



ΤΜΗΜΑ  
**Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας**  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*« Ποσοτικός και ποιοτικός χαρακτηρισμός των φυσικών κυτταροκτόνων ,NK,  
κυττάρων στο ανθρώπινο ενδομήτριο »*

---

DIPLOMA THESIS

**« Quantitative and qualitative characterization of natural killers, NK, in the  
endometrium »**

**Νικολάου Νεόφυτος**

Προπτυχιακός φοιτητής

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2023

## **Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή**

### ***Καλαλά Φανή-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια***

Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### ***Παπουτσοπούλου Σταματία- Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια***

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### ***Σπελέτας Ματθαίος***

Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

### **Νεόφυτος Νικολάου,**

του Αποστόλου

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2023

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογία στο πλαίσιο συνεργασία με το τμήμα Ιατρικής. Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιστοσυμβατότητας και Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής. Η διεκπεραίωση της πτυχιακής εργασίας δε θα μπορούσε έχει πραγματοποιηθεί χωρίς την βοήθεια ενός αριθμού ατόμων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω, χωρίς την βοήθεια των οποίων, θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιήσω τον στόχο μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια και επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας κ.Καλαλά Φανή, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας στο τμήμα Ιατρικής, για την συμβουλευτική και επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας και για την μεγάλη εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την διάρκεια αυτής. Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην συνεπιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την συνεχής στήριξη, καθοδήγηση και το τεράστιο ενδιαφέρον εντός και εκτός εργαστηρίου. Όπως και επίσης για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς χωρίς την πολύτιμη βοήθεια της κ.Παπουτσοπούλου θα ήταν αδύνατο να ολοκληρώσω την παρούσα πτυχιακή εργασία.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Σπελέτα Ματθαίο, καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας στο τμήμα Ιατρικής, για την στήριξη και την συμβουλευτική καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Περαιτέρω οφείλω ένα ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα στην τεχνολόγο του εργαστηρίου κ.Φουσίκα Αθανασία για την εμπιστοσύνη, στήριξη και την βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την συνάδελφο και φίλη μου, Ρίλου Μαρία, για την πολύτιμη βοήθεια, στήριξη και ενθάρρυνση καθώς ήμασταν μαζί από την πρώτη μέρα μέχρι το τέλος στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, οφείλω το μεγαλύτερο μου ευχαριστώ στους γονείς μου, στα αδέρφια μου και στους φίλους μου για την στήριξη τους σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

# Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	3
1.1. Προέλευση Ενδομητριακών NK κυττάρων.....	4
1.2. Τροφοβλάστη-Ενδομητρικά NK κύτταρα	
1.2.1 Τροφοβλάστη.....	5
1.2.2 Υποδοχείς KIR.....	6
1.2.3 Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας HLA.....	7
1.2.4 Αλληλεπίδραση τροφοβλάστης-ενδομητριακών NK κυττάρων.....	7
1.3 Ο ρόλος των ενδομητριακών κυττάρων στην φυσιολογική κύηση.....	9
1.3.1 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην διείσδυση της εξωλάχνης τροφοβλάστης.....	11
1.3.2 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας.....	12
1.3.3 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην ανοσολογική ανοχή.....	13
1.4 Παθολογίας της κύησης.....	14
1.4.1 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στις επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις.....	16
1.4.2 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στις καθ'εξιν αποβολές.....	18
1.4.3 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην προεκλαμψία.....	19
2. Σκοπός εργασίας.....	25
3. Υλικά και μέθοδοι.....	26
3.1.1 Κυτταρομετρία ροής.....	26

3.1.2 Πειραματική διαδικασία.....	32
3.1.3 Στατιστική ανάλυση.....	42
4. Σύνοψη Αποτελέσματος.....	41
5. Συζήτηση και συμπεράσματα.....	47
6. Βιβλιογραφία.....	54

## Περίληψη

Για την επίτευξη μιας φυσιολογικής εξελισσόμενης εγκυμοσύνης κυρίαρχο ρόλο παίζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Αλλαγές στο μικροβιώμα του ενδομήτριου λόγω ιογενών λοιμώξεων φαίνεται να απορρυθμίζουν τις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε μια υγιή κύηση. Συγκεκριμένα αλλαγές στους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και κυρίως των ενδομητριακών NK κυττάρων φαίνεται πως επηρεάζουν την έκβαση της κύησης. Τα NK κύτταρα είναι μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα και υπό "φυσιολογικές συνθήκες" ελέγχουν τις τυχόν μικροβιακές λοιμώξεις στην εμβρυομητρική επιφάνεια και συμβάλουν στην ανοσολογική ανοχή μεταξύ μητέρας-εμβρύου, την υπέρμετρη διείσδυση της τροφοβλάστης στο φθαρτό και στην αγγειογένεση μέσω του ρυθμιστικού φαινοτύπου τους εκκρίνοντας κυτοκίνες. Μελέτες έχουν δείξει πως σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές αγνώστου αιτίας ο ρυθμιστικός φαινότυπος των NK κυττάρων γίνεται κυτταροτοξικός με αποτέλεσμα να δρουν ενάντια στα κύτταρα της τροφοβλάστης. Απόρροια αυτού να απορρυθμίζεται η ανοσολογική ανοχή στην διεπαφή μητέρας-εμβρύου θέτοντας σε κίνδυνο το έμβρυο λόγω των ανοσολογικών αποκρίσεων της μητέρας προς αυτό με στόχο την απόρριψη του. Περαιτέρω, ο κυτταροτοξικός φαινότυπος των NK κυττάρων οδηγεί σε απορύθμιση της αγγειογένεσης λόγω μειωμένης παραγωγής αγγειογενετικών παραγόντων με αποτέλεσμα την ανεπαρκή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας. Παρόλα αυτά τόσο ο ρόλος όσο και ο μηχανισμός δράσης των ενδομητριακών NK κυττάρων στις παθολογίες της κύησης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Στην παρούσα εργασία, μελετάτε ο ποιοτικός και ποσοτικός ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στο ανθρώπινο ενδομήτριο. Στόχος η περαιτέρω διερεύνηση, μελέτη και συσχέτιση των ενδομητριακών ανθρώπινων NK κυττάρων με τις παθολογίες στην κύηση για την συλλογή δεδομένων που θα βοηθήσουν σε μελλοντικό χρόνο στην αντιμετώπιση διαφόρων παθολογιών της κύησης.

## **Abstract**

The immune system plays an important role in achieving a normal ongoing pregnancy. Changes in the endometrial microbiome due to viral infections appear to deregulate the physiological processes that take place in a healthy pregnancy. Specifically, changes in lymphocyte subpopulations and especially in endometrial NK cells seem to affect the outcome of pregnancy. NK cells are large granular lymphocytes which under "normal conditions" control any microbial infections on the fetal maternal surface and contribute to maternal-fetal immune tolerance, excessive trophoblast penetration into the decidua and angiogenesis through their regulatory phenotype by secreting cytokines. Studies have shown that in women with recurrent miscarriages of unknown cause, the regulatory phenotype of NK cells becomes cytotoxic and acts against trophoblast cells. As a result, the immune tolerance at the mother-fetal interface is dysregulated, endangering the fetus because of the maternal immune responses to it in order to reject it. Furthermore, the cytotoxic phenotype of NK cells leads to deregulation of angiogenesis due to reduced production of angiogenic factors resulting in inadequate remodeling of the spiral artery. However, both the role and the mechanism of action of endometrial NK cells in pregnancy pathologies has not been fully elucidated. In this diploma thesis, we study the qualitative and quantitative role of endometrial NK cells in the human endometrium. The aim is to further investigate, study and correlate endometrial human NK cells with pregnancy pathologies in order to collect data that will help in the future in the treatment of various pregnancy pathologies.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα NK (Natural Killers) περιγράφονται ως μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα και αποτελούν μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Προέρχονται από τα CD34<sup>+</sup> αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) του μυελού των οστών και εκφράζουν στην επιφάνεια τους το δείκτη CD56 και CD16 [1]. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν την ανάπτυξη και ωρίμανση τους και σε δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς (Secondary Lymphoid Tissues, SLTs) συμπεριλαμβανομένων των αμυγδαλών και του σπλήνα [2]. Τα NK κύτταρα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς με βάση την έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD56 και CD16. Τα δύο κύρια υποσύνολα είναι τα CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> NK κύτταρα με ρόλο την παραγωγή ανοσορυθμιστικών κυτοκινών όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και τα CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> NK κύτταρα με σημαντικό ρολό στην διαδικασία της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταροτοξικότητας (ADCC) [3]. Οι κυτταροτοξικές ιδιότητες τους οφείλονται στην απελευθέρωση των πρωτεϊνών περφορίνων και πρωτεάσων σερίνης (granzymes) από τα λυτικά κοκκία των NK κυττάρων και στην έκκριση κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη-10 (IL-10) και οδηγούν στην απόπτωση ή λύση των κυττάρων στόχων [4].

Τα NK κύτταρα βρίσκονται τόσο στο περιφερικό αίμα (Peripheral Blood Natural Killers-pBNK) όσο και στο ενδομήτριο (Uterine Natural Killers-uNK). Διαφέρουν μεταξύ τους στο φαινότυπο και στις λειτουργίες τους. Τα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος είναι σημαντικά ως πρώτη γραμμή άμυνας κατά των ιών (αντική) και στον έλεγχο της πρώιμης εξάπλωσης των όγκων (αντικαρκινική), λειτουργίες διαμεσολαβούμενες από την κυτταροτοξική ιδιότητα τους και από την έκκριση κυτοκινών [5]. Στο περιφερικό αίμα υπάρχουν δύο κύριοι τύποι NK κυττάρων με το 90% να παρουσιάζει φαινότυπο CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> NK και το 10% με φαινότυπο CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> NK. Σε αντίθεση με τα περιφερικά NK κύτταρα, τα uNK κύτταρα παρουσιάζουν έναν μοναδικό μοτίβο επιφανειακών δεικτών και χαρακτηρίζονται ως CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> NK που αντιπροσωπεύει πάνω από το 70% των συνολικών λεμφοκυττάρων



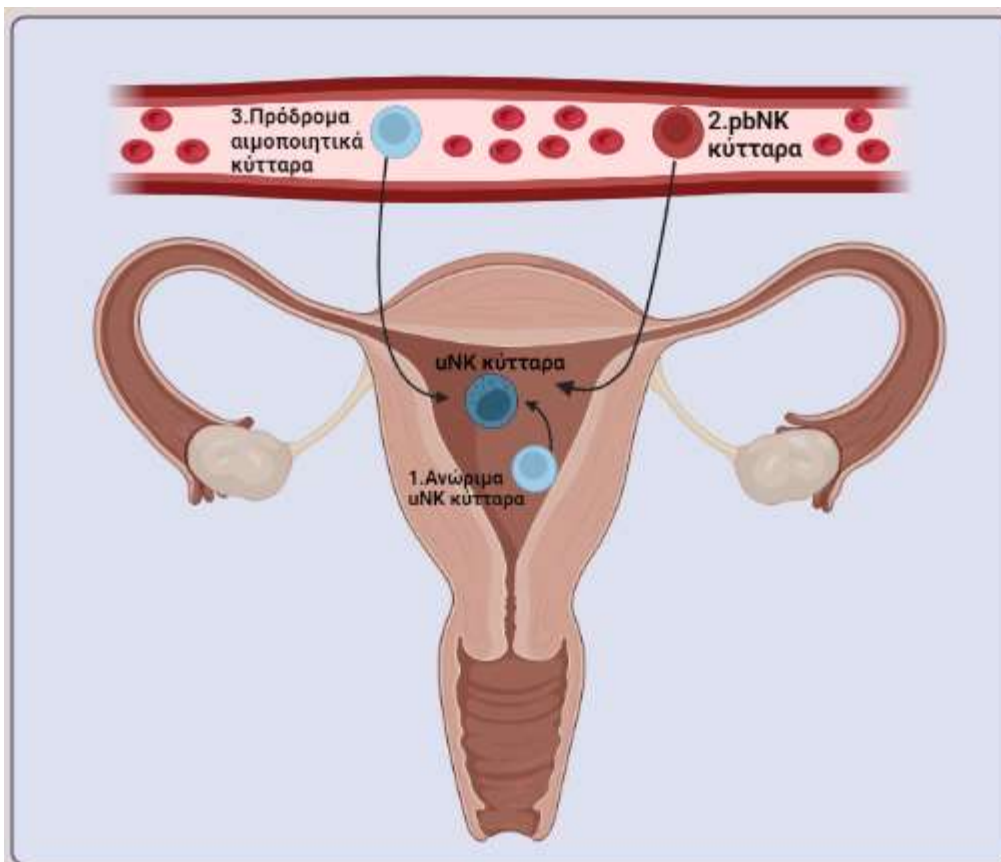
στο ενδομήτριο [6]. Διαφέρουν σημαντικά από τα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος, καθώς έχουν σχετικά χαμηλή κυτταροτοξική δράση αλλά αυξημένη παραγωγή κυτοκινών. Επομένως, τα NK κύτταρα που εντοπίζονται στην μήτρα είναι μια ειδική κατηγορία NK κυττάρων που φέρουν διαφορετικές λειτουργίες, επιφανειακούς δείκτες και υποδοχείς σε σύγκριση με τα NK κύτταρα του περιφερικού αίματος.

Κατά την διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης τα ενδομητριακά NK κύτταρα είναι άφθονα εμφανίζοντας μοναδικά φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο υπάρχει ετερογένεια των ενδομητριακών NK κυττάρων και πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει πως στο φθαρτό υμένα εκφράζονται τρεις υποπληθυσμοί ( $uNK_1$ ,  $uNK_2$ ,  $uNK_3$ ) με διαφορετικούς επιφανειακούς δείκτες και έκφραση γονιδίων [7]. Τα  $uNK_1$  κύτταρα φαίνεται να εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων KIR σε σύγκριση με τα υποσύνολα  $uNK_2$  και  $uNK_3$  κυττάρων [8]. Ακόμη φαίνεται πως έχουν περισσότερους κυτταροπλασματικούς κόκκους και εκφράζουν περισσότερες πρωτεΐνες όπως η περφορίνη και η γρανζύμη συγκριτικά με τα υποσύνολα  $uNK_2$  και  $uNK_3$  κυττάρων τα οποία παράγουν περισσότερες κυτοκίνες μετά από διέγερση. Παρόλα αυτά η ακριβής λειτουργία των υποπληθυσμών  $uNK$  κυττάρων στον άνθρωπο παραμένει ακόμη άγνωστη και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση από την επιστημονική κοινότητα [9].

Τα ενδομητριακά NK κύτταρα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για την έκβαση της εγκυμοσύνης λόγω της συμμετοχής τους σε έναν αριθμό διεργασιών όπως η ρύθμιση διείσδυσης της τροφοβλάστης στο φθαρτό υμένα, η αγγειογένεση και η δημιουργία ανοσολογικής ανοχής μεταξύ μητέρας-εμβρύου [10]. Επίσης, αλλαγές στον φαινότυπο και στον φυσιολογικό αριθμό τους συσχετίζονται με παθολογίες της κύησης όπως οι επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις και καθ'εξιν αποβολές αλλά μέχρι στιγμής ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

## 1.1. Προέλευση των ενδομητριακών NK κυττάρων

Παρόλο τις μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια η ακριβής προέλευση των ενδομητριακών NK κυττάρων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Μια υπόθεση υποστηρίζει πως τα ενδομητριακά NK κύτταρα προέρχονται από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία στρατολογούνται από το αίμα στο ενδομήτριο και όταν βρεθούν σε βέλτιστο μικροπεριβάλλον διαφοροποιούνται σε uNK κύτταρα [10]. Ακόμη μια άλλη υπόθεση υποστηρίζει πως τα uNK κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν *in situ* από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα CD34<sup>+</sup> τα οποία εντοπίζονται στο ενδομήτριο. Η μελέτη αυτή υποστηρίζεται από *in vitro* πειράματα στα οποία πραγματοποιήθηκε επιτυχής απομόνωση πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων από ενδομητριακό ιστό γυναικών που δεν κυοφορούσαν αλλά και από το φθαρτό υμένα γυναικών στα πρώιμα στάδια της κύησης. Τα HPCs κύτταρα που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υγρό CM (Conditioned Medium) στρωματικών κυττάρων στο οποίο προστέθηκε και μείγμα κυτοκινών με αποτέλεσμα την επιτυχή διαφοροποίηση τους σε κύτταρα που μοιάζουν με τα uNK κύτταρα με φαινότυπο CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> [11]. Επιπλέον, μια άλλη υπόθεση υποστηρίζει πως τα uNK κύτταρα προέρχονται από CD34<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> CD94<sup>-</sup> NK κύτταρα του περιφερικού αίματος [12]. Χημειοκίνες και κυτοκίνες προτείνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση τους στο ενδομήτριο. Η μελέτη αυτή υποστηρίζεται από *in vitro* πειράματα στα οποία πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση και στην συνέχεια καλλιέργεια NK κυττάρων του περιφερικού αίματος σε μέσο εμπλουτισμένο με μείγμα κυτοκινών και χημειοκινών με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση τους σε κύτταρα που μοιάζουν φαινοτυπικά με τα uNK κύτταρα (**Εικόνα 1**) [13]. Επομένως, η προέλευση των ενδομητριακών NK κυττάρων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως όμως η γνώση της ακριβούς προέλευσης τους είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό κατάλληλων θεραπειών για την αντιμετώπιση παθολογιών στις οποίες εμπλέκονται τα ενδομητριακά NK κύτταρα.



**Εικόνα 1:** Οι υποθέσεις για την προέλευση των ενδομητριάκων NK κυττάρων (uNK)

**(1)** Από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία εντοπίζονται στο ενδομήτριο και διαφοροποιούνται *in situ* σε ενδομητριάκα NK κύτταρα. **(2)** Από NK κύτταρα του περιφερικού αίματος (ρbNK) τα οποία στρατολογούνται στο ενδομήτριο και διαφοροποιούνται με την βοήθεια κυτοκινών σε ενδομητριάκα NK κύτταρα. **(3)** Από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία στρατολογούνται στο ενδομήτριο και στην συνέχεια όταν βρεθούν σε βέλτιστο περιβάλλον διαφοροποιούνται σε uNK κύτταρα. (Πηγή: BioRender)

## **1.2. Τροφοβλάστη και υποδοχείς ενδομητριακών NK κυττάρων**

### **1.2.1 Τροφοβλάστη**

Η τροφοβλάστη είναι έναν λεπτό στρώμα κυττάρων, διαφοροποιείται από το γονιμοποιημένο ωάριο και αποτελεί το εξωτερικό στρώμα των κυττάρων της βλαστοκύστης. Βοηθάει το αναπτυσσόμενο έμβρυο να προσκολληθεί στο τοίχωμα της μήτρας κατά την διαδικασία της εμφύτευσης και αποτελεί μέρος του πλακούντα [14]. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε δύο κατηγορίες στην κυτταροτροφοβλάστη και στη συγκυτιοτροφοβλάστη. Η κυτταροτροφοβλάστη διαιρείται περαιτέρω στην εξωλάχνη τροφοβλάστη (EVT, extravillous trophoblasts), η οποία διεισδύει στα στρωματικά κύτταρα του φθαρτού και συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας για την δημιουργία του κατάλληλου αγγειακού περιβάλλοντος στον πλακούντα [15]. Βρίσκεται σε στενή επαφή με τα ενδομητριακά NK κύτταρα τα οποία δεν προκαλούν τη λύση της λόγω του μη κυτταροτοξικού φαινότυπου τους αντιθέτως όμως ρυθμίζουν την διείσδυση της στο φθαρτό [16]. Περαιτέρω τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα φέρουν αντιγόνα HLA τα οποία αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς KIR των ενδομητριακών NK κυττάρων αποτέλεσμα την δημιουργία ανοσολογικής ανοχής μεταξύ μητέρας και εμβρύου [17].

### **1.2.2 Υποδοχείς Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR)**

Οι υποδοχείς KIR εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδομητριακών NK κυττάρων και σε έναν υποσύνολο T κυττάρων. Ορίζονται με βάση τον αριθμό των εξωκυτταρικών περιοχών που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνη (2D ή 3D) και το μήκος της κυτταροπλασματικής ουράς. Είναι μια οικογένεια ενεργοποιητικών ή ανασταλτικών υποδοχέων που χρησιμεύουν ως βασικοί ρυθμιστές της λειτουργίας των NK κυττάρων [18]. Χαρακτηρίζονται από έναν εξαιρετικά υψηλό βαθμό γενετικής και λειτουργικής ποικιλομορφίας. Τα KIR γονίδια διαχωρίζονται σε δύο απλότυπους το KIR-A και το KIR-B ανάλογα με το γονιδιακό περιεχόμενο τους [19]. Επομένως,

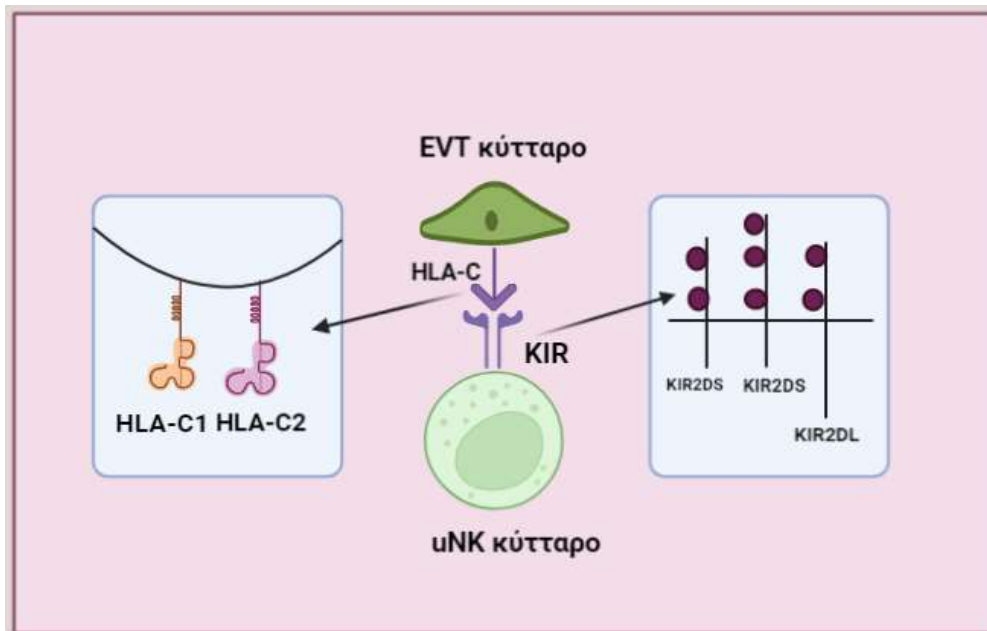
η συχνότητα αυτών των απλοτύπων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών [20]. Ο απλότυπος A περιλαμβάνει κυρίως ανασταλτικούς υποδοχείς KIR όπως οι KIR2DL1, KIR2DL3, και μόνο έναν υποδοχέα ενεργοποίησης τον KIR2DS4 [21]. Ο απλότυπος B περιλαμβάνει τόσο ανασταλτικούς όσο και ενεργοποιητικούς υποδοχείς. Συνεπώς, σε κάθε κύηση ο γονότυπος KIR της μητέρας μπορεί να είναι AA ή AB/BB [22].

### **1.2.3 Αντιγόνα ανθρώπινων λευκοκυττάρων**

Τα αντιγόνα ανθρώπινων λευκοκυττάρων (Human Leukocyte Antigen-HLA) είναι ένα σύμπλεγμα γονιδίων το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας με στόχο την ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και είναι το αντίστοιχο κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC) στον άνθρωπο [23]. Η βασική λειτουργία του συμπλέγματος γονιδίων HLA είναι η διάκριση μεταξύ «εαυτού» και «μη εαυτού» κατά την έναρξη μιας ανοσολογικής απόκρισης και διακρίνονται σε τρεις τάξεις γονιδίων [24]. Τα γονίδια τάξης I (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G) κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται στις κυτταρικές επιφάνειες σε όλα τα εμπύρνηνα ευκαρυωτικά κύτταρα και δεσμεύουν πεπτίδια από το εσωτερικό του κυττάρου για να τα παρουσιάσουν στα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Ακόμη, τα γονίδια τάξης I υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες την τάξη Ia, η οποία περιλαμβάνει τα κλασικά μόρια HLA-A, HLA-B, και HLA-C και στην τάξη Ib, η οποία περιλαμβάνει τα μη κλασικά μόρια HLA-E, HLA-F, και HLA-G. Τα γονίδια τάξης II εκφράζονται σε δενδριτικά κύτταρα και B-κύτταρα κωδικοποιώντας πρωτεΐνες οι οποίες παρουσιάζουν αντιγόνα από το εξωτερικό του κυττάρου προς τα T-λεμφοκύτταρα. Τα T-λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους διεγείρουν τα B-κύτταρα τα οποία παράγουν αντισώματα για το συγκεκριμένο αντιγόνο [25]. Τα γονίδια τάξης III δεν κωδικοποιούν HLA πρωτεΐνες αλλά παράγουν πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

### **1.2.4 Αλληλεπίδραση υποδοχέων KIR με αντιγόνα HLA**

Η επιτυχής εμφύτευση του εμβρύου στην μήτρα, η δημιουργία του πλακούντα, η αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας και η ανοσολογική ανοχή μητέρας-εμβρύου είναι απαραίτητα στάδια για μια επιτυχή και υγιή εγκυμοσύνη [26]. Η πραγματοποίησή τους οφείλεται τόσο στην ισορροπία του μικροβιώματος στο ενδομήτριο όσο και στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα KIR των ενδομητριάκων NK κυττάρων με τα αντιγόνα HLA της τροφοβλάστης (**Εικόνα 2**). Η εξωλάχνη τροφοβλάστη (EVT) στην επιφάνεια της εκφράζει μόνο το κλασικό πολυμορφικό μόριο HLA-C της τάξης Ia και τα μη κλασικά αντιγόνα όπως HLA-G, HLA-E, HLA-F της τάξης Ib ενώ δεν εκφράζει HLA αντιγόνα της τάξης II [27].



**Εικόνα 2:** Συνδυασμοί του πολυμορφικού αντιγόνου ανθρώπινων λευκοκυττάρων HLA-C των εξωλαχνικών κυττάρων της τροφοβλάστης (Extravillous trophoblasts-EVT) με τον υποδοχέα KIR των ενδομητριάκων NK κυττάρων (Uterine-Natural Killers-uNK) (Πηγή: BioRender)

Το HLA-C είναι εξαιρετικά πολυμορφικό και η στην σύνδεση του με τους υποδοχείς KIR των ενδομητριάκων NK κυττάρων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την έκβαση της κύησης. Τα ενδομητριάκα NK κύτταρα αναγνωρίζουν συγκεκριμένα δύο ομάδες αλλοτύπων HLA-C, το

HLA-C1 και HLA-C2 [28]. Το HLA-C1 και HLA-C2 διακρίνονται μεταξύ τους λόγω των διαφορετικών αμινοξέων που φέρουν, ασπαραγίνη και λυσίνη αντίστοιχα, στην θέση 80 της βαριάς αλυσίδας [29]. Το HLA-C1 συνδέεται με ανασταλτικούς υποδοχείς KIR, ενώ το HLA-C2 συνδέεται σε ανασταλτικούς ή ενεργοποιητικούς υποδοχείς KIR. Σε κάθε εγκυμοσύνη οι αλληλεπιδράσεις των ενδομητριακών NK κυττάρων με την εξωλάχνη τροφοβλάστη διαφέρουν λόγω των διαφορετικών συνδυασμών των μητρικών απλοτύπων KIR με το εμβρυικό αλλότυπο του HLA-C [30]. Αυτό συμβαίνει επειδή τόσο τα γονίδια KIR όσο και τα γονίδια HLA είναι πολυμορφικά.

Ακόμη έχει δειχθεί πως γυναίκες με ανασταλτικό υποδοχέα-KIR-AA οι οποίες κυοφορούν έμβρυο με αλλότυπο HLA-C2, ο συνδυασμός αυτός μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη διείσδυση της τροφοβλάστης και σε ανεπαρκή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας [31]. Επομένως οι συνδυασμοί μεταξύ του εμβρυικού αλλότυπου HLA-C της τροφοβλάστης και του μητρικού υποδοχέα KIR διαφέρουν σε κάθε εγκυμοσύνη παίζοντας πολύ σημαντικό ρόλο στην έκβαση της [32]. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει πως τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης HLA-C μπορούν να επηρεάσουν άμεσα και την κυτταροτοξική δραστηριότητα των ενδομητριακών NK κυττάρων [33].

Τα HLA-G είναι ένα μη κλασικό αντιγόνο το οποίο εντοπίζεται κυρίως κατά την διεπαφή μητέρας-εμβρύου και έχει χαμηλό επίπεδο πολυμορφισμού. Συνδέεται με τους KIR2DL4 υποδοχείς των uNK κυττάρων και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ανοσολογικής ανοχής μεταξύ μητέρας-εμβρύου [34]. Επιπλέον σχετίζεται με την ανάπτυξη του πλακούντα και με την αγγειακή αναδιαμόρφωση μέσω της παραγωγής κυτοκινών και αγγειακών παραγόντων όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας-VEGF αντίστοιχα [35]. Ακόμη, αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως τα χαμηλά επίπεδα του σχετίζονται με το κίνδυνο ανάπτυξη προεκλαμψίας.

Τα HLA-E και HLA-F είναι μη κλασικά αντιγόνα της τάξης Ib τα οποία δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Το HLA-F συνδέεται με KIR υποδοχείς και εκφράζεται στον πλακούντα από το δεύτερο τρίμηνο της κύησης. Οι ακριβείς λειτουργίες του δεν έχουν διευκρινιστεί και δεν υπάρχουν

δεδομένα για την αλληλεπίδραση του με τα ενδομητριακά NK κύτταρα. Παρόλα αυτά αν και ο βασικός ρόλος του δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως βοηθάει στην ανάπτυξη και διατήρηση του πλακούντα [36]. Το πολυμορφικό HLA-E συνδέεται με ανασταλτικούς υποδοχείς των ενδομητριακών NK κυττάρων και φαίνεται να υποκινεί την αναστολή του κυτταροτοξικού φαινοτύπου τους [37]. Η αλληλεπίδραση του με τους υποδοχείς των ενδομητριακών NK κυττάρων έχει θεωρηθεί πως παίζει βασικό ρόλο στην διαδικασία της πλακουντοποίησης [38]. Μελέτες έχουν δείξει πως ο πολυμορφισμός του HLA-E ίσως σχετίζεται με τις καθ'έξιν αποβολές ενώ άλλες μελέτες δεν βρίσκουν καμία συσχέτιση. Συνεπώς οι μελέτες για τον ρόλο του στην εγκυμοσύνη δεν έχουν δώσει σαφή αποτελέσματα και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

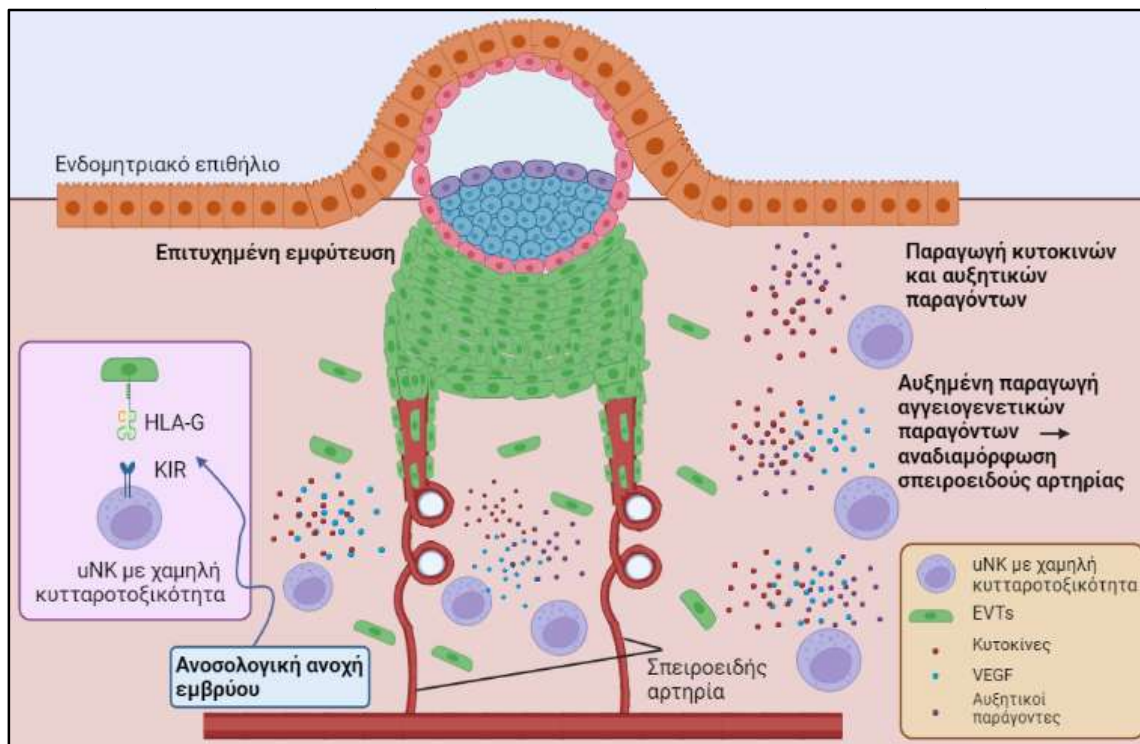
### **1.3 Ο φυσιολογικός ρόλος των uNK κυττάρων στην εγκυμοσύνη**

Η εμφύτευση του εμβρύου είναι έναν κρίσιμο βήμα στην κύηση το οποίο προϋποθέτει προσκόλληση και διείσδυση του στο βασικό επιθήλιο του ενδομητρίου. Περιλαμβάνει μια ιδιαίτερα περίπλοκη συνεργασία μεταξύ της τροφοβλάστης, των ανοσοκυττάρων του ενδομητρίου και των παραγόμενων ορμονών της μητέρας [39]. Αυτές οι διεργασίες οδηγούν σε μια σταθερή επαφή μεταξύ του εμβρυϊκού και μητρικού ιστού με αποτέλεσμα να αρχίζουν οι διαδικασίες για τον σχηματισμό του πλακούντα. Ο πλακούντας εξασφαλίζει την άμεση επαφή της μητριαίας κυκλοφορίας δια μέσου του μεσολάχιου χώρου με τις χοριακές λάχνες [40]. Για να συμβεί αυτό πρέπει τα μητριαία αγγεία να υποστούν σημαντικές μεταβολές με στόχο την καταστροφή του μυώδους τοιχώματος τους. Οι μεταβολές που γίνονται στην σπειροειδή αρτηρία προέρχονται αρχικά από τα ανοσοκυττάρα του φθαρτού υμένα κυρίως των ενδομητριακών NK κυττάρων [41]. Στην συνέχεια η εξωλάχνη τροφοβλάστη διαφοροποιείται σε ενδαγγειακή τροφοβλάστη η οποία προκαλεί περαιτέρω αλλαγές στο τοίχωμα της σπειροειδούς αρτηρίας. Η αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της παροχής θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου για την επιβίωση του εμβρύου και απαιτείται η συνεργασία των ενδομητριακών NK κυττάρων με την εξωλάχνη τροφοβλάστη.



Σε μια φυσιολογική εγκυμοσύνη τα επίπεδα των ενδομητριακών κυττάρων είναι πολύ αυξημένα και αποτελούν το 70% των λευκοκυττάρων στο φθαρτό υμένα κατά τα πρώτα στάδια της κύησης μέχρι το τέλος του πρώτου τριμήνου. Αυτό οφείλεται στην έντονη αναπαραγωγική ικανότητα τους σε συνδυασμό με την ικανότητα τους να αυτό-ανανεώνονται *in situ* [42]. Επιπλέον τα ορμονικά σήματα από τους αναπαραγωγικούς ιστούς φαίνεται να αποτελούν έναν ακόμη λόγο για τον αυξημένο αριθμό τους στο ενδομήτριο [43]. Τα ενδομητριακά NK κύτταρα δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξικό φαινότυπο αλλά αντίθετα ρυθμιστικό. Συνεπώς παράγουν μια σειρά κυτοκινών όπως οι IL-1β, IL-6, IL-8, IFN-γ, ο παράγοντας διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), ο παράγοντας διέγερσης αποικίας μακροφάγων (M-CSF), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και αυξητικούς παράγοντες των οποίων τα επίπεδα μεταβάλλονται κατά την διάρκεια της κύησης [44]. Οι κυτοκίνες φαίνεται να ενορχηστρώνουν μια ανοσολογική εξισορρόπηση μεταξύ φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών αποκρίσεων. Σε κάθε τρίμηνο της κύησης πρωταγωνιστεί διαφορετική οικογένεια ανοσογονιδίων για να εξυπηρετήσει διαφορετικό σκοπό. Πιο συγκεκριμένα στο πρώτο τρίμηνο επικρατεί φλεγμονώδης κατάσταση λόγω εμφύτευσης της βλαστοκύστης, της δημιουργίας του πλακούντα, των αγγείων με την επικράτηση της T-helper1 (T<sub>H</sub>1) ανοσολογικής απόκρισης. Στο δεύτερο τρίμηνο λόγω της οργανογένεσης επικρατεί αντιφλεγμονώδης κατάσταση και επομένως υπερισχύει η T-helper2 (T<sub>H</sub>2) ανοσολογική απόκριση. Στο τελευταίο τρίμηνο λόγω της αύξησης βάρους του εμβρύου και του τοκετού δημιουργείται μια φλεγμονώδης κατάσταση με την επικράτηση της T-helper1 (T<sub>H</sub>1) ανοσολογικής απόκρισης.

Ο ρόλος των ενδομητριάκων NK κύτταρα στην φυσιολογική κύηση είναι η συμβολή τους στην αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας στο πλακούντα και η ρύθμιση της διείσδυσης της εξωλάχνης τροφοβλάστης στο φθαρτό υμένα. Ακόμη, ένας τρίτος ρόλος τους είναι η αλληλεπίδραση του υποδοχέα KIR που φέρουν με τα αντιγόνα HLA των τροφοβλαστικών κυττάρων με στόχο την δημιουργία ανοσολογικής ανοχής μεταξύ της μητέρας-εμβρύου με στόχο την προστασία του εμβρύου και όχι την απόρριψη του **(Εικόνα 3)**.



**Εικόνα 3:** Ο ρόλος των ενδομητριάκων NK κυττάρων στις διαδικασίες οι οποίες συμβαίνουν στην επιτυχή εμφύτευση και διατήρηση της εγκυμοσύνης (Πηγή: BioRender)

### **1.3.1 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην διείσδυση της εξωλάχνης τροφοβλάστης (Extravillous trophoblasts-EVT)**

Η αυστηρός έλεγχος διείσδυσης της εξωλάχνης τροφοβλάστης (EVT) είναι απαραίτητος για την έκβαση της εγκυμοσύνης. Η εξωλάχνη τροφοβλάστη συμβάλει στην ανάπτυξη του πλακούντα και στην εξασφάλιση θρεπτικών συστατικών με την συμμετοχή της στην αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας. Ξεκινάει την διείσδυση της στον φθαρτό και στην συνέχεια εισβάλλει και αναδιαμορφώνει τις σπειροειδείς αρτηρίες. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα έρχονται σε επαφή με όλα τα μητρικά κύτταρα του φθαρτού υμένα και εκφράζουν στην επιφάνεια τους μόνο αντιγόνα HLA κατηγορίας I HLA-C, HLA-E και HLA-G τα οποία αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των ενδομητριακών NK κυττάρων [45]. Η διαδικασία της διείσδυσης πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος της υπερβολικής διείσδυσης της στο φθαρτό. Τα ενδομητριακά κύτταρα φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της κινητικότητας των εξωλαχνικών τροφοβλαστικών κυττάρων ενισχύοντας ή καταστέλλοντας την διείσδυση τους [46]. Πιο συγκεκριμένα η διείσδυση της τροφοβλάστης ευνοείται σε υποξικές καταστάσεις και τα ενδομητριακά NK κύτταρα την ρυθμίζουν μέσω της έντασης του οξυγόνου στην διεπαφή μητέρας-εμβρύου. Επομένως αλλαγές στην διακύμανση της παροχής οξυγόνου στο μητροπλακουντιακό περιβάλλον θα προκαλούσαν συνέπειες στην διείσδυση της τροφοβλάστης [47]. Συνεπώς όταν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες είναι υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα και υπάρχει αύξηση της δραστηριότητας των ενδομητριακών NK κυττάρων λόγω της αυξημένης άφιξης οξυγόνου αυτό οδηγεί σε μη φυσιολογική κύηση.

### **1.3.2 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην αναδιαμόρφωση σπειροειδών αρτηριών**

Η αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας λαμβάνει χώρα μεταξύ της 7<sup>ης</sup> και της 18<sup>ης</sup> εβδομάδας με σκοπό να βοηθήσει στην αυξημένη διατροφική ζήτηση του εμβρύου [48]. Στην πρώτη φάση της αναδιαμόρφωσης συμμετέχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κυρίως τα ενδομητριακά NK κύτταρα. Τα ενδομητριακά NK κύτταρα συσσωρεύονται γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία και χαρακτηρίζονται ως οι κύριοι ρυθμιστές της αγγειογένεσης στο ενδομήτριο. Ο σκοπός της πρώτης φάσης είναι η απώλεια της μυοελαστικής δομής και η καταστροφή του στρώματος των ενδοθηλιακών κυττάρων [49]. Κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-2 (Interleukin-2-IL-2), ιντερλευκίνη-10 (Interleukin-10-IL-10), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha-TNF- $\alpha$ ) και διάφοροι αγγειογόνοι αυξητικοί παράγοντες όπως ο ενδοθηλιακός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF), η αγγειοποιητίνη 1 (Angiopoietin 1-Ang1) και η αγγειοποιητίνη 2 (Angiopoietin 2-Ang2) εκκρίνονται από ενδομητριακά NK κύτταρα και φαίνεται πως συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας [50]. Η έκκριση αγγειογενετικών παραγόντων και κυτοκινών από τα uNK κύτταρα είναι απόρροια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποδοχέα KIR που βρίσκεται στην επιφάνεια τους με τα αντιγόνα HLA των εξωλαχνικών τροφοβλαστικών κυττάρων. Τόσο οι κυτοκίνες όσο και οι αγγειογόνοι αυξητικοί παράγοντες συμβάλουν στην αλλαγή του σχήματος και της στοίχισης των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων με αποτέλεσμα από αγγεία μικρού διαμετρήματος, υψηλών αντιστάσεων και χαμηλών ροών να μετατρέπονται σε αγγεία με μεγαλύτερη διάμετρο, με χαμηλή αντίσταση και υψηλή ροή που μπορούν να παρέχουν θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο στο έμβρυο [51]. Στην δεύτερη φάση εκτός από τα ενδομητριακά NK κύτταρα φαίνεται πως η εξωλάχνη τροφοβλάστη και πιο συγκεκριμένα τα ενδοαγγειακά τροφοβλαστικά κύτταρα προκαλούν περαιτέρω αλλαγές στο τοίχωμα της σπειροειδούς αρτηρίας. Οι μεταβολές που προκαλούν τα ενδοαγγειακά τροφοβλαστικά κύτταρα είναι απώλεια των αρτηριακών λείων μυϊκών ινών και των ενδοθηλιακών κυττάρων [52].

Συνεπώς, η συνεργασία μεταξύ των ενδομητριακών NK κυττάρων και των τροφοβλαστικών κυττάρων είναι απαραίτητη για την σωστή αγγειογένεση στο πλακούντα. Η αυξημένη διαπερατότητα και διαστολή των αγγείων, η απώλεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και η εισβολή της ενδαγγειακή τροφοβλάστης στην σπειροειδή αρτηρία είναι απαραίτητες διεργασίες για την αναδιαμόρφωση της με στόχο η αιματική ροή να γίνεται ακόμη πιο αποτελεσματική φτάνοντας μέχρι τα 500 – 600 ml/min στις 34 – 40 εβδομάδες κύησης.

### **1.3.3 Ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην ανοσολογική ανοχή μεταξύ μητέρας-εμβρύου**

Για μια επιτυχή και υγιή κύηση είναι απαραίτητη η σωστή αλληλεπίδραση και η συνεργασία του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας με το έμβρυο. Το έμβρυο μοιράζεται μόνο τα μισά γονίδια του από την μητέρα του ενώ τα υπόλοιπα τα κληρονομεί από τον πατέρα του επομένως το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα το αντιλαμβάνεται ως έναν αντιγονικό ξένο σώμα [53]. Συνεπώς το μητρικό ανοσολογικό σύστημα εκκινεί ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του εμβρύου με σκοπό την απόρριψη του. Οι ερευνητές είχαν προτείνει διάφορες υποθέσεις πώς μπορεί το έμβρυο να ξεφύγει από τις μητρικές ανοσολογικές αποκρίσεις και να γίνει δεκτικό από την μητέρα μεταξύ των οποίων ο ανατομικός διαχωρισμός των ιστών μεταξύ μητέρας-εμβρύου με τον σχηματισμό του πλακούντα, η ανωριμότητα των αντιγονικών λευκοκυττάρων (HLA) και η καταστολή της μητρικής ανοσίας. Μετά από χρόνια έρευνας αποδείχθηκε πως ο διάλογος μεταξύ των τροφοβλαστικών κυττάρων με τα μητρικά ανοσοκύτταρα στην διεπαφή μητέρας-εμβρύου είναι ένας καθαριστικός παράγοντας για την καθιέρωση και την διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής. Η διεπαφή μητέρας-εμβρύου δημιουργείται στην αρχή της κύησης όταν η εξωλάχνη τροφοβλάστη (EVT) διεισδύει στο φθαρτό και έρχεται σε επαφή με τα μητρικά ανοσοκύτταρα. Επομένως η διεπαφή αποτελείται από εμβρυϊκούς τροφοβλάστες και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα ενδομητριακά NK κύτταρα [54]. Για την δημιουργία της ανοσολογικής ανοχής τα ανοσοποιητικά κύτταρα τα οποία αποτελούν μέρος του περιβάλλοντος στην διεπαφή μητέρας-

εμβρύου δεν πρέπει να φέρουν κυτταροτοξικό φαινότυπο ο οποίος θα οδηγήσει στην απόρριψη του εμβρύου. Συνεπώς τα ενδομητριάκα NK κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αντιγόνα HLA-G, HLA-C και HLA-E που εκφράζονται στα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα με αποτέλεσμα να την καταστολή της κυτταροτοξικής τους δράση η οποία οφείλεται λόγω της έναρξης των ανοσολογικών αποκρίσεων από το μητρικό σύστημα της μητέρας. Πιο συγκεκριμένα η αλληλεπίδραση του αντιγόνου HLA-G με τους ανασταλτικούς υποδοχείς KIR2DL1 και KIR2DL2/L3 των ενδομητριάκων NK κυττάρων ευθύνεται για την μείωση της κυτταροτοξικότητας τους [55]. Το HLA-G πέρα από την αναστολή του κυτταροτοξικού φαινότυπου των uNK κυττάρων καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξικότητα τόσο των T-λεμφοκυττάρων όσο και των B-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον σημαντικό ρόλο για την μείωση της κυτταροτοξικότητας των ενδομητριάκων NK κυττάρων παίζει και το αντιγόνο HLA-E το οποίο αλληλεπιδρά με τους ανασταλτικούς υποδοχείς τους. Συνεπώς το αποτέλεσμα της μείωσης της κυτταροτοξικότητας των κυττάρων του ενδομητρίου οδηγεί στην προστασία του εμβρύου δηλαδή στην ανοσολογική ανοχή και όχι στην απόρριψη του λόγω των ανοσολογικών αποκρίσεων από μητέρα προς αυτό [56]. Παρόλα αυτά το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα πέρα από την ανοσολογική ανοχή διατηρεί παράλληλα και την ανοσολογική άμυνα έναντι των παθογόνων για την προστασία τόσο της μητέρας όσο και του εμβρύου από λοιμώξεις καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

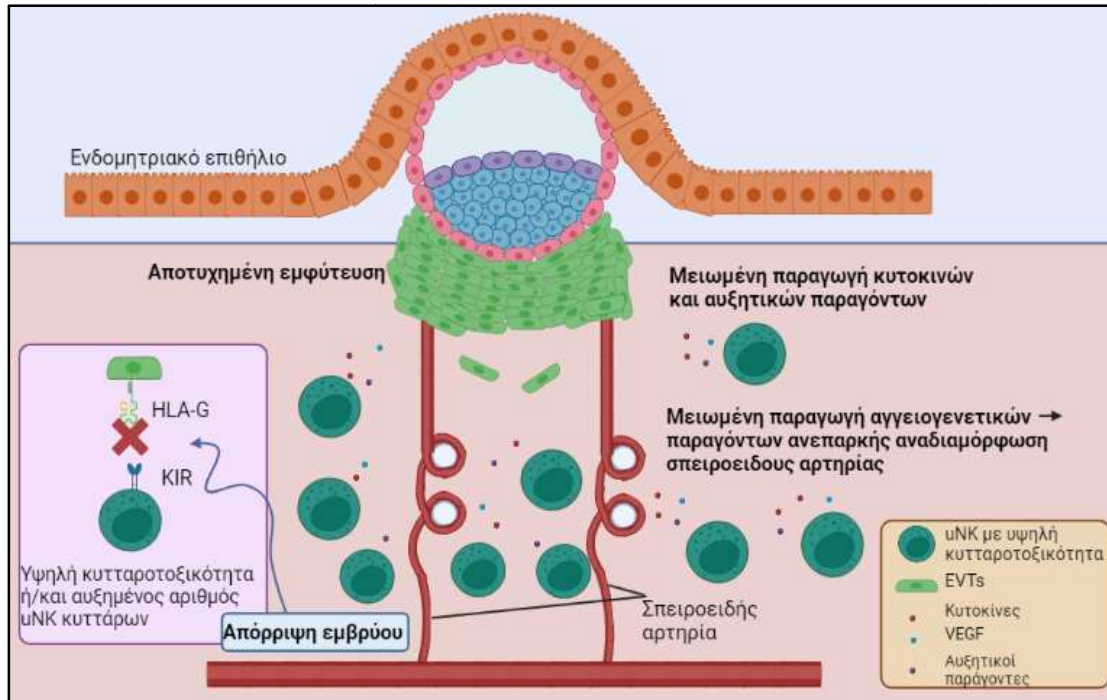
#### **1.4 Παθολογία στην κύηση**

Ο μη φυσιολογικός αριθμός και η αλλαγή φαινοτύπου των ενδομητριάκων NK κυττάρων μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες παθολογίες της κύησης όπως η προεκλαμψία, οι καθ'έξιν αποβολές και οι επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις [57]. Συνεπώς, ο στόχος των ερευνητών τα τελευταία χρόνια είναι η συσχέτιση ενδομητριάκων NK κυττάρων με τις παθολογίες της κύησης. Αλλαγές στην συγκέντρωση ή/και στο φαινότυπο των uNK κυττάρων οφείλονται σε ένα μη ρυθμισμένο ενδομητριάκο περιβάλλον [58]. Όταν η συγκέντρωση των

NK κυττάρων στο ενδομήτριο είναι αυξημένη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά επίπεδα ή/και έχουν κυτταροτοξικό φαινότυπο  $CD16^{bright}/CD56^{dim}$  αντί ρυθμιστικό  $CD16^{dim}/CD56^{bright}$  τότε όλες οι διεργασίες όπως η ανοσολογική ανοχή, η ρύθμιση της διείσδυσης της εξωλάχνης τροφοβλάστης και η αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας που συμβαίνουν κατά την φυσιολογική εγκυμοσύνη απορρυθμίζονται [60]. Αρχικά τα ενδομητριάκα NK κύτταρα αποτυγχάνουν να αλληλεπιδράσουν με τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα όπως θα έπρεπε λόγω του κυτταροτοξικού φαινότυπου τους με αποτέλεσμα να τα επιτίθενται και να τα καταστρέφουν **(Εικόνα 4)**. Απόρροια αυτού να απορρυθμίζεται η ανοσολογική ανοχή στην διεπαφή μητέρας-εμβρύου θέτοντας σε κίνδυνο το έμβρυο λόγω των ανοσολογικών αποκρίσεων της μητέρας προς αυτό με στόχο την απόρριψη του [61]. Επιπλέον, η διείσδυση των κυττάρων της τροφοβλάστης στο φθαρτό μειώνεται λόγω της περιορισμένης έκκρισης κυτοκινών από τα ενδομητριάκα NK κύτταρα που οφείλεται στις τροποποιήσεις στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν κυτοκίνες και στον κυτταροτοξικό φαινότυπο των ενδομητριάκων NK κυττάρων.

Επιπλέον τα ενδομητριάκα NK κύτταρα λόγω του κυτταροτοξικού φαινότυπου τους οδηγούν σε ανεπαρκή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας και σε απορρύθμιση της αγγειογένεσης λόγω μειωμένης παραγωγής αγγειογενετικών παραγόντων. Εναλλακτικά άλλες μελέτες έχουν δείξει πως η απορρύθμιση της αγγειογένεσης η οποία οδηγεί σε παθολογία κύησης μπορεί να πραγματοποιηθεί και από τα αυξημένα επίπεδα των ενδομητριάκων NK κυττάρων με ρυθμιστικό φαινότυπο  $CD56^{bright}/CD16^{dim}$ . Ο αυξημένος αριθμός των ενδομητριάκων NK κυττάρων οδηγεί σε αυξημένη αγγειογένεση λόγω της έκκρισης μεγάλων συγκεντρώσεων αγγειογενετικών παραγόντων. Η αυξημένη αγγειογένεση προάγει αυξημένα επίπεδα αιματικής ροής γύρω από την εμφύτευση με αποτέλεσμα να δημιουργείται υπερβολικό οξειδωτικό στρες κατά την διεπαφή μητέρας-εμβρύου λόγω διαταραχής της μητρικής κυκλοφορίας στα αρχικά στάδια της κύησης. Απόρροια της αυξημένης αγγειογένεσης είναι η αποβολή της κύησης λόγω του υπερβολικού οξειδωτικού στρες που δημιουργείται [62].

Εν κατακλείδι, τόσο ο ρόλος όσο και ο μηχανισμός δράσης των uNK κυττάρων στις παθολογίες της κύησης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση από την επιστημονική κοινότητα.



**Εικόνα 4:** Ο ρόλος των ενδομητριάκων NK κυττάρων στις διαδικασίες οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στην αποτυχημένη εμφύτευση και οδηγούν σε παθολογίες κύησης όπως οι αποτυχημένες εμφυτεύσεις και οι καθ'έξιν αποβολές (Πηγή: BioRender)



### **1.4.1 Ο ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στις επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις**

Στο πλαίσιο της θεραπείας εξωσωματικής γονιμοποίησης μια κατηγορία υπογόνιμων γυναικών παρουσιάζει έναν μη συνηθισμένο υψηλό ποσοστό διαδοχικών αποτυχιών εμφύτευσης εμβρύου καλής ποιότητας (Recurrent Implantation Failure-RIF) [63]. Μέχρι πρόσφατα στην επιστημονική κοινότητα ο ορισμός της επαναλαμβανόμενης αποτυχημένης εμφύτευσης ήταν αμφιλεγόμενος επειδή αποτελούσε μια πολυπαραγοντική κατάσταση. Ο αριθμός των αποτυχημένων κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης, ο αριθμός των μεταφερούμενων εμβρύων και η ηλικία της μητέρας ήταν μεταξύ των αμφισβητούμενων κριτηρίων [64]. Πλέον ο πιο ευρέως ορισμός είναι αυτός που περιγράφει την αποτυχία εμφύτευσης μετά από δύο ή περισσότερους επαναλαμβανόμενους κύκλους θεραπείας εξωσωματικής γονιμοποίησης. Μεταβολικές, γενετικές και ορμονικές παθολογίες σχετίζονται και ευθύνονται για το φαινόμενο της επαναλαμβανόμενης αποτυχημένης εμφύτευσης [65]. Παρόλα αυτά σε ένα πολύ αυξημένο ποσοστό ασθενών με RIF, η υποκείμενη παθολογία παραμένει άγνωστη, γι' αυτό αναφέρεται ως ανεξήγητη RIF και ο τρόπος αντιμετώπισης της είναι ακόμη πιο δύσκολος και περίπλοκος [66]. Επιπλέον πιο πρόσφατες μελέτες σε γυναίκες με ανεξήγητη RIF έδειξαν πως οι διαταραχές του μικροβιώματος στο ενδομήτριο ίσως να σχετίζονται με αυτή την παθολογία [67]. Συνεπώς η διατήρηση της ποσοτικής και ποιοτικής ισορροπίας του μικροβιώματος στο ενδομήτριο είναι απαραίτητη προϋπόθεση για μια υγιή και επιτυχής εγκυμοσύνη.

Όπως έχει αναφερθεί πρωτύτερα σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ μητέρας-εμβρύου διαμεσολαβούν οι κυτοκίνες όπως χημειοκίνες και ιντερλευκίνες οι οποίες παράγονται από τα ενδομητριακά NK κύτταρα [68]. Οι ιντερλευκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην διείσδυση των κυττάρων της τροφοβλάστης, στην ανοσολογική ανοχή μεταξύ της μητέρας-εμβρύου, στην διαδικασία της εμφύτευσης και στον σχηματισμό του πλακούντα. Στόχος των ερευνητών ήταν μια πιθανή συσχέτιση των ιντερλευκινών με τα ενδομητριακά NK κύτταρα σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφύτευσης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια μελέτη σε γυναίκες με RIF με βιοψία ενδομητρίου κατά την 20<sup>η</sup> μέρα του εμμηνορροϊκού τους

κύκλου. Τα αποτελέσματα από την μελέτη έδειξαν αλλαγές στην έκφραση της τριπλέτας ιντερλευκινών IL12 , IL-18 και IL-15 και αύξηση των ενδομητριακών NK κυττάρων [69]. Η IL-15 εκφράζεται στο ενδομήτριο κυρίως κατά την εκκριτική φάση του εμμηνορροϊκού κύκλου και τα επίπεδα της συνδέονται στενά με τα επίπεδα των ενδομητριακών NK κυττάρων. Η IL-18 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην διεπαφή μητέρας-εμβρύου ρυθμίζοντας τις Th1 ή Th2 ανοσολογικές αποκρίσεις ενώ η φλεγμονώδης IL-12 παίζει ρόλο στην ρύθμιση και στην ενεργοποίηση των uNK κυττάρων [70]. Η περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού έκφρασης της τριπλέτας IL12 , IL-18 και IL-15 έδειξε πως ρυθμίζουν την έκφραση του ασθενή επαγωγέα απόπτωσης-TWEAK . Πιο συγκεκριμένα, ο επαγωγέας TWEAK είναι μέλος της υπερικογένειας TNF (Tumor Necrosis Factor), είναι σε θέση να επηρεάσει την αγγειογένεση όταν συνδυάζεται με τον υποδοχέα του Fn-14 και συμβάλει στην ρύθμιση της κυτταροτοξικότητας των ενδομητριακών NK κυττάρων [71]. Συνεπώς, αλλαγές στα επίπεδα του επαγωγέα TWEAK έχει ως αποτέλεσμα ο φαινότυπος των ενδομητριακών NK κυττάρων να γίνεται κυτταροτοξικός και αυτό οδηγεί σε ανεπαρκή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας, σε αποτυχημένη εμφύτευση και σε απόρριψη του εμβρύου παρόλο που τα έμβρυα είναι καλής ποιότητας στην θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης με αποτέλεσμα να οδηγεί σε RIF [72].

Επιπλέον σε μια άλλη μελέτη σε γυναίκες με RIF παρατηρήθηκε αύξηση του παράγοντα νέκρωσης όγκου - TNF-a και των ενδομητριακών κυττάρων NK σε σύγκριση με γόνιμες γυναίκες ως ομάδα ελέγχου. Ο παράγοντας TNF-a παράγεται από τα uNK κύτταρα συμβάλλοντας στην διαφοροποίηση και στην σωστή διαμόρφωση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Επομένως τα μη φυσιολογικά επίπεδα του επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της τροφοβλάστης με τα ενδομητριακά NK κύτταρα οδηγώντας στην μη επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου [73]. Ακόμη σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε πως η αλλαγή του αριθμού των ενδομητριακών NK κυττάρων σχετίζεται με τις επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις ενώ άλλες δεν βρίσκουν καμία συσχέτιση με την συγκέντρωση των ενδομητριακών NK κυττάρων σε γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποτυχημένων εμφυτεύσεων [74]. Εναλλακτικά η παθολογία RIF μπορεί να οφείλεται και σε γενετικούς παράγοντες λόγω του πολυμορφισμού των γονιδίων KIR. Γυναίκες με απλότυπο KIR-AA έχουν αυξημένη πιθανότητα να έχουν επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις από εκείνες

με απλότυπο KIR-AB ή -BB. Εν κατακλείδι, οι μελέτες που έγιναν σε γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποτυχημένων εμφυτεύσεων είναι περιορισμένες και δεν κατέληξαν σε σαφείς συμπεράσματα. Τα ενδομητριάκα NK κύτταρα μπορεί να ευθύνονται για τις επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις αλλά ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει αποσαφηνιστεί και παραμένει άγνωστος.

#### **1.4.2 Ο ρόλος των ενδομητριάκων NK κυττάρων στις καθ'έξιν αποβολές**

Οι καθ'έξιν αποβολές (Recurrent Pregnancy Loss-RPL) ορίζονται ως η απώλεια δύο ή περισσότερων διαδοχικών κυήσεων πριν από την 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης [75]. Τα αίτια των καθ'έξιν αποβολών περιλαμβάνουν γενετικούς, ανοσολογικούς, ενδοκρινολογικούς και λοιμογόνους παράγοντες. Όμως, σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό ασθενών τα αίτια παραμένουν άγνωστα με αποτέλεσμα να ορίζεται ως ανεξήγητη καθ'έξιν αποβολή [76]. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε γυναίκες με RPL έδειξαν πως τα ενδομητριάκα NK κύτταρα διαφέρουν ποσοτικά και ποιοτικά σε σύγκριση με υγιή άτομα ως ομάδα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη υποστήριξε αυξημένη συγκέντρωση των κυτταροτοξικών ενδομητριάκων NK κυττάρων CD16<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> και μειωμένη συγκέντρωση των NK κυττάρων με φαινότυπο CD16<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> [77]. Τα ενδομητριάκα CD16<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> κύτταρα NK εκκρίνουν κυτοκίνες και αγγειογενετικούς παράγοντες οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την έκβαση της κύησης. Συνεπώς, η ανεπαρκής ποσότητα κυτοκινών σε συνδυασμό με την μετατόπιση της δραστηριότητας των ενδομητριάκων NK κυττάρων από ρυθμιστική σε κυτταροτοξική δραστηριότητα που θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγήσει τις RPL.

Επιπλέον, μια άλλη μελέτη σε γυναίκες με RPL έδειξε πως οι υποδοχείς KIR των ενδομητριάκων NK κυττάρων δεν αλληλεπιδρούν με το αντιγόνα HLA-G στα κύτταρα της τροφοβλάστης με

αποτέλεσμα την απορρύθμιση της διείσδυσης της εξωλάχνης τροφοβλάστης και της αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών [78]. Οι σπειροειδείς αρτηρίες στις γυναίκες με RPL είχαν πολύ αυξημένο πάχος αγγειακού τοιχώματος και μειωμένο διάμετρο αυλού συγκριτικά με υγιείς γυναίκες ως ομάδα ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης των ενδομητριακών NK κυττάρων συμβάλει σε μια μη σωστή διαμορφωμένη σπειροειδή αρτηρία και πιθανότατα να οδηγήσει σε RPL [79]. Ακόμη μια μελέτη έδειξε πως η συγκέντρωση και η δραστηριότητα των ενδομητριακών NK κυττάρων στην πρώτη αποβολή εμβρύου είναι πολύ αυξημένη συγκριτικά με μια επόμενη αποβολή. Συνεπώς τόσο το ποσοστό των ενδομητριακών NK κυττάρων όσο και η δραστηριότητα τους ποικίλει ανάλογα με τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων αμβλώσεων λόγω της απορρύθμισης του μικροβιώματος στο ενδομητρίου[80].

Παρόλο την πληθώρα μελετών η συσχέτιση του αριθμού των ενδομητριακών κυττάρων με τις καθ'έξιν αποβολές είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Τα συμπεράσματα αλλά και τα αντικρουόμενα στοιχεία που προέρχεται από τις μελέτες που γίνονται, αποδεικνύουν πως ο μοριακός μηχανισμός εμπλοκής των ενδομητριακών κυττάρων στις καθ'έξιν αποβολές παραμένει άγνωστος. Παρόλα αυτά κάποιες μελέτες υποστηρίζουν το σενάριο πως οι αλλαγές στα επίπεδα των ενδομητριακών NK κυττάρων σε γυναίκες με RPL ίσως αντιπροσωπεύουν το αποτέλεσμα και όχι την αιτία αποβολής της κύησης [81]. Επομένως, τόσο η πολυπλοκότητα των ενδομητριακών NK κυττάρων όσο και η συσχέτιση τους με το RPL θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

### **1.4.3 Ο ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην προεκλαμψία**

Η προεκλαμψία είναι μια παθολογία με υψηλή αρτηριακή πίεση και πρωτεϊνουρία η οποία εμφανίζεται μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και θέτει σε κίνδυνο την ζωή τόσο της μητέρας όσο και του νεογνού. Αν δεν υπάρχει έλεγχος και αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της η προεκλαμψία ενδέχεται να εξελιχθεί σε σπασμό, που ονομάζεται εκλαμψία [82]. Πιο συγκεκριμένα σχετίζεται με την κακή διαμόρφωση του πλακούντα στην αρχής της

εγκυμοσύνης. Σύμφωνα με μελέτες μια από τις αιτίες της προεκλαμψίας είναι η ανοσολογική ανισορροπία του μικροβιώματος του ενδομητρίου με συνέπεια να παρουσιάζονται αλλαγές στον αριθμό των ενδομητριακών NK κυττάρων και στις λειτουργίες τους.

Στην αρχή μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης τα τροφοβλαστικά κύτταρα διεισδύουν στο μυομήτριο και σχηματίζονται οι σπειροειδείς αρτηρίες με την βοήθεια των ενδομητριακών NK κυττάρων. Αυτό εξασφαλίζει πως υπάρχει άφθονη ροή αίματος στη διεπαφή μεταξύ μητέρας-εμβρύου διασφαλίζοντας και την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών ειδικότερα όταν η ζήτηση τους είναι μεγαλύτερη προς το τέλος της κύησης. Μελέτες σε γυναίκες με προεκλαμψία έδειξαν πως τα ενδομητριακά NK κύτταρα ήταν λιγότερο ικανά να προσελκύουν χημικά τα τροφοβλαστικά κύτταρα. Αυτό μπορεί να οφείλετε στα μειωμένα επίπεδα κυτοκινών και αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντος και η αγγειοποιητίνη-2 που παράγονται από τα ενδομητριακά NK κύτταρα, με συνέπεια τη μη σωστή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας [83]. Η ανεπαρκής αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας οδηγεί σε μειωμένη ροή του αίματος με αποτέλεσμα να προκαλεί μείωση των θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου που λαμβάνει το έμβρυο στο φαινόμενο της προεκλαμψίας.

Επιπλέον μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε γυναίκες με προεκλαμψία έδειξαν αυξημένα ποσοστά ενδομητριακών NK κυττάρων σε σύγκριση με υγιείς εγκυμοσύνες ενώ αντιθέτως άλλες μελέτες έδειξαν πως ο αριθμός των ενδομητριακών NK κυττάρων μειώθηκε δείχνοντας πως αυτά τα κύτταρα έχουν μια προστατευτική δράση στην φυσιολογική εγκυμοσύνη [84]. Εναλλακτικά, άλλες μελέτες έχουν υποθέσει πως δεν αλλάζει ο αριθμός των ενδομητριακών NK κυττάρων σε γυναίκες με προεκλαμψία αλλά η λειτουργία αυτών των κυττάρων από ρυθμιστική σε κυτταροτοξική.

Η προεκλαμψία μπορεί να οφείλεται και σε γενετικούς παράγοντες. Όπως έχει αναφερθεί πρωτίτερα τα uNK κύτταρα φέρουν υποδοχείς KIR οι οποίοι συνδυάζονται με συνδέτες HLA-C στα κύτταρα της τροφοβλάστης. Η συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ του υποδοχέα KIR και του HLA-C στα κύτταρα τροφοβλάστης αποδεικνύει μια ισχυρή απόδειξη για τη γενετική αιτιολογία της προεκλαμψίας [85]. Τα γονίδια KIR της εγκύου εκφράζονται από ενδομητριακά NK κύτταρα

και αναμένεται να είναι διαφορετικά σε κάθε κύηση. Διαφορετικό αναμένεται να είναι και το HLA-C το οποίο προέρχεται από τον πατέρα επομένως το έμβρυο είναι πιθανό να κληρονομήσει οποιαδήποτε ομάδα HLA-C από τον πατέρα. Επομένως, οι συνδυασμοί μεταξύ του γονοτύπου KIR στην μητέρα και του HLA-C στο έμβρυο είναι πολυμορφικοί και είναι πολύ να καθορίζουν την έκβαση της εγκυμοσύνης. Ένας ακατάλληλος συνδυασμός του υποδοχέα KIR με το αντιγόνο HLA-C οδηγεί σε μη ενεργοποίηση των ενδομητριάκων NK κυττάρων προκαλώντας προεκλαμψία.

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν πως όταν η μητέρα έχει γονότυπο KIR AA και το έμβρυο κληρονομήσει το HLA-C2 από τον πατέρα, ο συνδυασμός αυτός μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας και σε ελαττωματικό πλακούντα με αποτέλεσμα την προεκλαμψία. Συνεπώς, τα ενδομητριάκα NK κύτταρα σε αυτές τις γυναίκες παρουσίασαν χαμηλή ρυθμιστική λειτουργική δραστηριότητα. Αντιθέτως, μια έγκυος μητέρα όταν έχει τον γονότυπο KIR B και το έμβρυο έχει HLA-C2 ο συνδυασμός αυτός ενεργοποιεί τα ενδομητριάκα NK κύτταρα με την σειρά τους παράγουν κυτοκίνες όπως GM-CSF βοηθώντας την διείσδυση των κυττάρων της τροφοβλάστης, την αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας και τον σχηματισμό του πλακούντα με αποτέλεσμα μια υγιή εγκυμοσύνη [86].

Συμπερασματικά, η προεκλαμψία μπορεί να προκληθεί από γενετικούς παράγοντες όπως ο συνδυασμός των υποδοχέων KIR των uNK κυττάρων με το HLA-C του εμβρύου αλλά και από την κυτταροτοξική λειτουργία των ενδομητριάκων NK κυττάρων με αποτέλεσμα μειωμένη διείσδυση τροφοβλαστών και ανεπαρκή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας. Ωστόσο, η ακριβής συσχέτιση της προεκλαμψίας με τα ενδομητριάκα NK κύτταρα, με τους υποδοχείς τους και με τις παραγόμενες κυτοκίνες δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

## 2. Σκοπός της εργασίας

---

Η εμφύτευση και διατήρηση της κύησης αποτελεί ένα αμφιλεγόμενο πεδίο έρευνας το οποίο περιλαμβάνει διάφορες παθολογίες της κύησης όπως οι επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις και καθ'έξιν αποβολές. Μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια προσπάθησαν να συσχετίσουν τις παραπάνω παθολογίες της κύησης με τα ενδομητριακά NK κύτταρα. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν πως ο κυτταροτοξικός φαινότυπος ή/και ο αυξημένος αριθμός τους οδηγεί σε απορρύθμιση των γεγονότων που συμβαίνουν κατά την φυσιολογική κύηση. Επομένως, η διαταραχή του μικροβιώματος στο ενδομήτριο έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή διατήρηση της κύησης. Τα ενδομητριακά NK κύτταρα φαίνεται πως συμβάλλουν αυξημένη παραγωγή κυτοκινών, αυξητικών και αγγειογενετικών παραγόντων με σκοπό την αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας. Παρόλο την πληθώρα ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια για την συσχέτιση των ενδομητριακών NK κυττάρων στην κύηση η πλήρης συσχέτιση και ο μηχανισμός δράσης τους στις παθολογίες της κύησης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με το συγκεκριμένο πεδίο έχουν πραγματοποιηθεί σε μοντέλα ποντικών και ελάχιστες στο ανθρώπινο ενδομήτριο.

Οι περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά και τον ρόλο των NK κυττάρων στο ενδομήτριο δεν προέρχονται από πειράματα που έγιναν στον άνθρωπο αλλά σε ποντίκια. και υποθέτουμε πως ισχύουν και στον άνθρωπο λόγω των κοινών ανοσιακών συστημάτων μεταξύ τους. Στο πλαίσιο αυτό, ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του ποιοτικού και ποσοτικού χαρακτηρισμού των ενδομητριακών NK κυττάρων στο ανθρώπινο ενδομήτριο σε γυναίκες με παθολογίες στην κύηση. Στόχος είναι τα δεδομένα από τα ανθρώπινα δείγματα ενδομητρίου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω πειραματικές διαδικασίες να βοηθήσουν σε μελλοντικό χρόνο στην αντιμετώπιση διαφόρων παθολογιών της κύησης συμβάλλοντας στην εύρεση αποτελεσματικής αντιμετώπισης τους.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

---

#### 3.1. Κυτταρομετρία Ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία που επιτρέπει τη ταυτόχρονη μέτρηση και ανάλυση πολλαπλών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου ή μικροσωματιδίου που βρίσκεται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε ένα διάλυμα [87]. Η ανάλυση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων συμβαίνει καθώς αυτά περνάνε από μια δέσμη λέιζερ η οποία χρησιμοποιείται ως πηγή φωτός στα σύγχρονα κυτταρόμετρα ροής. Αρχικά, τα κύτταρα στο εσωτερικό τους διαθέτουν περιορισμένες φθορίζουσες ουσίες και για αυτό το σκοπό τα κύτταρα χρωματίζονται με ιχνηθέτες σημασμένους με φθορισμό πριν την έγχυση τους στο κυτταρόμετρο έχοντας την δυνατότητα να δείξουν την ύπαρξη στοιχείων όπως η αναγνώριση διαφορετικών πληθυσμών, οι υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια που διαφορετικά δεν θα ήταν ορατά. Η φθορίζουσα ουσία διεγείρεται από την ακτινοβολία λέιζερ και εκπέμπει ενέργεια με την μορφή νέας ακτινοβολίας με μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σύγκριση με αυτή που την διέγειρε. Επομένως, η ποσότητα ενός συγκεκριμένου κυτταρικού συστατικού υπολογίζεται με την ένταση του φθορισμού η οποία οφείλεται στο φως που εκπέμπεται σε διάφορες διακυμάνσεις μήκους κύματος καθώς διέρχεται από μια δέσμη φωτός λέιζερ. Πιο συγκεκριμένα οι φθορίζουσες χρωστικές συνδέονται με ιχνηθέτες όπου συνήθως είναι μονοκλωνικά αντισώματα, η λεκτίνη και η αβιδίνη [88]. Οι πιο κοινές φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής είναι η ισοθειοκυανική φθορισκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate-FITC), η φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin-PE) και η αλλοφυκοκυανίνη (Allophycocyanin-APC) [89]. Η επιλογή της κατάλληλης φθορίζουσας ουσίας είναι πολύ σημαντικό βήμα το οποίο καθορίζεται τόσο από το λέιζερ το οποίο θα χρησιμοποιηθεί όσο και από το συνολικό αριθμό των παραμέτρων που θα αναλυθούν. Συγκεκριμένα σε ένα δείγμα μπορεί να προστεθούν περισσότερες από μια φθορίζουσες ουσίες με σκοπό την μέτρηση πολλαπλών παραμέτρων [90]. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που εκπέμπει η φθορίζουσα πρέπει να είναι διαφορετικό για να μπορεί να γίνει η διάκριση των σημάτων που στέλνει η κάθε φθορίζουσα. Παρόλα αυτά υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες μπορεί να υπάρχει “αλληλοεπικάλυψη φάσματος” της ακτινοβολίας στην οποία εκπέμπουν με αποτέλεσμα να



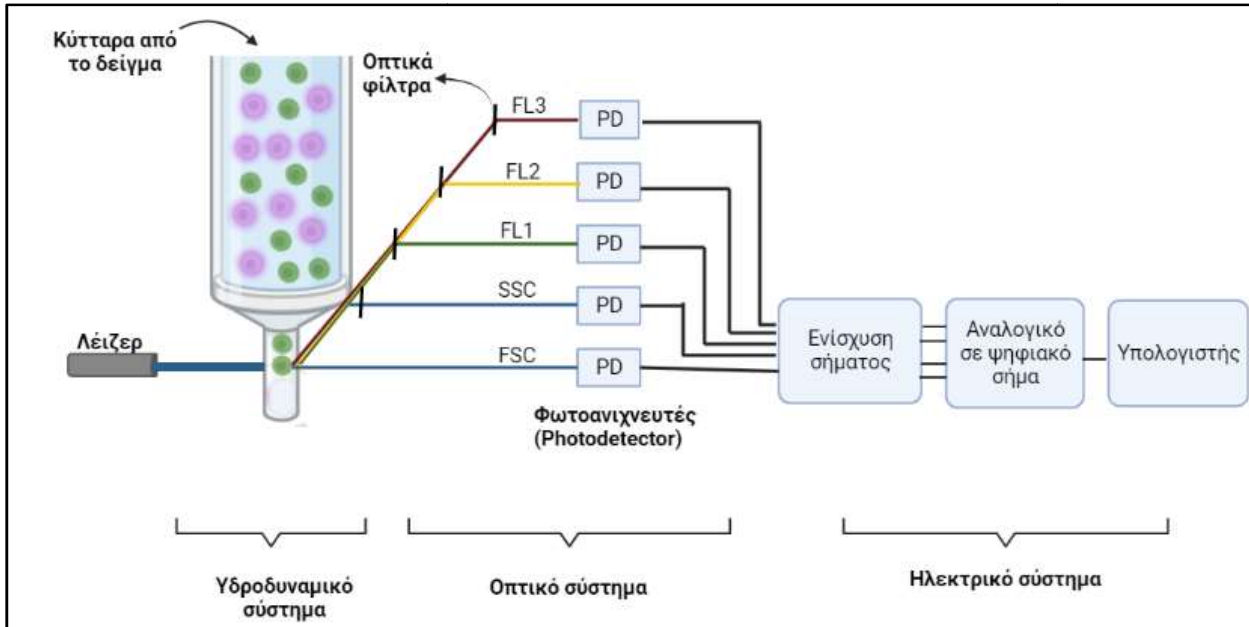
υπάρχει σύγχυση των σημάτων τους και χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι φθορίζουσες FITC και PE οι οποίες επικαλύπτονται στα ίδια μήκη κύματος. Για την αντιμετώπιση του παραπάνω φαινομένου πρέπει να γίνει αντιστάθμιση του φθορισμού με την αφαίρεση ενός κλάσματος του σήματος από το άλλο [91]. Επομένως, πρέπει να επιλέγονται σήματα φθορισμού τα οποία έχουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Αρχικά, τα κυτταρικά συστατικά χρωματίζονται με χρωστικές ουσίες σημασμένες με φθορισμό ο οποίος ορίζεται ως η εκπομπή φωτός από μια ουσία η οποία έχει απορροφήσει φως ή ακτινοβολία και αποτελεί έναν αναπόσπαστο κομμάτι της κυτταρομετρίας ροής.

Το κυτταρόμετρο αποτελείται από τρία συστήματα το υδροδυναμικό σύστημα ροής, το οπτικό σύστημα καθώς και το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 5** [92]. Αρχικά, το υδροδυναμικό σύστημα ροής έχει ως στόχο την μετακίνηση των επιθυμητών κυττάρων ή μικροσωματιδίων τα οποία βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος σε μια συγκεκριμένη περιοχή ανίχνευσης έτσι ώστε το κάθε κύτταρο να φωτίζεται από με την ίδια ποσότητα φωτός που εκπέμπεται από το λέιζερ. Αρχικά γίνεται η απορρόφηση του εναιωρήματος και σχηματίζεται ένα κεντρικό ρεύμα ροής (sample core) το οποίο διέρχεται από ένα υγρό περιροής (sheath fluid) το οποίο είναι ένα ισότονο διάλυμα εξασφαλίζοντας την διατήρηση του σχήματος των κυττάρων στην κεντρική κυψελίδα ροής ένα σύστημα κλειστό χωρίς αέρα. Το υγρό περιροής όσο και το κεντρικό ρεύμα πρέπει να έχουν νηματώδεις ροή δηλαδή να διατηρούν την θέση τους χωρίς να αναμειγνύονται. Το υγρό περιροής εξασφαλίζει πως τα κύτταρα εισέρχονται μεμονωμένα δηλαδή το ένα να κινείται πίσω από το άλλο σε ένα συγκεκριμένο σημείο που ονομάζεται "σημείο εξέτασης" στο οποίο η μονοχρωματική ακτινοβολία από το λέιζερ προσπίπτει σε αυτά [93].

Κατά το οπτικό σύστημα η ακτινοβολία που προσπίπτει κάθετα πάνω στα κύτταρα απορροφάται από αυτά, είναι μονοχρωματική και εκπέμπει φθορισμό στην περίπτωση που τα κύτταρα έχουν σημανθεί με φθοριούχα αντισώματα. Σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις και ανάλογα με την κατεύθυνση του σκεδασμένου φωτός δίνει πληροφορίες σχετικά με τα κύτταρα. Το σκεδασμένο φως διακρίνεται σε δύο κατηγορίες τον πρόσθιο σκεδασμό (Forward

Scatter-FSC) και τον πλάγιο σκεδασμό (Side Scatter-SSC) με τον πρώτο να οφείλεται στην περίθλαση του φωτός και ο δεύτερος στην διάθλαση του φωτός [94].



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση των κύριων συστημάτων ενός κυτταρόμετρου ( Πηγή: BioRender)

Ο πρόσθιος σκεδασμός σχετίζεται με την έκταση της διαφάνειας δηλαδή με το μέγεθος των κυττάρων ενώ ο πλάγιος σκεδασμός με την δομή, την κοκκίωση και την πολυπλοκότητα συμβάλλοντας στο διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών. Το φως το οποίο εκπέμπεται από τα κύτταρα συλλέγεται από τους φακούς οι οποίοι έχουν ως στόχο την ευθυγράμμιση του έτσι ώστε να διανύσουν οι φωτεινές ακτίνες μια διαδρομή χωρίς αποκλείσεις μέχρι τους ανιχνευτές. Συνεπώς, η απορρόφηση και ενίσχυση της φωτεινής ακτίνας πραγματοποιείται από τους φωτοανιχνευτές οι οποίο διακρίνονται σε φωτοδιόδοι και φωτοπολλαπλασιαστές [95]. Οι φωτοδιόδοι λαμβάνουν σήμα από το πλάγιο και πρόσθιο σκεδασμό, έχουν χαμηλή ευαισθησία λόγω απουσίας ενίσχυσης του σήματος και υψηλή μετατροπή των φωτονίων σε ηλεκτρόνια (κβαντική απόδοση) ενώ οι φωτοπολλαπλασιαστές ενισχύουν το ασθενές σήμα το οποίο λαμβάνουν και γι αυτό το λόγο έχουν υψηλότερη ευαισθησία και χαμηλότερη κβαντική

απόδοση σε σύγκριση με τις πρώτες. Στην συνέχεια το ηλεκτρικό σύστημα περιλαμβάνει τους φωτοανιχνευτές που μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρονικά τα οποία στην συνέχεια αυξάνονται από τους ενισχυτές και σχηματίζεται παλμός τάσης. Ακολουθεί μετατροπή του παλμού τάσης από επεξεργαστές σήματος μέσω ποσοτικοποίησης του σε αριθμητικές τιμές σχετικά με το πλάτος και την περιοχή του και τα δεδομένα μεταφέρονται στον υπολογιστή [96]. Τα ηλεκτρονικά σήματα αποθηκεύονται και παρουσιάζονται στο υπολογιστή μέσω ειδικού λογισμικού σε μορφή ιστογράμματος ή σε διαγράμματα πυκνότητας και ακολουθεί αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τον αναλυτή.

Τέλος, η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής κατατάσσεται σε ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία στα κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια. Βρίσκει εφαρμογή σε ένα πλήθος διαφορετικών κλάδων όπως η αιματολογία, παθολογία, ογκολογία και μικροβιολογίας. Περαιτέρω χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς σκοπούς και σε ένα σύγχρονο κομμάτι της ιατρικής τις κυτταρικές θεραπείες.

## 3.2 Πειραματική διαδικασία

---

Στη παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα ενδομητρίου τα οποία λήφθηκαν μέσω υστεροσκοπικής αφαίρεσης ενδομητρικού ιστού συγκεκριμένου μήκους (>2cm) από γυναίκες με παθολογίες στην κύηση (Αρ.Πρωτοκ: 375). Τα δείγματα προήλθαν από το Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και την Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική ΜΗΤΕΡΑ στην Αθήνα. Τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου FALCON με υγρό θρεπτικό υλικό IMDM (LONZA) ή RPMI (Sigma Aldrich) και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα από το Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας επεξεργάστηκαν την ίδια μέρα ενώ τα δείγματα από την Αθήνα επεξεργάστηκαν την επόμενη μέρα.

- **Η 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος περιλάμβανε τα εξής υλικά και αντιδραστήρια:**

### **Υλικά:**

1. Απαγωγός Hood
2. Αναδευτήρας-Vortex
3. Φυγόκεντρος
4. Υδατόλουτρο
5. Σωληνάρια-FALCON
6. Τρυβλίο
7. Νυστέρι
8. Πουάρ
9. Σύριγγα

### **Αντιδραστήρια:**

1. Hank's Balanced Salt Solution pH 7,4 (HBBS-Thermo Fisher Scientific)
2. Λιμπεράση (ROCHE)

### **Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:**

- Αν το δείγμα έφερε πολύ μεγάλα κομμάτια ενδομητρικού ιστού αυτά έπρεπε να αποδομηθούν ως εξής:

Το δείγμα μεταφέρθηκε στο τρυβλίο και με την χρήση νυστεριού διαλύθηκε ο ιστός του ενδομητρίου και με σύριγγα μεταφέρθηκε η ποσότητα του δείγματος σε ένα νέο falcon.

- Αν το δείγμα έφερε μικρά κομμάτια ενδομητρικού ιστού τότε ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία όπως και στην πρώτη περίπτωση μετά την αποδόμηση των κομματιών.

1. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1600 στροφές και έπειτα με την χρήση πουάρ απόρριψη του υπερκείμενου αφήνοντας μόνο ελάχιστη ποσότητα του.
2. Προσθήκη μέχρι 8 ml HBSS θρεπτικό υλικό και ακολουθεί ανάδευση-vortex.
3. Φυγοκέντρηση στις 1600 στροφές για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου με την χρήση πουάρ αφήνοντας ελάχιστη ποσότητα του.
4. Προσθήκη μέχρι 8 ml HBSS στο δείγμα και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1600 στροφές.
5. Απόρριψη του υπερκείμενου και ακολουθεί ανάδευση-vortex.
6. Προσθήκη μέχρι 5 ml HBSS θρεπτικό υλικό στο falcon.
7. Προσθήκη 500 μl λιμπεράσης για την αποδόμηση του ιστού και την απελευθέρωση των κυττάρων και έπειτα ακολουθεί ανάδευση του δείγματος.
8. Επώαση στο υδατόλουτρο στους 37° C για 45 λεπτά.

### **Η 2<sup>η</sup> φάση του πειράματος περιλάμβανε τα εξής υλικά και αντιδραστήρια:**

### **Υλικά:**

1. Κυτταρόμετρο ροής (Cytomics FC500 Flow Cytometer by Beckman Coulter Life Sciences)
2. Φυγόκεντρος
3. Αναδευτήρας-Vortex
4. Βαθμονομημένες πιπέτες (2-20μl, 10-100μl, 20-200μl, 200-1000μl)
5. Δοκιμαστικοί σωλήνες
6. Ρύγχη πιπετών
7. Falcon με φίλτρο (BD Biosciences)
8. Σύριγγα
9. Στατό

### **Αντιδραστήρια:**

1. VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter)
2. Phosphate Buffer Saline pH 7,2 (PBS) (Thermo Fisher Scientific)
3. CD3-FITC → Κλώνος-UCHT1C (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)
4. CD4-PE → Κλώνος-13B8.2 (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)
5. CD8-ECD → Κλώνος-B9.11 (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)
6. CD19-PC5 → Κλώνος-J3-119 (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)
7. CD45-PC7 → Κλώνος-J33 (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)
8. CD57-FITC → Κλώνος- NC1 (IgM Mouse) (Beckman Coulter)
9. CD3-PE → Κλώνος-UCHT1 (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)
10. CD16-ECD → Κλώνος-BG8 (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)
11. CD56-PC5 → Κλώνος –N901 (IgG1 Mouse) (Beckman Coulter)

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στο υδατόλουτρο (τέλος της 1<sup>ης</sup> φάσης), η επόμενη διαδικασία περιλάμβανε τα παρακάτω βήματα:

1. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1600 στροφές και έπειτα απόρριψη του υπερκείμενου με χρήση πουάρ και ακολουθεί ανάδευση-vortex.
2. Προσθήκη έως 10ml PBS θρεπτικό και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1600 στροφές.
3. Απόρριψη του υπερκείμενου με πουάρ και ακολουθεί ανάδευση-vortex.
4. Προσθήκη έως 2ml PBS στο σωλήνα falcon που περιείχε το δείγμα και μεταφορά με την χρήση σύριγγας όλης της ποσότητας σε νέο falcon στο οποίο έχει προστεθεί φίλτρο.
5. Προσθήκη έως 1ml PBS για ξέπλυμα των τοιχωμάτων του προηγούμενου falcon για να μην χαθεί ποσότητα δείγματος και μεταφορά και αυτής της ποσότητας στο falcon με το φίλτρο.
6. Μεταφορά όλης της ποσότητας σε ένα νέο falcon.
7. Μεταφορά 200μl εναιωρήματος, του προηγούμενου βήματος, σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες με τα αντίστοιχα αντισώματα, για κάθε δείγμα, όπως θα περιγραφεί στους παρακάτω πίνακες.
8. Τέλος, προστέθηκε 1ml VersaLyse Lysing Solution στο διάλυμα για να γίνει λύση των ερυθροκυττάρων, ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά και τα δείγματα ήταν πλέον έτοιμα προς ανάλυση.

❖ **Αντισώματα 1<sup>ο</sup> σωληναρίου:**

Στο πρώτο σωληνάριο βάζουμε τα εξής αντισώματα και χρωστικές:

<b>Χρωστική</b>	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
<b>Αντισώματα</b>	CD3	CD4	CD8	CD19	CD45
<b>Ποσότητα</b>	10μl	20μl	10μl	10μl	10μl

Ο σκοπός επιλογής των παραπάνω αντισωμάτων είναι για την διάκριση των εξής ανοσοκυτταρικών πληθυσμών:

Χρησιμοποιήθηκε το Anti-CD3/FITC για την διάκριση των T-λεμφοκυττάρων το οποίο είναι σημασμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) που εκπέμπει πράσινο χρώμα στα 525 nm και προσδέεται στον συν υποδοχέα TCR. Το αντίσωμα CD19 και CD45 χρησιμοποιούνται για την διάκριση των B-λεμφοκυττάρων και λεμφοκυττάρων αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, το Anti-CD19/PC5 είναι σημασμένο με φυκοερυθρίνη-κυανίνη 5 (Phycoerythrin-Cyanin 5, PC5), που εκπέμπει κόκκινο χρώμα στα 670 nm ενώ το Anti-CD45/PC7 είναι σημασμένο με φυκοερυθρίνη-κυανίνη 7 (PhycoerythrinCyanin 7, PC7), που εκπέμπει σκούρο κόκκινα στα 767 nm. Το Anti-CD4/PE χρησιμοποιείται για την διάκριση των βοηθικών T-λεμφοκυττάρων και είναι σημασμένο με φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin, PE) , που εκπέμπει κίτρινο στα 576 nm. Το Anti-CD8/ECD χρησιμοποιείται για την διάκριση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και είναι σημασμένο με Phycoerythrin Texas Red-X, (PE-Texas Red) γνωστό και ως ECD, που εκπέμπει πορτοκαλί στα 620nm.

Πιο συγκεκριμένα ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν διάκριση των συγκεκριμένων πληθυσμών:

**CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>**: Βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, **CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>**: Κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, **CD3<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>**: NK κύτταρα, **CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>**: Double Negative(DN) T-λεμφοκύτταρα, **CD45**: Λεμφοκύτταρα

❖ **Αντισώματα 2<sup>ου</sup> σωληναρίου:**

**Στο δεύτερο σωληνάριο βάζουμε τα εξής με σκοπό την περαιτέρω μελέτη των NK κυττάρων:**

<b>Χρωστική</b>	PC7	PE	ECD	PC5
<b>Αντισώματα</b>	CD45	CD3	CD16	CD56
<b>Ποσότητα</b>	10μl	10μl	20μl	20μl

Ο σκοπός επιλογής των παραπάνω αντισωμάτων είναι η μελέτη των εξής υποπληθυσμών:

Χρησιμοποιήθηκε το Anti-CD3/FITC για την διάκριση των T-λεμφοκυττάρων το οποία είναι σημασμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) που εκπέμπει



πράσινο χρώμα στα 525 nm και προσδένεται στον συν υποδοχέα TCR. Επιπλέον, το Anti-CD56/PC5 χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την παρατήρηση της έκφρασης ή όχι του δείκτη στα NK κύτταρα, σημασμένο με φυκοερυθρίνη-κυανίνη 5 (Phycoerythrin-Cyanin 5, PC5), που εκπέμπει κόκκινο χρώμα στα 670 nm και το Anti-CD16/ECD με σκοπό την παρατήρηση της έκφρασης ή όχι του δείκτη στα NK κύτταρα, σημασμένο με με (PhycoerythrinTexas Red-X, PE-Texas Red) γνωστό και ως ECD, που εκπέμπει πορτοκαλί στα 620nm. Το Anti-CD45/FITC χρησιμοποιείται με σκοπό την διάκριση των λεμφοκυττάρων και είναι σημασμένο με φυκοερυθρίνη-κυανίνη 7 (PhycoerythrinCyanin 7, PC7), που εκπέμπει σκούρο κόκκινα στα 767 nm

Πιο συγκεκριμένα ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη των συγκεκριμένων φαινοτύπων των NK κυττάρων:

1. CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>bright</sup>, 2. CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>dim</sup> 3. CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>bright</sup> 4. CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>dim</sup>

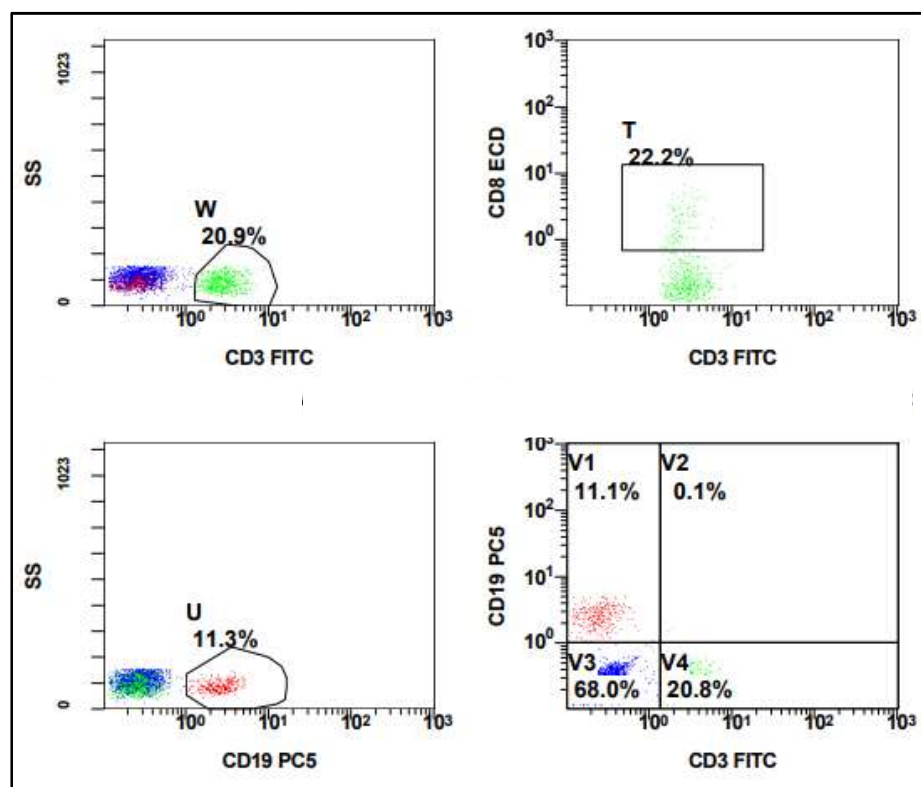
### 3.3 Στατιστική ανάλυση

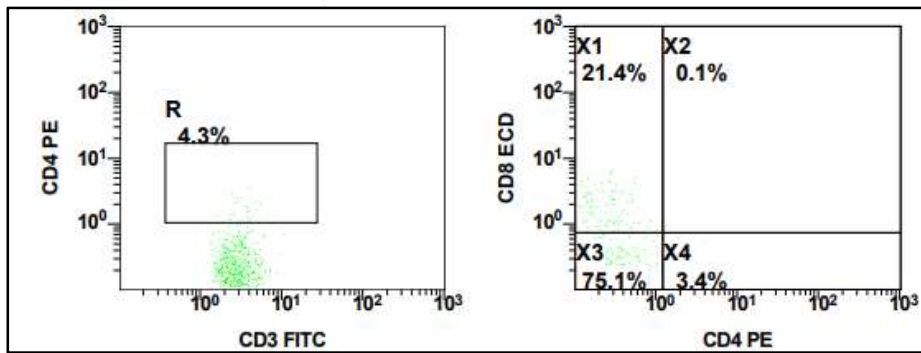
Μετά την ολοκλήρωση της τεχνικής κυτταρομετρίας ροής ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Ειδικότερα, μέσω του λογισμικού CXP Flow Cytometry Software (Beckman Coulter) πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δεδομένων της κυτταρομετρίας ροής. Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε “gating” με σκοπό την αναγνώριση των ανοσοκυτταρικών πληθυσμών και τον υπολογισμό των ποσοστών τους. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του αριθμητικού μέσου όρου (Mean) των ποσοστών του κάθε ανοσοκυτταρικού πληθυσμού καθώς και το τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (Standard Error of Mean, SEM). Πιο συγκεκριμένα, για τον έλεγχο σημαντικότητας των παραπάνω μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Student (t-test) μη εξαρτημένων δειγμάτων. Στατιστικά σημαντικές τιμές θεωρήθηκαν αυτές που παρουσίασαν p-value  $\leq 0,05$ . Τα γραφήματα και οι υπολογισμοί των παραπάνω μεταβλητών πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος GraphPad Prism 9.4.1.

## 4. Σύνοψη αποτελεσμάτων

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της κυτταρομετρίας ροής αναλύθηκαν συνολικά 20 δείγματα ενδομητρίου, εκ των οποίων τα 12 ήταν μη φυσιολογικά δείγματα και 8 δείγματα υγείων εθελοντών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν με αντισώματα σημασμένα με φθοριόχρωμα με σκοπό την διάκριση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα καθορίστηκαν τα Β-λεμφοκύτταρα (CD19<sup>+</sup>), Τ-λεμφοκύτταρα (CD3<sup>+</sup>), Τ-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), NK κύτταρα (CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>) και τα Double Negative(DN) Τ-λεμφοκύτταρα (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>). Ο κύριος σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης αφορούσε το ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμών των NK κυττάρων στο ενδομήτριο και γι' αυτό το λόγο μελετήθηκε περαιτέρω ο ρυθμιστικός/ανοχής (CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup>) και ο κυτταροτοξικός (CD16<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup>) φαινότυπος τους.

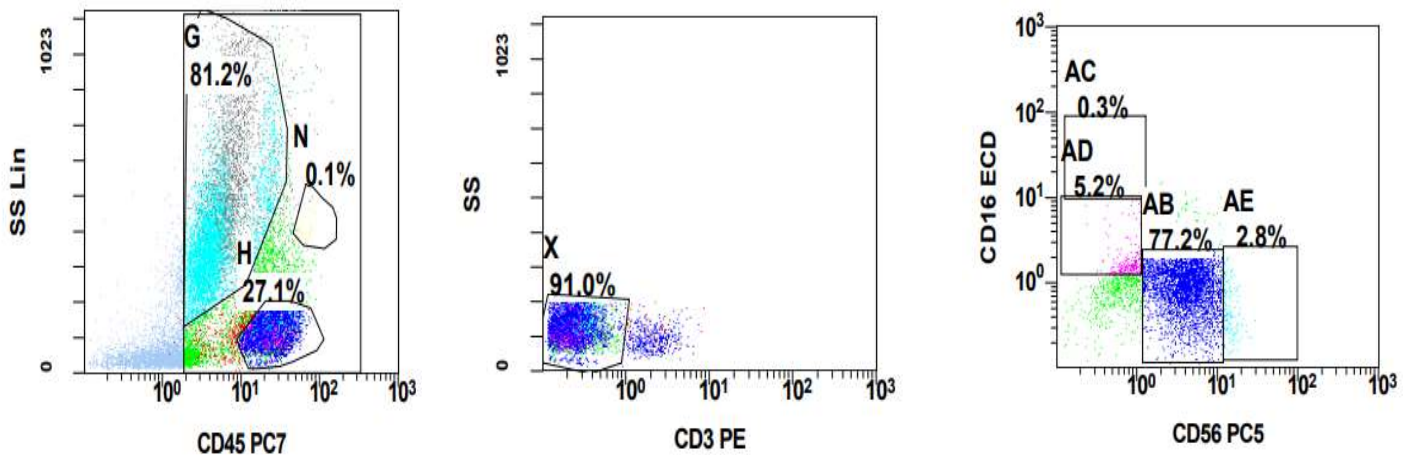
Παρακάτω παρουσιάζεται ενδεικτικά το gating που πραγματοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των διάφορων ανοσοκυτταρικών πληθυσμών με βάση το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε. Πιο συγκεκριμένα στην **Εικόνα 6** παρατίθεται ενδεικτικά η ανάλυση ενός παθολογικού δείγματος.





**Εικόνα 6:** Ενδεικτικό gating των ανοσοκυτταρικών πληθυσμών των CD3<sup>+</sup> κυττάρων, CD4<sup>+</sup> βοηθητικών κυττάρων, CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών κυττάρων τα οποία ανήκουν στον υποπληθυσμό των T λεμφοκυττάρων, των CD19<sup>+</sup> κυττάρων τα οποία αντιστοιχούν στον πληθυσμό των B λεμφοκυττάρων, και των CD3<sup>-</sup> C19<sup>-</sup> κυττάρων τα οποία αντιστοιχούν στα NK κύτταρα ενός παθολογικού δείγματος.

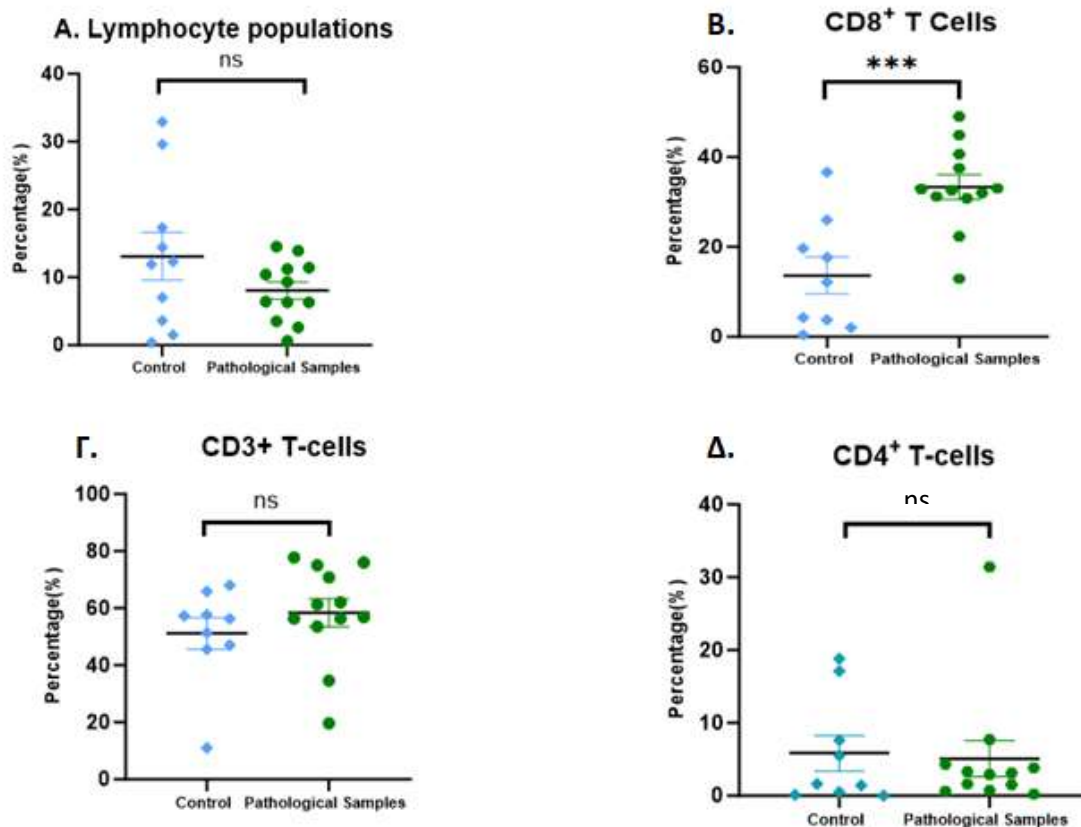
- Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζετε ενδεικτικά το gating που πραγματοποιήθηκε για την περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη των ενδομητριακών NK κυττάρων σε παθολογικό δείγμα.



**Εικόνα 7:** Ενδεικτικό gating των κυττάρων CD3<sup>-</sup> /CD56 /CD16 τα οποία αντιστοιχούν στο πληθυσμό των NK κυττάρων ενός παθολογικού δείγματος.

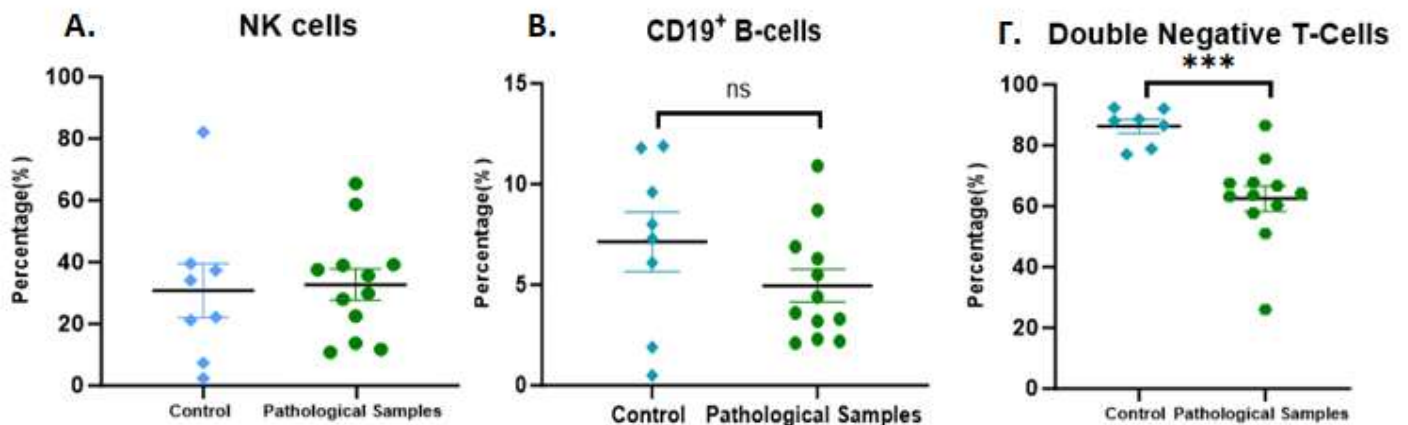
## Διαφορές στα ποσοστά των ανοσοκυτταρικών πληθυσμών στο ενδομήτριο

Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των ποσοστών των πληθυσμών T-λεμφοκυττάρων ( $CD3^+$ ), T-κυτταροτοξικών λεμφοκύτταρα ( $CD3^+/CD8^-$ ), των ενδομητριακών NK κυττάρων ( $CD3^-/CD56^+$ ), Double Negative (DN) T-λεμφοκυττάρων ( $CD4^-/CD8^-$ ) μεταξύ των υγιών και παθολογικών δειγμάτων τα οποία λήφθηκαν από την ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής (**Εικόνα 8**).



**Εικόνα 8:** Σύγκριση ποσοστών ανοσοκυτταρικών πληθυσμών σε δείγματα ενδομητρίου υγιών (n=9) και παθολογικών δειγμάτων (n=12). **Α.** Σύγκριση ποσοστών των λεμφοκυττάρων (p-value= 0.162). **Β.** Σύγκριση ποσοστών των T-CD3<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων (p-value= 0.348). **Γ.** Σύγκριση ποσοστών των T-CD8<sup>+</sup>λεμφοκυττάρων (p-value=0.006) και **Δ.** Σύγκριση ποσοστών των CD4<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων (p-value= 0.83).

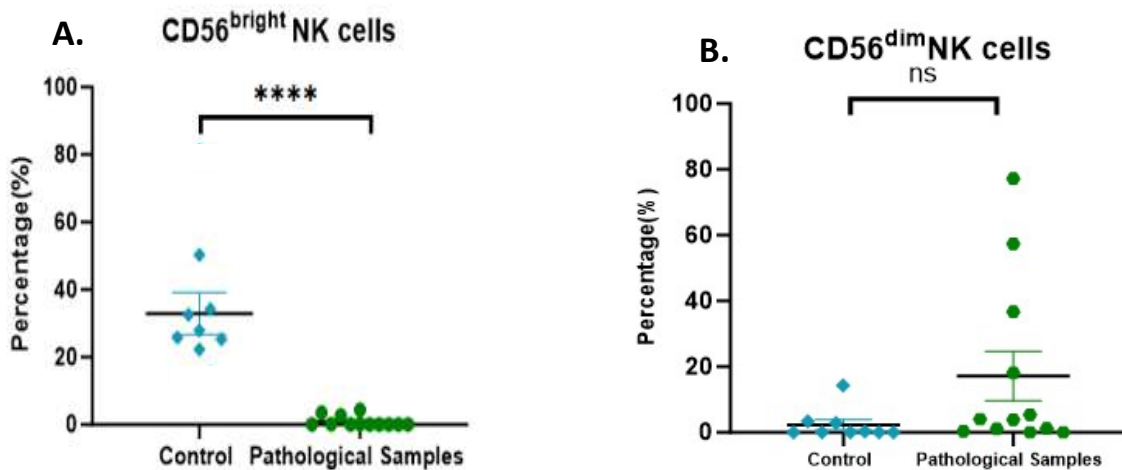
Ο μέσος όρος του ποσοστού των λεμφοκυττάρων (Εικ.8Α) στους υγιείς είναι  $13,09 \pm 3,05 \%$ , ενώ στους ασθενείς είναι  $8,03 \pm 1,28 \%$  και το p-value είναι ίσο με 0.162 επομένως η διαφορά μεταξύ τους δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική. Επιπλέον, ο μέσος όρος του ποσοστού των T-CD3<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων (Εικ.8Β) στους υγιείς  $51,13 \pm 5,61 \%$  και στα παθολογικά δείγματα  $58,36 \pm 4,91 \%$ . Το p-value υπολογίστηκε 0,348, επομένως δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά ανάμεσα στον πληθυσμό των T-CD3<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων των υγιών και των παθολογικών δειγμάτων. Ακολούθως, το μέσο ποσοστό των T-CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών κυττάρων (Εικ.8Γ) στους υγιείς είναι  $13,63\% \pm 4,1$  και στα παθολογικά δείγματα είναι  $33,31 \pm 2,77 \%$  εμφανίζοντας σημαντικά στατιστική διαφορά (\*\*\*) ανάμεσα στον πληθυσμό των T-CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών κυττάρων των υγιών και των παθολογικών δειγμάτων καθώς το p-value υπολογίστηκε 0,0006 (p-value=0.0006<0.05). Παράλληλα, ο μέσος όρος του ποσοστού των T-CD4<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων (Εικ.8Δ) στους υγιείς είναι  $5.09 \pm 2,46 \%$ , ενώ στους ασθενείς είναι  $5,84 \pm 2.47\%$  και το p-value είναι ίσο με 0.83, επομένως η διαφορά μεταξύ τους δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική.



**Εικόνα 9 :** A. Σύγκριση ποσοστών των NK κυττάρων. B. Σύγκριση ποσοστών των Double Negative -T cells (p-value = 0.008). Γ. Σύγκριση ποσοστών των B λεμφοκυττάρων (p-value = 0.1774).

Επιπλέον, ο μέσος όρος του ποσοστού των ενδομητριακών NK κυττάρων (Εικ.9Α) στα υγιή δείγματα είναι  $39,79 \pm 4,77$  % και στα παθολογικά δείγματα  $39,12 \pm 4,92$  %, χωρίς να παρουσιάζουν σημαντική διαφορά ανάμεσα τους. Ακολούθως, το μέσο ποσοστό των Β-λεμφοκυττάρων (Εικ.9Β) στα υγιή δείγματα είναι  $7,11 \pm 1,48$  % ενώ στα παθολογικά δείγματα είναι  $4,95 \pm 0,80$  %. Το p-value υπολογίστηκε 0,1774, επομένως δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά ανάμεσα στον πληθυσμό των Β-λεμφοκυττάρων των υγιών και των παθολογικών δειγμάτων. Επίσης, το μέσο ποσοστό των διπλά αρνητικών κυττάρων-DN (Double Negative cells) (Εικ.9Γ) στους υγιείς είναι  $86,26 \pm 2,28$  % και στα παθολογικά  $62,51 \pm 4,41$  % και το p-value υπολογίστηκε 0,008, άρα υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά (\*\*\*) ανάμεσα στον πληθυσμό των DN κυττάρων των υγιών και των παθολογικών δειγμάτων ( $p=0,008 < 0,05$ ).

- **Δείκτης CD56 στα ενδομητριακά NK κύτταρα:**

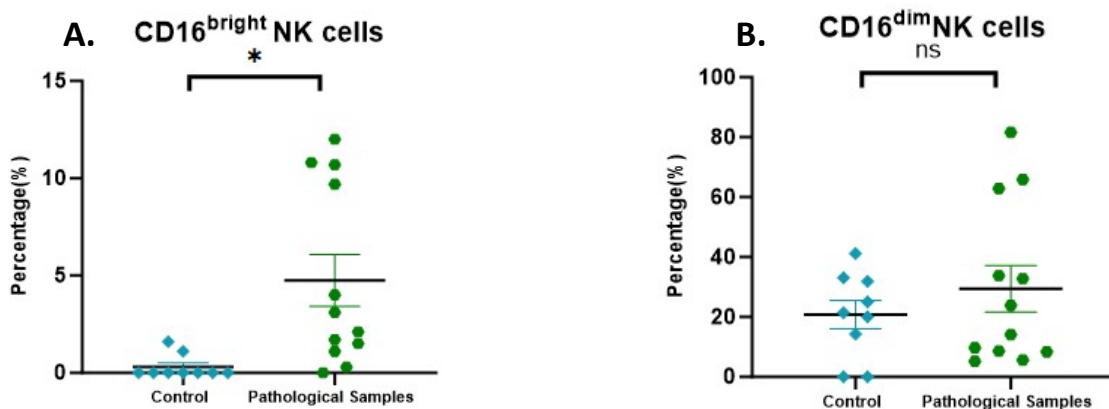


**Εικόνα 10:** **A.** Σύγκριση ποσοστών των ενδομητριακών CD56<sup>bright</sup> NK κυττάρων (p-value= 0.0001). **B.** Σύγκριση ποσοστών των ενδομητριακών CD56<sup>dim</sup> NK κυττάρων (p-value = 0.110).

Ο μέσος όρος του ποσοστού των ενδομητριακών NK CD56<sup>bright</sup> κυττάρων (Εικ.10Α) στους υγιείς είναι  $34,5 \pm 3,4$  %, ενώ στα παθολογικά δείγματα είναι  $0,908 \pm 1,160$  % και το p-value είναι ίσο με 0,0001, επομένως η διαφορά μεταξύ τους είναι ιδιαίτερα σημαντική. Επιπλέον, ο μέσος

όρος του ποσοστού των ενδομητριακών NK CD56<sup>dim</sup> κυττάρων (Εικ.10B) στους υγιείς  $2,32 \pm 1,56\%$  και στα παθολογικά δείγματα  $17,12 \pm 3,76\%$ . Το p-value υπολογίστηκε  $0,110$ , επομένως δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά ανάμεσα στον πληθυσμό των ενδομητριακών NK CD56<sup>bright</sup> κυττάρων των υγιών και των παθολογικών δειγμάτων.

- **Δείκτης CD16 στα ενδομητριακά NK κύτταρα:**



**Εικόνα 11:** **A.** Σύγκριση ποσοστών των ενδομητριακών CD16<sup>bright</sup> NK κυττάρων (p-value= 0.012). **B.** Σύγκριση ποσοστών των ενδομητριακών CD16<sup>dim</sup> NK κυττάρων (p-value= 0.393).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 11** ο μέσος όρος του ποσοστού των ενδομητριακών NK CD16<sup>dim</sup> στους υγιείς είναι  $20,77 \pm 1,56\%$  και παθολογικά δείγματα  $29,37 \pm 1,56\%$ . Το p-value υπολογίστηκε  $0,393$ , άρα δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά (\*) ανάμεσα στον πληθυσμό των ενδομητριακών NK CD16<sup>dim</sup> κυττάρων των υγιών και των παθολογικών δειγμάτων. Ακολούθως, ο μέσος όρος του ποσοστού των ενδομητριακών NK CD16<sup>bright</sup> κυττάρων (Εικ11.B) στους υγιείς είναι  $0,300 \pm 0,201\%$ , ενώ στα παθολογικά δείγματα είναι  $4,750 \pm 1,34\%$  και το p-value είναι ίσο με  $0,012$ , επομένως η διαφορά μεταξύ τους είναι ιδιαίτερα σημαντική ( $p=0.012 < 0.05$ ).

## 5. Συμπεράσματα-συζήτηση

---

Η ανοσολογία της κύησης είναι ένα αμφιλεγόμενο πεδίο έρευνας με πολλά αναπάντητα ερωτήματα με το κυριότερο να είναι πώς καταφέρνει μια έγκυος μητέρα, να θρέψει για πολλές εβδομάδες ή μήνες, ένα έμβρυο που είναι αντιγονικό ξένο σώμα. Η εκλεκτική επικοινωνία μεταξύ της μητέρας και του πλακούντα, τα ανώριμα εμβρυικά αντιγόνα τα οποία στοχεύουν την ανοσολογική ανοχή μειώνοντας την ανοσολογική απόκριση από την μητέρα και η ανοσολογική αδράνεια του μητρικού συστήματος κατά την διάρκεια της κύησης ήταν οι τρεις κύριες υποθέσεις από τον Medawar για την δεκτικότητα του εμβρύου από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας [97]. Πληθώρα μελετητών βασίστηκαν σε αυτές τις υποθέσεις για να δώσουν απαντήσεις στα κυριότερα ερωτήματα στην ανοσολογία της κύησης.

Το ενδομήτριο περιλαμβάνει ένα βασικό στρώμα το οποίο περιέχει τα βλαστοκύτταρα και ένα λειτουργικό στρώμα το οποίο δέχεται ερεθίσματα από ορμόνες κατά το πρώτο ήμισυ του εμμηνορρυσιακού κύκλου με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση κυττάρων και την αύξηση της αγγειογένεσης. Περαιτέρω κατά το δεύτερο ήμισυ του εμμηνορρυσιακού κύκλου και σε περίπτωση πετυχημένης εμφύτευσης της βλαστοκύστης λαμβάνει χώρα η διαφοροποίηση των στρωματικών κυττάρων, η αύξηση των λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένα των ενδομητριακών NK κυττάρων καθώς και η αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας [98]. Όλες αυτές οι μεταβολές συμπεριλαμβάνονται στην διαδικασία της φθαρτοποίησης, όπου ορμονικά ερεθίσματα επιστρατεύουν κυτταρικούς πληθυσμούς με σκοπό την δεκτικότητα του εμβρύου από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας. Τα πρώτα στάδια της κύησης χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυττάρων έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας όπως τα δενδρική κύτταρα σε ποσοστό 1-7%, τα T-Tregg και T-CD8<sup>-</sup> λεμφοκύτταρα σε ποσοστό 3-10% , τα μακροφάγα σε ποσοστό 20-25% και τα ενδομητριακά NK κύτταρα σε ποσοστό 70% [99]. Η κατανομή, οι λειτουργίες και ο φαινότυπος των κυττάρων καθορίζονται από σήματα που προέρχονται τόσο από τον πλακούντα όσο και από τον φθαρτό. Πέρα από την διατήρηση της ανοσοποιητικής προστασίας ο κάθε κυτταρικός τύπος ασκεί τον δικό του ρόλο μέσα από βιολογικές διεργασίες με σκοπό να συμβάλει στην διατήρηση μιας υγιούς κύησης.



Στο ενδομήτριο κατά την διάρκεια μιας υγιούς κύησης ο μεγαλύτερος κυτταρικός πληθυσμός με ποσοστό 70% είναι τα NK κύτταρα με έκφραση των επιφανειακών δεικτών CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup>. Τα ενδομητριακά NK κύτταρα με φαινότυπο CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> παίζουν ρυθμιστικό ρόλο παράγοντας κυτοκίνες όπως η ιντερφερόνη-γ, ιντερλευκίνη-10 και αγγειογενετικούς παράγοντες όπως ο ενδοθηλιακός παράγοντας [99]. Οι κυτοκίνες φαίνεται να ενορχηστρώνουν μια ανοσολογική εξισορρόπηση μεταξύ φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών αποκρίσεων με σκοπό την διατήρηση της κύησης. Ο κύριος ρόλος των ενδομητριακών NK κύτταρων στην φυσιολογική κύηση είναι τόσο η συμβολή τους στην αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας στο πλακούντα όσο και η ρύθμιση της διείσδυσης της εξωλάχνης τροφοβλάστης στο φθαρτό υμένα. Ακόμη, ένας τρίτος ρόλος τους είναι η αλληλεπίδραση των υποδοχέων KIR που φέρουν στην επιφάνεια τους με τα αντιγόνα HLA των τροφοβλαστικών κυττάρων με στόχο την δημιουργία ανοσολογικής ανοχής μεταξύ της μητέρας-εμβρύου για την προστασία του εμβρύου και όχι την απόρριψη του [100]. Παρόλα αυτά όταν το μικροβίωμα του ενδομητρίου απορρυθμίζεται τα ενδομητριακά NK κύτταρα αποκτούν κυτταροτοξικό φαινότυπο CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> οδηγώντας σε παθολογίες της κύησης όπως οι καθ'έξιν αποβολές και οι επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις. Απόρροια του κυτταροτοξικού φαινοτύπου τους είναι η απορρύθμιση όλων των διεργασιών όπως η ανοσολογική ανοχή, η ρύθμιση της διείσδυσης της εξωλάχνης τροφοβλάστης και η αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας που συμβαίνουν κατά την φυσιολογική κύηση.

Επομένως, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των ενδομητριακών NK κυττάρων στο ενδομήτριο. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την κυτταρομετρία ροής αναλύθηκαν ώστε να διερευνηθούν τα ποσοστά των ανοσοκυτταρικών πληθυσμών στο ενδομήτριο με ιδιαίτερη και περαιτέρω έμφαση στα ενδομητριακά NK κύτταρα.

Αρχικά, στην πρώτη φάση της ανάλυσης των πληθυσμών στο ενδομήτριο δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των λεμφοκυττάρων με δείκτη CD45<sup>+</sup> μεταξύ των υγιών και παθολογικών δειγμάτων. Παρόλα αυτά παρατηρούμε πως ο αριθμός των λεμφοκυττάρων στα παθολογικά δείγματα είναι μειωμένος σε σύγκριση με το ποσοστό

των λεμφοκυττάρων σε μια φυσιολογική κύηση το οποίο κυμαίνεται από 30-40% σύμφωνα με την βιβλιογραφία λόγω της αύξησης τους κατά την διάρκεια του δεύτερου ήμισυ του εμμηνορρυσιακού κύκλου [100]. Επιπλέον, αύξηση παρατηρούμε στο ποσοστά των T-CD3<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στα παθολογικά δείγματα με ποσοστό 58,36 % συγκριτικά με τα υγιή δείγματα 51,13 %. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το ποσοστό των T- CD3<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στο ενδομήτριο αποτελεί το 1-2 % στο σύνολο των λεμφοκυττάρων και μελέτες έχουν δείξει πως η ραγδαία αύξηση τους στο ενδομήτριο φαίνεται να σχετίζεται με τις καθ'έξιν αποβολές [100]. Ακολούθως, τα T-CD4<sup>+</sup> βοηθητικά λεμφοκύτταρα στα παθολογικά δείγματα παρουσίασαν ελάχιστη μείωση συγκριτικά με τα υγιή δείγματα. Τα T-CD4<sup>+</sup> βοηθητικά λεμφοκύτταρα ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση παράγοντας μεγάλη ποσότητα κυτοκινών και πιο συγκεκριμένα διακρίνονται σε δύο υποομάδες κυττάρων την Th<sub>1</sub> και Th<sub>2</sub> οι οποίες εκκρίνουν κυτοκίνες όπως ιντερλευκίνη-2 (IL-2), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και η ιντερλευκίνη-4 (IL-4), η ιντερλευκίνη-5 (IL-5) αντίστοιχα [101]. Σε μια υγιή κύηση το φλεγμονώδες περιβάλλον το οποίο δημιουργείται κατά πρώτο τρίμηνο της κύησης από τα Th<sub>1</sub> κύτταρα συμβάλλει τόσο στην εμφύτευση της βλαστοκύστης όσο και στην ενεργοποίηση των ενδομητριακών NK κυττάρων από την ιντερφερόνη-γ. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει πως η υπερβολική φλεγμονώδης απόκριση δηλαδή η υπερβολική έκκριση κυτοκινών λόγω της αύξησης των T- CD4<sup>+</sup> βοηθητικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενή αποτελέσματα στην κύηση. Αντίστοιχα, μελέτες με επίκεντρο την δράση των Th<sub>2</sub> κύτταρων παρουσίασαν μια συσχέτιση αυτών με τις παθολογίες στην κύηση ενώ άλλες έδειξαν αντίθετα αποτελέσματα [102]. Περαιτέρω, η σύγκριση των T-CD8<sup>+</sup>κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων μεταξύ των υγιών και παθολογικών δειγμάτων έδειξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα τους. Τα T-CD8<sup>+</sup>κυτταροτοξικών λεμφοκυτταρα αποτελούν το πιο άφθονο υποσύνολο των T-λεμφοκυττάρων με ρόλο την παροχή προστατευτικής ανοσίας [103]. Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει πως τα αυξημένα ποσοστά των T-CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων σχετίζονται με τις επαναλαμβανόμενες αποβολές κύησης λόγω της κακής ισορροπίας μεταξύ της ανοσολογικής ανοχής μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου. Περαιτέρω μελέτες αναφέρουν πως ιογενείς λοιμώξεις αυξάνουν τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών διαταράζοντας την ροή των T-λεμφοκυττάρων και κυρίως αλλάζουν την δυναμική απόκριση των T-CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών κυττάρων παρόλα αυτά όμως

χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Αντίθετα, άλλες μελέτες αναφέρουν πως τα T-CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικά κύτταρα δεν φαίνονται ικανά να σκοτώνουν τα υγιή τροφοβλαστικά κύτταρα [104].

Ακολούθως, ο πληθυσμός των B-λεμφοκυττάρων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα υγιή και παθολογικά δείγματα παρόλο που παρατηρείται μια μείωση τους στα τελευταία. Ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την συσχέτιση των B-λεμφοκυττάρων στις παθολογίες της κύησης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αποτέλεσμα μιας μελέτης η οποία αναφέρει αυξημένα ποσοστά B-λεμφοκυττάρων στις γυναίκες με ανεξήγητες αποβολές κύησης συγκριτικά με υγιής [105]. Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμη σαφές αν τα αυξημένα ποσοστά των B-λεμφοκυττάρων είναι η αιτία ή συνέπεια των ανεξήγητων αποβολών κύησης καθώς χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως σημαντικό εύρημα από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι το αυξημένο ποσοστό των διπλά αρνητικών κυττάρων—Double Negative T-cells (DN cells) τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα παθολογικά δείγματα. Συγκεκριμένα το ποσοστό των Double Negative T-cells (DN cells) στα υγιή δείγματα είναι πολύ πιο αυξημένο από ότι στα παθολογικά. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο ρόλος τους στην κύηση ενδέχεται να συμβάλει ανοσολογική ανοχή και στην αγγειογένεση. Είναι ένας ετερογενής πληθυσμός αποτελούμενος από κύτταρα μνήμης και ανοχής και καθίσταται ο πιο διαφοροποιημένος πληθυσμός των T-λεμφοκυττάρων. Παρόλα αυτά οι μελέτες όσο αφορά τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι ελάχιστες και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση τους όσο αφορά τον φαινότυπο, τον κύριο ρόλο τους και την συσχέτιση τους με τις παθολογίες της κύησης [106].

Ακολούθως, δεν παρατηρήθηκαν διαφορά στα ποσοστά του πληθυσμού των ενδομητριακών NK κυττάρων στα παθολογικά δείγματα συγκριτικά τα υγιή δείγματα καθώς το ποσοστό τους κυμαινόταν στο 39% και στις δύο περιπτώσεις. Αντιθέτως, στην βιβλιογραφία παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά των ενδομητριακών NK κυττάρων στο ενδομήτριο γυναικών με καθ'έξιν αποβολές και επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις συσχετίζοντας τις αλλαγές της συγκέντρωσης τους με τις παθολογίες αυτές [107]. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός δράσης πίσω

από την αύξηση των ενδομητριακών NK κυττάρων αλλά και των μεταβολών που προκαλεί χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση από την επιστημονική κοινότητα. Παρόλα αυτά, άλλες μελέτες δεν παρατηρούν καμία συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ενδομητριακών NK κυττάρων με τις παθολογίες στην κύηση, δείχνοντας πως τόσο η αύξηση όσο και η μείωση της συγκέντρωσης των ενδομητριακών NK κυττάρων δεν επηρεάζει την έκβαση της [108]. Μια σημαντική παρατήρηση από μια ομάδα ερευνητών υποστηρίζει πως οι διαφορές στο αριθμό των ενδομητριακών NK κυττάρων ίσως αντιπροσωπεύουν το αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής κύησης και όχι την αιτία αυτής [109]. Επομένως, ο μοριακός μηχανισμός εμπλοκής και συσχέτισης των ενδομητριακών NK κυττάρων με τις παθολογίες δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως καθώς τα διφορούμενα στοιχεία από τις πολυάριθμες μελέτες δεν επιτρέπουν την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Στην δεύτερη φάση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ο στόχος ήταν η περαιτέρω διερεύνηση των ενδομητριακών NK κυττάρων ποσοτικά και ποιοτικά. Ένα από τα πιο κύρια ευρήματα της παρούσας εργασίας αποτελεί η αύξηση των ενδομητριακών NK κυττάρων με δείκτη CD56<sup>bright</sup> και η μείωση του δείκτη CD16<sup>dim</sup>. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της έκφρασης των συγκεκριμένων δεικτών στις υγιείς γυναίκες στην παρούσα εργασία συμφωνούν με την βιβλιογραφία καθώς οι υποπληθυσμοί CD56<sup>bright</sup> και CD16<sup>dim</sup> NK αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των λεμφοκυττάρων στο ενδομήτριο μιας υγιούς κύησης εκκρίνοντας μια σειρά κυτοκινών συμβάλλοντας στην διείσδυση της τροφοβλάστης και στην αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας [110]. Παρόλα αυτά στα παθολογικά δείγματα παρατηρήθηκε μειωμένο το ποσοστό των παραπάνω δύο δεικτών κάτι το οποίο έχει αποδειχθεί και σε άλλες μελέτες σε γυναίκες με ανεξήγητες αποβολές χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης πίσω από το αποτέλεσμα αυτό [111]. Συγκεκριμένα, πολυάριθμες μελέτες σε γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές υποστηρίζουν ότι η μείωση του συγκεκριμένου φαινοτύπου οδηγεί σε ανεπαρκή αναδιαμόρφωση της σπειροειδούς αρτηρίας και μη διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής λόγω της απορρυθμισμένης παραγωγής κυτοκινών [111]. Αντίθετα, άλλες μελέτες σε γυναίκες με

επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις δεν έδειξαν μείωση αλλά αύξηση του ποσοστού των ενδομητριακών CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> NK κυττάρων. Η υπερβολική αύξηση τους μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων με αποτέλεσμα να προκαλέσει ανώμαλη ενδομήτρια αγγειογένεση και αγγειακή διαταραχή κάτι το οποίο παρατηρείται στις γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές [112].

Ακολούθως, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των ενδομητριακών NK CD16<sup>bright</sup> κυττάρων μεταξύ των υγιών και παθολογικών δειγμάτων με ποσοστά 0,30 % και 4,77% αντίστοιχα. Παράλληλα, κύριο εύρημα αποτέλεσε και η αύξηση του δείκτη CD56<sup>dim</sup> στα παθολογικά δείγματα συγκριτικά με τα υγιή δείγματα. Πράγματι, η αύξηση των συγκεκριμένων δεικτών CD16<sup>bright</sup> CD56<sup>dim</sup> έχει παρατηρηθεί τόσο σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις όσο και με καθ'έξιν αποβολές σύμφωνα και με άλλες μελέτες [113]. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι τα ενδομητριακά NK κύτταρα CD16<sup>bright</sup> CD56<sup>dim</sup> φέρουν ένα κυτταροτοξικό φαινότυπο απορρυθμίζοντας τις φυσιολογικές διεργασίες που θα λάμβαναν χώρα σε μια φυσιολογική κύηση όπως η αγγειογένεση και διείσδυση της τροφοβλάστης λόγω της μειωμένης παραγωγής κυτοκινών και της ισχυρής κυτταροτοξικότητας [114]. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης αλλά και η αλλαγή από ρυθμιστικά σε κυτταροτοξικά NK κύτταρα δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Κάποιες μελέτες αναφέρουν πως αλλαγές στην έκφραση της τριπλέτας των ιντερλευκινών IL-12/IL-15/IL-18, οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση του ασθενή επαγωγέα απόπτωσης-TWEAK, μπορούν να οδηγήσουν στην κυτταροτοξικότητα των ενδομητριακών NK κυττάρων καθώς ο επαγωγέας είναι απαραίτητος για την κυτταροτοξική κατάσταση των NK κυττάρων κατά την εμφύτευση και για την αγγειογένεση. Επομένως αλλαγές στην έκφραση της τριπλέτας IL-12/IL-15/IL-18 και του επαγωγέα TWEAK οδηγούν σε αυξημένα ποσοστά κυτταροτοξικών CD16<sup>bright</sup> NK κυττάρων [115]. Ακόμη, μια πρόσφατη μελέτη δείχνει πως η αύξηση των κυτταροτοξικών ενδομητριακών CD16<sup>bright</sup> NK ίσως να οφείλεται σε αυτοάνοσα νοσήματα και σε ιογενείς λοιμώξεις τα οποία με την σειρά τους προκαλούν αλλαγές στο μικροβίωμα με αποτέλεσμα να θέτουν σε κίνδυνο την διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής μεταξύ μητέρας-εμβρύου καθώς τα ενδομητριακά NK κύτταρα αρχίζουν να παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα για την αντιμετώπιση της λοίμωξης [116]. Ωστόσο, η μετάβαση των ενδομητριακών NK κυττάρων από μια ρυθμιστική με χαμηλή

κυτταροτοξική κατάσταση σε μια ισχυρή κυτταροτοξικότητα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση για το ποιοι παράγοντες καθορίζουν τον μηχανισμό μετάβασής τους και την αλλαγή του φαινοτύπου τους στα διάφορα στάδια της κύησης.

Συμπερασματικά, στην βιβλιογραφία υπάρχουν αντιφατικά δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης των ενδομητριακών NK κυττάρων και με την συσχέτιση τους με παθολογίες της κύησης. Τα αντιφατικά αποτελέσματα που προκύπτουν οφείλονται τόσο στην πρόκληση που υπάρχει για την απόκτηση των δειγμάτων ενδομητριακού ιστού από ηθικής πλευράς όσο και λόγω της ετερογένειας των κυτταρικών υποπληθυσμών NK που συνεχώς διερευνάται. Η περαιτέρω κατανόηση του βασικού ρόλου των ενδομητριακών NK κυττάρων, πέρα της συμβολής τους στην αγγειογένεση, στην διατήρηση της ανοσολογικής ανοχής και την ρύθμιση διεύθυνση της τροφοβλάστης, αναμένεται να επεκταθεί με τις μελλοντικές έρευνες. Παρόλα αυτά, οι ερευνητές θα πρέπει να πραγματοποιήσουν πολυάριθμες μελέτες για την περαιτέρω κατανόηση τους και στο ανθρώπινο ενδομήτριο καθώς οι περισσότερες έρευνες στην βιβλιογραφία εστιάζουν την μελέτη τους σε άλλα θηλαστικά. Επιπλέον, ο κυριότερος στόχος των μελλοντικών ερευνών είναι η εξακρίβωση του μηχανισμού δράσης των ενδομητριακών NK κυττάρων και η ακριβής συσχέτιση τους με τις παθολογίες στην κύηση. Επομένως, τα νέα επαρκεί δεδομένα από αυτές τις μελέτες θα βοηθήσουν να αναγνωριστεί η κλινική αξία των ενδομητριακών NK κυττάρων με σκοπό αυτά τα κύτταρα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ισχυροί βιοδείκτες για την διάγνωση, πρόγνωση αλλά και για την δημιουργία θεραπευτικών πρωτοκόλλων για τις παθολογίες που σχετίζονται με αυτά τα κύτταρα. Κλείνοντας, η ανοσολογία της κύησης είναι ένα πολύ περίπλοκο πεδίο έρευνας επομένως οι μελλοντικές έρευνες πρέπει να είναι επιτακτικές για να φέρουν φώς σε μερικά από τα κυριότερα ερωτήματα που την ταλανίζουν ανάμεσα τους και ο ρόλος των ενδομητριακών NK κυττάρων στην κύηση και στις παθολογίες της.

## Βιβλιογραφία

---

1. Robertson, M., & Jerome, R. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 76(12), 2421-2438
2. Scoville, S. D., Freud, A. G., & Caligiuri, M. A. (2017). Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Frontiers in Immunology*, 8
3. LoNigro, C., Macagno, M., Sangiolo, D., Bertolaccini, L., Aglietta, M., & Merlano, M. C. (2019). NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Annals of Translational Medicine*, 7(5), 105-105.
4. Krzewski, K., & Coligan, J. E. (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in Immunology*, 3.
5. Moffett, A., & Shreeve, N. (2015). First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Human Reproduction*, 30(7), 1519-1525
6. Rai, R., Sacks, G., & Trew, G. (2005). Natural killer cells and reproductive failure—theory, practice and prejudice. *Human Reproduction*, 20(5), 1123-1126.
7. Vacca, P., Vitale, C., Munari, E., Cassatella, M. A., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2018). Human Innate Lymphoid Cells: Their Functional and Cellular Interactions in Decidua. *Frontiers in Immunology*, 9.
8. Bento-Tormo R, Efremova M, Botting RA, Turco MY, Vento-Tormo M, Meyer KB, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans. *Nature*. 2018 ; 563 : 347 – 53
9. Buhn O, Ivarsson MA, Gardner L, Hollinshead M, Stinchcombe JC, Chen P, et al. Distinctive phenotypes and functions of innate lymphoid cells in human decidua during early pregnancy. *Nat Commun*. 2020 ; 11 : 381
10. Sfakianoudis, K., Rapani, A., Grigoriadis, S., Pantou, A., Maziotis, E., Kokkini, G., Tsirligkani, C., Bolaris, S., Nikolettos, K., Chronopoulou, M., Pantos, K., & Simopoulou, M. (2021). The Role of Uterine Natural Killer Cells on Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: From Pathophysiology to Treatment. *Biomedicines*, 9(10), 1425.
10. 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), 68

11. Lynch, L., Golden-Mason, L., Eogan, M., O'Herlihy, C., & O'Farrelly, C. (2007). Cells with haematopoietic stem cell phenotype in adult human endometrium: Relevance to infertility? *Human reproduction*, 22(4), 919-926
12. Kale V, Hughes T, McClory S, Colucci F, Caligiuri MA, Moffett A. Immature Nk Cells, Capable of Producing IL-22, Are Present in Human Uterine Mucosa. *J Immunol* (2010) 185(7):3913–8.
13. Bulmer, J. N., & Lash, G. E. (2019). Uterine natural killer cells: Time for a re-appraisal?. *F1000Research*, 8, 999.
14. Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J. r., Gamage, T. K. J. B., & James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3479-3496.
15. Moffett, A., Chazara, O., & Colucci, F. (2017). Maternal allo-recognition of the fetus. *Fertility and Sterility*, 107(6), 1269-1272.
16. Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J. r., Gamage, T. K. J. B., & James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3479-3496
17. Chen LJ, Han ZQ, Zhou H, Zou L, Zou P. Inhibition of HLA-G expression via RNAi abolishes resistance of extravillous trophoblast cell line TEV-1 to NK lysis. *Placenta*. 2010 ; 31 : 519 – 27
18. Moretta L , Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors . *Curr Opin Immunol* 2004 ; 16 : 626 – 633
19. Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal Kir and Fetal Hla-C: A Fine Balance. *J Leukoc Biol* (2011) 90(4):703–16
20. SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Morgan L, Tower C, Regan L, Moore GE, Carrington MMA. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by HLA-C2. *J Clin Invest*. 2010;120:4102–4110.
21. Nowak I, Wilczyńska K, Wilczyński JR, Malinowski A, Radwan P, Radwan M, et al. Kir, Lilrb and Their Ligands' Genes as Potential Biomarkers in Recurrent Implantation Failure. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (2017) 65(5):391–9.
22. Xie, M., Li, Y., Meng, Y. Z., Xu, P., Yang, Y. G., Dong, S., He, J., & Hu, Z. (2022). Uterine Natural Killer Cells: A Rising Star in Human Pregnancy Regulation. *Frontiers in Immunology*, 13.
23. Parham, P. (2018). Molecular definition of the transplantation antigens. *The FEBS Journal*, 285(15), 2728-2745.
24. Rock, K. L., Reits, E., & Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology*, 37(11), 724-737



25. Rock, K. L., Reits, E., & Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology*, 37(11), 724-737
26. Moffett, A., Chazara, O., & Colucci, F. (2017). Maternal allo-recognition of the fetus. *Fertility and Sterility*, 107(6), 1269-1272.
27. King A., Allan D.S., Bowen M., Powis S.J., Joseph S., Verma S., Hiby S.E., McMichael A.J., Loke Y.W., Braud V.M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK Cells. *Eur. J. Immunol.* 2000;30:1623–1631
28. Van der Meer Lukassen HGM van Lierop MJC ,Wijnands F, Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO and Wagtmann N: Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol.* 161:571–577. 1998
29. Morin SJ, Treff NR, Tao X, Scott RT III, Franasiak JM, Juneau CR, Maguire M and Scott RT: Combination of uterine natural killer cell immunoglobulin receptor haplotype and trophoblastic HLA-C ligand influences the risk of pregnancy loss: A retrospective cohort analysis of direct embryo genotyping data from euploid transfers. *Fertil Steril.* 107:677–683.e2. 2017
30. Parham P., Norman PJ, Abi-Rached L., Hilton HG, Guethlein LA Review: Immunogenetics of human placentation
31. Larsen TG, Hackmon R., Geraghty DE, Hviid TVF Fetal human leukocyte antigen-C and maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors in cases of severe preeclampsia, *Placenta* 2019; 75 :27–33
32. Tersigni, C., Meli, F., Neri, C., Iacoangeli, A., Franco, R., Lanzone, A., Scambia, G., & Di Simone, N. (2020). Role of Human Leukocyte Antigens at the Feto-Maternal Interface in Normal and Pathological Pregnancy: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4756.
33. Li H, Ivarsson MA, Walker-Sperling VE, Subleski J, Johnson JK, Wright PW, et al. Identification of an elaborate NK-specific system regulating HLA-C expression. *PLoS Genet.* (2018) 14:e1007163
34. Ingman WV, Robertson SA. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction . *BioEssays* 2002 ; 24 : 904 – 914
35. Rajagopalan S Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells *J Exp Med* 1999 ; 189 1093 – 1099
36. Ishitani A , Sageshima N , Lee N , Dorofeeva N , Hatake K , Marquardt H , Geraghty DE. protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition . *J Immunol* 2003 ; 171 : 1376-1384
37. King A., Allan D.S., Bowen M., Powis S.J., Joseph S., Verma S., Hiby S.E., McMichael A.J., Loke Y.W., Braud V.M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK Cells. *Eur. J. Immunol.* 2000;30:1623–1631
38. Lee N., Llano M., Carretero M., Ishitani A., Navarro F., López-Botet M., Geraghty D.E. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:5199–5204.

39. Pijnenborg R., Vercruyssen L., Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: Facts and controversies. *Placenta*. 2006; 27 :939–958
40. Kaufmann P, Baergen R eds. *Pathology of the Human Placenta*. 5th ed. New York: Springer–Verlag, 2006:30-42
41. Morgan T, Ward K. Decidual spiral artery remodeling begins before cellular interaction with cytotrophoblast. *Placenta* 1998; 19: 241-252
42. Chantakru S., Miller C., Roach L.E., Kuziel W.A., Maeda N., Wang W.-C., Evans S.S., Croy B.A. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J. Immunol.* 2002;168:22–28
43. Lobo S.C., Huang S.-T.J., Germeyer A., Dosiou C., Vo K.C., Tulac S., Nayak N.R., Giudice L.C. The immune environment in human endometrium during the window of implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004;52:244–251
44. Kharfi A , Giguère Y , Sapin V , Massé J, Dastugue B , Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines . *Clin Biochem* 2003 ; 36 : 323 331
45. Moffett, A., & Shreeve, N. (2022). Local immune recognition of trophoblast in early human pregnancy: controversies and questions. *Nature Reviews Immunology*, 23(4), 222-235
46. Gaynor L.M., Colucci F. Uterine natural killer cells: Functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Front. Immunol.* 2017;8:467
47. Chakraborty D., Rumi M.A.K., Konno T., Soares M.J. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108:16295–16300
48. Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies.,*Placenta*. 2006 ; 27 : 939 – 58
49. Smith S.D., Dunk C.E., Aplin J.D., Harris L.K., Jones R.L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am. J. Pathol.* 2009;174:1959–1971.
50. Kharfi A , Giguère Y , Sapin V , Massé J, Dastugue B , Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines . *Clin Biochem* 2003 ; 36 : 323 331
51. Xie, M., Li, Y., Meng, Y. Z., Xu, P., Yang, Y. G., Dong, S., He, J., & Hu, Z. (2022). Uterine Natural Killer Cells: A Rising Star in Human Pregnancy Regulation. *Frontiers in Immunology*, 13
52. Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies.,*Placenta*. 2006 ; 27 : 939 – 58
53. Xu, X., Zhou, Y., & Wei, H. (2020). Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 11

54. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Morgan L, Tower C, Regan L, Moore GE, Carrington MMA. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by HLA-C2. *J Clin Invest.* 2010;120:4102–4110.
55. Nowak I, Malinowski A, Barcz E, Wilczyński JR, Wagner M, Majorczyk E, Motak-Pochrzęst H, Banasik MKP. Possible role of HLA-G, LILRB1 and KIR2DL4 gene polymorphisms in spontaneous miscarriage. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016;64:505–514. doi: 10.1007/s00005-016-0389-7
56. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol.* 2006;4:e9.
57. 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), 68
58. Tuckerman E., Mariee N., Prakash A., Li T.C., Laird S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J. Reprod. Immunol.* 2010;87:60–66
60. Lobo S.C., Huang S.-T.J., Germeyer A., Dosiou C., Vo K.C., Tulac S., Nayak N.R., Giudice L.C. The immune environment in human endometrium during the window of implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004;52:244–251
61. Pantos, K., Grigoriadis, S., Maziotis, E., Pistola, K., Xystra, P., Pantou, A., Kokkali, G., Pappas, A., Lambropoulou, M., Sfakianoudis, K., & Simopoulou, M. (2022). The Role of Interleukins in Recurrent Implantation Failure: A Comprehensive Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2198.
62. Quenby, S., Nik, H., Innes, B., Lash, G., Turner, M., Drury, J., & Bulmer, J. (2009). Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human reproduction*, 24(1), 45-54
63. Chen X, Man GCW, Liu Y, Wu F, Huang J, Li TC, Wang CC, Cimadomo D., Craciunas L., Vermeulen N., Vomstein K., Toth B. Definition, Diagnostic and Therapeutic Options in Recurrent Implantation Failure: An International Survey of Clinicians and Embryologists. *Hum. Reprod.* 2021;36:305–317
64. Coughlan C., Ledger W., Wang Q., Liu F., Demiroglu A., Gurgan T., Cutting R., Ong K., Sallam H., Li T.C. Recurrent Implantation Failure: Definition and Management. *Reprod. Biomed. Online.* 2014;28:14–38.
65. Halper K.I., Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-Update Overview on Etiology, Diagnosis, Treatment and Future Directions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018;16:121
66. Chen X., Mariee N., Jiang L., Liu Y., Wang C.C., Li T.C., Laird S. Measurement of Uterine Natural Killer Cell Percentage in the Periimplantation Endometrium from Fertile Women and Women with Recurrent Reproductive Failure: Establishment of a Reference Range. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2017;217:680.e1–680.e6.

67. Pantos, K., Grigoriadis, S., Maziotis, E., Pistola, K., Xystra, P., Pantou, A., Kokkali, G., Pappas, A., Lambropoulou, M., Sfakianoudis, K., & Simopoulou, M. (2022). The Role of Interleukins in Recurrent Implantation Failure: A Comprehensive Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2198
68. Chaouat G., Dubanchet S., Ledée N. Cytokines: Important for Implantation? *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007;24:491–505.
69. Lédée-Bataille N., Dubanchet S., Coulomb-L'hermine A., Durand-Gasselín I., Frydman R., Chaouat G A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil. Steril* 2004; 81 :59–65
70. Pantos, K., Grigoriadis, S., Maziotis, E., Pistola, K., Xystra, P., Pantou, A., Kokkali, G., Pappas, A., Lambropoulou, M., Sfakianoudis, K., & Simopoulou, M. (2022). The Role of Interleukins in Recurrent Implantation Failure: A Comprehensive Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2198.
71. Lédée N., Petitbarat M., Rahmati M., Dubanchet S., Chaouat G., Sandra O., Perrier-d'Hauterive S., Munaut C., Foidart J.M. New Pre-Conception Immune Biomarkers for Clinical Practice: Interleukin-18, Interleukin-15 and TWEAK on the Endometrial Side, G-CSF on the Follicular Side. *J. Reprod. Immunol.* 2011;88:118–123
72. Petitbarat M., Rahmati M., Sérazin V., Dubanchet S., Morvan C., Wainer R., de Mazancourt P., Chaouat G., Foidart J.-M., Munaut C., et al. TWEAK Appears as a Modulator of Endometrial IL-18 Related Cytotoxic Activity of Uterine Natural Killers. *PLoS ONE.* 2011;6:e14497.
73. Argilés J.M., Carbó N., López-Soriano F.J. TNF and Pregnancy: The Paradigm of a Complex Interaction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:181–188
74. Donoghue J., Paiva P., Teh W., Cann L., Nowell C., Rees H., Bittinger S., Obers V., Bulmer J., Stern C., et al. Endometrial uNK cell counts do not predict successful implantation in an IVF population. *Hum. Reprod.* 2019;34:1–11
75. MaZ, Yang H, Kessler M, Sperandio M, Mahner S, Jeschke U, von Schönfeldt V. Targeting aberrantly elevated Sialyl Lewis A as a potential therapy for impaired endometrial selection ability in unexplained recurrent miscarriage. *Front Immunol* 2022
76. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 2013; 11:154
77. Lachapelle, M., Miron, P., Hemmings, R., & Roy, D. (1996). Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *The Journal of Immunology*, 156(10), 4027–4034
78. Guo W, Fang L, Li B, Xiao X, Chen S, Wang J, et al. Decreased Human Leukocyte Antigen-G Expression by miR-133a Contributes to Impairment of Proinvasion and Proangiogenesis Functions of Decidual NK Cells. *Front Immunol* (2017) 8:741

79. El-Azzamy H, Dambaeva S V, Katukurundage D, Salazar Garcia MD, Skariah A, Hussein Y, et al. Dysregulated uterine natural killer cells and vascular remodeling in women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol*. 2018 Oct;80(4):e13024.
80. Shakhar, K.; Ben-Eliyahu, S.; Loewenthal, R.; Rosenne, E.; Carp, H. Differences in number and activity of peripheral natural killer cells in primary versus secondary recurrent miscarriage. *Fertil. Steril*. 2003, 80, 368–375.
81. Laird, S., Tuckerman, E., & Li, T. (2006). Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproductive biomedicine online*, 13(1), 13-23
83. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, et al. Expression of Angiogenic Growth Factors by Uterine Natural Killer Cells During Early Pregnancy. *J Leukoc Biol* (2006) 80(3):572–80
84. Xie, M., Li, Y., Meng, Y. Z., Xu, P., Yang, Y. G., Dong, S., He, J., & Hu, Z. (2022). Uterine Natural Killer Cells: A Rising Star in Human Pregnancy Regulation. *Frontiers in Immunology*, 13
85. Jokhi P.P., King A., Loke Y.W. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine*. 1997;9:126–137
86. Xiong S, Sharkey AM, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, Chazara O, et al. Maternal Uterine Nk Cell-Activating Receptor Kir2ds1 Enhances Placentation. *J Clin Invest* (2013) 123(10):4264–72
86. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, et al. Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success. *J Exp Med* (2004) 200(8):957–65.
87. Robinson P. J. (2013). Wallace H. Coulter: Decades of invention and discovery. *Cytometry Part A*, 83A (5), 1552–4922
88. Petit, J.-M., Denis-Gay, M., & Ratinaud, M.-H. (1993). Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 1–13
89. Hulspas, R., Dombkowski, D., Preffer, F., Douglas, D., Kildew-Shah, B., & Gilbert, J. (2009). Flow cytometry and the stability of phycoerythrin-tandem dye conjugates. *Cytometry Part A*, 75A(11), 966–972
90. Goddard, G., Martin, J.C., Naivar, M., Goodwin, P.M., Graves, S.W., Habbersett, R., Nolan, J.P., and Jett, J.H. (2006). Single particle high resolution spectral analysis flow cytometry. *Cytometry A* 69:842-851
91. Chevrier, S., Crowell, H. L., Zanotelli, V. R. T., Engler, S., Robinson, M. D., & Bodenmiller, B. (2018). Compensation of Signal Spillover in Suspension and Imaging Mass Cytometry. *Cell Systems*, 6(5), 612–620.e5
92. Davies D. (2010) Cell sorting by flow cytometry. In: Macey MG, ed. *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa (NJ): Humana Press, 257"76

93. Macey MG (2010). Principles of flow cytometry. Flow cytometry: principles and applications In: Macey MG, ed. Totowa (NJ): Humana Press, 1-15
94. Maecker, H. T., & Trotter, J. (2006). Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry Part A*, 69A(9), 1037–1042
95. Perfetto, S. P., Ambrozak, D., Nguyen, R., Chattopadhyay, P., & Roederer, M. (2006). Quality assurance for polychromatic flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1522–1530
96. Snow, C. Kit (2004). Flow cytometer electronics. *Cytometry*, 57A(2), 63–69
97. Rendell, V., Bath, N. M., & Brennan, T. V. (2020). Medawar’s paradox and immune mechanisms of fetomaternal tolerance. *OBM transplantation*, 4(1).
98. Moffett, A., & Shreeve, N. (2023). Local immune recognition of trophoblast in early human pregnancy: controversies and questions. *Nature Reviews Immunology*, 23(4), 222-235.
99. Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 17(8), 469-482.
100. Kavvadas, D., Karachrysafti, S., Anastasiadou, P., Kavvada, A., Fotiadou, S., Papachristodoulou, A., ... & Sioga, A. (2022). Immunohistochemical evaluation of CD3, CD4, CD8, and CD20 in decidual and trophoblastic tissue specimens of patients with recurrent pregnancy loss. *Clinics and Practice*, 12(2), 177-193.
101. Li, D., Zheng, L., Zhao, D., Xu, Y., & Wang, Y. (2021). The role of immune cells in recurrent spontaneous abortion. *Reproductive Sciences*, 28(12), 3303-3315.
102. Andreescu, M., Frîncu, F., Plotogea, M., & Mehedințu, C. (2023). Recurrent Abortion and the Involvement of Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) Genes, Activated T Cells, NK Abnormalities, and Cytokine Profiles. *Journal of Clinical Medicine*, 12(4), 1355.
103. Tilburgs, T., & Strominger, J. L. (2013). CD 8+ Effector T Cells at the Fetal–Maternal Interface, Balancing Fetal Tolerance and Antiviral Immunity. *American journal of reproductive immunology*, 69(4), 395-407.
104. Lee, S. K., Kim, C. J., Kim, D. J., & Kang, J. H. (2015). Immune cells in the female reproductive tract. *Immune network*, 15(1), 16-26.
105. Ângelo-Dias, M., Martins, C., Dias, S. S., Borrego, L. M., & Lima, J. (2022). Association of B Cells with Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15200.
106. 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, 886645.
107. Tuckerman E., Mariee N., Prakash A., Li T.C., Laird S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J. Reprod. Immunol.* 2010;87:60–66

108. Quenby, S., Nik, H., Innes, B., Lash, G., Turner, M., Drury, J., & Bulmer, J. (2009). Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human reproduction*, 24(1), 45-54
109. Sfakianoudis, K., Rapani, A., Grigoriadis, S., Pantou, A., Maziotis, E., Kokkini, G., Tsirligkani, C., Bolaris, S., Nikolettos, K., Chronopoulou, M., Pantos, K., & Simopoulou, M. (2021). The Role of Uterine Natural Killer Cells on Recurrent Miscarriage and Recurrent Implantation Failure: From Pathophysiology to Treatment. *Biomedicines*, 9(10), 1425.
110. Lachapelle, M., Miron, P., Hemmings, R., & Roy, D. (1996). Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *The Journal of Immunology*, 156(10), 4027–4034
111. Zhang, X., & Wei, H. (2021). Role of decidual natural killer cells in human pregnancy and related pregnancy complications. *Frontiers in immunology*, 12, 728291.
112. Homayouni, V., Dehghan, F., & Sherkat, R. (2023). The Role of NK Cells in Recurrent Miscarriage (Abortion). In *Natural Killer Cells-Lessons and Challenges*. IntechOpen.
113. Chiokadze, M., Bär, C., Pastuschek, J., Dons' koi, B. V., Khazhlyenko, K. G., Schleußner, E., ... & Favaro, R. R. (2020). Beyond uterine natural killer cell numbers in unexplained recurrent pregnancy loss: combined analysis of CD45, CD56, CD16, CD57, and CD138. *Diagnostics*, 10(9), 650.
114. Chiokadze, M., Bär, C., Pastuschek, J., Dons' koi, B. V., Khazhlyenko, K. G., Schleußner, E., ... & Favaro, R. R. (2020). Beyond uterine natural killer cell numbers in unexplained recurrent pregnancy loss: combined analysis of CD45, CD56, CD16, CD57, and CD138. *Diagnostics*, 10(9), 650.
115. Pantos, K., Grigoriadis, S., Maziotis, E., Pistola, K., Xystra, P., Pantou, A., Kokkali, G., Pappas, A., Lambropoulou, M., Sfakianoudis, K., & Simopoulou, M. (2022). The Role of Interleukins in Recurrent Implantation Failure: A Comprehensive Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2198.
116. Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 17(8), 469-482.