείωση στο συνολικό αριθμό των T κυττάρων κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης σε σχέση με πριν (31).

T ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory cells, Tregs)

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα έχουν φαινότυπο $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ καθώς επίσης χαρακτηριστική είναι η έκφραση από αυτά του παράγοντα FOXP3. Αποτελούν υποσύνολο των $CD4^+$ T βοηθητικών κυττάρων της επίκτητης ανοσίας με βασικό ρόλο τον περιορισμό των ανοσολογικών αντιδράσεων, την αναστολή αυτοδραστικών κλώνων, την αποφυγή αυτοάνοσων απαντήσεων και την αποφυγή απόρριψης των μοσχευμάτων στις μεταμοσχεύσεις (1)(17). Καταστέλλουν την παραγωγή ποικίλων κυτταροκινών από τα $CD4^+$ και $CD8^+$ κύτταρα, ανοσοσφαιρινών από τα B κύτταρα, καταστέλλεται η κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων καθώς καταστολή επέρχεται και στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (37). Στην εγκυμοσύνη τα Tregs εξαπλώνονται στην περιοχή του φθαρτού όπου και φυσιολογικά αναστέλλεται η ανάπτυξη των κυτταροτοξικών $CD8^+$ T κυττάρων και επιτελούν τον έλεγχο στο σημείο της εμφύτευσης όπου προκαλείται φλεγμονή και συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη της ανοσιακής ανοχής της μητέρας προς το αναπτυσσόμενο έμβρυο κυρίως στα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης (38)(39). Τα Tregs συνήθως

απουσιάζουν από τον ιστό του ενδομητρίου στις περιπτώσεις μη κύησης. Πρόκειται για κύτταρα αντιγονοειδικά σε συγκεκριμένα πατρικά αντιγόνα και με χαρακτηριστικά μνήμης (17)(25)(40).

Τα Tregs είναι τα πιο ευρέως μελετημένα κατασταλτικά κύτταρα στην αποτυχία αναπαραγωγής και στην ανοσιακή ανοχή που σχετίζεται με αυτή. Ρυθμίζουν την απόρριψη του εμβρύου από τα μητρικά κύτταρα του ανοσιακού και καταστέλλουν τη φλεγμονή στη μήτρα κατά την εμφύτευση (1)(13). Ακόμη σχετίζονται άμεσα με τις ορμόνες της κύησης και συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων προκαλούν την ανάπτυξη και αύξηση των CD4⁺ Tregs (13).

Στις παθολογικές περιπτώσεις όπως στις καθέξιν αποβολές παρατηρείται μείωση των T ρυθμιστικών κυττάρων σε σχέση με κοντρόλ τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο ενδομήτριο. Σε ζωικά μοντέλα υπήρξε αποβολή του εμβρύου λόγω έλλειψης CD4⁺CD25⁺ Tregs που οδήγησε στην εξάπλωση CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων. Τα Tregs διέπονται από μια πλαστικότητα και σε ορισμένες συνθήκες μπορούν να μετατραπούν σε T βοηθητικά ή T κυτταροτοξικά κύτταρα και έτσι σχετίζονται άμεσα με τις αποβολές (1)(13)(14).

T βοηθητικά κύτταρα και Th17

Τα T βοηθητικά κύτταρα ή αλλιώς CD4⁺ T κύτταρα είναι από τα πιο σημαντικά κύτταρα της επίκτητης ανοσίας καθώς είναι αυτά που ενεργοποιούν άλλα κύτταρα του ανοσιακού όπως τα CD8⁺ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αλλά και τα B λεμφοκύτταρα με σκοπό την επιτυχή αντιμετώπιση ενός αντιγόνου ή κάποιου παθογόνου. Όσον αφορά την κατάσταση της κύησης, μια συγκεκριμένη υποομάδα των βοηθητικών κυττάρων είναι αυτή που πρωταγωνιστεί. Αυτά είναι τα Th17 (T helper 17) κύτταρα και συμβάλλουν στην ανοσιακή απάντηση έναντι εξωκυττάρων βακτηρίων και μυκήτων, προωθούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και όπως παραπέμπει και η ονομασία τους είναι τα κύτταρα που ως κύρια κυτταροκίνη παράγουν την ιντερλευκίνη 17 (IL-17) (17)(41).

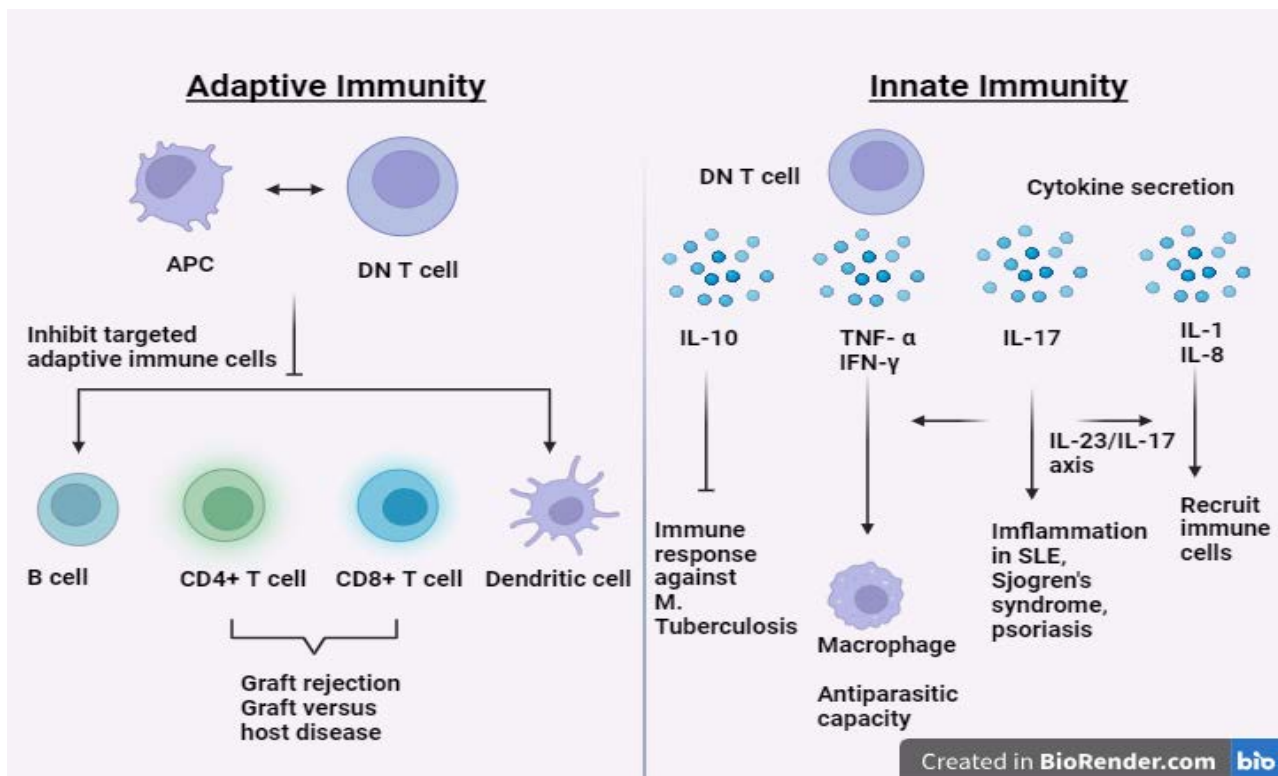
Η αύξηση στον αριθμό των CD4⁺ κυττάρων, στα T ρυθμιστικά κύτταρα αλλά και στα Th17 προβλέπει μια «εχθρική μήτρα» και αποτελεί ένα σημάδι πρόγνωσης για καθέξιν αποβολές οι οποίες βέβαια θα μπορούσαν να προκύψουν και από την αδυναμία του ανοσιακού της

μητέρας να αποκτήσει ανοχή έναντι του εμβρύου (4)(16). Αυξημένη IL-17 βρέθηκε στον ορό γυναικών με ανεξήγητη υπογονιμότητα καθώς έχει υπάρξει σε έρευνες και συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των Th17 κυττάρων με καθέξιν αποβολές και σε δείγματα περιφερικού αίματος και ενδομητρίου. Φυσιολογικά έχει βρεθεί 60% μείωση των CD3⁺CD8⁻IL17⁺ κυττάρων στις εγκύους ανάμεσα στο πρώτο και το δεύτερο τρίμηνο της κύησης (42).

A.2.4 Διπλά Αρνητικά Τ λεμφοκύτταρα (Double Negative T cells, DNTs)

Σπάνιο πληθυσμό των Τ λεμφοκυττάρων αποτελούν τα διπλά αρνητικά Τ κύτταρα (DN T cells) ή αλλιώς φυσικοί καταστολείς (natural suppressors, NS) (36). Εμφανίζονται σε μικρή συχνότητα στο περιφερικό αίμα και μπορούν να διεισδύσουν σε διάφορους ιστούς και να παρατηρηθούν εκτός από την περιφέρεια σε όργανα όπως στους νεφρούς, τους πνεύμονες, το ήπαρ, το στομάχι, τη γεννητική οδό. Τα περισσότερα από κύτταρα αυτά εκφράζουν στον ετεροδιμερή TCR υποδοχέα τους τις α και β αλυσίδες δηλαδή ο φαινότυπός τους είναι TCRα/β αλλά ένα μικρό ποσοστό εκφράζει τις γ και δ αλυσίδες, με φαινότυπο TCRγ/δ αντίστοιχα. Όμως τα διπλά αρνητικά Τ κύτταρα δεν εκφράζουν τους συνυποδοχείς CD4 και CD8 και χαρακτηρίζονται από έναν γενικότερο φαινότυπο CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (43).

Αρχικά τα διπλά αρνητικά Τ κύτταρα συσχετίστηκαν με την επαγωγή της ανοσιακής ανοχής και τις ανοσορρυθμιστικές τους ικανότητες έναντι της αποτροπής ασθενειών (13)(44). Συγκεκριμένα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία λόγω της αδρανοποίησης που προκαλούν σε διάφορα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος και συγκεκριμένα καταστέλλοντας τα ενεργοποιημένα CD4⁺ και CD8⁺, τα Β κύτταρα και τα δενδριτικά (43), στις ανοσιακές απαντήσεις μέσω της έμφυτης ανοσίας με την έκφραση από αυτά πληθώρας κυτταροκινών, στην ανοσιακή παρακολούθηση, την ομοιόσταση αλλά και στην επαγωγή και ίσως θεραπεία των αυτοάνοσων ασθενειών (43)(44). Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια λόγω της διττής φύσης τους καθώς και από προστατευτική και παθολογική δράση (44)(45).



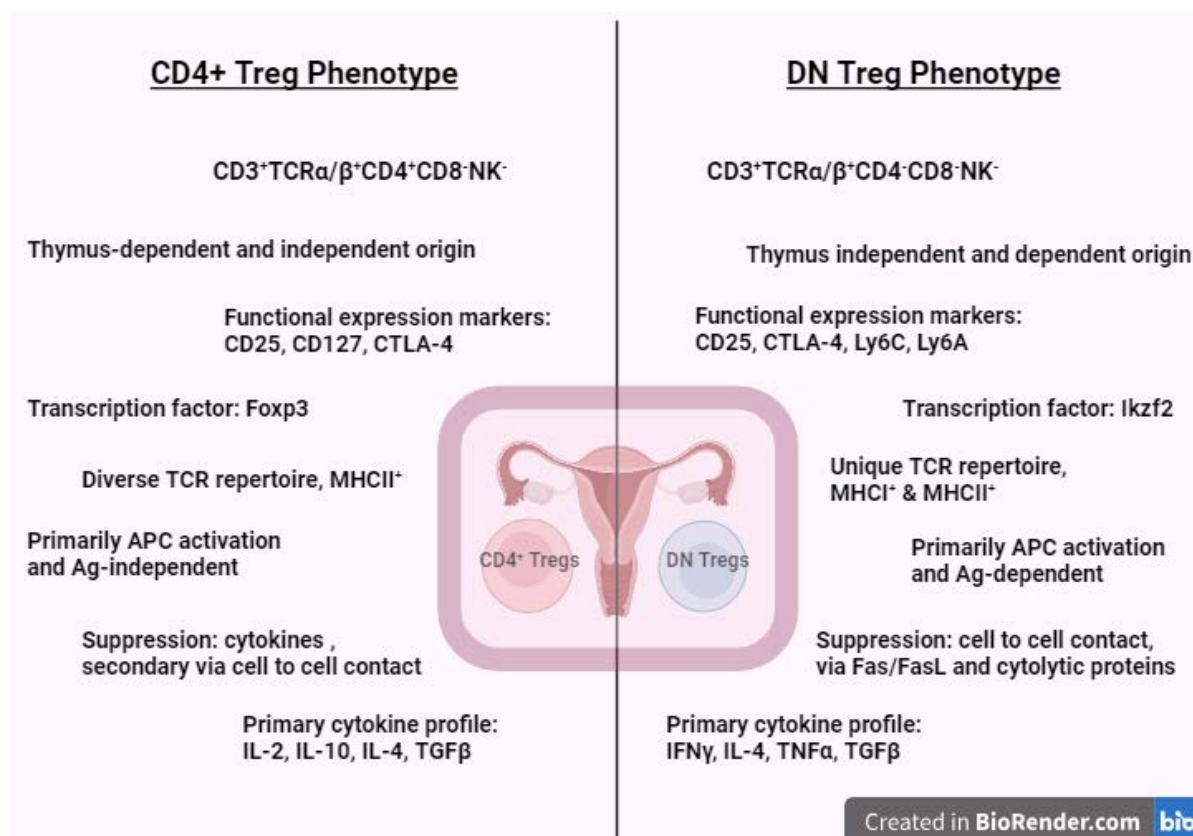
Εικόνα 4: Ο ρόλος των διπλά αρνητικών T κυττάρων τόσο στην επίκτητη όσο και στην έμφυτη ανοσία (Biorender.com).

Παρατηρούνται κυρίως 2 κατηγορίες DN T κυττάρων: αυτά που παρομοιάζονται με τα T βοηθητικά (T helper like DN T κύτταρα) και τα DN ρυθμιστικά κύτταρα (DN Tregs). Τα πρώτα είναι αυτά που έχουν συσχετιστεί κυρίως με την ανοσία ενώ τα δεύτερα παρέχουν προστασία έναντι της φλεγμονής ή προαγωγή αυτής, προστασία έναντι ιικών λοιμώξεων αλλά και προαγωγή αυτοανοσίας (43).

Η πλειονότητα των T κυττάρων είναι TCRα/β κύτταρα σε ένα 95% με ρόλο στην επίκτητη ανοσία και TCRγ/δ σε ένα ποσοστό 5% με ρόλο και στην επίκτητη και την έμφυτη ανοσία. Αποτελούν ένα ποσοστό 3-5% των T λεμφοκυττάρων του αίματος και τα DN TCRα/β ένα ποσοστό 1-3% των CD3⁺ του περιφερικού (36)(46)(47). Περισσότερα από 70% των γ/δ T κυττάρων είναι διπλά αρνητικά με τα TCR γ/δ να έχουν καίριο ανοσορυθμιστικό ρόλο(48)

Τα Thelper like διπλά αρνητικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως IL-4, IL-17, IFN-γ, TNF-α με παρόμοιο ρόλο με τα CD4+ βοηθητικά κύτταρα. Τα DN Tregs εκκρίνουν IFN-γ, περφορίνη και γρανένζυμο B και έχουν έναν

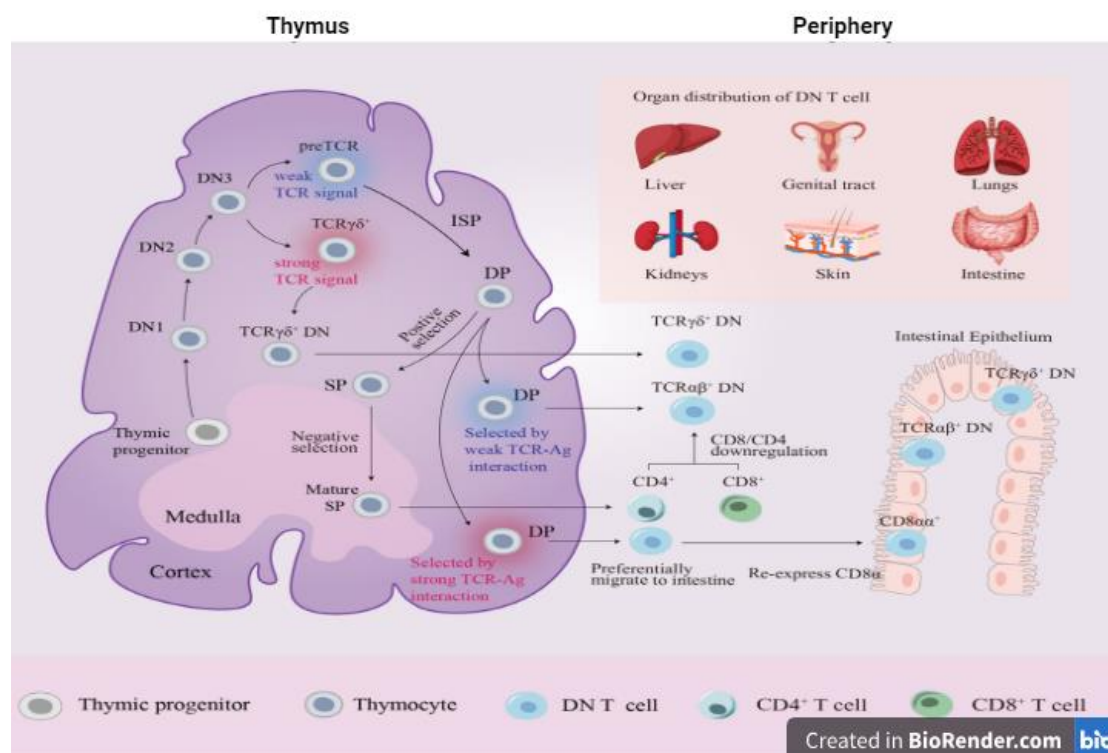
κυτταροτοξικό ρόλο έναντι αιματολογικών κακοηθειών και έναντι όγκων (49). Στις περιπτώσεις αιματολογικών κακοηθειών και ιδιαίτερα στις λευχαιμίες τα διπλά αρνητικά T ρυθμιστικά (DN Tregs) είναι περισσότερο κυτταροτοξικά σε σχέση με τα CD8⁺ και τα NK κύτταρα γι αυτό και έχει γίνει η χρήση τους ως θεραπεία σε λεμφώματα αλλά κυρίως στην οξεία μυελογενή λευχαιμία σε συνδυασμό πάντοτε με την χημειοθεραπεία (45)(50).



Εικόνα 5: Σύγκριση μεταξύ των ιδιοτήτων των CD4⁺ T ρυθμιστικών κυττάρων και των διπλά αρνητικών T ρυθμιστικών κυττάρων στο αναπαραγωγικό σύστημα (Biorender.com).

Τα διπλά αρνητικά T κύτταρα προέρχονται είτε από τον θύμο αδένά είτε εξωθυμικά από την περιφέρεια. Στην πρώτη περίπτωση προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών τα οποία μεταναστεύουν στο θύμο και έπειτα δεν γίνεται έκφραση ούτε του συνυποδοχέα CD4 ούτε του CD8. Έπειτα μπορούν να δραπετεύσουν από την αρνητική επιλογή και να εισέλθουν στην κυκλοφορία. Στην δεύτερη περίπτωση,

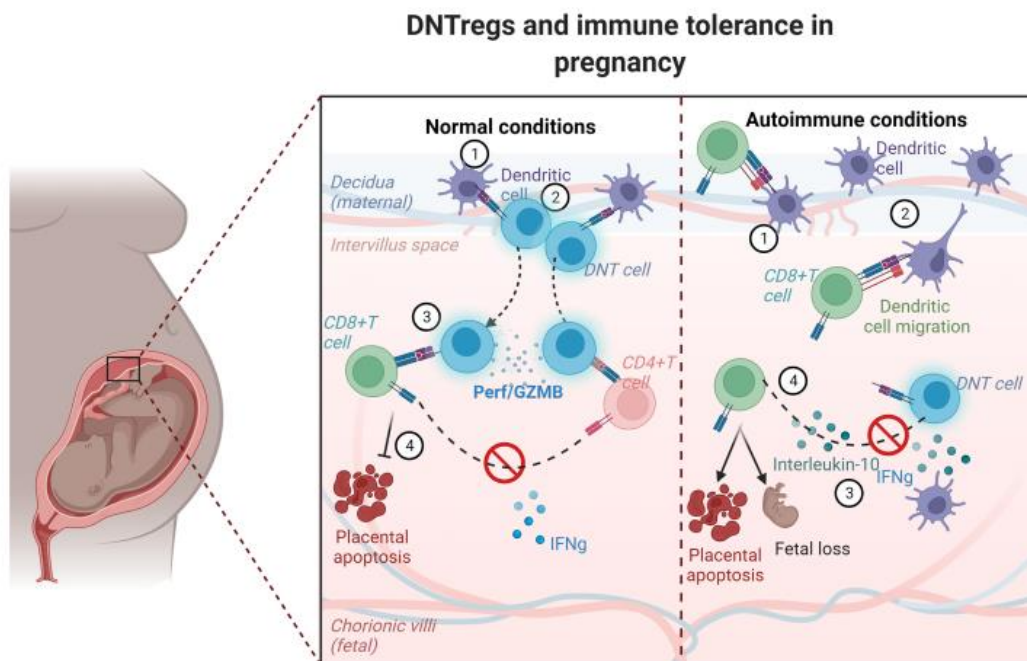
μπορεί να προκύψουν από ενεργοποιημένα $CD4^+$ και $CD8^+$ κύτταρα δεχόμενα ειδικά σήματα, μια διαδικασία η οποία παρατίθεται και στην εικόνα (44).



Εικόνα 6: Η προέλευση των διπλά αρνητικών T κυττάρων από τον θύμο αδένά και εξωθυμικά και η κατανομή τους στα διάφορα όργανα (Biorender.com).

Τα διπλά αρνητικά T κύτταρα έχειδειχθεί ότι εκφράζουν έναν φαινότυπο μνήμης με την έκφραση του μορίου CD45RO από τα $CD4^+$ κύτταρα τα οποία χωρίς την παρουσία των διπλών αρνητικών κυττάρων είναι $CD45RO^-$ (13) (43).

Ακόμη τα DN Tregs συγκεκριμένα συνεισφέρουν στην ανοσιακή ανοχή του ενδομητρίου έτσι ώστε να γίνει η επιτυχής εμφύτευση του εμβρύου και να κυλήσει ομαλά η κύηση κάτι που παρουσιάζεται στην εικόνα 7 παρακάτω. Διπλά αρνητικά T κύτταρα έχουν παρατηρηθεί στο περιφερικό αίμα και στο ενδομήτριο γυναικών και κατά την διάρκεια της περιόδου της κύησης και σε περίοδο μη κύησης (13).



Εικόνα 7: Ο ρόλος των διπλά αρνητικών T ρυθμιστικών κυττάρων στην ανοσιακή ανοχή κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης.

Επιπλέον έχει περιγραφεί συσχέτιση με ποικίλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως το Αυτοάνοσο Λεμφοπολλαπλασιαστικό Σύνδρομο (ALPS), τον Συστηματικό Ερυθματώδη Λύκο (SLE), τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα, το Διαβήτη τύπου 1 και το Σύνδρομο Sjögren. Μάλιστα σε ασθενείς με SLE έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα TCRα/β⁺DNTs στο περιφερικό αίμα η οποία σχετίζεται με φλεγμονή και βλάβη σε ιστούς. Ο ρόλος των αβDN T cells και των γδDN T cells στα διάφορα νοσήματα που αναφέρθηκαν παρατίθεται στον πίνακα 1.

Τέλος σημαντική είναι η συμβολή τους σε φλεγμονώδεις νόσους, στη μεταμόσχευση, στην απόκριση σε ιούς και βακτήρια αλλά και στον καρκίνο (43)(46)(51).

DISEASE	AETIOLOGICAL AGENT	DN T CELL	ROLE OF DN T CELLS
Systemic lupus erythematosus	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory
Rheumatoid arthritis	Autoimmune	$\gamma\delta$ DN T cells	Inflammatory
Sjögren's syndrome	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory
Psoriasis	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory
Hepatitis B	Hepatitis B virus	$\gamma\delta$ DN T cells	Regulatory
Leishmaniasis	Leishmania sp.	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory NKT cells
Chagas disease	Trypanosoma cruzi	NKT cells & $\gamma\delta$ DN T cells	Inflammatory
Graft against host	Graft	$\alpha\beta$ DN T cells	Regulatory
Type 1 diabetes	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells & iNKT cells	Anti-inflammatory
Cancer	-	$\alpha\beta$ DN T cells & $\gamma\delta$ DN T cells	Anti-tumour
Flu	Influenza A virus	$\alpha\beta$ DN T cells & NKT cells	Cytotoxic
Tularaemia	Francisella tularensis	$\alpha\beta$ DN T cells	Cytotoxic
Tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis	$\alpha\beta$ DN T cells & $\gamma\delta$ DN T cells	Inflammatory
HIV infection	HIV	$\alpha\beta$ DN T cells	Regulatory
Pneumonia	Influenza A virus and bacteria	NKT cells & $\gamma\delta$ DN T cells	Inflammatory
Leishmaniasis	Leishmania sp.	$\gamma\delta$ DN T cells	Regulatory
Malaria	Plasmodium falciparum	$\gamma\delta$ DN T cells	Inflammatory
Acanthamoebiasis	Acanthamoeba sp.	$\alpha\beta$ DN T cells	Regulatory
Chagas disease	Trypanosoma eruzi	$\alpha\beta$ DN T cells & $\gamma\delta$ DN T cells	Regulatory & Anti-inflammatory

Πίνακας 1: Τύποι διπλά αρνητικών κυττάρων στις διάφορες αυτοάνοσες και μη διαταραχές και ο ρόλος τους σε αυτές.

A.3 Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό τον ποσοτικό και ποιοτικό χαρακτηρισμό των διαφορετικών λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών του ανοσιακού συστήματος του περιφερικού αίματος και συγκεκριμένα των διπλών αρνητικών T κυττάρων και τη συσχέτισή τους με δείγματα ενδομητρίου τόσο σε γυναίκες χωρίς προβλήματα γονιμότητας όσο και σε γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές και ανεξήγητη υπογονιμότητα. Ο χαρακτηρισμός αυτός θα αποσαφηνίσει πιθανές διαταραχές στο ανοσιακό σύστημα στο περιφερικό αίμα στις παραπάνω περιπτώσεις και τους μηχανισμούς που συνοδεύουν αυτές και θα

μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη ή εφαρμογή στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

B.Ειδικό Μέρος

Η παρακάτω ανάλυση αφορά τις εργαστηριακές τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν κατά την περίοδο διεξαγωγής του πειράματος οι οποίες έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα τέθηκε σε εφαρμογή από τις αρχές του 2023 και επομένως τα πειράματα και τα αποτελέσματα αυτών αφορούν το χρονικό διάστημα από τον Ιανουάριο του 2023 έως τον Δεκέμβριο του ίδιου έτους.

Η παρούσα μελέτη έχει λάβει έγκριση από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας με αριθμό πρωτοκόλλου 11718 και από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με αριθμό πρωτοκόλλου 375 . Οι συμμετέχοντες της έρευνας ενημερώθηκαν πλήρως για τους σκοπούς της μελέτης και προσκόμισαν την απαραίτητη ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους.

B.1 Δείγματα που μελετήθηκαν

Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του πειράματος προήλθαν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους από την Γυναικολογική και Μαιευτική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας αλλά και από την κλινική Υγεία στην Αθήνα. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 9 δείγματα γυναικών με προβλήματα γονιμότητας και 14 δείγματα φυσιολογικών γυναικών χωρίς προβλήματα γονιμότητας με ιστορικό φυσιολογικών κυήσεων. Τη μέση ηλικία των δειγμάτων με πρόβλημα υπογονιμότητας αποτελούν τα 27,8 έτη ενώ των φυσιολογικών δειγμάτων τα 30,3 έτη.

Τα δείγματα βιολογικού υγρού , στην περίπτωση του συγκεκριμένου πειράματος αποτελεί το περιφερικό αίμα, τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια γενικής αίματος με αντιπηκτικό και συγκεκριμένα EDTA για την αποφυγή

της πήξης τους, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και επεξεργάστηκαν την ίδια ημέρα που έγινε η λήψη τους.

B.2 Κριτήρια Έρευνας

Η έρευνα την οποία αφορά η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αφορά δείγμα γυναικών:

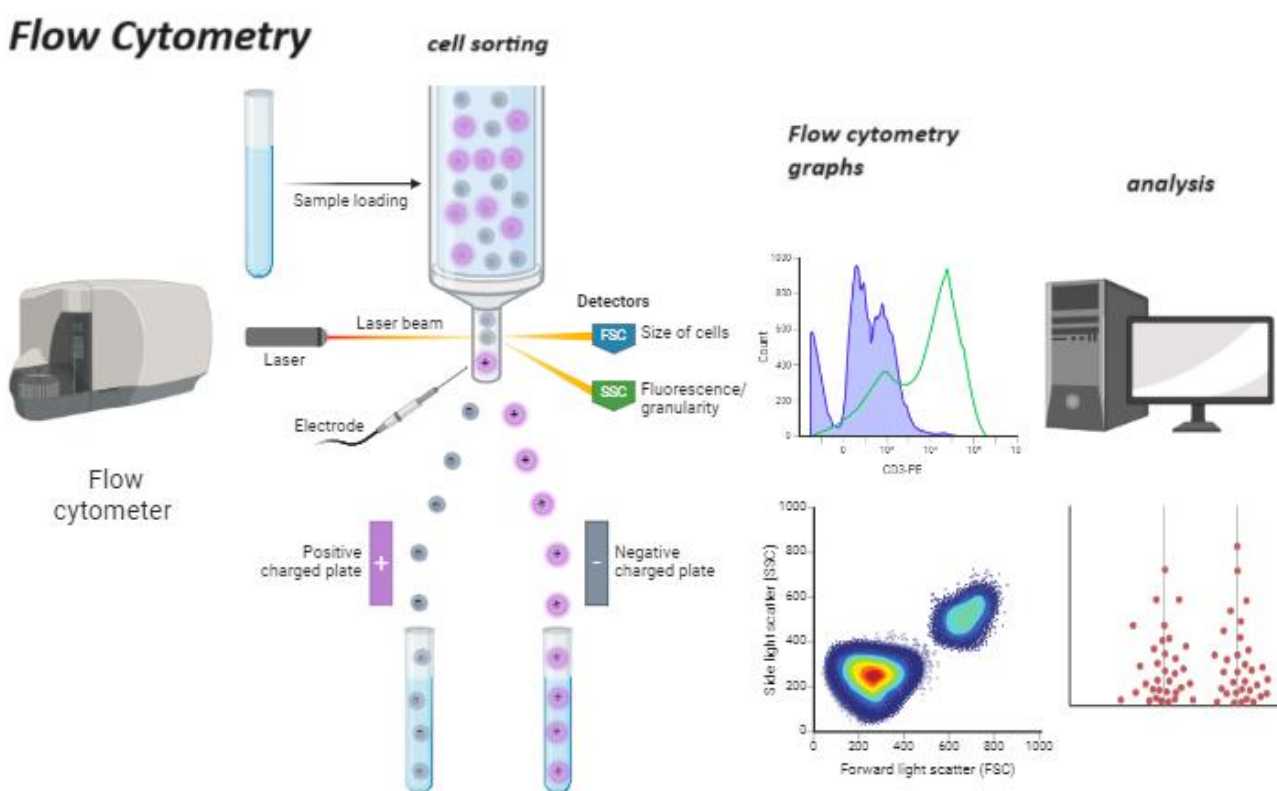
1. Αναπαραγωγικής ηλικίας 18-50 ετών
2. Με απουσία ανατομικής βλάβης σε ενδομήτριο
3. Με απουσία ορμονικών διαταραχών, καρυοτυπικών βλαβών, λοίμωξης ή ενδομητρίωσης
4. Με καθ'έξιν αποβολές (>2 αποβολές διαδοχικές ή μη 1ου τριμήνου)
5. Με αποτυχημένες εμφυτεύσεις (>1 ΑΕ)
6. Με ανεξήγητη υπογονιμότητα

B.3 Μεθοδολογία Έρευνας

B.3.1. Κυτταρομετρία Ροής

Η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρούσα διπλωματική εργασία ήταν η κυτταρομετρία ροής, μια μέθοδος η οποία βρίσκει εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών σε ποικίλους τομείς της ιατρικής όπως η ανοσολογία, η αιματολογία, η μοριακή βιολογία. Πρόκειται για μια ποσοτική και αυτοματοποιημένη μέθοδο κατά την οποία γίνεται χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, σημασμένων με φθοριοχρώματα έναντι μεμβρανικών πρωτεϊνών (αντιγόνων) έτσι ώστε η ποσότητα ενός αντιγόνου να υπολογίζεται με βάση την ένταση φθορισμού στα κύτταρα στόχους ή τα μικροσωματίδια ενός δείγματος βιολογικών υγρών, όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση περιφερικού αίματος, ή σε κύτταρα που προέρχονται από κυτταροκαλλιέργειες ή ιστούς όπως το ενδομήτριο, αλλά και σε μικροοργανισμούς. Τα μηχανήματα τα οποία χρησιμοποιούνται για την κυτταρομετρία ροής

ονομάζονται κυτταρόμετρα ή FACS και λειτουργούν ως μικροσκόπια που ανιχνεύουν ανοσοφθορισμό όντας ικανά να χαρακτηρίζουν σπάνιες κυτταρικές σειρές αλλά και κύτταρα με πολύ μικρή έκφραση ενός μεμβρανικού αντιγόνου υπό διερεύνηση. Τα κύτταρα διατάσσονται το ένα μετά το άλλο και διέρχονται με τη μορφή υγρού από μια δέσμη φωτός laser το οποίο εκπέμπει φως σε μια ζώνη μηκών κύματος . Έτσι επιτρέπεται η ταχεία και ποσοτική ανάλυση κυττάρων σε ένα ετερογενές υγρό μίγμα. Τα φωτεινότερα φθοριοχρώματα χρησιμοποιήθηκαν για τους δείκτες με τη χαμηλότερη αντιγονική πυκνότητα .



Εικόνα 8: Παρουσίαση της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής σχηματικά (Biorender.com).

Η ανάλυση των δεδομένων που εξάγονται από το κυτταρόμετρο πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές και τα αποτελέσματα έχουν τη μορφή του ιστογράμματος

δύο παραμέτρων (dot plot). Το κυτταρόμετρο ροής το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι το Cytomics FC500 Flow Cytometer της εταιρίας Beckman Coulter Life Sciences.

B.3.2. Υλικά και Πειραματική Διαδικασία

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την κυτταρομετρική μελέτη ήταν περιφερικό αίμα σε ποσότητα 2ml . Το περιφερικό αίμα επιλέχθηκε καθώς αποτελεί ένα βιολογικό υλικό το οποίο είναι εύκολο , γρήγορο και ανώδυνο να γίνει η δειγματοληψία του. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται τα έμμορφα στοιχεία του αίματος στα οποία περιέχεται πληθώρα κυττάρων του ανοσιακού συστήματος (λευκά αιμοσφαίρια) και μπορεί να γίνει η μελέτη αυτών σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή του καταμήνιου κύκλου της γυναίκας απαιτείται να γίνει η έρευνα.

Τα υλικά- αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ήταν:

- Κυτταρόμετρο ροής (Cytomics FC500 Flow Cytometer by Beckman Coulter Life Sciences)
- Αναδευτήρας-Vortex
- Βαθμονομημένες πιπέτες (2-20μl, 10-100μl, 200-1000μl)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ρύγχη πιπετών
- Στατό
- VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter)

Στον παρακάτω πίνακα 1 παρατίθενται τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, με ποιο φθοριόχρωμα ήταν αυτά συνδεδεμένα , από ποιο κλώνο παράχθηκαν και από ποια εταιρεία τα προμηθεύτηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος:

Πίνακας 2:

Antibodies	Fluorochrome	Clone		Supplier
anti-CD3	FITC	UCHT1	IgG1 mouse	Beckman Coulter
	PE	UCHT1	IgG1 mouse	Beckman Coulter
	ECD	UCHT1	IgG1 mouse	Beckman Coulter
anti-CD4	FITC	13B8.2	IgG1 mouse	Beckman Coulter
	PE	13B8.2	IgG1 mouse	Beckman Coulter
	PC5	13B8.2	IgG1 mouse	Beckman Coulter
anti-CD8	FITC	B9.11	IgG1 mouse	Beckman Coulter
	PE	B9.11	IgG1 mouse	Beckman Coulter
	PC5	B9.11	IgG1 mouse	Beckman Coulter
anti-CD19	PC5	J3-119	IgG1 mouse	Beckman Coulter
anti-CD45	PC7	J33	IgG1 mouse	Beckman Coulter
anti-CD45RO	FITC	UCHL1	IgG2a mouse	Beckman Coulter
anti-CD45RA	ECD	2H4LDH11LDB9	IgG1 mouse	Beckman Coulter
anti-TCRαβ	PC5	IP26A	IgG1 mouse	Beckman Coulter
anti-TCRγδ	FITC	IMMU510	IgG1 mouse	Beckman Coulter

Στον παρακάτω πίνακα 3 παρατίθενται τα διάφορα φθοριοχρώματα με τις ονομασίες τους και σε ποιο μήκος ακτινοβολίας αυτά εκπέμπουν και στον πίνακα 4 τι αναγνωρίζουν τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, ο οποίος ήταν και ο λόγος που επιλέχθηκε το εκάστοτε αντίσωμα .

Πίνακας 3:

Φθοριόχρωμα	Ονομασία	Εκπομπή
FITC	ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate)	525 nm
PE	φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin)	576 nm
ECD	Phycoerythrin Texas Red-X (PE-Texas Red) ή ECD	620nm
PC5	φυκοερυθρίνη-κυανίνη 5 (Phycoerythrin-Cyanin 5)	670 nm
PC7	φυκοερυθρίνη-κυανίνη 7 (PhycoerythrinCyanin 7)	767 nm

Πίνακας 4:

Antibodies	Identifies
CD3	T cells (lineage marker), part of the TCR complex
CD4	T helper lymphocytes
CD8	T cytotoxic lymphocytes
CD19	B cells (lineage marker)
CD45	All leukocytes, Leukocyte Common Antigen (LCA)
CD45RO	CD4 ⁺ memory T lymphocytes, activated lymphocytes
CD45RA	Medullar thymocytes, naïve/resting CD4 ⁺ lymphocytes
TCRαβ	T cells , chain α/β part of the TCR complex
TCRγδ	T cells , chain γ/δ part of the TCR complex

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- i. Ανάδευση (σε αναδευτήρα vortex) του υλικού αμέσως μετά την παραλαβή του
- ii. Προσθήκη σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες 30μl περιφερικού αίματος με αντίστοιχα αντισώματα :

1^{ος} δοκιμαστικός σωλήνας: αντισώματα anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8 ECD, anti-CD19 PC5, anti-CD45 PC7 .

Όπως αναφέρθηκε και στον παραπάνω πίνακα το αντίσωμα anti-CD3 χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση του πληθυσμού των T λεμφοκυττάρων καθώς προσδένεται στον TCR υποδοχέα, πιο συγκεκριμένα το αντίσωμα anti-CD4 για τον χαρακτηρισμό των T βοηθητικών κυττάρων και το anti-CD8 για τον χαρακτηρισμό των T κυτταροτοξικών κυττάρων , το αντίσωμα anti-CD19 για τον χαρακτηρισμό των B λεμφοκυττάρων και το anti-CD45 αποτελεί το κοινό λευκοκυτταρικό αντιγόνο για όλους τους πληθυσμούς των λευκοκυττάρων.

2^{ος} δοκιμαστικός σωλήνας: αντισώματα anti-TCRγδ FITC, anti-CD8 PE, anti-CD3 ECD, anti-TCRαβ PC5, anti-CD45 PC7

Το αντίσωμα anti-TCRγδ χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των Τ λεμφοκυττάρων που φέρουν στον TCR υποδοχέα τους τις αλυσίδες γ και δ και το anti-TCRαβ τις αλυσίδες α και β αντίστοιχα

3^{ος} δοκιμαστικός σωλήνας: αντισώματα anti-CD45RO FITC, anti-CD3 PE, anti-CD45RA ECD, anti-CD4 PC5/ anti-CD8 PC5, anti-CD45 PC7

Τα αντισώματα anti-CD45RO και anti-CD45RA χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί ποιοτικά εάν τα διπλά αρνητικά Τ κύτταρα τα οποία μας ενδιέφεραν, εμφάνιζαν φαινότυπο μνήμης όπως είχε περιγραφεί στη βιβλιογραφία.

- iii. Επώαση των αντισωμάτων με το βιολογικό δείγμα για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου
- iv. Προσθήκη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 1ml λυτικού διαλύματος VersaLyse Lysing Solution
- v. Επώαση για 2-3 λεπτά έως ότου δράσει το λυτικό διάλυμα
- vi. Ανάλυση του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα μέσω κυτταρομετρικής μεθόδου

Γ. Αποτελέσματα

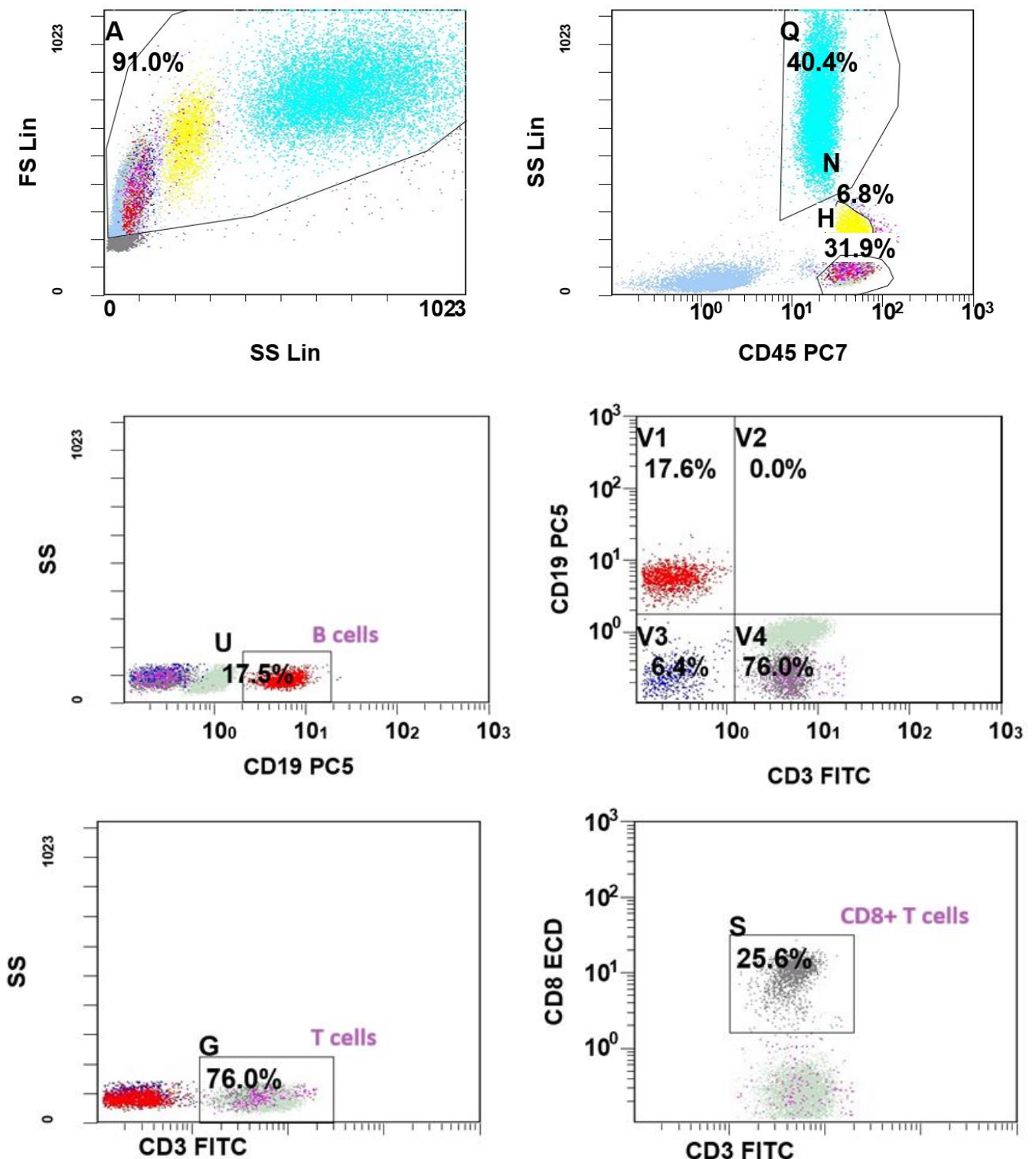
Γ.1. Κυτταρομετρική ανάλυση αποτελεσμάτων

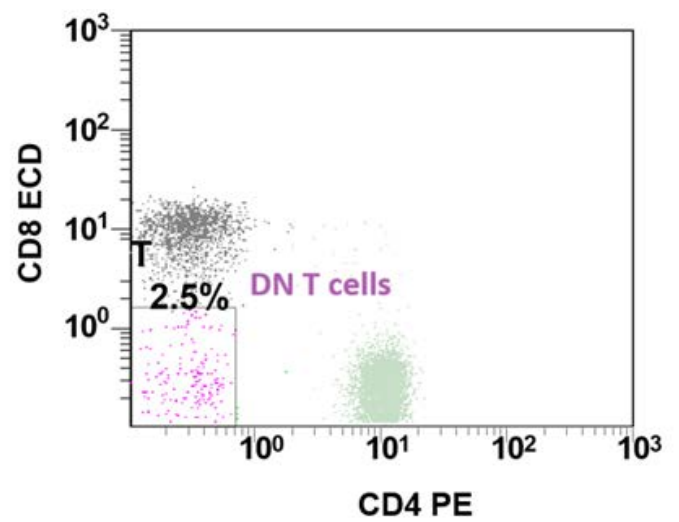
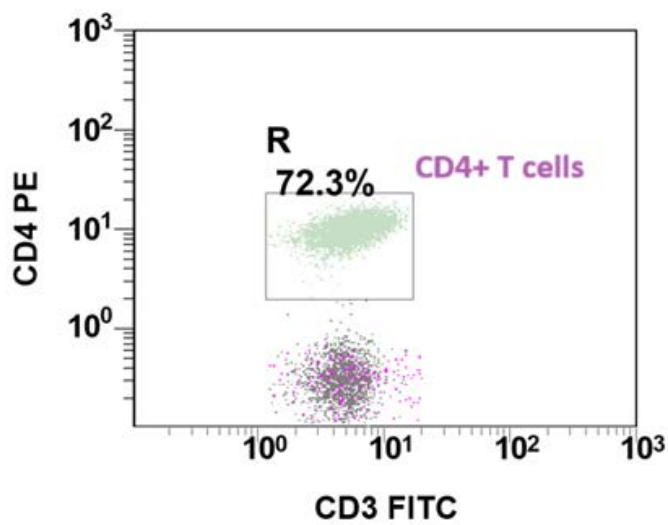
Η ανάλυση των δεδομένων που αποκτήθηκαν από τη διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού CXP Flow Cytometry Software της εταιρείας Beckman Coulter . Σε κάθε περίπτωση έγινε η διαδικασία του gating με σκοπό τον υπολογισμό του ποσοστού του εκάστοτε κυτταρικού πληθυσμού και ο υπολογισμός της μέσης τιμής κάθε πληθυσμού στην πληθώρα των δειγμάτων.

Παρακάτω παρατηρείται ενδεικτικά έπειτα από τυχαία επιλογή η απεικόνιση των διαγραμμάτων μέσω της ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής

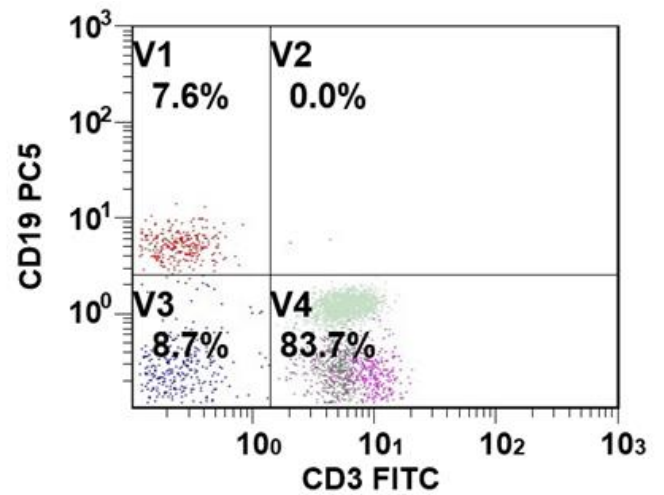
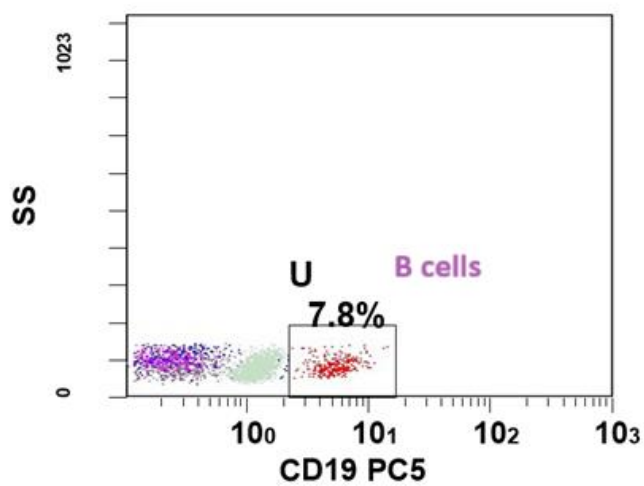
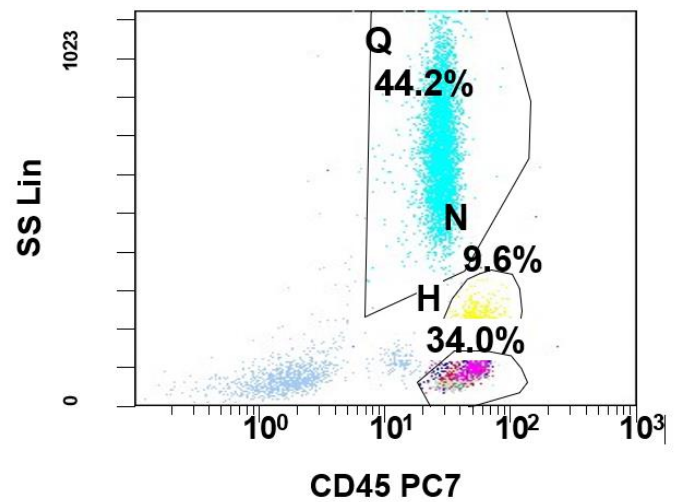
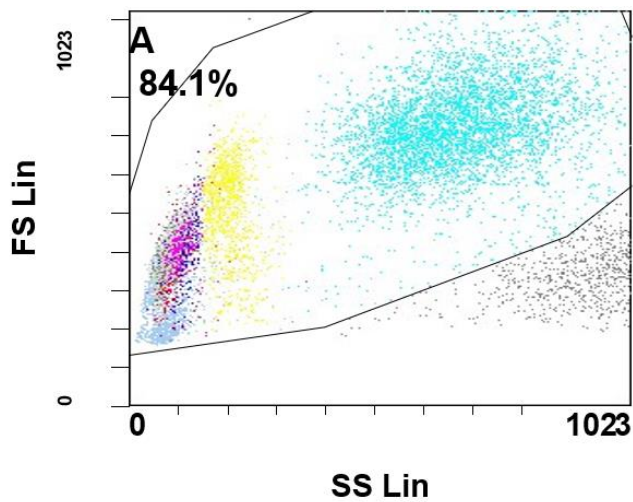
ενός φυσιολογικού δείγματος και ενός παθολογικού δείγματος
αντίστοιχα όσον αφορά τον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα για τη διάκριση
των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών :

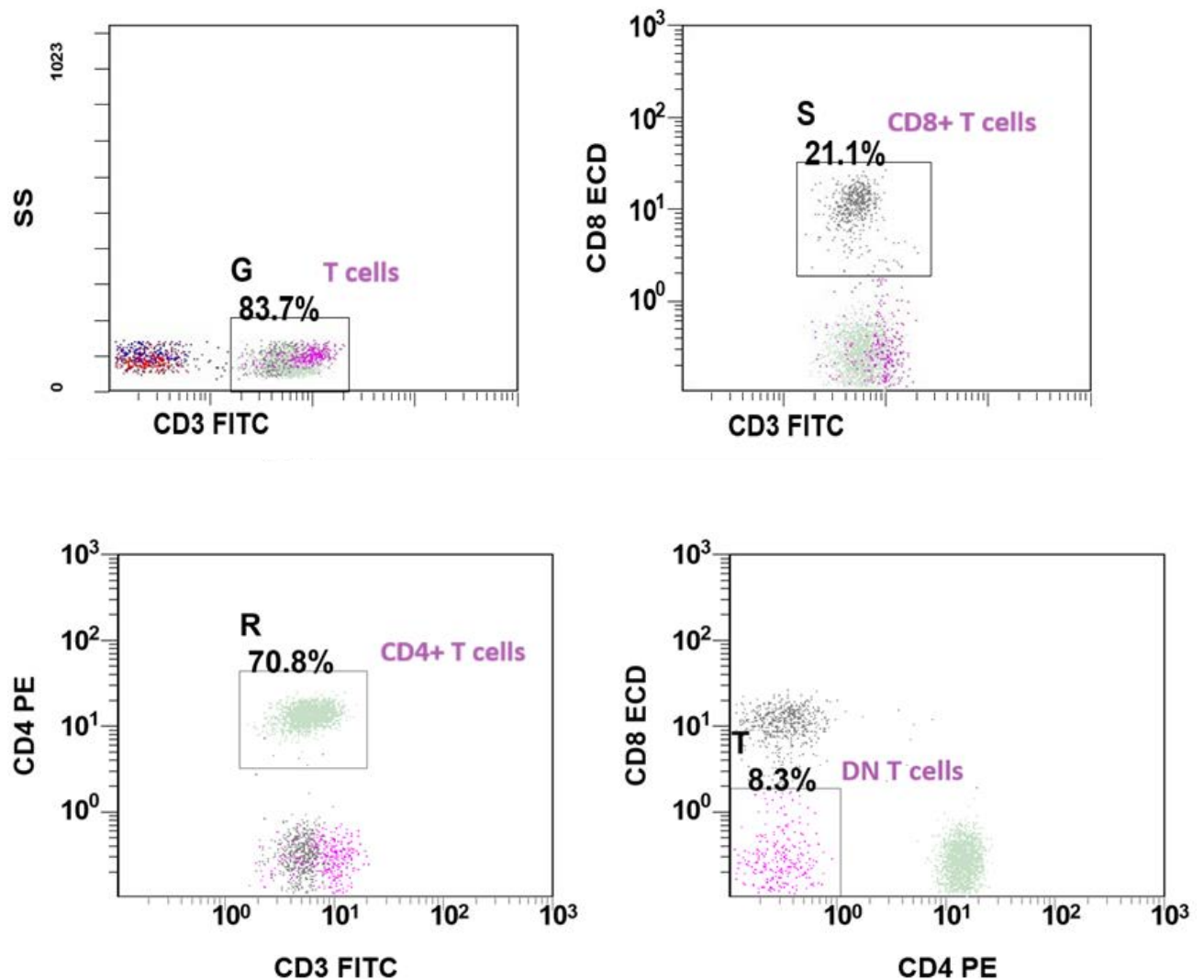
Φυσιολογικό δείγμα 1^{ος} Δοκιμαστικός σωλήνας





Παθολογικό δείγμα 1^{ος} Δοκιμαστικός σωλήνας

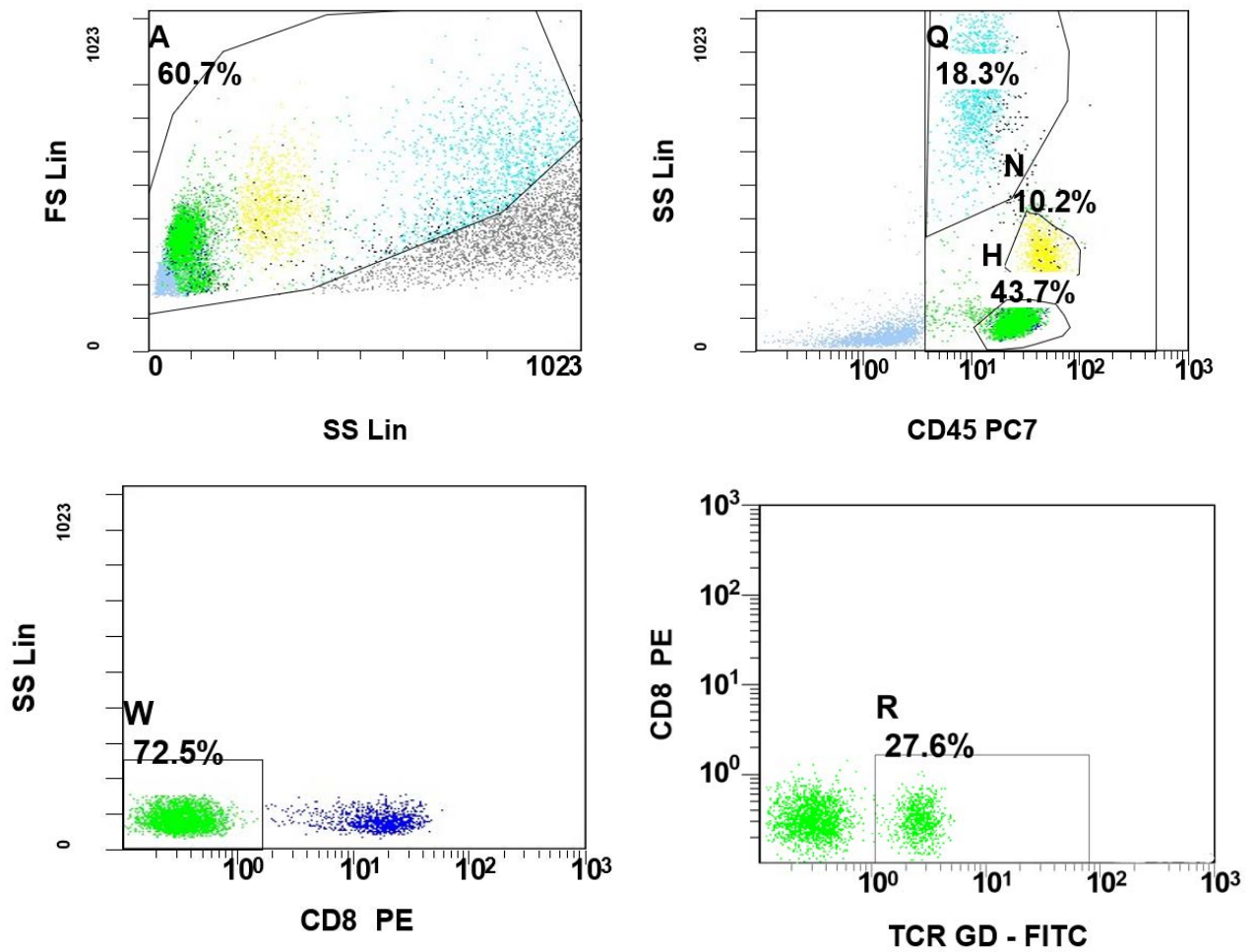




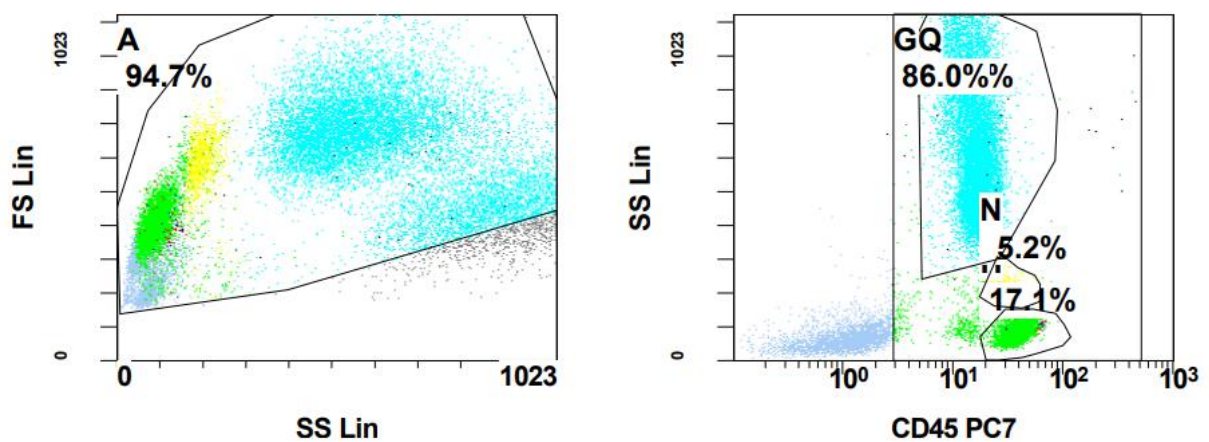
Αυτό που μας απασχόλησε ιδιαίτερα στην παρούσα μελέτη ήταν ο πληθυσμός των διπλά αρνητικών Τ κυττάρων (Double Negative , DN T cells) ο οποίος βρέθηκε να είναι σε πολλές περιπτώσεις και όπως βλέπουμε και παραπάνω έως και 3 φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο πληθυσμό στα φυσιολογικά δείγματα.

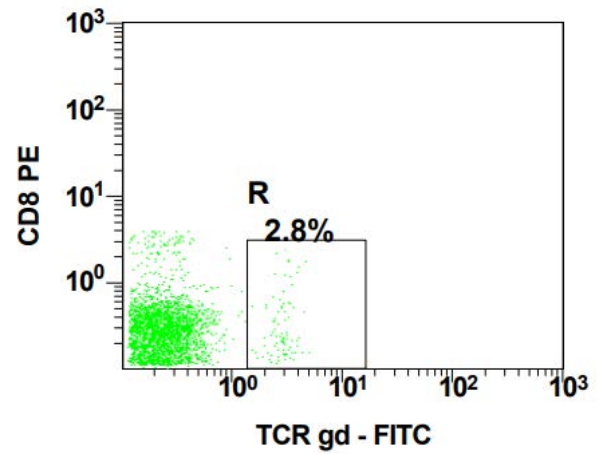
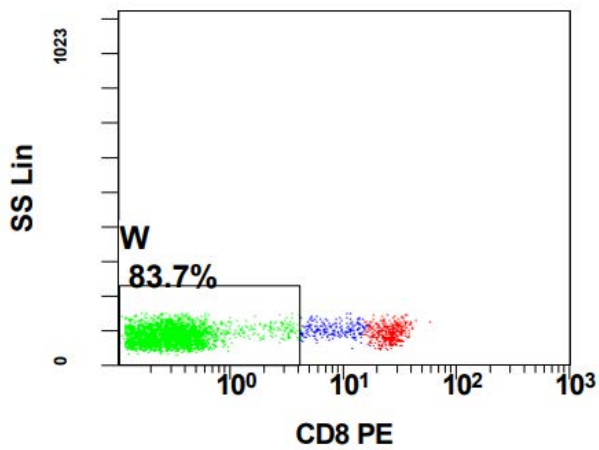
Τα διαγράμματα από τον δεύτερο καθώς και τον τρίτο δοκιμαστικό σωλήνα ήταν τα εξής:

2^{ος} σωλήνας φυσιολογικό δείγμα:

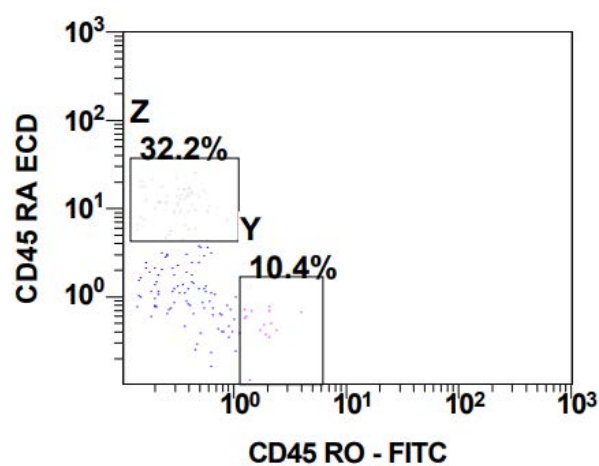
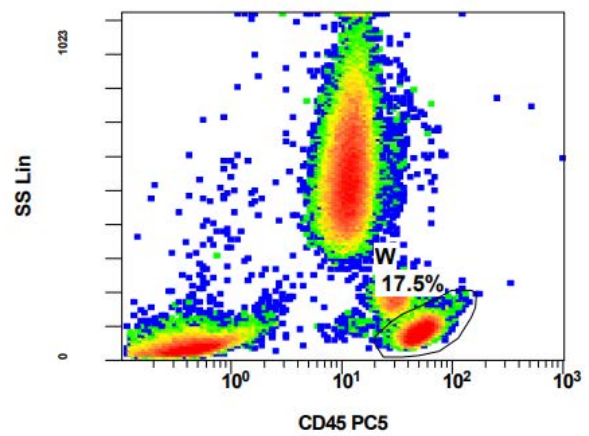
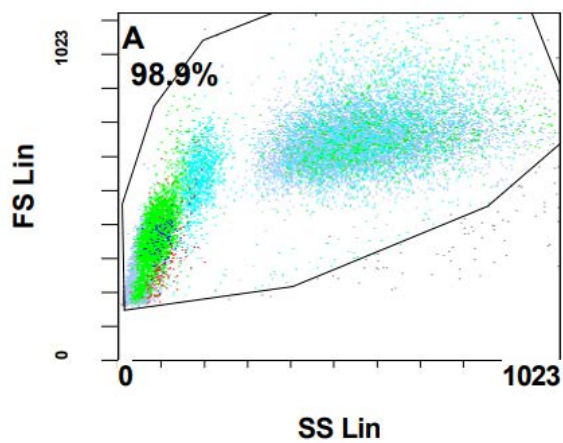


2^{ος} σωλήνας παθολογικό δείγμα:

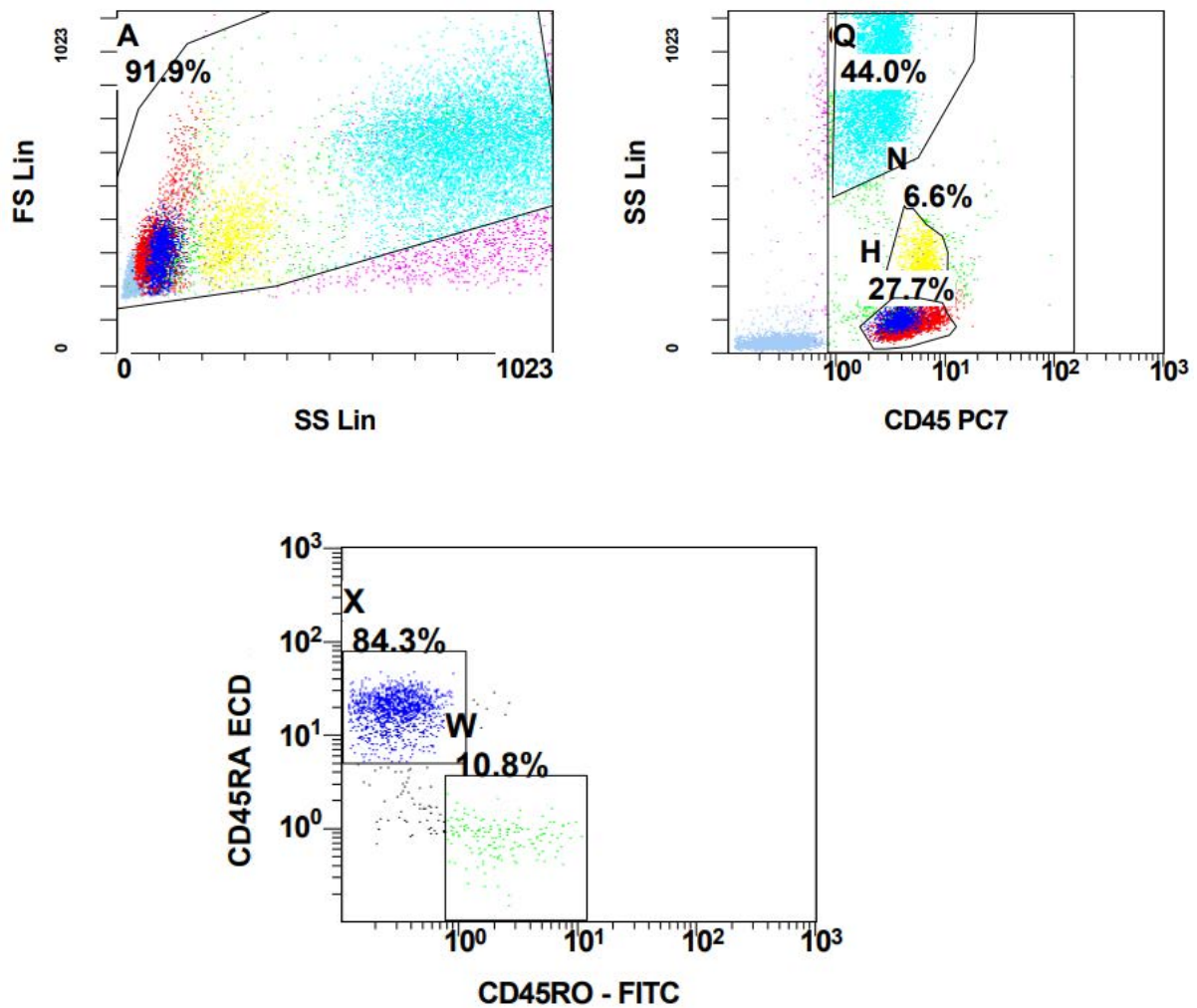




3^{ος} σωλήνας φυσιολογικό δείγμα:



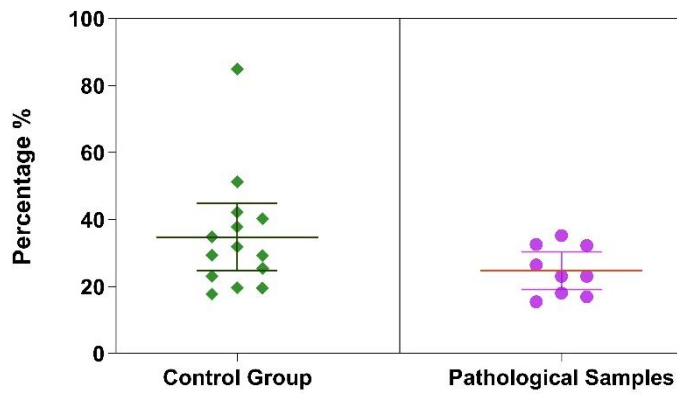
3^{ος} σωλήνας παθολογικό δείγμα:



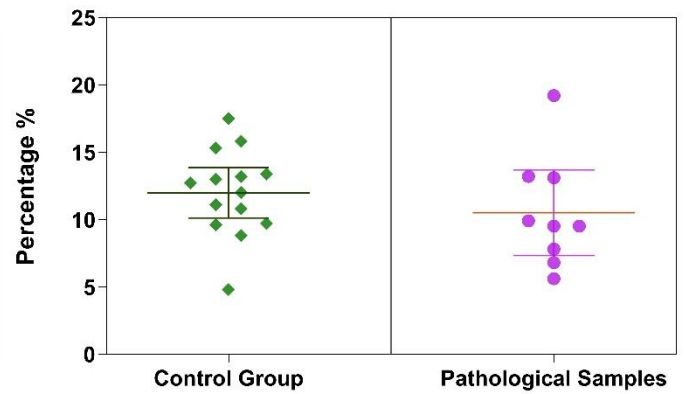
Γ.2. Στατιστική Ανάλυση και απεικόνιση αποτελεσμάτων

Όσον αφορά τη στατιστική ανάλυση παρατίθεται παρακάτω τα διαγράμματα των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων, των Β κυττάρων, των Τ κυττάρων (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, DN Τ cells) των φυσιολογικών δειγμάτων σε σχέση με αυτά των παθολογικών στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα λήφθηκαν τα εξής αποτελέσματα :

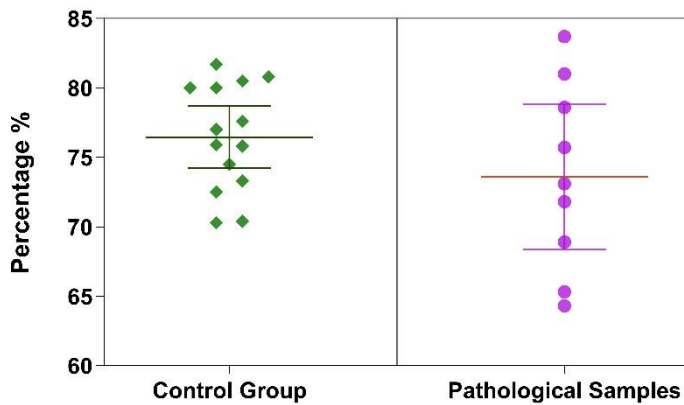
Lymphocyte Populations



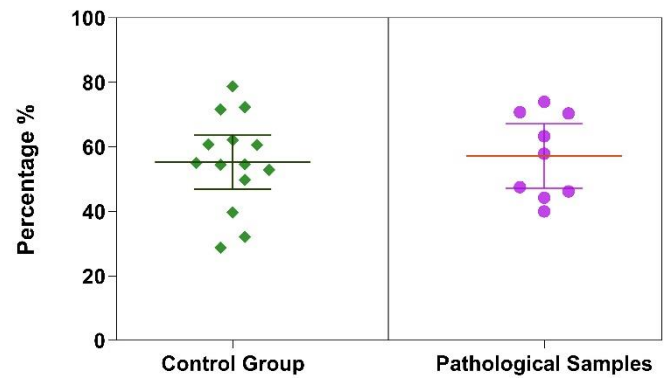
CD19+ B cells



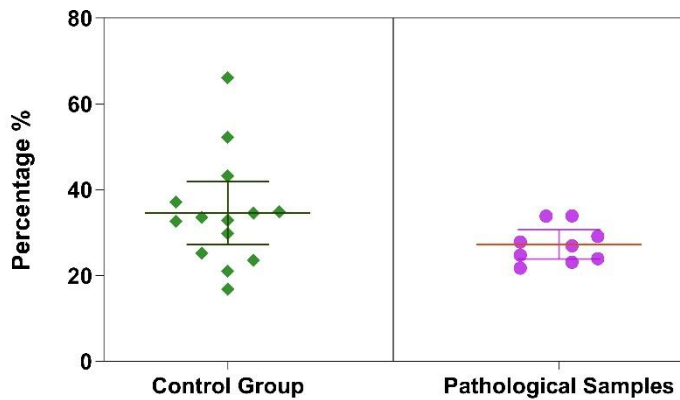
CD3+ T cells



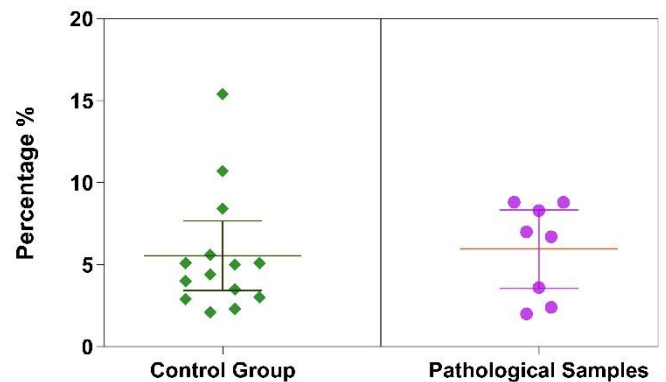
CD4+ T cells



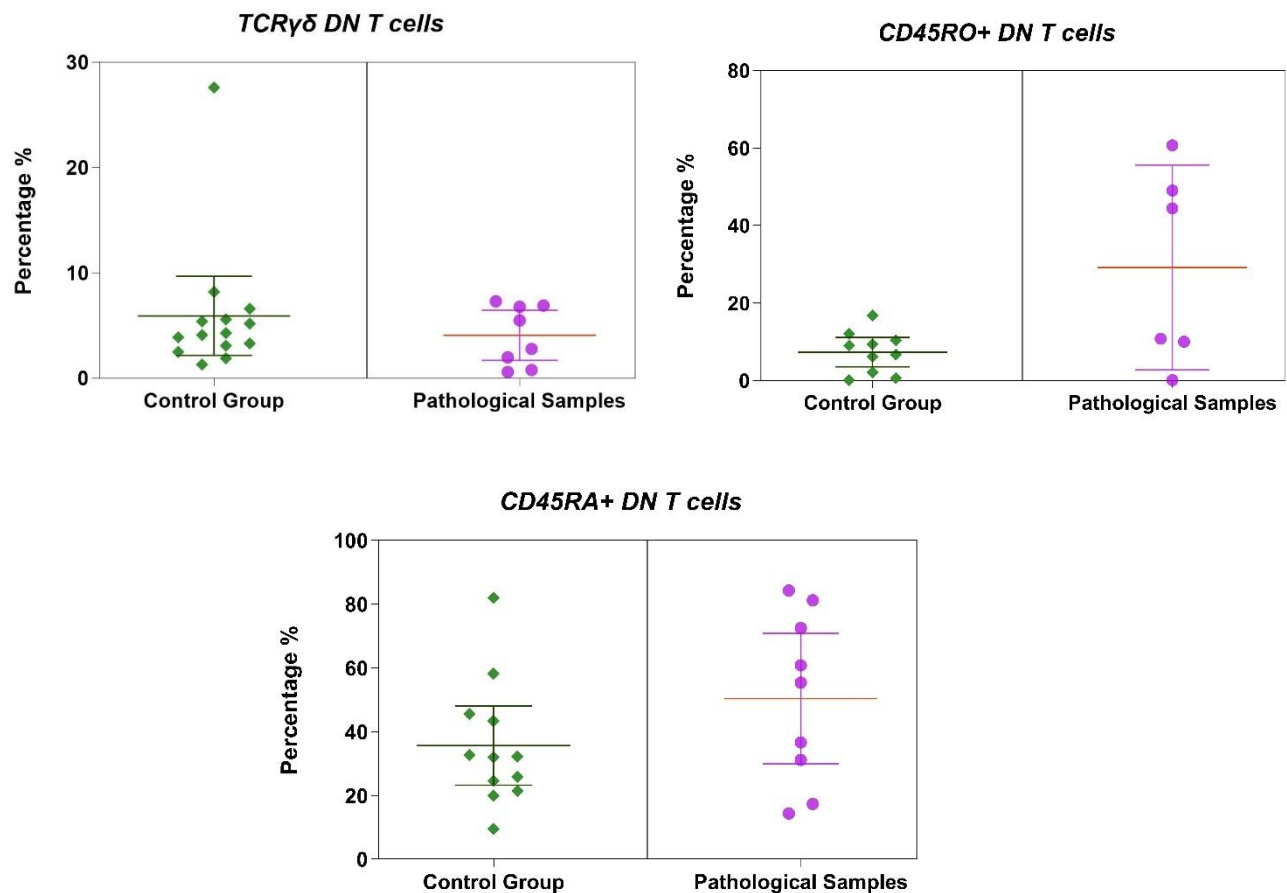
CD8+ T cells



Double Negative T cells



Ενώ στον δεύτερο και τρίτο δοκιμαστικό σωλήνα οι πληθυσμοί που αφορούν συγκεκριμένα τα διπλά αρνητικά T κύτταρα (TCR γ/δ DN T cells, CD45RO⁺, CD45RA⁺) :



Δ. Συμπεράσματα

Όσον αφορά τις αναλύσεις των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στα δείγματα τα οποία είχαμε στη διάθεσή μας ο μέσος όρος των φυσιολογικών δειγμάτων σε αντίθεση με τα παθολογικά ήταν 34,77 και 24,73 αντίστοιχα (p value=0,1176) . Ο μέσος όρος των φυσιολογικών δειγμάτων σε αντίθεση με τα παθολογικά στα T λεμφοκύτταρα ήταν 5,37 και 5,95 αντίστοιχα (p value=0,7001) και στα B λεμφοκύτταρα 11,58 και 10,51 (p value=0,3516). Στα CD4⁺ και CD8⁺ παρατηρούμε στα πρώτα μέσο όρο φυσιολογικών δειγμάτων 55,25 και παθολογικών 57,14 (p value=0,7539) ενώ στα δεύτερα μέσο όρο φυσιολογικών 34,51 και παθολογικών 27,21 (p value=0,1161). Στους παραπάνω πληθυσμούς δεν παρατηρείται μεγάλη απόκλιση μεταξύ των μέσων όρων των τιμών που

λήφθηκαν από τις αναλύσεις και δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά (p value < 0,05) μεταξύ κανενός πληθυσμού από τα δείγματα γυναικών με προβλήματα και control δειγμάτων . Στην περίπτωση των διπλών αρνητικών κυττάρων, παρόλο που αυτά έγιναν αντικείμενο μελέτης της έρευνάς μας έπειτα από αρχικές αναλύσεις όπου βρέθηκε σχεδόν τριπλάσιο το ποσοστό τους σε κάποια παθολογικά δείγματα σε σχέση με κάποια φυσιολογικά, ο μέσος όρος αυτών παρουσιάζεται 5,54 και 5,95 στα φυσιολογικά και τα παθολογικά δείγματα αντίστοιχα (p value=0,7872) .

Το αποτέλεσμα αυτό δεν μας επιτρέπει να καταλήξουμε σε κάποιο πόρισμα σχετικά με το αν τα διπλά αρνητικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα θα μπορούσαν να θεωρηθούν έπειτα από μελέτη προγνωστικός δείκτης σε σχέση με την πορεία μιας κύησης ή λόγος για κάποια ανεξήγητη υπογονιμότητα , γεγονός στο οποίο αποσκοπούσε και η περαιτέρω μελέτη των διπλών αρνητικών κυττάρων με τους επιπλέον δείκτες TCR γ/δ , CD45RO⁺, CD45RA⁺ οι οποίοι επιλέχθηκαν. Ποιοτικά μπορούμε να αποφανθούμε ότι τα διπλά αρνητικά κύτταρα τα οποία μελετήθηκαν φαίνεται να είναι TCR γ/δ όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία και να εμφανίζουν φαινότυπο μνήμης επίσης όπως αναφέρεται σε διάφορες μελέτες. Στους υπόλοιπους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς όπως τα Β λεμφοκύτταρα, τα Τ βοηθητικά κύτταρα και τα Τ κυτταροτοξικά , δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά έτσι ώστε να μπορέσει κάποιος από αυτούς τους πληθυσμούς έπειτα από περαιτέρω πειράματα και μελέτη να θεωρηθεί ως δείκτης ανεξήγητης υπογονιμότητας ή καθέξιν αποβολών , τουλάχιστον στο περιφερικό αίμα.

Ε.Συζήτηση

Πληθώρα εργασιών και πειραμάτων τα οποία πραγματοποιούνται συνεχώς έχουν σκοπό να αποφέρουν απαντήσεις στα διάφορα ερωτήματα τα οποία αφορούν το ρόλο της ανοσολογίας της κύησης στην επίτευξη αυτής και στην αποτροπή επιπλοκών και αποβολών.

Επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για να διερευνηθούν τα αίτια των καθέξιν αποβολών , των επαναλαμβανόμενων αποτυχιών εμφύτευσης

στην εξωσωματική γονιμοποίηση αλλά και της ανεξήγητης υπογονιμότητας από πλευράς ανοσιακού συστήματος. Το τελευταίο διαδραματίζει καίριο ρόλο στην πραγματοποίηση και έκβαση των κυήσεων, οι επιπλοκές των οποίων αποτελούν ένα θέμα πολύ ευαίσθητο και προκαλούν συναισθηματικό βάρος σε εκατοντάδες γυναίκες στις μέρες μας.

Όσον αφορά τα ευρήματα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε στο δικό μας εργαστήριο, απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα γυναικών αλλά και περαιτέρω διερεύνηση του φαινοτύπου των διπλά αρνητικών T κυττάρων έτσι ώστε να αποβεί σε κάποιο αξιοσημείωτο συμπέρασμα.

Βιβλιογραφία

1. Abu-Raya, B., Michalski, C., Sadarangani, M., & Lavoie, P. M. (2020). Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 11(October), 1–18.
2. Anin, S. R., Vince, G., & Quenby, S. (2004). Trophoblast invasion. *Human Fertility*, 7(3), 169–174.
3. Koshak, E., Atwah, A., Aljedani, R., Aljaied, Y., & Gaddoury, M. A. (2022). Common Autoimmune Antibodies in Unexplained Infertile Female Patients in Saudi Arabia. *Cureus*, 14(11).
4. Rasmark Roepke, E., Bruno, V., Nedstrand, E., Boij, R., Strid, C. P., Piccione, E., Berg, G., Svensson-Arvelund, J., Jenmalm, M. C., Rubér, M., & Ernerudh, J. (2019). Low-molecular-weight-heparin increases Th1- and Th17-associated chemokine levels during pregnancy in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a randomised controlled trial. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
5. Ticconi, C., Pietropolli, A., Di Simone, N., Piccione, E., & Fazleabas, A. (2019). Endometrial immune dysfunction in recurrent pregnancy loss. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21).
6. Bohring, C., Krause, E., Habermann, B., & Krause, W. (2001). Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Molecular Human Reproduction*, 7(2), 113–118.
7. Power, M. L., Quaglieri, C., & Schulkin, J. (2017). Reproductive Microbiomes: A New Thread in the Microbial Network. *Reproductive Sciences*, 24(11), 1482–1492.
8. Benner, M., Ferwerda, G., Joosten, I., & van der Molen, R. G. (2018). How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human Reproduction Update*, 24(4), 393–415.
9. Moreno, I., Codoñer, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazán, J., Alonso, R., Alamá, P., Remohí, J., Pellicer, A., Ramon, D., & Simon, C. (2016). Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(6), 684–703.
10. Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 17(8), 469–482.
11. Anders, A. P., Gaddy, J. A., Doster, R. S., & Aronoff, D. M. (2017). Current concepts in maternal–fetal immunology: Recognition and response to microbial pathogens by decidual stromal cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 77(3), 1–8.

12. Sojka, D. K. (2020). Uterine Natural Killer Cell Heterogeneity: Lessons From Mouse Models. *Frontiers in Immunology*, 11(February), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00290>
13. Bafor, E. E., Valencia, J. C., & Young, H. A. (2022). Double Negative T Regulatory Cells: An Emerging Paradigm Shift in Reproductive Immune Tolerance? *Frontiers in Immunology*, 13(July), 1–15.
14. Vallvé-Juanico J, Santamaria X, Vo KC, Houshdaran S, Giudice LC. Macrophages display proinflammatory phenotypes in the eutopic endometrium of women with endometriosis with relevance to an infectious etiology of the disease. *Fertil Steril*. 2019 Dec;112(6):1118-1128.
15. Critchley, H. O. D., Maybin, J. A., Armstrong, G. M., & Williams, A. R. W. (2020). Physiology of the endometrium and regulation of menstruation. *Physiological Reviews*, 100(3), 1149–1179.
16. Marron, K., Walsh, D., & Harrity, C. (2019). Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(2), 199–210.
17. Ehsani, M., Mohammadnia-Afrouzi, M., Mirzakhani, M., Esmailzadeh, S., & Shahbazi, M. (2019). Female unexplained infertility: A disease with imbalanced adaptive immunity. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(4), 274–282.
18. Carp, H. J. A., Selmi, C., & Shoenfeld, Y. (2012). The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *Journal of Autoimmunity*, 38(2–3), J266–J274.
19. Jagadeesan, V. (1988). Serum complement levels in normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 26(3), 389–391.
20. Massimiani, M., Lacconi, V., La Civita, F., Ticconi, C., Rago, R., & Campagnolo, L. (2020). Molecular signaling regulating endometrium–blastocyst crosstalk. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1).
21. Mahajan, D., Sharma, N. R., Kancharla, S., Kolli, P., Tripathy, A., Sharma, A. K., Singh, S., Kumar, S., Mohanty, A. K., & Jena, M. K. (2022). Role of Natural Killer Cells during Pregnancy and Related Complications. *Biomolecules*, 12(1).
22. Germain, S. J., Sacks, G. P., Soorana, S. R., Sargent, I. L., & Redman, C. W. (2007). Systemic Inflammatory Priming in Normal Pregnancy and Preeclampsia: The Role of Circulating Syncytiotrophoblast Microparticles. *The Journal of Immunology*, 178(9), 5949–5956.
23. Hey-Cunningham, A. J., Wong, C., Hsu, J., Fromm, P. D., Clark, G. J., Kupresanin, F., Miller, E. J., Markham, R., & McGuire, H. M. (2021). Comprehensive analysis utilizing flow cytometry and immunohistochemistry reveals inflammatory changes in local endometrial and systemic dendritic cell populations in endometriosis. *Human Reproduction*, 36(2), 415–428.

24. Akhmedova, S. R., & Omarov, N. S. M. (2020). Determination of cytokine status indicators and angiogenesis factors in patients with external genital endometriosis and vitamin d deficiency. *Periodico Tche Quimica*, 17(34), 251–259.
25. Berbic, M., & Fraser, I. S. (2011). Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(2), 149–155.
26. Tuckerman, E., Mariee, N., Prakash, A., Li, T. C., & Laird, S. (2010). Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *Journal of Reproductive Immunology*, 87(1–2), 60–66.
27. Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2017). The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*, 47(5), 820–833.
28. Kuon, R. J., Vomstein, K., Weber, M., Müller, F., Seitz, C., Wallwiener, S., Strowitzki, T., Schleussner, E., Markert, U. R., Daniel, V., & Toth, B. (2017). The “killer cell story” in recurrent miscarriage: Association between activated peripheral lymphocytes and uterine natural killer cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 119, 9–14.
29. Guo, M., Bafligil, C., Tapmeier, T., Hubbard, C., Manek, S., Shang, C., Martinez, F. O., Schmidt, N., Obendorf, M., Hess-Stumpp, H., Zollner, T. M., Kennedy, S., Becker, C. M., Zondervan, K. T., Cribbs, A. P., & Oppermann, U. (2020). Mass cytometry analysis reveals a distinct immune environment in peritoneal fluid in endometriosis: A characterisation study. *BMC Medicine*, 18(1), 1–16.
30. Southcombe, J., Redman, C., & Sargent, I. (2010). Peripheral blood invariant natural killer T cells throughout pregnancy and in preeclamptic women. *Journal of Reproductive Immunology*, 87(1–2), 52–59.
31. Watanabe, M., Iwatani, Y., Kaneda, T., Hidaka, Y., Mitsuda, N., Morimoto, Y., & Amino, N. (1997). Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 37(5), 368–377.
32. Kühnert, M., Strohmeier, R., Stegmüller, M., & Halberstadt, E. (1998). Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 76(2), 147–151.
33. Kraus, T. A., Engel, S. M., Sperling, R. S., Kellerman, L., Lo, Y., Wallenstein, S., Escribese, M. M., Garrido, J. L., Singh, T., Loubeau, M., & Moran, T. M. (2012). Characterizing the pregnancy immune phenotype: Results of the viral immunity and pregnancy (VIP) study. *Journal of Clinical Immunology*, 32(2), 300–311.
34. Prieto, J. M. B., & Felipe, M. J. B. (2017). Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 54(March), 38–44.

35. Salamonsen, L. A., & Lathbury, L. J. (2000). Endometrial leukocytes and menstruation. *Human Reproduction Update*, 6(1), 16–27.
36. Chen, X., Wang, D., & Zhu, X. (2022). Application of double-negative T cells in haematological malignancies: recent progress and future directions. *Biomarker Research*, 10(1), 1–9.
37. Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 6(4), 345–352.
38. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., & Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 601–610.
39. Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M., & Drayson, M. T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺ CD4⁺ regulatory T-cell subset. *Immunology*, 112(1), 38–43.
40. Krop, J., Heidt, S., Claas, F. H. J., & Eikmans, M. (2020). Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3. *Frontiers in Immunology*, 11(June), 1–16.
41. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*. 2008 Jun;223:87-113.
42. Lissauer, D., Goodyear, O., Khanum, R., Moss, P. A. H., & Kilby, M. D. (2014). Profile of maternal CD4 T-cell effector function during normal pregnancy and in women with a history of recurrent miscarriage. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 126(5), 347–354.
43. Wu, Z., Zheng, Y., Sheng, J., Han, Y., Yang, Y., Pan, H., & Yao, J. (2022). CD3⁺CD4⁺CD8[−] (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 13(February), 1–14.
44. Velikkakam, T., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2022). Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression. *Immunology*, 165(4), 371–385.
45. Li, H., & Tsokos, G. C. (2021). Double-negative T cells in autoimmune diseases. *Current Opinion in Rheumatology*, 33(2), 163–172.
46. Rodríguez-Rodríguez, N., Flores-Mendoza, G., Apostolidis, S. A., Rosetti, F., Tsokos, G. C., & Crispín, J. C. (2020). TCR- α/β CD4[−] CD8[−] double negative T cells arise from CD8⁺ T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(3), 851–857.
47. Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G. K., Mondal, K., Laumer, M., Kunz-Schughart, L., Schmidt, C. A., Andreesen, R., & Mackensen, A. (2005). Isolation and characterization of human antigen-specific TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4[−]CD8[−] double-negative regulatory T cells. *Blood*, 105(7), 2828–2835.
48. Kalyan, S., & Kabelitz, D. (2013). Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: A biographical sketch of the highly empathetic. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(1), 21–29.

- 49.** Fang, L., Ly, D., Wang, S. S., Lee, J. B., Kang, H., Xu, H., Yao, J., Tsao, M. S., Liu, W., & Zhang, L. (2019). Targeting late-stage non-small cell lung cancer with a combination of DNT cellular therapy and PD-1 checkpoint blockade. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–14.
- 50.** Chen, B., Lee, J. B., Kang, H., Minden, M. D., & Zhang, L. (2018). Targeting chemotherapy-resistant leukemia by combining DNT cellular therapy with conventional chemotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1), 1–11.
- 51.** Crispin JC, Hedrich CM, Suárez-Fueyo A, Comte D, Tsokos GC. SLE-Associated Defects Promote Altered T Cell Function. *Crit Rev Immunol*. 2017;37(1):39-58.