



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ Τ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ
ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ**

**CHARACTERIZATION OF DOUBLE NEGATIVE T
LEMPHOCYTES IN THE HUMAN ENDOMETRIUM**

ΚΕΧΑΓΙΑ ΕΥΑΝΘΙΑ, ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2025

«ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ»

Όνοματεπώνυμο φοιτήτριας: **Κεχαγιά Ευανθία**

Πατρώνυμο: **Σωτήριος**

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: **Καλαλά Φανή**

Εργαστήριο: **Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα**

«CHARACTERIZATION OF DOUBLE NEGATIVE T LEMPHOCYTES IN HUMAN ENDOMETRIUM»

Name of student: **Kechagia Evanthia**

Father's name: **Sotirios**

Supervisor: **Fani Kalala**

Laboratory: **Immunity and Histocompatibility, Department of Medicine, University of Thessaly, School of Health Science, Larissa, Greece**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φανή Καλαλά: Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα fkalala@uth.gr 2410685687

Παπουτσοπούλου Σταματία: Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Ματθαίος Σπελέτας: Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, maspel@med.uth.gr 2410685695

«Η παρούσα διπλωματική εργασία σηματοδοτεί το τέλος της προπτυχιακής ακαδημαϊκής μου πορείας, επομένως θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες στα άτομα που κατέστησαν δυνατή την ολοκλήρωση της με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Καλαλά Φανή για την ευκαιρία που μου έδωσε να εντρυφήσω σε μια θεματολογία που μου προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον, την καθοδήγηση που μου παρείχε, καθώς και την εμπιστοσύνη που υπέδειξε καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας. Η επιστημονική υποστήριξη της υπήρξε καίρια για την πρωταρχική επαφή μου με το αντικείμενο τόσο των κλινικών δειγμάτων όσο και της αξιοποίησης της Κυτταρομετρίας ροής με σκοπό την όξυνση της ερευνητικής μου σκέψης. Η μέθοδος αυτή, συνέβαλε στην εξοικείωσή μου με τον επιστημονικό συνδυασμό τεχνολογίας και πειραματικής πράξης, γεγονός που διέγειρε ακόμα περισσότερο τη περιέργειά μου για τις μελλοντικές εφαρμογές του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την συνολική ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας για την προθυμία τους να με επιμορφώσουν σε πρακτικές δεξιότητες κρίσιμες για την εργασία μου, καθώς και για την ευχάριστη και φιλόξενη ατμόσφαιρα που δημιούργησαν στα πλαίσια της συνεργασίας μας. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου κ. Ματθαίο Σπελέτα και την κα Σταματία Παπουτσοπούλου που μου παρείχαν την δυνατότητα να συμμετέχω στην διεξαγωγή της πειραματικής διπλωματικής ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά και τις φίλες μου για την υποστήριξη, την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διαδρομή μου για την ολοκλήρωση των προπτυχιακών σπουδών μου.»

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΚΥΗΣΗ	7
1. Ιστορική Αναδρομή	7
2. Ανοσιακό σύστημα της Εγκυμοσύνης	8
ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ και ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΠΑΘΟΓΕΝΙΑΣ	10
Α. Ανεξήγητη Υπογονιμότητα	10
Β. Καθ' έξιν Αποβολές	11
Γ. Συσχέτιση των δύο φαινομένων	11
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΗΣΗ..	13
DNT ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	19
ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ	20
ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	21
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
1. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	22
2. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – ΕΥΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	23
3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	24
4. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	25
5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	28
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	28
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ	29
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	30
1 ^η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ ΑΡΛΟΣ, PLASMA, NK CELLS, TCRγ/δ	30
2 ^η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΙΤ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΝΕΛ	
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	32
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
Κυτταρομετρική ανάλυση	33
Στατιστική ανάλυση	38
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	43
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εγκυμοσύνη αποτελεί μια βιολογική διαδικασία η οποία προβληματίζει διαχρονικά τον επιστημονικό κλάδο. Συγκεκριμένα, η ιδιότητα αναγνώρισης του αναπτυσσόμενου εμβρύου από το μητρικό σώμα και η ανάπτυξη ανοχής προς αυτό είναι κάποια από τα φαινόμενα που προκαλούν πληθώρα ερωτήσεων σε τομείς της βιολογίας, εμβρυολογίας αλλά και φυσικά της ανοσολογίας, προσφέροντας την ευκαιρία για περαιτέρω μελέτη. Για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που οδηγούν στην αποδοχή του εμβρύου, αναπτύχθηκαν κατά τα χρόνια διάφορες θεωρίες ερευνητών που έκαναν λόγο για ανοσοκαταστολή της μητέρας, απουσία εμβρυϊκού ανοσοποιητικού συστήματος και ύπαρξη ανατομικών φραγμών μεταξύ μητέρας-εμβρύου όπως ο πλακούντας. Πλέον γνωρίζουμε πως αυτές οι θεωρίες δεν έχουν βιολογική υπόσταση καθώς έχουν απορριφθεί, ωστόσο ήταν σημαντικές και λειτούργησαν ως έναυσμα στην συμπερίληψη της ανοσολογίας όταν αναζητούμε τα αίτια μιας αρνητικής κύησης.

Επιπρόσθετα, η ανοσιακή απόκριση στην εγκυμοσύνη διευρύνθηκε πέραν της ανάλυσης στο περιφερικό αίμα και τη σήμερον ημέρα εξετάζεται η οργάνωση του ανοσοποιητικού συστήματος εξειδικευμένα στους ιστούς του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος που δίνει την δυνατότητα πρόβλεψης θετικής ή αρνητικής έκβασης της εγκυμοσύνης **(1)**. Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα διαθέτει ένα προστατευτικό στρώμα βλεννογόνου πάνω στο οποίο μπορούν να ανιχνευτούν σχετιζόμενοι με τον βλεννογόνο λεμφικοί ιστοί (mucosa associated lymphoid tissue), με ευρεία ποικιλία κυττάρων του ανοσοποιητικού να επικάθονται στις στρωματικές στιβάδες της επιφάνειας του επιθηλίου. **(2)** Με την επιστημονική εξέλιξη και την κατάρτιση των ερευνητών γνωρίζουμε πως η σύσταση των κυττάρων αυτών, ο συσχετισμός τους και η φυσιολογική έκφραση τους είναι καίριας σημασίας για τη φυσιολογία της κύησης καθώς οποιαδήποτε διατάραξη του ενδομητριακού περιβάλλοντος μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία στο ισοζύγιο μεταξύ κυτταροπροστατευτικών και κυτταροτοξικών παραγόντων, συνεπώς στην απουσία ομοιόστασης και τελικά στην απόρριψη του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Επομένως, επιχειρώντας την βελτιστοποίηση των μηχανισμών ομοιόστασης των ανοσοαποκρίσεων του ενδομήτριου δημιουργείται μια νέα καινοτόμα προσέγγιση στην αντιμετώπιση της υπογονιμότητας που απασχολεί πολλές γυναίκες παγκοσμίως.

Η παρούσα πειραματική μελέτη αποσκοπεί στην διερεύνηση αυτών των κυτταρικών συστημάτων που εγκαθιδρύουν την ομοιόσταση του ενδομήτριου, με έμφαση στον χαρακτηρισμό των ενδογενών γνωρισμάτων των Double Negative (DN) ή Διπλά Αρνητικών Τ Λεμφοκυττάρων που εμφανίζουν τον ανοσοφαινότυπο CD4-CD8-. Σε άμεση συσχέτιση με τα DN Τ λεμφοκύτταρα, η έρευνα συμπεριλάμβανε τον χαρακτηρισμό των κυτταροτοξικών CD8+ Τ λεμφοκυττάρων,

των NK κυττάρων και γενικότερα των υποπληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού στα δείγματα ενδομήτριου που αναλύθηκαν.

ABSTRACT

Pregnancy represents a biological process that consistently intrigued the scientific community over the years. Specifically, some of the phenomena that raise numerous questions for the scientific fields of biology, embryology and, of course, immunology are the maternal body's ability to recognize and establish tolerance towards the newly developing embryo which remains under further investigation. Over the years, researchers formulated multiple theories to identify the mechanisms leading to embryo tolerance such as the immunosuppression of the maternal body, the lack of embryonic immune system and the development of anatomic barriers between the two organisms via the placenta. Nowadays, it is well known that these assumptions have no biological significance and have been rejected, nevertheless, they played a critical role in highlighting the importance of immunology in comprehending the causes of unsuccessful, negative pregnancies.

Furthermore, the immune response during pregnancy has now expanded beyond analyzing the peripheral blood, leading to nowadays focused evaluation of the immune system organization within the tissues of the female reproductive tract, which suggests the possibility of predicting positive or negative pregnancy outcomes (1). The female reproductive system consists of a protective mucosal barrier tissue where mucosa associated lymphoid tissue (MALT) can be detected, thus immune cells infiltrate the stromal layers adjacent to the epithelial surface (2). Thanks to scientific advances and the scientific training of researchers, we now have a better image of the composition of these immune cells. Moreover, the correlation, interactions and normal expression between them are of vital importance to the physiology of pregnancy. Any sign of disruption in the endometrial environment can cause imbalance among cytoprotective and cytotoxic factors that will eventually terminate the development of the embryo. Therefore, by attempting to optimize the homeostasis mechanisms of immune responses of the endometrium, a new and innovative approach emerges in the treatment of infertility, an issue that affects women globally.

This experimental study aims to explore the cellular systems that regulate and facilitate the endometrial homeostasis, with a focus on the characterization of the intrinsic properties of Double Negative (DN) T lymphocytes, which display the CD4-CD8- immunophenotype. In a close connection with DN T lymphocytes, this assay included the characterization of cytotoxic CD8+ T lymphocytes, Natural

Killer (NK) cells and generally different cell subsets of the immune system in endometrial samples as subjects of analysis.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΥΗΣΗ

1. Ιστορική Αναδρομή



Εικόνα 1 Starzl TE. Peter Brian Medawar: father of transplantation. J Am Coll Surg. 1995 Mar;180(3):332-6. PMID: 7874344; PMCID:

Η διαδικασία της κύησης αποτελεί φαινόμενο προβληματισμού στον επιστημονικό κλάδο και έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τον τομέα της ανοσολογίας. Αρχική προσέγγιση του ζητήματος ήταν η αντίληψη ότι η απόκριση του οργανισμού μίας γυναίκας ως προς το αναπτυσσόμενο έμβρυο φέρει τα χαρακτηριστικά του Ημι-αλλογενούς μοσχεύματος. Ωστόσο, η θεωρία αυτή γνωρίζουμε πλέον ότι δεν υποστηρίζεται καθώς βασική παρατήρηση είναι πως στην αρνητική έκβαση μιας εγκυμοσύνης δεν παρατηρείται η εκτεταμένη αύξηση των Τ λεμφοκυττάρων όπως κατά την απόρριψη ενός οργάνου-μοσχεύματος. (3)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ερμηνεία που είχαν αποδώσει ερευνητές όπως ο Βρετανός βιολόγος

Dr. Peter Brian Medawar, για την υποστήριξη της θεωρίας την δεκαετία των 60s. Σύμφωνα με τον Medawar, προτάθηκαν τρεις μηχανισμοί με τους οποίους το έμβρυο αποφεύγει την αναγνώριση του από το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας:

- Η δομή του πλακούντα δημιουργεί έναν ανατομικό φραγμό μεταξύ μητέρας και εμβρύου που αποτρέπει την αναγνώριση του «ξένου» σώματος.
- Η ανωριμότητα των αναπτυσσόμενων εμβρυϊκών αντιγόνων το προστατεύει από αναγνώριση.
- Με την εξέλιξη της εγκυμοσύνης, επάγεται η συστηματική ανοσοκαταστολή στην μητέρα για την ανοχή του εμβρύου.

Τα παραπάνω πορίσματα, αν και έχουν πλέον απορριφθεί με την εξέλιξη της επιστήμης, αποτυπώθηκαν ως το «Παράδοξο του Medawar» και αποτέλεσαν βάση για την εξέλιξη της κριτικής σκέψης όσων αφορά τις σωματικές αποκρίσεις κατά την εγκυμοσύνη στον κλάδο της ανοσολογίας.

2. Ανοσιακό σύστημα της Εγκυμοσύνης

Η εγκυμοσύνη καθώς και τα διαφορετικά στάδια αυτής αποκαλύπτουν έντονη πολυπλοκότητα ως προς τις αλληλεπιδράσεις διαμέσου της μητρο-εμβρυϊκής διεπαφής (μητροπλακουντικός φραγμός), με ποικίλα συμμετέχοντα μόρια, διαδικασίες και αλληλεπιδράσεις, μοναδικές ανά οργανισμό. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, δεν εγκαθιστούν απλώς ένα περιβάλλον ξενιστή-μοσχεύματος όπως θεωρούνταν προγενέστερα, αλλά σκιαγραφούν την εικόνα του τοπικού ανοσιακού συστήματος ανάλογη των κυτταρικών αποκρίσεων κατόπιν επαφής με το αναπτυσσόμενο έμβρυο. **(4)** Η πρώτη επαφή των δύο οργανισμών σηματοδοτείται από την εμφύτευση του εμβρύου, συγκεκριμένα στο στάδιο σχηματισμού της βλαστοκύστης, στην επιφάνεια του ενδομήτριου, γεγονός που θα καθορίσει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία της επακόλουθης κύησης. Κατόπιν της εγκόλπωσης του εμβρύου, μοριακοί κυτταρικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται για να προωθήσουν την προσκόλληση της βλαστοκύστης σε συνδυασμό με την δημιουργία του πλακούντα από κύτταρα τόσο της τροφοβλάστης του εμβρύου όσο και μητρικά. **(5)** Στην συνέχεια, ακολουθεί ένας ελεγχόμενος κύκλος διαδοχικών φάσεων όπου το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα αποκρίνεται σε εμβρυϊκά αντιγόνα προωθώντας την ανοσολογική ανοχή του εμβρύου και την ενδομητριάκη δεκτικότητα. Η διαδικασία αυτή δεν είναι παθητική αλλά αντιθέτως, το ανοσοποιητικό σύστημα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος υπόκειται σε διαρκή ρύθμιση κατά την πρόοδο της εγκυμοσύνης, επιστρατεύοντας διαφορετικές συστάσεις κυτταρικών πληθυσμών ανάλογα τα διαφορετικά στάδια της κύησης. **(6)**

Ο κύκλος κάθε ομαλής εγκυμοσύνης αποτελείται από διακριτά στάδια με τροποποιημένο ανοσοπεριβάλλον τα οποία συνοψίζονται παρακάτω:

1. Περι-εμφυτευτική περίοδος

Κατά την φάση εμφύτευσης του εμβρύου στα τοιχώματα του ενδομήτριου δημιουργείται ένα φλεγμονώδες περιβάλλον (προ-φλεγμονώδες) που υποβοηθά την προσκόλληση του. **(7)** Με την επιτυχία της εμφύτευσης του εμβρύου επάγονται προσωρινές τροποποιήσεις των ανοσιακών αποκρίσεων που επιτρέπουν τόσο την προσκόλληση της τροφοβλάστης όσο και την ανάπτυξη ανοχής **(8)** και έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την πρώτη θετική ένδειξη κύησης. Η φλεγμονή προκύπτει από κύτταρα του ενδομήτριου αλλά και από την έκκριση σηματοδοτικών αναστολέων από το έμβρυο που αποτρέπουν την απόρριψη του με τελικό στόχο την δημιουργία σταθερών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μητρικού σώματος και του εμβρύου.

2. 1^ο τρίμηνο

Με την επιτυχία της εμβρυϊκής εγκόλπωσης, τα πρώιμα στάδια του πρώτου τριμήνου κύησης χαρακτηρίζονται από εξίσου σταθερά εκφραζόμενες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες διεγείροντας την

προστατευτική δράση της έμφυτης ανοσίας του μητρικού σώματος. Το στάδιο αυτό είναι κρίσιμο για την προστασία του εμβρύου από πιθανές λοιμώξεις παθογόνων ενώ ταυτοχρόνως συμβάλλει στην επούλωση των ήπιων φθορών που δημιουργήθηκαν στην στιβάδα επιθηλίου του ενδομήτριου κατά την εμφύτευση. (7)

3. 2^ο τρίμηνο

Η έκβαση του δεύτερου τριμήνου κύησης αρχίζει να μετατοπίζει την ομοιόσταση του ενδομητριακού περιβάλλοντος προς ένα αντιφλεγμονώδες προφίλ. Η διαφοροποίηση αυτή είναι σκόπιμη για την αποφυγή της εμβρυϊκής απόρριψης λόγω φλεγμονής για την ανάπτυξη του, η οποία καθοδηγείται από ανασταλτικούς παράγοντες. Οι πληθυσμοί προ-φλεγμονωδών κυτταρικών πληθυσμών της φυσικής ανοσίας μειώνονται χωρίς να απαλείφονται πλήρως, καθώς παρατηρείται η σταδιακή έκφραση αντιφλεγμονωδών παραγόντων και η συγκρότηση κυτταρικών μηχανισμών της επίκτητης ανοσίας για την μακροχρόνια ανοχή του εμβρύου από το μητρικό αναπαραγωγικό σύστημα. **(9)**

4. 3^ο τρίμηνο

Η αντιφλεγμονώδης απόκριση του ενδομήτριου συνεχίζεται κατά το τρίτο και τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης όπου ένα νέο ελαφρώς τροποποιημένο αντιφλεγμονώδες περιβάλλον σχηματίζεται καθώς η γυναίκα προετοιμάζεται για τοκετό.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τροποποιήσεις στην φυσιολογία του γυναικείου σώματος σε αυτό το στάδιο, το οποίο εκτός από τις κυτταρικές διαφορές, καλείται να αντιμετωπίσει τα αυξημένα ποσοστά σωματικού stress και την πρώιμη γαλουχία. Οι έντονες μεταβολικές και ιστικές μεταβολές που παρατηρούνται στο παρόν βήμα σε συνδυασμό με την μείωση των βλεννωδών φραγμών καθιστούν το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα ευάλωτο σε μολύνσεις από ευκαιριακούς μικροοργανισμούς που ενδεχομένως δράσουν καταλυτικά στον τερματισμό της κύησης. Τέλος, το αντιφλεγμονώδες περιβάλλον συντηρείται σε σύζευξη με την έναρξη λιπόλυσης προς αποθήκευση ενεργειακών αποθεμάτων για την ενεργοβόρα και απαιτητική διαδικασία του τοκετού. (7)

5. Τοκετός

Το αρχικό έναυσμα που οδηγεί στην διέγερση του τοκετού δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένο, ωστόσο θεωρείται πως το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο. Το ισοζύγιο κυτταροπροστατευτικών παραγόντων ξαφνικά ανατρέπεται και μια νέα φλεγμονώδης κατάσταση περικλείει το ενδομήτριο. Η έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών ωθεί τις συσπάσεις της μήτρας για την εξώθηση του νεογνού από το μητρικό σώμα όπως και του πλακούντα που πλέον δεν χρειάζεται (7).

Από τις παραπάνω διαδικασίες προκύπτει το συμπέρασμα πως οι ανοσολογικές αποκρίσεις του ενδομητριακού περιβάλλοντος αναπαριστούν τον «συντονιστή» της εγκυμοσύνης, τροποποιώντας πλήρως ρυθμικά τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς αναλόγως των αναγκών. Συνολικά πρόκειται για μια αυστηρά ελεγχόμενη ισορροπία εναλλαγών μεταξύ προ- και αντί- φλεγμονώδων καταστάσεων που διαφυλάσσουν την φυσιολογική έκβαση του τοκετού. **(10)**

Η διαδοχική τροποποίηση είναι συνεχής κατά το σύνολο της εγκυμοσύνης και αφορά έντονες κυτταρικές μεταβολές του ανοσοποιητικού συστήματος ανά κάθε περίοδο κύησης που χρήζουν έντονης ομοιοστατικής ρύθμισης. **(6)**

ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ και ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΠΑΘΟΓΕΝΙΑΣ

Η υγιής και επιτυχής εγκυμοσύνη ξεκινά με την υγεία του ενδομήτριου όπως και του γυναικείου σώματος που θα φιλοξενήσει το αναπτυσσόμενο έμβρυο. **(10)** Η επιτυχία απορρέει από την αλληλεπίδραση ενός ικανού εμβρύου και ενός δεκτικού ενδομητριακού περιβάλλοντος, με την άριστη ρύθμιση των ανοσιακών αποκρίσεων, την στελέχωση των σωστών κυτταρικών πληθυσμών και ιδανικά την απουσία εξωγενών παθογόνων όπως λοιμογόννοι μικροοργανισμοί.

Όπως είναι λογικό, ο συντονισμός των παραπάνω διεργασιών συχνά παρεκκλίνει από το βέλτιστο, δημιουργώντας την ανάγκη αντιστάθμισης παραγόντων που έχουν αρνητική επίδραση στην εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και στην σωματική ακεραιότητα της μητέρας.

Με την πρόοδο της επιστήμης, έχουν ταυτοποιηθεί παράγοντες που επιδρούν άμεσα στην γυναικεία υπογονιμότητα όπως η ενδομητρίωση και οι διαταραχές των σαλπίγγων. Ωστόσο παρατηρούνται και επιπρόσθετες αιτίες που εντείνουν το ζήτημα και οδηγούν σε ανεξήγητη ή αλλιώς ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Στη συνέχεια αναλύονται δύο βασικοί όροι-πυλώνες που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των εκδηλώσεων υπογονιμότητας που κατηγοριοποιούν γενικευμένα τα χαρακτηριστικά που θα οδηγήσουν σε αρνητικά αποτελέσματα κατά την κύηση.

A. Ανεξήγητη Υπογονιμότητα

Με μία ανασκόπηση στα υπάρχοντα επιστημονικά και κλινικά ευρήματα, προσεγγιστικά, το 16% των περιπτώσεων υπογονιμότητας κατατάσσονται υπό το φάσμα της ανεξήγητης υπογονιμότητας (unexplained infertility UI). Πρόκειται για μία πολυπαραγοντική παθολογία κατάσταση, η οποία όσων αφορά την ανοσιακή ομοιόσταση φαίνεται να συσχετίζεται με την μειωμένη ανοσιακή εμβρυϊκή ανοχή του μητρικού αναπαραγωγικού συστήματος με διατάραξη της συγκρότησης της προσαρμοστικής ανοσίας. **(5)**

Άλλες πιθανές συνιστώσες που επιβαρύνουν την αρνητική πρόγνωση είναι η παρουσία αυτοάνοσων νοσημάτων, τα οποία κατ' επέκταση θα προκαλέσουν την

αποσταθεροποίηση της ανοσορύθμισης του ενδομήτριου, **(11)** ή η πιθανή λοίμωξη λόγω διατάραξης του ενδομητριακού μικροβιώματος. Συγκεκριμένα, αναφέρεται πως η δυσβίωση μικροοργανισμών στο περιβάλλον του ενδομήτριου συχνά οδηγεί σε έκκριση περίσσειας φλεγμονωδών κυτταροκινών υπονομεύοντας τη γονιμότητα της γυναίκας. **(12)** Συμπερασματικά, το φαινόμενο ανεξήγητης υπογονιμότητας είναι μια δυσχερής κατάσταση εξίσου για την διάγνωση από τον ιατρικό κλάδο και για την αντιμετώπιση του από το άτομο που επιθυμεί να κυφορήσει. Η δυσκολία πηγάζει από την πολύπλευρη φύση της νόσου παρόλη την αύξηση των διαγνωστικών εργαλείων. **(13)**

B. Καθ' ἑξιν Αποβολές

Ετυμολογικά, οι καθ' ἑξιν αποβολές περιγράφουν τα επάλληλα αρνητικά αποτελέσματα δύο ή περισσότερων εγκυμοσύνων πριν τις 20 ή 24 εβδομάδες κύησης σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρία Εμβρυολογικής Ιατρικής που μαστίζουν το 2-5% των γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία. **(14)** Το φαινόμενο χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθές ή δευτεροπαθές αναλόγως εάν η γυναίκα έχει ήδη κυφορήσει επιτυχώς σε κάποιο προπορευόμενο χρονικό πλαίσιο. **(2)** Επιπλέον, οι επαναλαμβανόμενες αποβολές (recurrent pregnancy loss, RPL) μπορούν να συσχετιστούν με γενετική προδιάθεση, ανισορροπία του γυναικείου ουρογεννητικού συστήματος, ενδοκρινικές ανοσολογικές, ανατομικές και περιβαλλοντικές διαταράξεις ενώ σημαντικό μερίδιο ευθύνης αποδίδεται και στην χρωμοσωμική και ανατομική ανωμαλία που φέρει το εκάστοτε δημιουργούμενο έμβρυο. **(14)** Πρόκειται για μία συχνή αναπαραγωγική νόσο της οποίας η έκφραση διαφέρει και οι ταυτοποιημένες μεταβλητές που την προκαλούν βρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση.

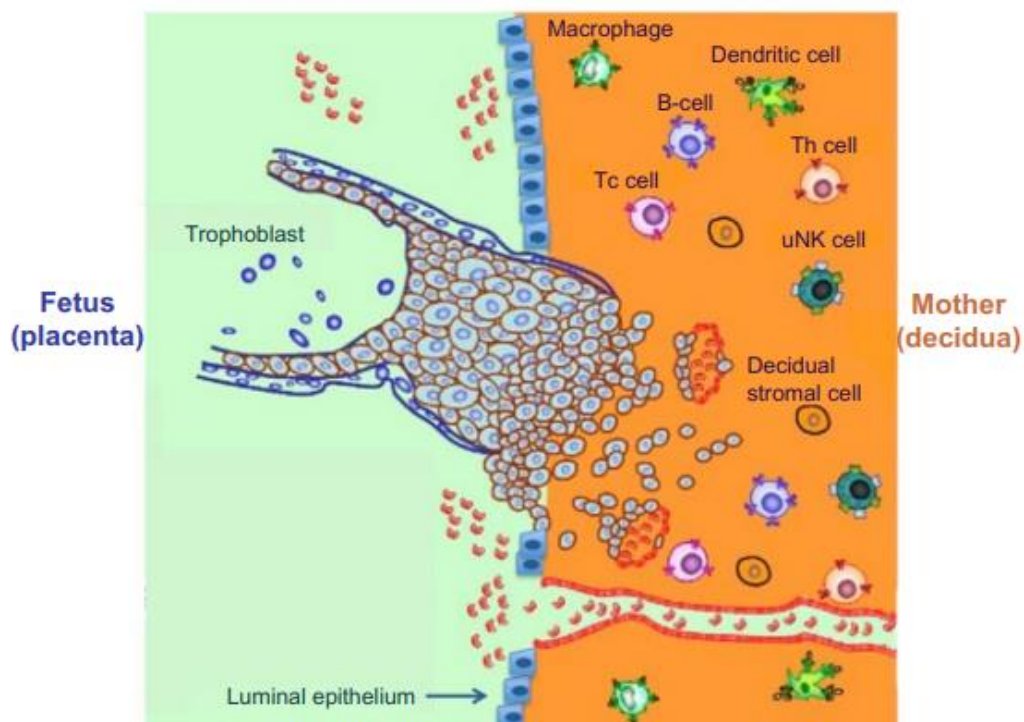
Γ. Συσχέτιση των δύο φαινομένων

Τα δύο φαινόμενα παθογένειας εμφανίζουν σημαντικά κοινά ανοσολογικά και ενδομητριακά γνωρίσματα, δημιουργώντας δυσκολία στον αυτόνομο χαρακτηρισμό τους. Τα βασικά κοινά χαρακτηριστικά τους αφορούν την εκτεταμένη κυτταροτοξικότητα λόγω διαταραγμένης ανοσορύθμισης του περιβάλλοντος **(15)** που επιδρά τόσο στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας όσο και σε αυτά της προσαρμοστικής. Επιπλέον, θετικές συσχετίσεις των δύο νόσων έχουν γίνει με φαινόμενα όπως χρόνια ενδομητρίτιδα, η οποία είναι σαφές πως υποδηλώνει την απορρύθμιση των μεταβολών μεταξύ προ- και αντί-φλεγμονώδους περιβάλλοντος, ενισχύοντας τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης, ή για όσο δεν καταλήγει σε αποβολή. **(16)**. Τέλος ένας παράγοντας που μπορεί να διεγείρει τόσο την αδυναμία σύλληψης όσο και τις επάλληλες αποβολές φαίνεται να είναι η πιθανότητα ιικής λοίμωξης που όπως προηγουμένως θα εντείνει την φλεγμονή σε βαθμό που θα προκαλέσει τη μη προσκόλληση ή αποκόλληση του αναπτυσσόμενου εμβρύου. **(17)**

Αναφορικά με τις ειδοποιούς διαφορές των δυσμενών καταστάσεων, η ακριβής συμπτωματολογία που διαχωρίζει τις δύο εκφάνσεις παθογένειας δεν γίνεται να

διαχωριστεί και να ταυτοποιηθεί πλήρως, μέχρι πρότινος, λόγω έντονης αλληλοεπικάλυψης των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα και συντελούν στην αρνητική έκβαση της εγκυμοσύνης. Για την απλοποίηση των όρων αντιλαμβανόμαστε πως οι επαναλαμβανόμενες αποτυχίες για εγκυμοσύνη συνοδεύονται από ένα αρχικό θετικό αποτέλεσμα το οποίο λόγω πληθώρας παραγόντων ανατρέπεται ενώ η ανεξήγητη υπογονιμότητα περιγράφει την αδυναμία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος να προβεί σε επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου συγκλίνοντας σε αυτόματη αποβολή του. Επομένως τα ευρήματα υποδεικνύουν πως η ανεξήγητη υπογονιμότητα αναφέρεται στην πρωταρχική φάση εμφύτευσης του ενδομήτριου, η οποία αποτυγχάνει λόγω ανοσοανισορροπίας ενώ οι επαναλαμβανόμενες αποβολές σχετίζονται με βαθύτερες και συστηματικές διαταραχές της ανοσορύθμιση με έντονα κυτταροτοξικά αποτελέσματα και την συνύπαρξη χρόνιας φλεγμονής ή αυτοανοσίας.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΗΣΗ



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της ανθρώπινης εμβryo-μητρικής διεπαφής με την εμφάνιση των κυτταρικών πληθυσμών του μητρικού ανοσοποιητικού συστήματος, Πηγή: Morelli S, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology*

Η ομαλή μετάβαση των σταδίων της εγκυμοσύνης ρυθμίζεται όπως έχουμε προαναφέρει στην συντονισμένη δράση κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος του ενδομήτριου, διευθύνοντας με επιμέλεια και λεπτομέρεια κάθε διαδικασία που πραγματοποιείται. Οι πρωταγωνιστικοί κυτταρικοί τύποι κατά την διαδικασία της κύησης είναι τα NK φυσικά φονικά κύτταρα, τα Μακροφάγα που προκύπτουν από την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, τα Δενδριτικά κύτταρα DCs και τελικά μεγάλο πλήθος T λεμφοκυττάρων, ενώ εντοπίζονται και μικρά ποσοστά B λεμφοκυττάρων, ενδογενών λεμφοειδών κυττάρων ILCs και μαστοκύτταρα. Επομένως, γίνεται η πλήρης ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων που υπηρετούν τους μηχανισμούς έμφυτης ανοσίας, γεγονός που οφείλεται στις ανάγκες του οργανισμού για άμεση απόκριση στην αναγνώριση το ημι-αλλογενοούς εμβρύου και για ανοσοεπιτήρηση του χωρίς την έκφραση επιθετικότητας. Παρακάτω συνοψίζεται το σύνολο των βασικών κυτταρικών τύπων καθώς και η συμβολή τους σε σηματοδοτικά μόρια όπως κυτταροκίνες και χημειοκίνες στα πλαίσια μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης.

Πίνακας 1: Βασικοί Κυτταρικοί Πληθυσμοί και Χαρακτηρισμός τους στο συντονισμό της φυσιολογικής κύησης

Κυτταρικός πληθυσμός	Λειτουργία	Εκκρινόμενα μόρια
Φυσικά Φονικά κύτταρα 25-40% περιεμφυτευτικά, 70% στο 1 ^ο τρίμηνο	Επιτυχία Εμφύτευσης, Διαμόρφωση πλακούντα, Αγγειογένεση και Παραγωγή κυτταροκινών	Κυτταροκίνες, Χημειοκίνες, Αγγειογενετικοί Παράγοντες, Ανοσορυθμιστικά μόρια
Μακροφάγα 20-25% Αποτέλεσμα διαφοροποίησης μονοκυττάρων	Προστασία εμβρύου, εμβρυομητρική ανοχή, φαγοκυττάρωση, έκκριση κυτταροκινών	Ανοσορυθμιστικά και Αντιφλεγμονώδη μόρια
Δενδριτικά Κύτταρα, DCs 1-2%	Αντιγονοπαρουσίαση για διαμόρφωση του πλακούντα και ανοσιακής ανοχής σε συνεργασία με TH2/TH2/TRegs T cells	Χημειοκίνες CCL2, κυτταροκίνη MIC-1, HLA-G
Ενδογενή Λεμφοειδή Κύτταρα, ILCs	Ρύθμιση φλεγμονώδων αποκρίσεων και ακεραιότητας του βλεννογόνου	IL-22
T λεμφοκύτταρα 10-20%		
TRegs ρυθμιστικά	Καταπράυνση ανοσολογικών φλεγμονώδων αποκρίσεων	Ανοσοκατασταλτικά μόρια: IL-10, TGF-β, PD-L1, περφορίνες κ.α.
Υποπληθυσμοί CD4+ T βοηθητικών Th1/Th2/Th17/TFH	Συμβολή στην εγκόλπωση του εμβρύου στο ενδομητριάκο επιθήλιο και προσαρμογή της ανοσορύθμισης	Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες: IL-1, IL-6, IL- 8, INF-γ και TNF-α (Th1) Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες: IL-4, IL-5, IL- 10 και IL-13 (Th2)
Κυτταροτοξικά CD8+ T λεμφοκύτταρα	Προστασία από λοιμώξεις και διατήρηση ανοχής	IL-10 και μικρές ποσότητες πεπτικών ενζύμων όπως περφορίνη
γ/δ T κύτταρα ή διπλά αρνητικά (DN) CD4-CD8- T λεμφοκύτταρα	Ομοιόσταση ιστών; Ανοσολογική μνήμη;	IL-10, TGF-β για ανοσοτροποποίηση και προστασία της βλαστοκύστης, Helios

Πίνακας 2: Συμμετοχή έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας στα διαφορετικά στάδια της κύησης

Στάδιο	Έμφυτη/Φυσική Ανοσία	Επίκτητη/Προσαρμοστική Ανοσία
Περιεμφυτευτική Περίοδος	uNK	T Regs ρυθμιστικά
Πρώτο Τρίμηνο	uNK, M1 Μακροφάγα, Ουδετερόφιλα, Μονοκύτταρα	T κύτταρα, 5% των CD4+ είναι T Regs ρυθμιστικά
Δεύτερο Τρίμηνο	uNK, M2 Μακροφάγα, DCs	T κύτταρα: CD4+ βοηθητικά και CD8+ κυτταροτοξικά
Τρίτο Τρίμηνο	uNK, M2 Περιφερικά Μακροφάγα	Επικράτεια T λεμφοκυττάρων: TH2, T Regs, γ/δ double negative T κύτταρα
Τοκετός (25)	M1 μακροφάγα, μειωμένα uNK, Μαστοκύτταρα (26)	CD8+ T λεμφοκύτταρα

NK κύτταρα

Τα κύτταρα επιφορτισμένα με τις περισσότερες λειτουργίες κατά την ανοσορύθμιση της κύησης είναι τα Φυσικά Φονικά κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν από το πρωταρχικό στάδιο της επιτυχούς εμφύτευσης, στις δομικές τροποποιήσεις που επιδέχεται ο πλακούντας, στην αγγειογένεση στον ιστό και τελικά στην προστασία του γονιμοποιημένου ωαρίου που πρόκειται να αναπτυχθεί. Δύο βασικές υποκατηγορίες φέρεται να εμφανίζονται στον ενδομητριάκο χώρο:

- NK κύτταρα της περιφέρειας (peripheral NK, pNK) και
- NK της μήτρας (uterine NK) ή αλλιώς desidual NK (dNK, γιατί εντοπίζονται στον φθαρτό υμένα του ενδομήτριου) και endometrial NK (eNK, σε άνιση κατανομή στο ενδομήτριο)

Τα pNKs δημιουργούν αλληλεπίδραση με μόρια προσκόλλησης στον φθαρτό υμένα κατά την είσοδο του εμβρύου και παρέχουν κυτταροτοξική δράση έναντι σε παράγοντες που ενδέχεται να βλάψουν την ακεραιότητα του εμβρύου.

Τα dNKs χαρακτηρίζονται ανοσοφαινοτυπικά ως CD56^{bright}CD16⁻ και από την έντονη έκφραση CD56 συμπεραίνουμε πως ο ρόλος τους είναι κυτταροπροστατευτικός και ευεργετικός για την εμφύτευση του εμβρύου. Τα dNKs μπορούν να ρυθμίσουν την προσβολή του εξωτερικού βλεννογόνου του

ενδομήτριου με σκοπό την εγκόλπωση του εμβρύου ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν την κυτταροτοξικότητα της περιοχής για να πραγματοποιηθεί η αναδιαμόρφωση του περιβάλλοντος, με την δημιουργία νέου αγγειακού συστήματος. Επιπλέον, αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο ενδομήτριο, όπως τα δένδριτικά DCs κύτταρα και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα, για την επαγωγή περιβάλλοντος ανοσοεπιτήρησης με μη-κυτταροτοξικούς μηχανισμούς. **(19,21,23)**

Τα eNKs εάν και μερικώς χαρακτηρισμένα, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση, καθώς, αν και ο εντοπισμός τους καθιστά δοκιμασία λόγω της διάσπαρτης έκφρασης τους, τα επίπεδα των κυττάρων αυξάνονται ραγδαία κατόπιν ωορρηξίας προετοιμάζοντας το ενδομήτριο για την υποδοχή του γονιμοποιημένου ωαρίου. **(18)**

Μακροφάγα

Αποτελούν τον δεύτερο πληθυσμό που απαντάται σε αφθονία στο ενδομητριακό μικροπεριβάλλον (φθαρτός υμένας ενδομήτριου) και χωρίζεται σε δύο βασικούς πληθυσμούς ανάλογα με την προ- και αντί- φλεγμονώδη δράση τους:

- M1 προφλεγμονώδη μακροφάγα: IL-12, IL-23, ενεργές ρίζες αζώτου (NO)
- M2 αντιφλεγμονώδη μακροφάγα: TGF-β, IL-10, IDO

Βασικός ρόλος των μακροφάγων που εγκαθίστανται στο περιβάλλον του ενδομήτριου κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης είναι η παρουσίαση αντιγονικών επιτόπων, οι οποίοι προέρχονται από το πατρικό γενετικό υλικό στα T κύτταρα που εποικίζουν στην επιφάνεια. Μέσω την αλληλεπίδρασης αυτής, η οποία επιτελείται από τον φλεγμονώδη υποκυτταρικό πληθυσμό M1 επιτυγχάνεται η μετρίαση της ανοσοαπόκρισης για το ημι-αλλογενές έμβρυο που έχει σχηματιστεί με την σταδιακή εξάπλωση της ανοσιακής εμβρυο-μητρικής ανοχής. Παράλληλα τα αντιφλεγμονώδη M2 κύτταρα φροντίζουν να διατηρούν ένα μη μολυσμένο περιβάλλον που θα φέρει σε κίνδυνο την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Στα δύο επόμενα αντιφλεγμονώδη στάδια του δεύτερου και τρίτου τριμήνου κύησης, τα M1 σταδιακά μειορρυθμίζονται και μετατοπίζονται σε περιφερικούς ιστούς για να αποτραπεί η επαγωγή μυϊκών συσπάσεων λόγω φλεγμονώδους ερεθίσματος. Τα επίπεδα έκφρασης τους είναι σταθερά μικρότερα έως ότου επέλθει η φάση του τοκετού, κατά την οποία μια νέα ανοσοαπόκριση επάγει φλεγμονή και στελέχωση των μακροφάγων ενεργοποιώντας διαδικασίες εξώθησης και μυϊκών συσπάσεων. **(19,20)**

Δενδριτικά Κύτταρα DCs

Μολονότι τα δενδριτικά κύτταρα δεν καταλαμβάνουν μεγάλη επιφάνεια του ενδομήτριου και εντοπίζονται μόλις σε ποσοστά 1-2%, ασκούν έντονη ανοσορύθμιση στα σημεία διεπαφής μητρικού σώματος και εμβρύου αποκαλύπτοντας την διλειτουργική φύση τους. Μέσω της αντιγονοπαρουσίασης που επιτελούν εκθέτουν εμβρυικά αντιγονικά θραύσματα. Αρχικά η ιδιότητα αυτή γίνεται σε άμεση επικοινωνία με τα Τ λεμφοκύτταρα προς ενεργοποίηση τους και επιβίωση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων (TRegs) ενώ με την εξέλιξη της εγκυμοσύνης στο δεύτερο τρίμηνο, τα DCs γεφυρώνουν την άμεση επικοινωνία μεταξύ NK και TRegs κυττάρων. Οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις έχουν απώτερο σκοπό την αποφυγή της μητρικής απόρριψης του εμβρύου λόγω εκδήλωσης επιθετικότητας προς τα ημι-άγνωστα αντιγόνα. (20) Η λειτουργία των DCs δεν περιορίζεται στην επικοινωνία κυτταρικών πληθυσμών αλλά βρίσκει άμεση εφαρμογή στις ανατομικές και μορφολογικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στο ενδομήτριο, με τη δημιουργία του φθαρτού υμένα και της θέσης εμφύτευσης του εμβρύου.

Ενδογενή Λεμφοειδή κύτταρα ILCs

Αποτελούν την ευρεία ILC οικογένεια κυτταρικών υποπληθυσμών από την οποία προκύπτει και ο βασικός και πιο άφθονος κυτταρικός τύπος που εμφανίζεται στην κύηση, τα NK φυσικά φονικά κύτταρα. (18) Τα κύτταρα ILCs του ενδομητριακού ιστού εμφανίζουν σχετική πλαστικότητα μεταξύ των υπότυπων τους και ο ρόλος τους δεν επεκτείνεται τόσο στην ανοσιακή απόκριση, όσο στην αναδιαμόρφωση του ιστού και στην διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης κατά την εγκυμοσύνη μέσω της διεπαφής του μητρο-εμβρυϊκού φραγμού.

Τ λεμφοκύτταρα

Τ λεμφοκύτταρα εντοπίζονται σε σημαντικά επίπεδα, συντελώντας το 10-20% του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού πληθυσμού στο ενδομητριακό περιβάλλον. Σε μια ευρεία εικόνα, βασική λειτουργική δράση των Τ κυττάρων είναι η διεκπεραίωση την εμβryo-μητρικής ανοχής.

CD4+ Βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα

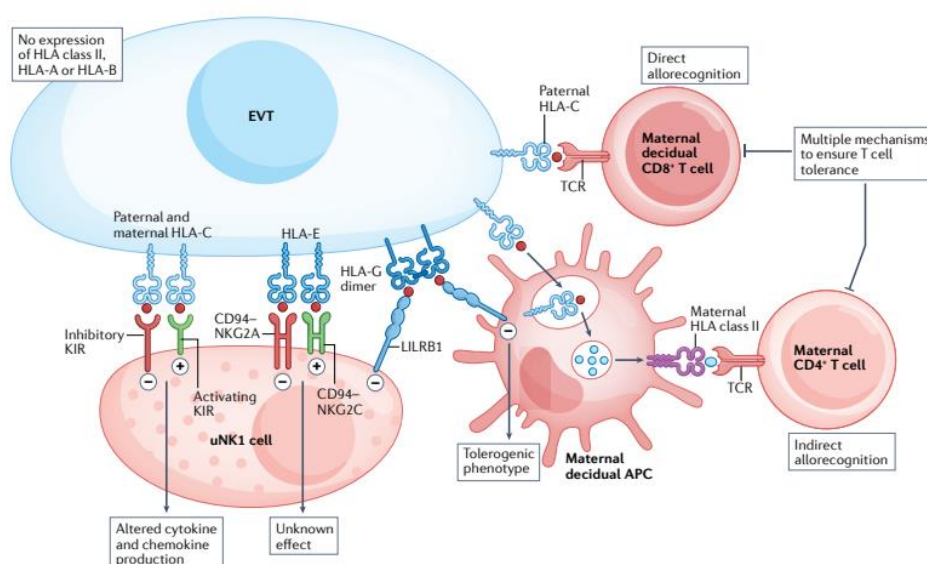
Τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα προάγουν την ισορροπία μεταξύ φλεγμονής και ανοχής στο ενδομητριακό μικροπεριβάλλον. (23) Οι βασικοί υποπληθυσμοί είναι αυτοί των Th1, Th2 και Th17, οι οποίοι συμβάλλουν την έκκριση εξίσου προ- και αντι- φλεγμονώδων κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6, IL-8, INF-γ και TNF-α (φλεγμονώδεις) και IL-4, IL-5, IL-10 και IL-13 (αντιφλεγμονώδεις)

CD8+ Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα

Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν κυτταροτοξική λειτουργία σε συνδυασμό με την έκκριση κυττοκινών όπως IFN- γ και IL-8 γεγονός που συμβάλλει στην δεκτικότητα της τροφοβλάστης του ενδομήτριου όταν έρθουν σε επαφή με το έμβρυο και στην προστασία από ιική μόλυνση. Ο κλασικός μηχανισμός δράσης εμφανίζεται τροποποιημένος καθώς η ανοσοεπιτήρηση του συστήματος εμφύτευσης έχει μεγαλύτερη βαρύτητα από την κυτταροτοξικότητα σε αυτό το στάδιο.

CD4+ Ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα

Βασικός κυτταρικός πληθυσμός των CD4+ Τ λεμφοκυττάρων είναι αυτός των TRegs ή αλλιώς Τ ρυθμιστικών κυττάρων, τα οποία επάγουν τον βασικό μηχανισμό ανοχής του εμβρύου. (22) Τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα ταυτοποιούνται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FOXP3 και του μεμβρανικού υποδοχέα IL-2, CD25, διαδραματίζοντας πρωταγωνιστικό ρόλο στην συντήρηση της ανοχής. Η τροποποιημένη καταστολή των ανοσιακών αποκρίσεων στο ενδομήτριο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία στο ισοζύγιο μεταξύ των υποπληθυσμών Th1, Th2, Th17 και Tregs προκειμένου να ευοδωθεί η εμβρυϊκή εμφύτευση. Η έκκριση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων αποσκοπεί συμπερασματικά στην άλλο-αναγνώριση των εμβρυϊκών αντιγόνων για την καταπράυνση της ανοσοαπόκρισης, με τα επίπεδα του να διαβαθμίζονται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. (23,24)



Εικόνα 3: Αλληλεπιδράσεις των μορίων HLA τάξης της τροφοβλάστης με τα μητρικά κύτταρα του ανοσοποιητικού για την άλλο-αναγνώριση του εμβρύου και την δημιουργία εμβryo-μητρικής ανοχής. Πηγή: Moffett, A., Shreeve, N. Local immune recognition of trophoblast in early human pregnancy: controversies and questions. *Nat Rev Immunol* **23**, 222–235 (2023)

DN T ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα διπλά αρνητικά T λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την απουσία των κλασσικών συνυποδοχέων των T λεμφοκυττάρων CD4 και CD8, εξού και ο ανοσοφαινότυπος του υποπληθυσμού CD4-CD8-. Ωστόσο εκφράζουν τον TCR υποδοχέα, οποίος ανάλογα με τις αλυσίδες από τις οποίες συγκροτείται μπορεί να είναι α/βTCR ή γ/δTCR. Τα DN T cells εντοπίζονται σε μικρές ποσότητες στο περιφερικό αίμα καθώς και σε δευτερογενή λεμφικά όργανα όπως οι βλεννογόνοι του ενδομήτριου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός πως στους ιστούς του ενδομητριακού περιβάλλοντος και στον πλακούντα τα DN T cells λειτουργούν ρυθμίζοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις, ωστόσο ο πλήρης χαρακτηρισμός τους δεν έχει γίνει ακόμα.(27) Με την διατήρηση ισορροπίας στο ενδομήτριο προσφέρουν την δυνατότητα ανοσολογικής ανοχής και κυτταροπροστασίας του αναπτυσσόμενου εμβρύου, διευθύνοντας ουσιαστικά την ενορχήστρωση και των υπόλοιπων εμφανιζόμενων κυτταρικών υποπληθυσμών. Ωστόσο φαίνεται πως ο ρόλος των κυττάρων είναι διττός με αναφορές να εκφράζουν είτε τον ανοσορυθμιστικό χαρακτήρα τους με την έκκριση κυτταροκινών όπως IL-10 ή TGF-β, είτε τον φλεγμονώδη που έχει συσχετιστεί με αυτοδραστικότητα και έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων. (28)

Ένα ακόμα αμφιλεγόμενο ζήτημα που απασχολεί τον επιστημονικό κλάδο είναι η φύση των κυττάρων αυτών όσον αφορά την ανοσολογική μνήμη. Υποστηρίζεται πως τα DN T λεμφοκύτταρα είναι θυμικά, ωστόσο δεν υπάρχουν πρόσφατες μελέτες σε ανθρώπινο δείγμα που να επιβεβαιώνουν την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Οι ενδείξεις που υποστηρίζουν τα μνημονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, πρώτον είναι η έλλειψη πολυκλωνικότητας των TCR υποδοχέων που φέρουν, **(29)** δεύτερον, οι δείκτες ανοσολογικής μνήμης που εντοπίστηκαν σε περάματα σε τρωκτικά, **(30)** και τρίτον, η έκφραση μορίων που τυπικά συσχετίζονται με τις T μνημονικές αποκρίσεις όπως CD45RA/CD27/CD28/CCR7/Helios **(31)**

ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ

Η παθολογία ενός κύκλου εγκυμοσύνης δεν θα μπορούσε να μη συμπεριλαμβάνει την διατάραξη της ισορροπίας στην ανοσορύθμιση του ενδομητριακού περιβάλλοντος, με έντονα δυσμενή αποτελέσματα που συχνά καταλήγουν στην αποτυχημένη προσπάθεια σύλληψης εμβρύου. Οι εκφάνσεις παθογένειας και ανοσοανισορροπίας πιθανά είναι πολλές, όμως η διπλωματική εργασία επικεντρώνεται επί του παρόντος στον χαρακτηρισμό των DN T λεμφοκυττάρων και στην συσχέτιση τους με άλλους T κυτταρικούς υποπληθυσμούς όπως τα CD8+ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα.

Το φαινόμενο αυτοδραστικότητας των double negative T λεμφοκυττάρων φέρει ελλιπή αποδεικτικά στοιχεία καθώς τα αποτελέσματα εκπονήθηκαν από μελέτες σε δείγματα ανώτερων θηλαστικών και δίνει την ευκαιρία για περαιτέρω ανάλυση στη παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα το προφίλ αυτοανοσίας προκύπτει από δείκτες που αναφέρονται στα υπάρχοντα δεδομένα και κάνουν λόγο για συνύπαρξη των ρυθμιστικών ιδιοτήτων (IL-10, TGF- β) των κυττάρων, της ανοσολογικής μνήμης (CD45RA/CD27/CD28/CCR7) αλλά και την έκφραση δεικτών αυτό-αντίδρασης όπως είναι οι PD-1 και Helios.

Η στόχευση των δράσεων των DN T λεμφοκυττάρων στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, αποτελεί ανερχόμενο αλλά καίριο μέρος της ανοσιακής συγκρότησης κατά την κύηση, το οποίο δεν έχει αναλυθεί σε βάθος και πιθανά μπορεί να αποδώσει σημαντικά αποτελέσματα για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς δείκτες.

ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πειραματικής διπλωματικής εργασίας είναι ο περαιτέρω χαρακτηρισμός του ανοσολογικού περιβάλλον καθώς και των αποκρίσεων του όπως εμφανίζονται σε δείγματα ενδομήτριων γυναικών που αντιμετωπίζουν παθολογία κατά την σύλληψη. Οι γυναίκες βιώνουν αναπαραγωγικές δυσκολίες υπό τη μορφή καθ' έξιν αποβολών ή ανεξήγητης υπογονιμότητας αποτελούν τα condition δείγματα, τα οποία συγκρίνονται με τα control δείγματα, δηλαδή δείγματα ενδομήτριου από γυναίκες που δεν αντιμετώπισαν κάποια εκδήλωση διαταραχής υπογονιμότητας. Η προπτυχιακή εργασία αποτελεί φυσική συνέχεια μιας προπορευόμενης μεταπτυχιακής διπλωματικής στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, στην οποία έγινε μια αρχική ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος στο ενδομητριο περιβάλλον γυναικών με αναπαραγωγικές διαταραχές. Τα ευρήματα που θα αποκομίσουν οι έρευνες αυτές είναι καίριας σημασίας καθώς τα περισσότερα ήδη υπάρχοντα δεδομένα έχουν προκύψει από αναλύσεις ζωικών δειγμάτων όπως σε τρωκτικά ή βοοειδή, δηλαδή σε ανώτερα θηλαστικά εκτός του ανθρώπου. Λόγω των ελλείπων στοιχείων δώθηκε η έμφαση της παρούσας προπτυχιακής έρευνας στον χαρακτηρισμό των Double Negative T λεμφοκυτταρικού υποπληθυσμού, ενός σχετικά πρόσφατα εξεταζόμενου κυτταρικού συνόλου, του οποίου ο ρόλος και οι ιδιότητες δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι χαρακτηρισμοί επιδιώκουν την ποσοτικοποίηση των ανιχνευόμενων κυτταρικών τύπων καθώς και των μορίων που αυτά εκκρίνουν.

Μέσω της ενδελεχούς ταυτοποίησης του ανοσιακού ενδομητριο μικροπεριβάλλοντος, προσφέρεται η δυνατότητα για βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στο ανθρώπινο ενδομήτριο αλλά και για την επίτευξη βελτιστοποίησης των συνθηκών που θα επιφέρουν θετικά αποτελέσματα σε προσπάθεια κύησης. Επιπρόσθετα, τα σταθερά εμφανιζόμενα ευρήματα είναι ικανά να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες για την λειτουργία του ανθρώπινου ενδομητρίου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η ανάλυση των εισερχόμενων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω την μεθόδου Κυτταρομετρίας Ροής. Η χρήση της μεθόδου επιτρέπει την ανίχνευση μορίων της κυτταρικής επιφάνειας των υπό ανάλυση κυττάρων. Μέσω της μεθόδου, γίνεται δυνατή η ταυτοποίηση υποσυνόλων του ενιαίου μίγματος που επιτρέπει την μετέπειτα απομόνωση και κατηγοριοποίηση τους. Η ανίχνευση των μορίων γίνεται με τη χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων σε σύζευξη με πληθώρα φθοριοχρωμάτων. Η ειδικότητα της σχέσης αντιγόνου-αντισώματος που εκμεταλλεύεται η μέθοδος επιτρέπει στην στόχευση πολύ συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που αξιοποιούνται ως διαγνωστικοί παράγοντες και όχι μόνο σε κλάδους όπως βιολογία, ανοσολογία, ιατρική και βιοτεχνολογία.

Βασικές προϋποθέσεις για την διεξαγωγή της πολυχρωματικής κυτταρομετρίας ροής είναι πρώτον η μετατροπή του δείγματος σε εναιώρημα ώστε κάθε κύτταρο να διαπερνά το σύστημα ανάλυσης ως μονάδα (event) και δεύτερον, η άσκηση υδροδυναμικής εστίασης για την διαδοχική δίοδο των μονάδων από την πηγή φωτός. Όσον αφορά το σύστημα ανάλυσης, πρόκειται για μια δέσμη φωτός η οποία, προσπίπτοντας στο μόριο προκαλεί σκεδασμό. Τα δύο βασικά είδη σκεδασμού είναι:

1. Πρόσθιος σκεδασμός (FSC – forward scatter): ο ανιχνευτής είναι στην ίδια διεύθυνση με την δέσμη φωτός. Είναι δηλωτικός του μεγέθους των μορίων.
2. Πλάγιος σκεδασμός (SSC – side scatter): ο ανιχνευτής βρίσκεται σε κάθετη κατεύθυνση από την πηγή φωτός. Οι ενδείξεις του αντιπροσωπεύουν την κοκκίωση/εξωτερική πολυπλοκότητα των μορίων.

Συμπληρωματικά των παραμέτρων FSC και SSC, ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος ανίχνευσης των μορίων. Ο τρόπος απορρόφησης του προσπίπτοντος φωτός και αντίστοιχης εκπομπής του ποσοτικοποιείται μέσω σειράς φίλτρων που διαθέτει το κυτταρόμετρο, τα οποία έχουν την ικανότητα να απομονώσουν τα μήκη κύματος του εκπεμπόμενου φωτός και τελικά να αποδώσουν τις τιμές για κάθε μήκος κύματος. Την ιδιότητα αυτή αξιοποιούν οι ερευνητές για να ανιχνεύσουν ταυτοχρόνως διαφορετικά συστατικά του αναλυόμενου μορίου με επιλογή φθοριοχρωμάτων που εμφανίζουν την μικρότερη δυνατή αλληλοεπικάλυψη στο εύρος εκπομπής τους κατά τον σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου κυτταρομετρίας.

Η κατηγοριοποίηση των αναλυόμενων μορίων γίνεται με την μέθοδο gating, όπου απομονώνεται και εστιάζεται ένας συγκεκριμένος εμφανιζόμενος πληθυσμός κυττάρων στα γραφήματα κυτταρομετρίας καταλήγοντας έτσι στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Με την συνεχή εξέλιξη της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής επιτυγχάνεται ο συνδυασμός των καινοτόμων τεχνικών ανίχνευσης των προς εξέταση μορίων με την αναβάθμιση των τεχνικών και υλικών μέσων. Ως αποτέλεσμα, η κυτταρομετρία ροής αποτελεί σημαντικό εργαλείο για το «οπλοστάσιο» των ερευνητών σε κλάδους της βιολογίας, ανοσολογίας αλλά και φυσιολογίας. Η ανάλυση σε επίπεδο κυττάρου γίνεται ολοένα και πιο λεπτομερής με την συλλογή δεδομένων από πολύπλοκα μίγματα φθοριωχρωμάτων που καταφέρνουν να διακρίνουν ακόμα και τους πιο μικρούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς χωρίς την ανάγκη φυσικού διαχωρισμού. (32),(33)

2. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – ΕΥΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν πληρούσαν ορισμένες προϋποθέσεις με την πληθυσμιακή ομάδα γυναικών να φέρει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία
- Παρατηρήθηκαν καθ' έξιν αποβολές ή φαινόμενα ανεξήγητης υπογονιμότητας
 - Αποτυχημένες προσπάθειες εμβρυομεταφοράς σε κύκλους IVF
- Απουσία ανατομικών αλλοιώσεων στο ενδομήτριο
- Απουσία ορμονικών διαταραχών, καρυοτυπικών βλαβών, ενδομητρίωσης και λοιμώξεων
- Εύρος ηλικίας των γυναικών της έρευνας στα 18 έως 50 έτη με μέση ηλικία τα 36,5 έτη
- Συνολικά συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν 46 δείγματα από βιοψίες ενδομητρίου, από τα οποία, τα 12 δείγματα αποτελούσαν τους control, θετικούς μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να συγκριθούν με τα υπόλοιπα 34 παθολογικά δείγματα. Από τα υπολειπόμενα, τα 24 δείγματα προέρχονται από γυναίκες που βίωσαν καθ' έξιν αποβολές, ενώ τα τελευταία 10 αφορούν τις περιπτώσεις ανεξήγητης υπογονιμότητας.

3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα μηχανήματα και τα όργανα που αξιοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραματικών πρωτοκόλλων της επικείμενης πτυχιακής εργασίας παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 1

Πίνακας 3: Μηχανήματα και εργαστηριακά όργανα/υλικά για την περάτωση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας.

Εργαστηριακός Εξοπλισμός	Εταιρεία
Μηχανήματα	
Κυτταρόμετρο Navios EX Flow Cytometer	Beckman Coulter Life Sciences
Αναδευτήρας (Vortex)	Snijders
Φυγόκεντρος AFI Sirena Multilab Centrifuge	AFI Centrifuge
Κλίβανος Επώασης	Thermo Electron Corporation
Μηχανικές Πιπέτες (2-20μl, 10-100ml, 200-1000μl) αναρρόφησης	Gilson (pipetman), ELKay (EXELPETTE)
Αναλώσιμα Υλικά	
Πιπέτες Pasteur (ΠΟΥΑΡ)	
Σωληνάρια falcon 15mL	
Τρυβλία	
Νυστέρια	V&L (SHANGHAI) INTERNATIONAL INC.
Σύριγγες 5mL, 21G	Changzhou Tongda Medical Appliance Co., Ltd
Φίλτρο Filcon, non-sterile, syringe type	BD Biosciences
EDTA σωληνάριο συλλογής αίματος	RONGYE
Σωληνάριο συλλογής αίματος Ηπαρίνης	BD Vacutainer
Ρύγχη (Tips) μηχανικής πιπέτας (10μl, 20μl, 100-200μl, 1000μl)	GILSON, ThermoLabsystems, Expell

4. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας αναγράφονται στον παρακάτω Πίνακα 2, τα περιεχόμενα των τυποποιημένων kit αντιδραστηρίων στον πίνακα 3, ενώ τα χρησιμοποιούμενα αντισώματα αναλύονται στον Πίνακα 4

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια για την επεξεργασία των δειγμάτων ενδομήτριων

Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά	Εταιρεία
IMDM θρεπτικό υπόστρωμα	Lonza
HBSS ρυθμιστικό διάλυμα	GIBCO, Invitrogen life technologies
Liberase TM	Research Grade Roche
Αντισώματα	Beckman Coulter Life Sciences
Versalyse Lysing Solution	Beckman Coulter
PBS ρυθμιστικό διάλυμα	ThermoFisher Scientific
Fetal Bovine Serum (FBS)	
Kit αντιδραστηρίων DURAClone IM Treg	Beckman Coulter
Kit αντιδραστηρίων DURAClone IM T Cell Subsets	
Kit αντιδραστηρίων DURActive 1, 25 Tests RUO	
Kit αντιδραστηρίων DURAClone IF T Helper Cell	
Kit αντιδραστηρίων DURAClone IF T Cell Activation	
Flow-Check Pro Fluorospheres	
Kit αντιδραστηρίων PerFic-nc	
Water for injection – αποστειρωμένο νερό (Endotoxin free)	DEMO ABEE

Πίνακας 5: Kit αντιδραστηρίων για Κυτταρομετρία ροής

Kit	Αντιδραστήρια	Δείκτες	Χρήση
DURAClone IM Treg	Test tube 1, Test tube 2	CD3, CD4, CD25, CD39, CD45, CD45RA, FoxP3, HELIOS	Ταυτοποίηση ταυτόχρονης έκφρασης δεικτών σε TRegs και DNs (με προσθήκη CD8)
DURAClone IM T Cell Subsets	Dried reagents tube	CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45, CD45RA, CD57, CD197 (CCR7), CD279 (PD-1)	Χαρακτηρισμός των δεικτών στα DN υποπληθυσμό των κυττάρων
DURActive 1, 25 Tests RUO	Duractive tube: PMA/Ionomycin/Brefeldin		Μιτογόνος ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων
DURAClone IF T Helper Cell	T helper tube	CD3, CD4, IL-4, IL-17A, IFN γ	Ταυτοποίηση T βοηθητικών κυτταρικών υποληθυσμών
DURAClone IF T Cell Activation	T act tube	CD3, CD4, CD8, IL-2, IFN γ , IFN α ,	Χαρακτηρισμός έκφρασης κυτταροκινών στα DN
PerFic-nc	Buffer 1: Fixative Reagent, Buffer2: Permeabilizing Reagent, Buffer 3: Final 10x solution		Μονιμοποίηση των κυττάρων στο δείγμα

Η χρήση των παραπάνω τυποποιημένων αντιδραστηρίων έγινε κατόπιν ειδικής επεξεργασίας του κάθε δείγματος όπως θα αναλυθεί την επόμενη ενότητα. Μέσω των κιτ, τα μεμονωμένα tubes περιείχαν ήδη ένα αντισωματικό πάνελ με επιλεκτική χρήση αντισωμάτων, για την κατηγοριοποίηση των αναλυόμενων κυτταρικών υποπληθυσμών.

Πίνακας 6: Αντισώματα

Αντισώματα	Φθοριοχρώματα	Κλώνος	Ισότυπος	Πάροχος
CD3	AA750	UCHT1	IgG1 Mouse	Beckman Coulter
CD4	PC5,5	13B8.2		
	APC	13B8.2		
CD8	ECD	SFCI21Thy2D3		
	AA700	B9.11		
CD16	FITC	3G8		
CD19	APC	J3-119		
CD45	PC7	J33		
	KROME	J33		
CD3, CD1656 (antibody cocktail)	FITC, PE		IgG1 Mouse	
CD38	APC	LS198-4-3	IgG1 Mouse	
CD138	PE	B-A38		
CD152	PE	BNI3	IgG2a Mouse	
CD56	PC5,5	N901	IgG1 Mouse	
CD196/CCR6	PC7	B-R35	IgG2a Mouse	
CD62L	PB	DREG56	IgG1 Mouse	
HLA-DR	PB	Immu-357		
TCR PAN γ/δ	PE	IMMU510		

5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα περιλαμβάνουν βιοψίες από το ενδομήτριο των γυναικών που συμμετέχουν στην έρευνα, οι οποίες κατόπιν λήψης τοποθετούνται σε σωληνάρια falcon των 15mL σε θρεπτικό υλικό IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) για την διασφάλιση της ακεραιότητας τους κατά την μεταφορά στο ανοσολογικό εργαστήριο. Τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα αφού παραληφθούν τα δείγματα για την διατήρηση των κυττάρων τους.

1. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 1600rpm για 5' για την απομάκρυνση του IMDM. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ γίνεται ανασύσταση του ιζήματος με το εναπομένον υλικό σε αναδευτήρα (vortex)
2. Ακολουθεί η 1^η πλύση με HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), ένα ισότονο διάλυμα ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}) που αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα και συμβάλλει στην ήπια αποκόλληση των κυττάρων του δείγματος. Μέσω του HBSS, το pH και η οσμωτική πίεση του δείγματος διατηρούνται σταθερά. Το βήμα ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση 1600rpm/5', απόρριψη υπερκειμένου και vortex
3. Το βήμα μηχανικού τεμαχισμού πραγματοποιούταν εάν το εισερχόμενο δείγμα έχει έντονα συμπαγή ιστό ή περίσσεια βλέννης, γεγονός που καθιστά δύσκολη την απελευθέρωση των λευκών κυττάρων που μας ενδιαφέρουν. Κατά το βήμα αυτό, το επαναιωρημένο δείγμα τοποθετούνταν σε petri τριβλύο, όπου με αποστειρωμένο νυστέρι γινόταν η καταστροφή των συμπαγών τμημάτων. Στο τέλος επανατοποθετώ το δείγμα στο σωληνάριο.
4. Προσθήκη 5ml HBSS και 50 μl Liberase T (η αναλογία HBSS:Liberase αποσκοπεί σε τελική συγκέντρωση του μίγματος ενζύμων στα 5%). Η λιμπεράση είναι ένα μίγμα των καταλυτικών πρωτεϊνών κολλαγενάση I, κολλαγενάση II και θερμολυσίνη που επιτελεί την αποκυτταροποίηση του ιστού του ενδομητρίου βάση των πρωτεολυτικών ιδιοτήτων που έχει που το καθιστούν ικανό αποδιατακτικό σκεύασμα. Η επιτυχής δράση της λιμπεράσης επιτυγχάνεται με επώαση του δείγματος σε κλίβανο (37°C) για 45' με ήπια ανάδευση του ανά 20'.
5. Το falcon βγαίνει από τον επωαστήρα και ακολουθούν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις 1600rpm/5' που μεσολαβούνται από μια τελευταία πλύση, αυτή τη φορά με PBS (Phosphate Buffer Saline), ένα δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δημιουργούμενο ίζημα ανασυστάθηκε σε 2 ml PBS.
6. Τελικό βήμα της προετοιμασίας είναι το πέρασμα του δείγματος από ένα φίλτρο filcon, κατόπιν φόρτωσης του δείγματος σε ένεση όγκου 5ml. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση των υπολειπόμενων

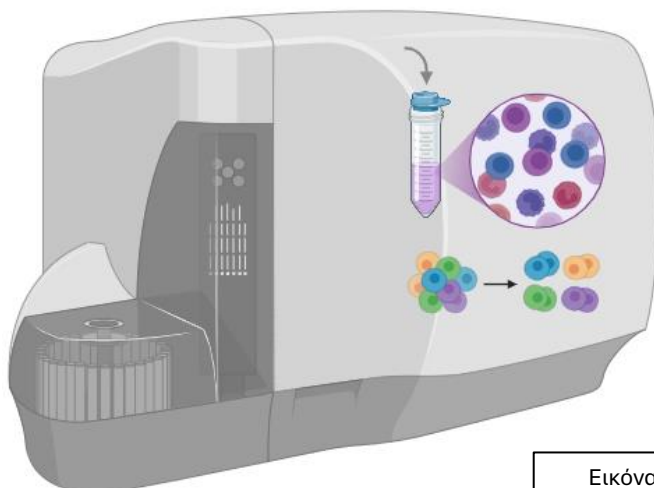
συσσωματωμάτων που θα εμποδίζουν την διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής.

7. Γίνεται η απομάκρυνση 700μl του έτοιμου δείγματος σε ένα φιαλίδιο EDTA (γενική αίματος), και κατόπιν αυτό είναι το μέρος που θα χρησιμοποιηθεί για τις διαγνωστικές μεθοδολογίες.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ

Για την ομαλή ροή των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο είναι απαραίτητες κάποιες ενέργειες που θα διασφαλίσουν την ορθή λειτουργία του μηχανήματος. Αυτές είναι:

1. Καθαρισμός του κυτταρόμετρου: Διαδικασία που λαμβάνει χώρα πριν και μετά την τοποθέτηση δειγμάτων προς ανάλυση στο κυτταρόμετρο. Συγκεκριμένα, προστίθενται 4 σωληνάρια στην καρουζέλα του κυτταρομέτρου, από τα οποία το 1^ο περιέχει χλωρίνη (10%) ενώ τα υπόλοιπα 3 έχουν αποστειρωμένο νερό (WFI: water for injection). Το βήμα αυτό εξασφαλίζει την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων από το σύστημα του κυτταρόμετρου για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων.
2. Flowcheck ή εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος των φθοριοχρωμάτων: Ο έλεγχος των ανιχνευτών φθοριοχρωμάτων του κυτταρομέτρου γίνεται με την χρήση του τυποποιημένου κιτ αντιδραστηρίων Flow-check pro fluorospheres. Πρόκειται για ένα μίγμα φθορίζοντων σφαιρών (beads) που χρησιμοποιείται πριν την ανάλυση των δειγμάτων (acquisition) και σκοπός του είναι η επιβεβαίωση του compensation που έχει γίνει στο μηχάνημα. Ο όρος compensation αναφέρεται στην σωστή απομάκρυνση των φασμάτων εκπομπής των φασμάτων εκπομπής των φθοριοχρωμάτων (μη αλληλοεπικαλυπτόμενα σήματα) που κατ' επέκταση διασφαλίζει τον διαχωρισμό των κυτταρικών υποπληθυσμών που έχουν σημειωθεί με διαφορετικό φθορίζον αντίσωμα.



Εικόνα: Κυτταρόμετρο, Πηγή: biorender.com

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1^η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ APLOS, PLASMA, NK CELLS, TCRγ/δ

Για τη πρώτη προσέγγιση προσδιορισμού των λευκοκυττάρων σε κάθε δείγμα που λήφθηκε, έγινε χρώση τους (staining) με μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές. Η μέθοδος επιλογής των κατάλληλων φθοριωχρωμάτων έχει αναλυθεί ήδη στα πλαίσια περιγραφής της πειραματικής αρχής της κυτταρομετρίας ροής και τα αποτελέσματα της συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 7: Πρωτόκολλα αντισωμάτων

	FITC	PE	EC D	PC5,5	PC7	APC	AA70 0	AA75 0	PB	KROM E
Tube 1: APLOS	CD3	CD16 56	CD 8	CD4	CD45	CD1 9				
Tube 2: PLASMA CELLS		CD13 8			CD45	CD3 8				
Tube 3: NK CELLS	CD1 6	CD15 2			CD196/C CR6	CD4	CD8	CD3	CD62 L	CD45
Tube 4: TCRγ/δ		TCRg d				CD4	CD8	CD3	DR	CD45

Κάθε σωληνάριο/πρωτόκολλο έχει σκοπό να χαρακτηρίσει ένα συγκεκριμένο εύρος κυτταρικών υποπληθυσμών και συνολικά οι 4 δοκιμασίες συντελούν το πρωταρχικό panel που επιτελείται για προσδιορισμό των συστατικών του δείγματος.

Πίνακας 8: Στόχος αντισωματικών πρωτοκόλλων

Πρωτόκολλο	Στόχος αντισωμάτων	Αποτέλεσμα
Tube 1: APLOS	CD45: Ταυτοποίηση λευκοκυττάρων (πάνλευκος δείκτης) CD3: Ταυτοποίηση T λεμφοκυττάρων (δομικό συστατικό του TCR) CD19: Ταυτοποίηση B λεμφοκυττάρων CD4: Ταυτοποίηση T βοηθητικών λεμφοκυττάρων CD8: Ταυτοποίηση T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων	Προσδιορισμός του ανοσοφαινότυπου του δείγματος με ποσοστιαία κατανομή των κυτταρικών τύπων και ανίχνευση DN
Tube 2: PLASMA CELLS	CD38/138: Προσδιορισμός πλασματοκυττάρων CD45: Τα ενεργοποιημένα ώριμα πλασματοκύτταρα εμφανίζουν μικρότερη έκφραση του CD45	Προσδιορισμός ποσοστού παρουσίας τελικώς διαφοροποιημένων B λεμφοκυττάρων: Πλασματοκύτταρα
Tube 3: NK CELLS	CD62L: Έκφραση από DN κύτταρα (L συλλέκτης: μόριο προσκόλλησης για μετακίνηση των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων) CD152: Προσδιορισμός έκφρασης από DN κύτταρα (αναστολέας της T απόκρισης) CD196/CCR6: Προσδιορισμός έκφρασης από DN κύτταρα (υποδοχέας συνδεδεμένος με G πρωτεΐνη, GPCR)	Ταυτοποίηση των NK κυττάρων του δείγματος βάση συνέκφρασης των CD16/CD56 και διερεύνηση παραγόντων έκφρασης από τα double negative T λεμφοκύτταρα
Tube 4: TCRγ/δ	TCR PAN γ/δ: Ανίχνευση της ετεροδιμερούς αλυσίδας γ/δ του υποδοχέα T λεμφοκυττάρων HLA-DR: υποείδος του γονιδίου HLA που κωδικοποιεί μόρια MCHII	Χαρακτηρισμός των DN (double negative-διπλά αρνητικών) T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα TCR με τις αλυσίδες γ/δ

Με το πρωτόκολλο του tube 1 πραγματοποιείται ο χαρακτηρισμός του συνολικού ανοσοφαινότυπου κάθε δείγματος, με ποσοστιαίο προσδιορισμό των λεμφοκυτταρικών κυτταρικών υποπληθυσμών ενώ ταυτόχρονα ανιχνεύονται τα επίπεδα double negative T λεμφοκυττάρων (CD4-CD8-). Το δεύτερο tube αφορά τη συσχέτιση μεταξύ των εμφανιζόμενων T και B λεμφοκυττάρων καθώς και ο ποσοστιαίος έλεγχος της ωρίμανσης των B λεμφοκυττάρων, με εμφάνιση πλασματοκυττάρων (CD38+CD138+) ή ώριμων παρθένων B λεμφοκυττάρων (CD45+). Με τα δύο τελευταία πρωτόκολλα επιχειρούμε να προσδιορίσουμε τα μοτίβα πρωτεϊνικής έκφρασης των DN κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, εκτός από

την ταυτοποίηση της γ/δ αλυσίδας του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (TCR), ερευνούμε την ύπαρξη των μορίων L-σελεκτίνη (CD62L), υποδοχέας χημειοκινών CCR6 (CD196), CTLA-4 (πρωτεΐνη 4 που σχετίζεται με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα-CD152) και HLA-DR (γονίδιο που εκφράζεται για παραγωγή μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II). Μέσω του πάνελ αυτών των πρωτοκόλλων μπορούμε να χαρακτηρίσουμε την μορφή και τη λειτουργία των διπλά αρνητικών T λεμφοκυττάρων.

Όσων αφορά την διαδικασία προετοιμασίας των πρωτοκόλλων, πραγματοποιήθηκαν τα εξής βήματα:

1. 100μl του δείγματος σε EDTA, προστίθενται σε κάθε tube που έχουμε προετοιμάσει
 - Για τις χρωστικές FITC και PE χρησιμοποιούμε τις διπλάσιες ποσότητες συγκριτικά με τα υπόλοιπα φθοριωχρώματα (10μl FITC, PE: 5μl ECD, PC5,5, PC7, APC, AA700, AA750, PB, KROME)
2. Ακολουθεί επώαση του δείγματος για 15' με τα αντισώματα για την ειδική σύνδεση τους σε περιβάλλον με χαμηλό/καθόλου φωτισμό λόγω φωτοευαισθησίας των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται.
3. Σε κάθε σωληνάριο χορηγείται 1ml Versalyse Lysing Solution, το οποίο αποσκοπεί στην λύση των ερυθροκυττάρων για τον αδιάκοπο χαρακτηρισμό των λευκοκυττάρων και την αποφυγή «θορύβου» λόγω αυτοφθορισμού κατά την κυτταρομετρία ροής (background noise). Επώαση με το λυτικό διάλυμα για 15'.
4. Τα δείγματα είναι έτοιμα για ανάλυση στο κυτταρόμετρο.

2^η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΙΤ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΝΕΛ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Συμπληρωματικά με την πρώτη μεθοδολογία όπου το προφίλ αντισωμάτων προσαρμόστηκε μέσω πειραματικού σχεδιασμού στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, παράλληλα αξιοποιήθηκαν και επιπρόσθετα κιτ για την διαδικασία κυτταρομετρίας ροής που αποκτήθηκαν σε πατενταρισμένη μορφή, για την πιο ολοκληρωμένη περιγραφή των δειγμάτων προς ανάλυση. Τα έτοιμα πρωτόκολλα περιείχαν τα δικά τους σωληνάρια με ήδη τοποθετημένα αντισωματικά κοκτέιλ σε λυοφιλοποιημένη μορφή για την εύκολη χρήση τους. Το συγκεκριμένο κιτ προαπαιτούσε την ύπαρξη δευτέρων προπαρασκευαστικών κιτ (PerFic-nc) και άλλων επιμέρους συστατικών όπως FBS, WFI, PBS που ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο. Τα βήματα των πειραματικών πρωτοκόλλων ολοκληρώθηκαν αυτολεξεί, με μόνη διαφοροποίηση πως στο κιτ με ονομασία DURAClone IM Treg έγινε η προσθήκη επιπλέον 10μl CD8 αντισώματος (συζευγμένο με το φθοριόχρωμα ECD), για τον ακριβή εντοπισμό των CD8+ κυτταροτοξικών κυττάρων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κυτταρομετρική ανάλυση

Τα αποτελέσματα κάθε πρωτοκόλλου κυτταρομετρίας ροής που ολοκληρώθηκε στα εξεταζόμενα δείγματα αναλύθηκαν με το CXP Flow Cytometry Software της Beckman Coulter. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τα εμφανιζόμενα lmd (list mode data) τους και πραγματοποιήθηκε η επιλεκτική διαγραμματική απομόνωση των κυτταρικών πληθυσμών, γνωστή ως gating για τον χαρακτηρισμό τους.

Τα δεδομένα του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την στατιστική ανάλυση τους, ενώ παρατίθενται κάποια ενδεικτικά διαγράμματα.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα πρωτοκόλλου APLOS

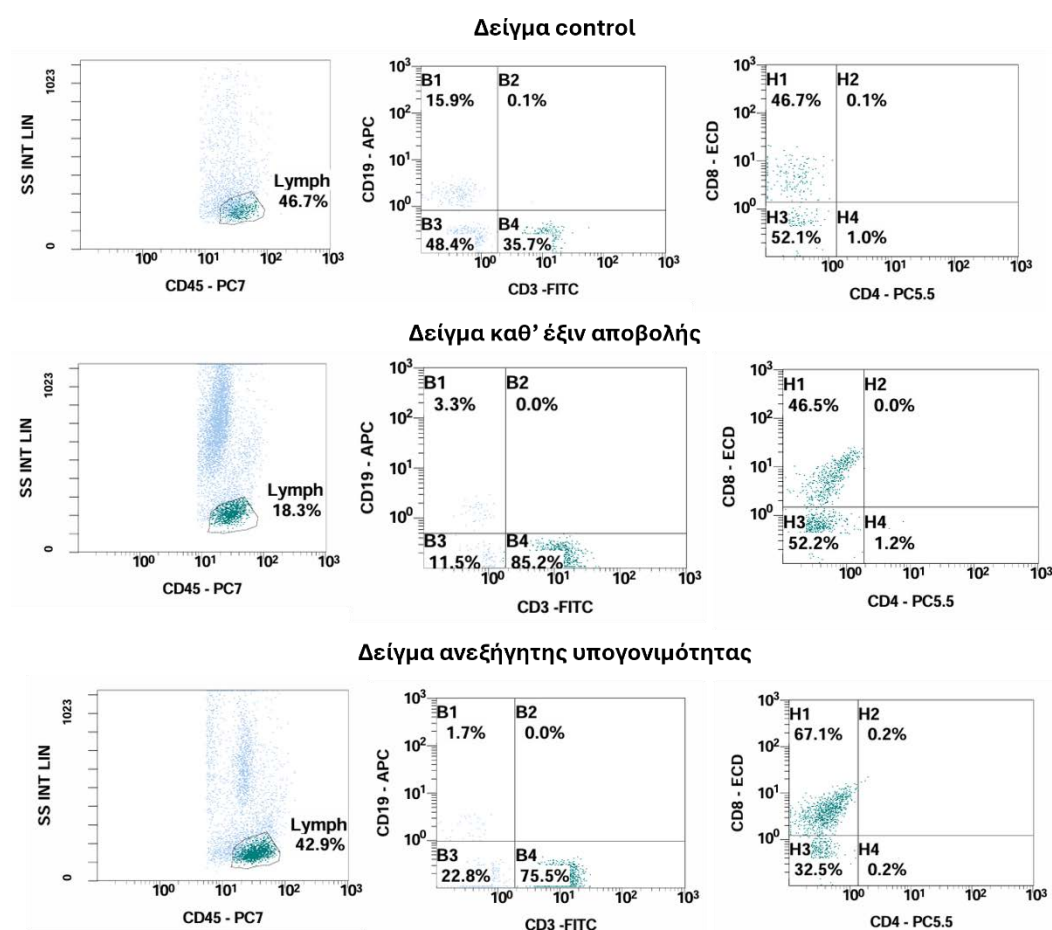
	Condition/Control	average	median
Lympho	Condition	24,06	20,2
	Control	15,9	11,9
CD3+	Condition	65,75	65,9
	Control	59,8	57,3
CD19+	Condition	4,50	3,1
	Control	6,55	6,05
NK	Condition	25,66	24,3
	Control	29,46	34,1
CD4+	Condition	10,83	2,5
	Control	4,57	1,5
CD8+	Condition	34,04	32,1
	Control	29,95	23,2
DN	Condition	52,53	55,4
	Control	70,12	73,2

Από τα αποτελέσματα μπορούμε να διακρίνουμε ποσοτικές διαφορές μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων. Αυτές οι διαφορές έγκειται να ελεγχθούν στατιστικά παρακάτω για την εγκυρότητα τους ωστόσο είναι ευδιάκριτες για τους κυτταρικούς πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων, και τους

υποπληθυσμούς των T λεμφοκυττάρων, των NKs, των CD8 κυτταροτοξικών T και των διπλά αρνητικών DN κυττάρων. Πληθυσμοί για τους οποίους οι αλλαγές έκφρασης δεν εμφανίζονται δραματικές είναι αυτοί των B λεμφοκυττάρων αλλά και των CD4 βοηθητικών T κυττάρων.

Για την περιγραφή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τόσο ο μέσος όρος των τιμών όσο και η διάμεσος τους καθώς καλύπτουν διαφορετικές προσεγγίσεις των δειγμάτων. Ο όρος mean είναι κατάλληλος για τιμές με ομοιόμορφη κατανομή ενώ η τιμή median αξιοποιείται όταν τα δείγματα εμφάνισαν ακραίες και ασύμμετρες τιμές.

Τα αποτελέσματα κανονικότητας προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων επομένως μέσω των δύο τρόπων σύγκρισης των παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων καλύψαμε μια πρωταρχική προσέγγιση στο αν θα χρειαστεί παραμετρική ή μη παραμετρική ανάλυση.



Εικόνα 4: Ενδεικτικά παραδείγματα διασποράς των καταγραφόντων δειγμάτων σε διαδοχικά δείγματα control και παθολογικά: καθ' ἑξιν αποβολές και ανεξήγητη υπογονιμότητα.

Λόγω των παραπάνω αποτελεσμάτων προβήκαμε σε κάποιες επιπρόσθετες δοκιμασίες υπό την μορφή των αυτοματοποιημένων kit T cell Subsets και Tregs επικεντρωμένα στον λεπτομερή χαρακτηρισμό των DN T λεμφοκυττάρων από τα

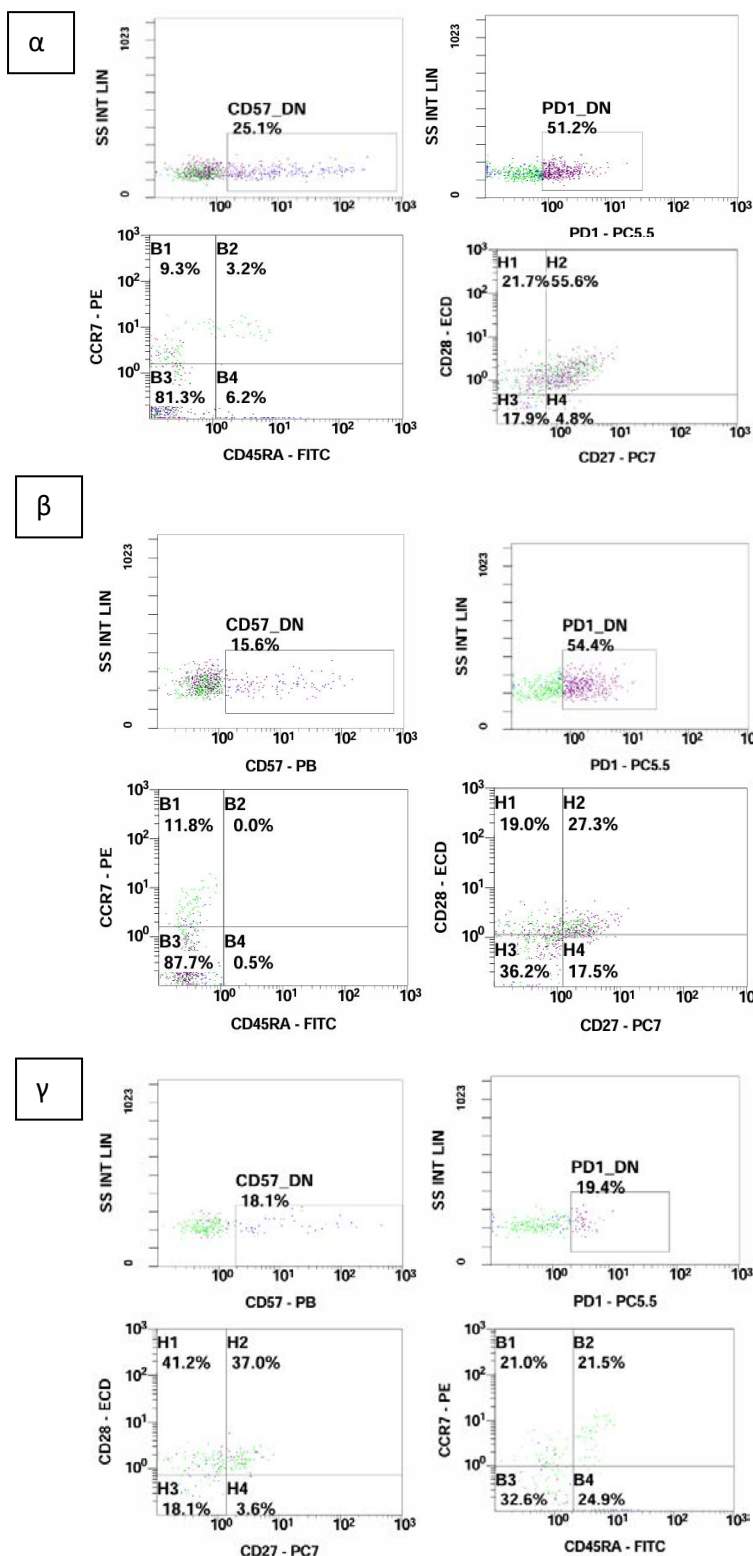
οποία εκμαιεύσαμε τα εξής αποτελέσματα:

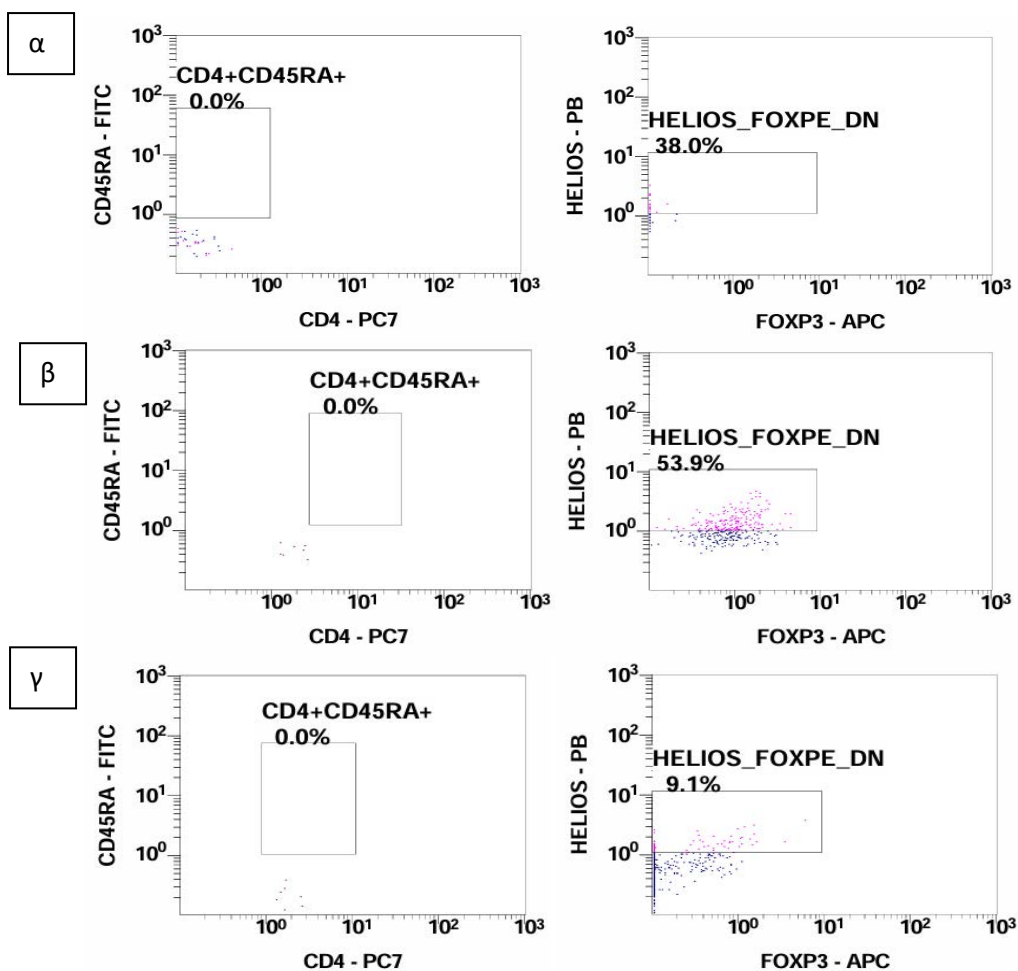
Εικόνα 5: Αποτελέσματα βοηθητικού kit T cell Subsets για δείγματα (α) control, (β) καθ' έξιν αποβολές,(γ) ανεξήγητη υπογονιμότητα.

Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα, το θεωρητικό υπόβαθρο διαθέσιμο για τα διπλά αρνητικά T κύτταρα επιβεβαιώνεται και από τα πειραματικά αποτελέσματα στα δείγματα ανθρώπινου ενδομητριακού ιστού. Παρουσιάζεται τόσο η έκφραση CD57, PD1, απουσία συνέκφρασης CCR7CD45RA και συνέκφραση CD27CD28.

Τελευταία δοκιμασία ήταν το πρωτόκολλο Tregs, με το οποίο και πάλι στοχεύσαμε στα DN T λεμφοκύτταρα, προκειμένου να εξεταστεί η μεμονωμένη έκφραση CD45RA αλλά και η έκφραση του υποδοχέα HELIOS.

Τα αποτελέσματα είναι τα εξής:





Εικόνα 6: Τα δείγματα α= control, β= KA, γ= AY, επιβεβαιώνουν τις προϋπάρχουσες βιβλιογραφίες οι οποίες κάνουν λόγο για έκφραση του υποδοχέα HELIOS στα DN T cells ενώ τα χαρακτηρίζουν ως κύτταρα μνήμης, με την απουσία έκφρασης του CD45RA.

Για τα αποτελέσματα αυτά υπήρξε περιορισμένος αριθμός δειγμάτων επομένως τα αποτελέσματα δεν ελέγχθηκαν για στατιστική σημαντικότητα και αναμένεται η συλλογή περισσότερων δεδομένων.

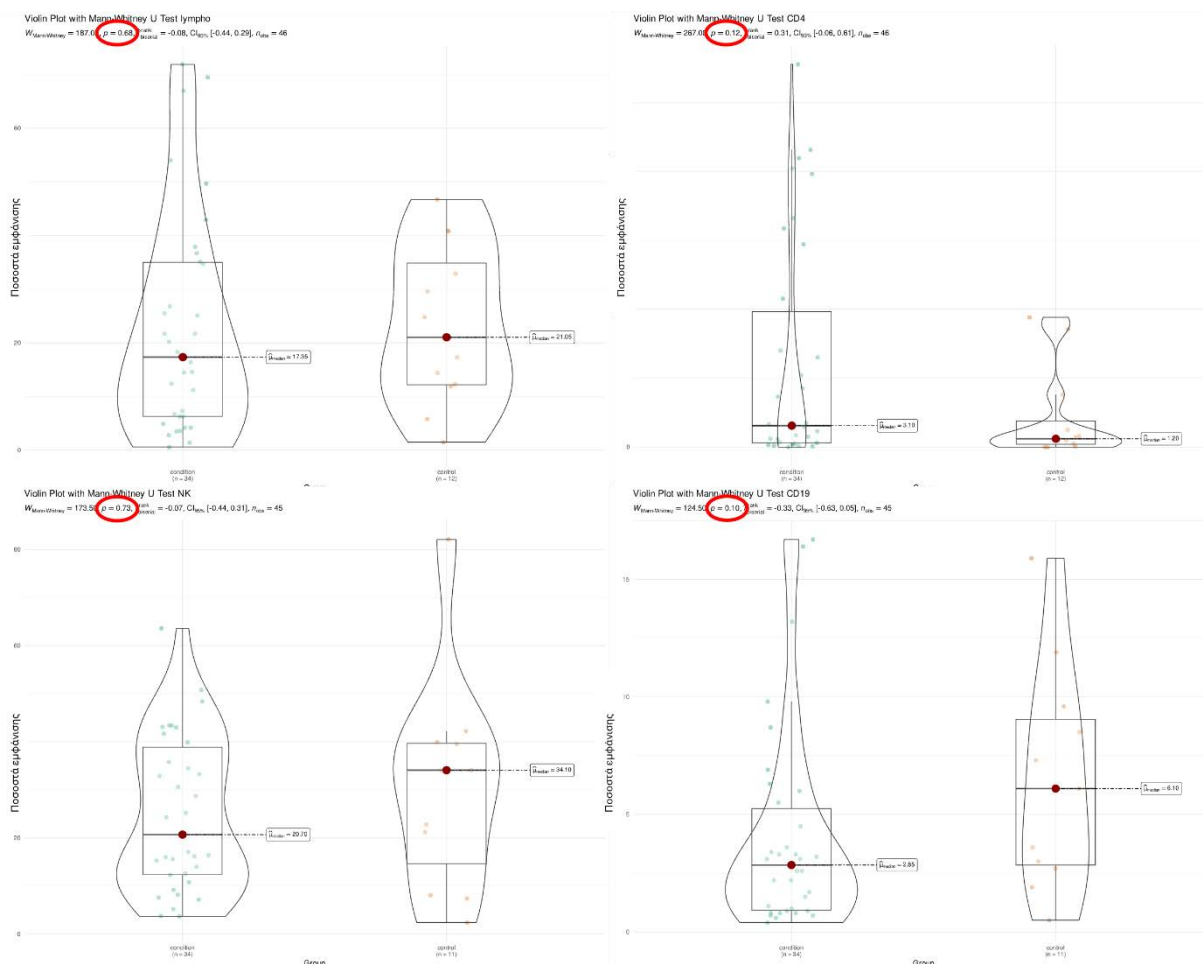
	Condition/Control	median
HELIOS	Condition	20,3
	Control	31,7
CD45RA	Condition	0
	Control	0
PD1	Condition	32
	Control	45,3
CD57	Condition	9,8
	Control	10,95
CCR7-CD45RA-	Condition	82,8
	Control	43,85
CD27+CD28+	Condition	46,2
	Control	53,35

Πίνακας 10: Αποτελέσματα πρωτόκολλων Tcell Subsets και TREGS.

Στατιστική ανάλυση

Ως πρώτη προσέγγιση στατιστικής ανάλυσης των πειραματικών αποτελεσμάτων που διεξήχθησαν από τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής έγινε η σύγκριση των παθολογικών δειγμάτων υπογονιμότητας, condition με τα δείγματα θετικών μαρτύρων ή αλλιώς control. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα:

Αρχικά, έγινε ο έλεγχος της κατανομής των τιμών κάθε μεταβλητής με σκοπό να αποσαφηνιστεί εάν ακολουθούν ή όχι κανονική κατανομή και αν τελικά θα προβούμε σε παραμετρική ή μη παραμετρική στατιστική ανάλυση (t-test ή Mann-Whitney ανάλογα) για την σύγκριση των δύο καταστάσεων που θέσαμε.



Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση των πρώτων ενδείξεων σύγκρισης παθολογικών και υγιών δειγμάτων για τους κυτταρικούς πληθυσμούς: Lympho, CD4, NK, CD19

Όπως απεικονίζεται και στα παραπάνω violin plots που σχεδιάστηκαν από τα αποτελέσματα, επιλέχθηκε η μη παραμετρική δοκιμή σύγκρισης Mann-Whitney, στην οποία τα σύνολα δειγμάτων συγκρίθηκαν ανεξαρτήτως την κανονικότητας των τιμών τους. Το πλάτος κάθε «βιολιού» αναπαριστά την κανονικοποιημένη κατανομή των δεδομένων ενώ τα στίγματα τις πραγματικές τιμές των δειγμάτων.

Δεύτερο σημαντικό εύρημα των διαγραμμάτων είναι η συγκριτική διαφορά των δειγμάτων μέσω της τιμής p-value που απορρέει. Βασική αρχή για την χρήση της τιμής p-value κατά την σύγκριση των δειγμάτων είναι η εξής: Τιμές $<0,05$ υποδηλώνουν στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο συγκρινόμενων ομάδων, ενώ αντίθετα τιμές $>0,05$ δεν φέρουν στατιστική υποστήριξη.

Για τα πρωταρχικά αποτελέσματα συγκρίσεων μεταξύ πληθυσμών κυττάρων CD4+, NK, CD19 και των συνολικών λεμφοκυττάρων, αποκομίζοντας τις συγκριμένες τιμές σε επίπεδο p-value δεν ενδείκνυται κάποια ουσιαστική διαφορά σε παθολογικές και υγιείς καταστάσεις.

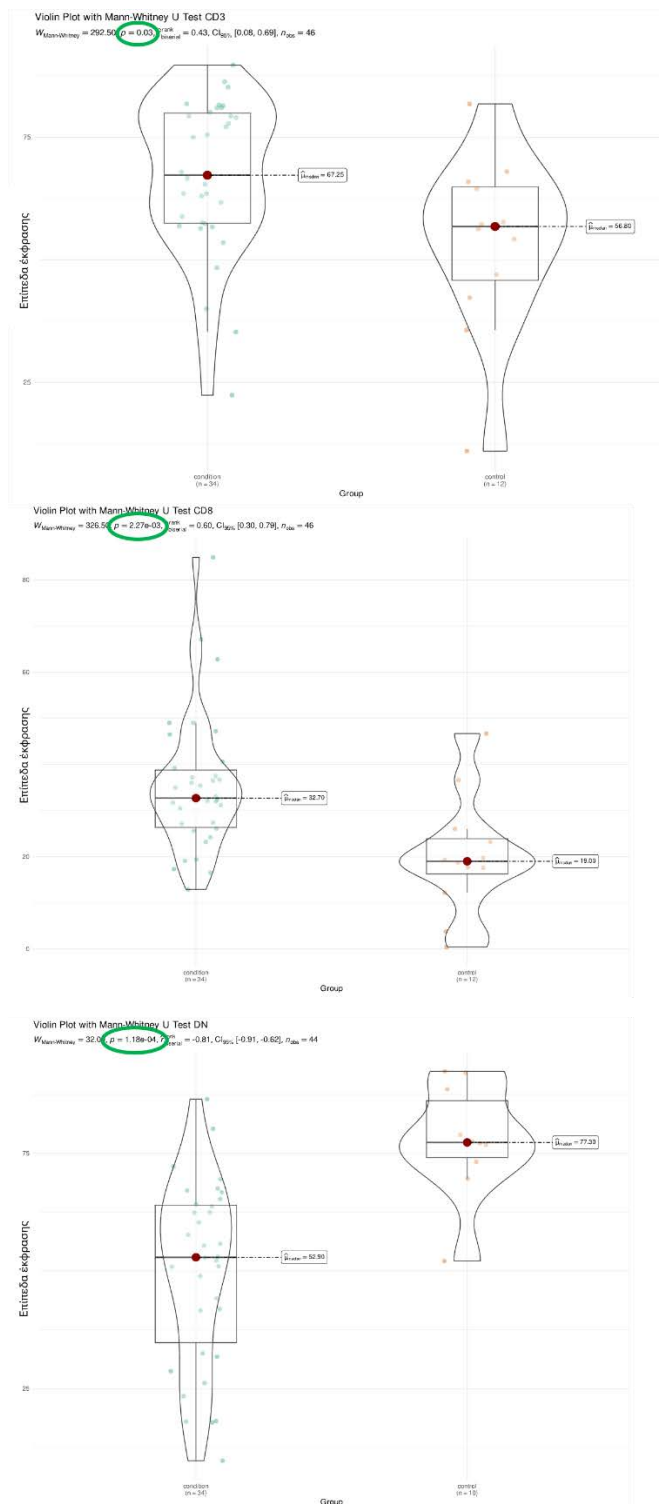
Απεναντίας, θετικά αποτελέσματα προέκυψαν για την σύγκριση των τιμών CD3+, CD8+ και DN κυτταρικών πληθυσμών με τα αποτελέσματα που αποσπάσαμε να εμφανίζονται κατά αυτόν τον τρόπο:

Πίνακας 11: Θετικά Αποτελέσματα από δοκιμασία Mann-Whitney και Violin Plot

	CD3		CD8		DN	
	p-value	median	p-value	median	p-value	median
Condition	0,03	67,25	0,00227	32,7	0,00018	52,9
Control		56,8		19		77,3

Τα αποτελέσματα προτείνουν στατιστική σημαντικότητα για την σύγκριση των δύο παραμέτρων όσων αφορά τα αποτελέσματα των CD3+, η οποία ισχυροποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό για τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς που χαρακτηρίζονται ως CD8+ και DN.

Όπως αναφέρεται, ο πληθυσμός που εμφανίζει παθογένεια/υπογονιμότητα όποιας μορφής παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων μέσω του δείκτη CD3. Εστιάζοντας στου υποπληθυσμούς που ανήκουν στο ευρύτερο πλαίσιο των CD3+ κυττάρων, εμφανίζεται η αλλαγή των κυτταρικών συστάσεων, με τα CD8+ κύτταρα σε σχεδόν διπλάσια επίπεδα, και τα DN κύτταρα εμφανώς μειωμένα.



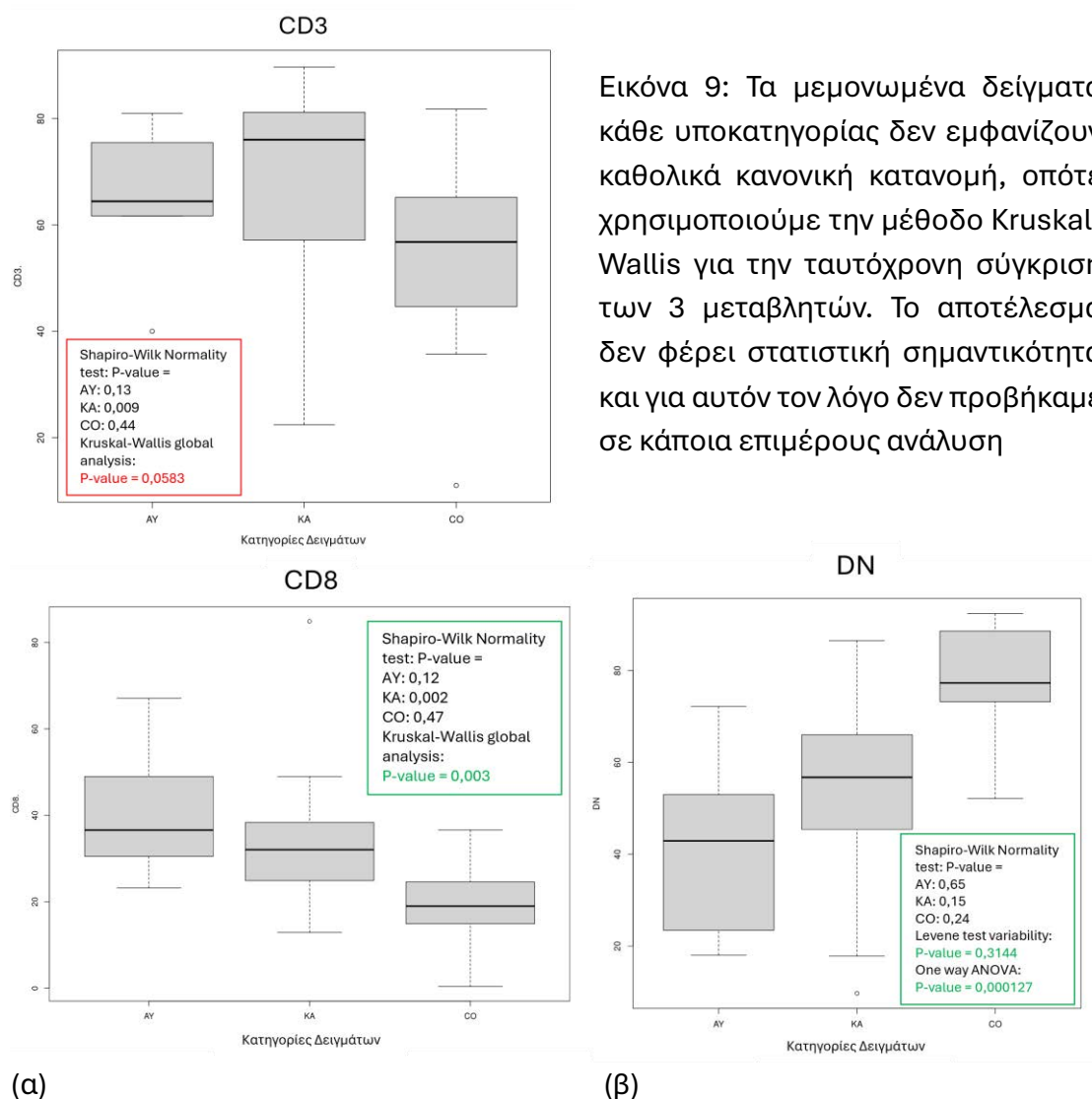
Εικόνα 8: Τα CD3+, CD8+ και DN+ ισχυροποιούν την υπόθεση διαφοροποίησης της ανοσορύθμισης του ενδομητριακού περιβάλλοντος μεταξύ δειγμάτων υγείας και παθολογικών ενδομήτριων

Τα πρωτοφανή αυτά δεδομένα που μπορούν να συσχετιστούν και μεταξύ τους όσον αφορά τα στάδια διαφοροποίησης της Τ λεμφοκυτταρικής σειράς, προκάλεσαν το ενδιαφέρον μας για την περαιτέρω μελέτη τους σε μία νέα παραμετρική κατάταξη. Οι νέες συγκριτικές αναλύσεις αφορούσαν την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε καθ' ἑξιν αποβολές (KA), ανεξήγητη υπογονιμότητα (AY), και θετικούς μάρτυρες/control (CO). Ουσιαστικά, στην νέα στατιστική δοκιμασία σκοπός είναι ο διαχωρισμός των παθολογικών δειγμάτων βάση του ιστορικού τους, για την διεξαγωγή πορισμάτων που θα αφορούν την περαιτέρω εξατομίκευση των δύο νόσων.

Οι τιμές των αποτελεσμάτων υποβλήθηκαν πρώτιστα σε τεστ κανονικότητας των τιμών, κοινώς Shapiro-Wilk test, μέσω του οποίου ισχύει πως:

- P-value<0,05: το εύρος των επιλεγμένων δειγμάτων δεν ακολουθεί κανονική κατανομή και συνιστάται η μη παραμετρική σύγκριση των τριών παραμέτρων με Kruskal-Wallis global analysis
- P-value<0,05: το σύνολο τιμών ακολουθεί κανονική κατανομή ιδανικό για παραμετρική σύγκριση των τριών παραμέτρων με one way ANOVA

Τα αποτελέσματα που παρατηρήσαμε παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 10: (α) Για τα CD8 αποτελέσματα, τα δείγματα έχουν ανάμεικτες αναπαραστάσεις κανονικής και μη κατανομής με αποτέλεσμα να καταφεύγουμε σε Kruskal-Wallis ανάλυση, με θετικό αποτέλεσμα $p=0,003$. (β) DN: και τα τρία σύνολα δειγμάτων εμφανίζουν κανονική κατανομή επομένως αξιοποιούμε το παραμετρικό στατιστικό τεστ one way ANOVA για να ελέγξουμε την στατιστική διαφορά των τιμών.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για global analysis σε παραμετρικό (ANOVA) και μη παραμετρικό (Kruskal-Wallis) test σημαντική είναι η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων κάθε μεμονωμένου p-value, το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της μεθόδου Benjamini-Hochberg (BH).

Ως αποτέλεσμα της παραμετρικής μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των συσχετίσεων στα DN αποτελέσματα, μεσολαβείται η ολοκλήρωση ενός Levene's test το οποίο θα ελέγξει την ομοιοσκεδαστικότητα

μεταξύ των τριών παραμέτρων που θέσαμε. Εφόσον η τιμή αυτού βγήκε «καλή», τα δείγματα μας έχουν ομοιομορφία στην διασπορά τους και μπορούμε να ακολουθήσουμε την one way ANOVA για την ταυτόχρονη σύγκριση τους.

Οι δύο στατιστικές αναλύσεις έχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα επομένως καταλήγουμε στο 3^ο και τελευταίο στάδιο ανάλυσης το οποίο είναι το pairwise analysis. Για τις ανάγκες αυτού του τεστ, οι 3 παράμετροι συνδυάζονται σε ζεύγη με κάθε πιθανό τρόπο και προκύπτει η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ αυτών.

Τα αποτελέσματα του pairwise analysis αναγράφονται στον πίνακα:

Πίνακας 12: pairwise analysis μη παραμετρικών και παραμετρικών αναλύσεων

Μη παραμετρικά	Mann-Whitney		Παραμετρικά	t-test	
CD8	AY	KA	DN	AY	KA
KA	0,1619	-	KA	0,081	-
CO	0,0072	0,0147	CO	0,00012	0,00102

Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των καταστάσεων: AY-CO, KA-CO τόσο για τα CD8+ και DN κύτταρα των δειγμάτων, ενώ εντοπίζεται η τάση για στατιστική σημαντικότητα μεταξύ KA-AY κυρίως στην μεταβλητή DN.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Καταλήγοντας προκύπτουν κάποια συμπεράσματα για τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας. Οι παρακάτω παρατηρήσεις συμβάλλουν στον πληρέστερο χαρακτηρισμό των φαινομένων που αναλύσαμε με σημαντικά αποδεικτικά στοιχεία μέσω των πειραμάτων. Αρχικά, τα δείγματα συλλέχθηκαν και επεξεργαστήκαν καταλλήλως για να είναι σε θέση να αναλυθούν μέσω της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής. Η κατάταξη τους ανάλογα το ιστορικό τους έγινε βάση τριών παραμέτρων, πρώτον δείγματα υγείων γυναικών που δεν έχουν αντιμετωπίσει ζητήματα υπογονιμότητας (control), δεύτερον, δείγματα γυναικών οι οποίες έχουν σημειώσει θετικές εγκυμοσύνες, οι οποίες στη συνέχεια είχαν αρνητική έκβαση, φαινόμενο γνωστό ως καθ' έξιν αποβολές και Τρίτη και τελευταία κατηγορία, δείγματα γυναικών οι οποίες υποβλήθηκαν σε προσπάθειες για κύηση και δεν κατάφεραν να το επιτύχουν. Από τις κυτταρομετρικές και κατόπιν στατιστικές αναλύσεις τα δεδομένα δημιουργούν ένα προφίλ πιθανής φλεγμονής στα παθολογικά δείγματα, με τις χαρακτηριστικές ενδείξεις που ακολουθούν:

Πρώτο πόρισμα που προκύπτει είναι πως συγκρίνοντας συνολικά τις καταστάσεις με διαταραχές υπογονιμότητας με τα φυσιολογικά δείγματα, παρατηρήθηκε εμφανής στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των Τ λεμφοκυττάρων, ο οποίος αυξάνεται ποσοστιαία. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πιο έντονη ενεργοποίηση των μηχανισμών επίκτητης ανοσίας στο ενδομήτριο, τη στιγμή που το περιβάλλον της επιφάνειας του θα έπρεπε να είναι προφλεγμονώδες.

Κατ' επέκταση, σε δεύτερη φάση ανάλυσης, στους υποπληθυσμούς των Τ λεμφοκυττάρων, αυξημένη είναι η έκφραση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώνεται με τις στατιστικά σημαντικές τιμές που προκύπτουν, υποδεικνύοντας την παρατεταμένη κατάσταση φλεγμονής η οποία δεν συμβάλλει στην επιτυχή εμφύτευση και διατήρηση του αναπτυσσόμενου εμβρύου.

Η αύξηση των CD8⁺ Τ κυττάρων έρχεται σε άμεση συσχέτιση με το τρίτο φαινόμενο που ταυτοποιήθηκε και αφορά την ξεκάθαρη μείωση ενός δεύτερου Τ λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, τα Double Negative CD4-CD8- Τ λεμφοκύτταρα.

Τα δύο αυτά φαινόμενα, αφενός παραπέμπουν σε πιο έντονη διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων προς την κυτταροτοξική μορφή τους, και αφετέρου παρουσιάζουν ένα έντονα παρατεταμένο φλεγμονώδες ενδομητριακό ιστό, ικανό να προκαλέσει την υπογονιμότητα των γυναικών. Με την ποσοτική μείωση των ανοσορρυθμιστικών κυτταρικών υποπληθυσμών, το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα είναι επιρρεπές σε υπερδιέγερση των ανοσιακών αποκρίσεων με την

παραμικρή ένδειξη απειλής γεγονός που δικαιολογεί και την απόρριψη του ημι-αλλογενούς εμβρύου που δημιουργείται στον χώρο.

Στην συνέχεια, έγινε η περαιτέρω τυποποίηση των Double Negative T λεμφοκυττάρων με αποτελέσματα που θέλουν τα κύτταρα να φέρουν ρυθμιστικό φαινότυπο όπως επίσης και ανοσολογική μνήμη που διατηρείται τόσο στα δείγματα control όσο και στα condition.

Τα χαρακτηριστικά επιβεβαιώνονται αρχικά από την εμφάνιση του υποδοχέα Helios που προσδίδει ρυθμιστική ικανότητα σε κύτταρα μνήμης και δεύτερον, των δεικτών συνδιέγερσης CD27+CD28+ που υποδηλώνουν την ενεργό μνημονική δράση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, η συνδυαστική απουσία έκφρασης CCR7-CD45RA- και επομένως ο εξ ολοκλήρου χαρακτηρισμός τους ως CD45RO+, τοποθετεί τα DN T λεμφοκύτταρα στην κατηγορία TEM, T effector memory, δηλαδή την ιστική κατανομή τους ως ενεργά κύτταρα μνήμης στην επιφάνεια του ενδομήτριου. Η ανοσολογική μνήμη των DN T κυττάρων έχει υποστηριχθεί και σε προγενέστερες έρευνες οι οποίες είτε προκύπτουν από πειράματα σε ζώα (ανώτερα πρωτεύοντα θηλαστικά)(35), είτε αφορούν διαφορετικούς υπό εξέταση ιστούς (36). Επομένως, επιβεβαιώνουμε πως τα DN T cells διατηρούν την ιδιότητα θυμικών κυττάρων και για τον ιστό του ενδομήτριου.

Τα DN λεμφοκύτταρα φαίνεται να εκφράζουν μόρια και υποδοχείς που λειτουργούν αυτοδραστικά. Την καχυποψία για αυτοδραστικότητα ενισχύει η ταυτόχρονη έκφραση των 1^{ov} Helios και 2^{ov} PD1 γεγονός έρχεται σε συμφωνία με διαφορετικά προφίλ αυτοανοσίας άλλων συστηματικών νόσων του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος όπως στον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, ψωρίαση και Sjögren's syndrome (37). Η αυτοδραστικότητα του κυτταρικού υποπληθυσμού δεν συγκρίθηκε με τα control δείγματα καθώς δεν υπήρξε επάρκεια δειγμάτων, όμως είναι σημαντική η προδιάθεση που παρουσιάζεται.

Τέλος, έγινε η διαστρωμάτωση των διαφορετικών παθολογικών πληθυσμών σε καταστάσεις καθ' έξιν αποβολών και ανεξήγητης, ιδιοπαθούς υπογονιμότητας. Από τις στατιστικές συγκριτικές αναλύσεις προκύπτουμε στο συμπέρασμα πως υπάρχει μια ισχυρή στατιστική διαφορά μεταξύ των DN T υποκυτταρικών πληθυσμών σε ασθενείς με κατ' επανάληψη αποβολές και σε ασθενείς με ανεξήγητη υπογονιμότητα, ενώ εμφανίζεται η τάση για τα ίδια αποτελέσματα στους πληθυσμούς των T κυτταροτοξικών κυττάρων με οριακές τιμές που θα αναλυθούν αργότερα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργαστηριακή μελέτη στοχεύει στη προσπάθεια εμβάθυνσης της μελέτης για τον χαρακτηρισμό των κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος σε δείγματα ενδομητρίου, με ιδιαίτερη έμφαση στον χαρακτηρισμό των DN T λεμφοκυττάρων. Τα προϋπάρχοντα δεδομένα συνέβαλλαν στην δημιουργία πιο ολοκληρωμένων αποτελεσμάτων καθώς και στην διάθεση περισσότερου ερευνητικού υλικού για την δημιουργία στατιστικά σημαντικών ευρημάτων. Συνολικά, τα εργαστηριακά αποτελέσματα συμφωνούν με τις βιβλιογραφικές αναφορές και βρίσκουν εφαρμογή στα δείγματα ανθρώπινου ενδομήτρίου που αναλύθηκαν πρότινος από το εργαστήριο. Ωστόσο, η έρευνα είναι κάθε άλλο παρά πλήρης καθώς υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω επανάληψη των πρωτοκόλλων, συλλογή περισσότερων δειγμάτων και συμπερίληψη τους στα βοηθητικά πειραματικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν υστερόχρονα.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρατηρούνται πρώτη φορά στον άνθρωπο και έρχονται σε συμφωνία με πορίσματα που προέκυψαν από την μελέτη ζωικών δειγμάτων. Η άμεση μεταφορά των αποτελεσμάτων από ζωικά μοντέλα σε ανθρώπινα δείγματα είναι θετική και παρουσιάζει μεταφραστικότητα στον ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος στους οργανισμούς διαφορετικών θηλαστικών. Ωστόσο, είναι σημαντική η μεγαλύτερη συμπερίληψη των ανθρώπινων δειγμάτων που θα επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των προηγούμενων ερευνών και θα ισχυροποιούν την κλινική και βιολογική τους σημασία. Η ανάγκη προκύπτει καθώς χρειάζεται να αξιολογηθούν τα ευρήματα και η εφαρμοσιμότητα τους στον άνθρωπο, προκειμένου να αναπτυχθούν και τα κατάλληλα διαγνωστικά και θεραπευτικά μέτρα για την βελτιστοποίηση των αποδόσεων σε διαταραχές υπογονιμότητας.

Επιπρόσθετα, χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των DN T κυττάρων εξετάζοντας το γεγονός εάν αυτός παραμένει ρυθμιστικός ή μεταλλάσσεται σε φλεγμονώδης. Η ανάλυση αυτή θα γίνει με τον εντοπισμό πιθανών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που εκκρίνουν όπως και με την λήψη περισσότερων δειγμάτων από δείγματα υγείων καταστάσεων προς σύγκριση. Στόχος είναι να εδραιωθεί ένα πολύ ξεκάθαρο ανοσολογικό προφίλ για τα CD4-CD8- T λεμφοκύτταρα, όσων αφορά τα εκκρινόμενα μόρια και υποδοχείς του που θα δώσει την δυνατότητα κατονομαστεί και ο ακριβής βιολογικός ρόλος που έχουν κατά τη διάρκεια των ανοσοαποκρίσεων στην κύηση και στην επαφή με το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η έρευνα αυτή δεν θα συμβάλλει μόνο στον χαρακτηρισμό τους στα πλαίσια παθολογικών περιπτώσεων αλλά θα δώσει και περισσότερες πληροφορίες για τις δράσεις τους κατά την ανοσορύθμιση στην ευρύτερη έννοια της εγκυμοσύνης.

Σε άμεση συσχέτιση των DN κυττάρων έρχεται η στατιστικά σημαντική αύξηση των CD8+ κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων. Επομένως, προκύπτει ανάγκη για την ανάλυση των λειτουργικών διαφορών των κυτταρικών υποπληθυσμών, οι οποίοι φαίνεται να δρουν ανταγωνιστικά και σε ανοσολογική ανισορροπία στα παθολογικά δείγματα. Το ενδιαφέρον που είχε η ξεκάθαρη τάση αύξησης των CD8+ Τ κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων δημιουργεί την ανάγκη για συμπερίληψη καινούργιων μοριακών διαγνωστικών μεθόδων όπως απομόνωση γενετικού υλικού των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του τοπικού ενδομητριακού μικροπεριβάλλοντος και ενίσχυση του (qPCR) που θα δώσουν την ευκαιρία για γονιδιακό και μεταγραφικό έλεγχο έκφρασης στα κύτταρα αυτά για την σύγκριση των αποτελεσμάτων που θα ληφθούν από τους δύο κυτταρικούς υποπληθυσμούς.

Τέλος, για την πιο λεπτομερή σύγκριση των δύο παθολογικών καταστάσεων καθ' έξιν αποβολών και ανεξήγητης υπογονιμότητας, στην τρέχουσα ερευνητική μελέτη παρατηρήθηκαν έγκυρες τιμές στατιστικής σημαντικότητας για τα DN Τ λεμφοκύτταρα αλλά και οριακή στατιστική εγκυρότητα για τα CD+ Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Μελλοντικός στόχος επομένως θα είναι η εδραίωση αυτών των διαφορών που προκύπτουν μέσω προμήθευσης περισσότερων δοκιμασιών και δειγμάτων που θα υποστηρίζουν τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η αποσαφήνιση των δύο νόσων, γεγονός που θα συμβάλλει κατόπιν και στην πιο εύκολη μοριακή και κλινική διάγνωση τους.

Η ανάλυση των ανοσιακών αποκρίσεων κατά την κύηση δεν έχουν φτάσει σε κορεσμό και αντιθέτως δίνουν την δυνατότητα για συνεχή εξέλιξη παράλληλα με την επιστημονική κατάρτιση που αυξάνεται και την εύρεση ολένα και περισσότερων διαγνωστικών βιοδεικτών. Τέλος, το ζήτημα της υπογονιμότητας απασχολεί εκατομμύρια γυναίκες παγκοσμίως, οι οποίες ψάχνουν την απάντηση και την θεραπευτική προσέγγιση στο πρόβλημα, τώρα περισσότερο από κάθε άλλη χρονική στιγμή, λόγω της εξέλιξης του ιατρικού και επιστημονικού κλάδου. Χαρακτηρισμός του ανοσοποιητικού του ενδομητρίου σηματοδοτεί τόσο την επιτυχία της φυσικής σύλληψης ενός εμβρύου, αλλά θα μπορούσε κατ' επέκταση να επιφέρει και θετικές απολήξεις σε προσπάθειες IVF με την βελτίωση των συνθηκών τόσο ανάπτυξης του εμβρύου αλλά και μέσω της υποδοχής του στο ενδομητριακό περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Franasiak JM, Alecsandru D, Forman EJ, Gemmell LC, Goldberg JM, Llarena N, Margolis C, Laven J, Schoenmakers S, Seli E. A review of the pathophysiology of recurrent implantation failure. *Fertil Steril*. 2021 Dec;116(6):1436-1448. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.09.014. Epub 2021 Oct 19. Erratum in: *Fertil Steril*. 2022 Mar;117(3):653. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.01.002. PMID: 34674825.
2. Granne I, Shen M, Rodriguez-Caro H, Chadha G, O'Donnell E, Brosens JJ, Quenby S, Child T, Southcombe JH. Characterisation of peri-implantation endometrial Treg and identification of an altered phenotype in recurrent pregnancy loss. *Mucosal Immunol*. 2022 Jan;15(1):120-129. doi: 10.1038/s41385-021-00451-1. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34552206; PMCID: PMC8732268.
3. Male V. Medawar and the immunological paradox of pregnancy: in context. *Oxf Open Immunol*. 2020 Dec 14;2(1): iqaa006. doi: 10.1093/oxfimm/iqaa006. PMID: 36845570; PMCID: PMC9914476.
4. Franasiak JM, Alecsandru D, Forman EJ, Gemmell LC, Goldberg JM, Llarena N, Margolis C, Laven J, Schoenmakers S, Seli E. A review of the pathophysiology of recurrent implantation failure. *Fertil Steril*. 2021 Dec;116(6):1436-1448. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.09.014. Epub 2021 Oct 19. Erratum in: *Fertil Steril*. 2022 Mar;117(3):653. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.01.002. PMID: 34674825.
5. Ehsani M, Mohammadnia-Afrouzi M, Mirzakhani M, Esmaeilzadeh S, Shahbazi M. Female Unexplained Infertility: A Disease with Imbalanced Adaptive Immunity. *J Hum Reprod Sci*. 2019 Oct-Dec;12(4):274-282. doi: 10.4103/jhrs.JHRS_30_19. Epub 2019 Dec 17. PMID: 32038075; PMCID: PMC6937763.
6. Inversetti A, Zambella E, Guarano A, Dell'Avanzo M, Di Simone N. Endometrial Microbiota and Immune Tolerance in Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 3;24(3):2995. doi: 10.3390/ijms24032995. PMID: 36769318; PMCID: PMC9917440.
7. Sharma S, Rodrigues PRS, Zaher S, Davies LC, Ghazal P. Immune-metabolic adaptations in pregnancy: A potential stepping-stone to sepsis. *EBioMedicine*. 2022 Dec; 86:104337. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104337. Epub 2022 Dec 2. PMID: 36470829; PMCID: PMC9782817.
8. Granne I, Shen M, Rodriguez-Caro H, Chadha G, O'Donnell E, Brosens JJ, Quenby S, Child T, Southcombe JH. Characterisation of peri-implantation endometrial Treg and identification of an altered phenotype in recurrent pregnancy loss. *Mucosal Immunol*. 2022 Jan;15(1):120-129. doi: 10.1038/s41385-021-00451-1. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34552206; PMCID: PMC8732268.

9. Kwan M, Hazan A, Zhang J, Jones RL, Harris LK, Whittle W, Keating S, Dunk CE, Lye SJ. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. *Placenta*. 2014 Dec;35(12):1027-34. doi: 10.1016/j.placenta.2014.09.018. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25449030.
10. Cuadrado-Torroglosa I, García-Velasco JA, Alecsandru D. The Impacts of Inflammatory and Autoimmune Conditions on the Endometrium and Reproductive Outcomes. *J Clin Med*. 2024 Jun 26;13(13):3724. doi: 10.3390/jcm13133724. PMID: 38999290; PMCID: PMC11242609.
11. Xie J, Gu A, He H, Zhao Q, Yu Y, Chen J, Cheng Z, Zhou P, Zhou Q, Jin M. Autoimmune thyroid disease disrupts immune homeostasis in the endometrium of unexplained infertility women-a single-cell RNA transcriptome study during the implantation window. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Jul 12;14:1185147. doi: 10.3389/fendo.2023.1185147. PMID: 37501789; PMCID: PMC10368980.
12. Cela V, Daniele S, Obino MER, Ruggiero M, Zappelli E, Ceccarelli L, Papini F, Marzi I, Scarfò G, Tosi F, Franzoni F, Martini C, Artini PG. Endometrial Dysbiosis Is Related to Inflammatory Factors in Women with Repeated Implantation Failure: A Pilot Study. *J Clin Med*. 2022 Apr 28;11(9):2481. doi: 10.3390/jcm11092481. PMID: 35566605; PMCID: PMC9101226.
13. Vaigauskaitė-Mažeikienė B, Baušytė R, Valatkaitė E, Maželytė R, Kazėnaitė E, Ramašauskaitė D, Navakauskienė R. Assisted reproductive technology outcomes and gene expression in unexplained infertility patients. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Jul 28; 11:1217808. doi: 10.3389/fcell.2023.1217808. PMID: 37576599; PMCID: PMC10416262.
14. Yang X, Tian Y, Zheng L, Luu T, Kwak-Kim J. The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 21;24(1):132. doi: 10.3390/ijms24010132. PMID: 36613575; PMCID: PMC9820098.
15. Fox CW, Savaris RF, Jeong JW, Kim TH, Miller PB, Likes CE, Schammel DP, Young SL, Lessey BA. Unexplained recurrent pregnancy loss and unexplained infertility: twins in disguise. *Hum Reprod Open*. 2019 Oct 29;2020(1):hoz021. doi: 10.1093/hropen/hoz021. PMID: 36694811; PMCID: PMC9869655.
16. Ticconi C, Inversetti A, Marraffa S, Campagnolo L, Arthur J, Zambella E, Di Simone N. Chronic endometritis and recurrent reproductive failure: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2024 Aug 16;15:1427454. doi: 10.3389/fimmu.2024.1427454. PMID: 39286255; PMCID: PMC11403846.
17. Garmendia JV, De Sanctis CV, Hajdúch M, De Sanctis JB. Exploring the Immunological Aspects and Treatments of Recurrent Pregnancy Loss and Recurrent Implantation Failure. *Int J Mol Sci*. 2025 Feb 3;26(3):1295. doi: 10.3390/ijms26031295. PMID: 39941063; PMCID: PMC11818386.

18. Huhn O, Zhao X, Esposito L, Moffett A, Colucci F, Sharkey AM. How Do Uterine Natural Killer and Innate Lymphoid Cells Contribute to Successful Pregnancy? *Front Immunol*. 2021 Jun 21;12:607669. doi: 10.3389/fimmu.2021.607669. PMID: 34234770; PMCID: PMC8256162.
19. Lee SK, Kim CJ, Kim DJ, Kang JH. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. *Immune Netw*. 2015 Feb;15(1):16-26. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.1.16>
20. Wang JJ, Han T, Zhu XM. Role of maternal–fetal immune tolerance in the establishment and maintenance of pregnancy. *Chin Med J* 2024;137:1399–1406. doi: 10.1097/CM9.0000000000003114
21. Li W-X, Xu X-H, Jin L-P. Regulation of the innate immune cells during pregnancy: An immune checkpoint perspective. *J Cell Mol Med*. 2021;25:10362– 10375. doi:10.1111/jcmm.17022
22. Morelli S, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Research and Reports in Biology*. 2015; 6:171-189 <https://doi.org/10.2147/RRB.S80652>
23. Shi, J., Xu, Q., Yu, S. et al. Perturbations of the endometrial immune microenvironment in endometriosis and adenomyosis: their impact on reproduction and pregnancy. *Semin Immunopathol* 47, 16 (2025). <https://doi.org/10.1007/s00281-025-01040-1>
24. Moffett, A., Shreeve, N. Local immune recognition of trophoblast in early human pregnancy: controversies and questions. *Nat Rev Immunol* **23**, 222–235 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00777-2>
25. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol*. 2014 Nov;11(6):571-81. doi: 10.1038/cmi.2014.46. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24954221; PMCID: PMC4220837.
26. Norström A, Vukas Radulovic N, Bullarbo M, Ekerhovd E. Mast cell involvement in human cervical ripening. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019 Jul; 238:157-163. doi: 10.1016/j.ejogrb.2019.05.010. Epub 2019 May 16. PMID: 31158573.
27. Chapman, J.C., Chapman, F.M. & Michael, S.D. The production of alpha/beta and gamma/delta double negative (DN) T-cells and their role in the maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 73 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0073-5>
28. Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Pablo Penaloza-MacMaster, José Manuel Martín Villa, Dan H. Barouch, George C. Tsokos, José C. Crispín; Programmed Cell Death 1 and Helios Distinguish TCR-αβ⁺ Double-Negative (CD4⁻CD8⁻) T Cells That Derive from Self-Reactive CD8 T Cells. *J Immunol* 194 (9): 4207–4214. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402775>

29. Human T-cell receptor (TCR) alpha/beta + CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V beta-gene families, and phenotypically resemble memory T cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (24) 11787-11791, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11787> (1993).
30. John J. Priatel, Oliver Utting, Hung-Sia Teh; TCR/Self-Antigen Interactions Drive Double-Negative T Cell Peripheral Expansion and Differentiation into Suppressor Cells¹. *J Immunol* 1 December 2001; 167 (11): 6188–6194. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6188>
31. Iván Bernardo, Esther Mancebo, Ignacio Aguiló, Alberto Anel, Luis M. Allende, Juan M. Guerra-Vales, Jesús Ruiz-Contreras, Antonio Serrano, Paloma Talayero, Oscar de la Calle, Cecilia Gonzalez-Santesteban, Estela Paz-Artal. Phenotypic and functional evaluation of CD3+CD4-CD8- T cells in human CD8 immunodeficiency. *Haematologica* 2011;96(8):1195-1203; <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.041301>.
32. J Paul Robinson (2022) Flow Cytometry: Past and Future, *BioTechniques*, 72:4, 159-169, DOI: 10.2144/btn-2022-0005
33. Lantz L, Holmes K, Douagi I. Conjugation of Fluorochromes to Monoclonal Antibodies. *Curr Protoc.* 2023 Jun;3(6): e795. doi: 10.1002/cpz1.795. PMID: 37358184; PMCID: PMC10369850.
34. Starzl TE. Peter Brian Medawar: father of transplantation. *J Am Coll Surg.* 1995 Mar;180(3):332-6. PMID: 7874344; PMCID: PMC2681237.
35. Sundaravaradan V, Saleem R, Micci L, Gasper MA, Ortiz AM, et al. (2013) Multifunctional Double-negative T Cells in Sooty Mangabeys Mediate T-helper Functions Irrespective of SIV Infection. *PLOS Pathogens* 9(6): e1003441. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003441>
36. Bernardo I, Mancebo E, Aguiló I, Anel A, Allende LM, Guerra-Vales JM, Ruiz-Contreras J, Serrano A, Talayero P, de la Calle O, Gonzalez-Santesteban C, Paz-Artal E. Phenotypic and functional evaluation of CD3+CD4-CD8- T cells in human CD8 immunodeficiency. *Haematologica.* 2011 Aug;96(8):1195-203. doi: 10.3324/haematol.2011.041301. Epub 2011 May 5. PMID: 21546492; PMCID: PMC3148914.
37. Brandt D, Hedrich CM. TCRαβ⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2018 Apr;17(4):422-430. doi: 10.1016/j.autrev.2018.02.001. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29428806.