



Διπλωματική Εργασία
Ποιοτικός και Ποσοτικός χαρακτηρισμός των δενδριτικών
κυττάρων (DCs) στο ενδομήτριο

Diploma Thesis
Qualitative and Quantitative characterization of dendritic cells
(DCs) at the endometrium

Μαρία Ρίλου
της Αποστολίας και του Βασιλείου
Λάρισα, Σεπτέμβριος 2023



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καλαλά Φανή – Συνεπιβλέπουσα

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

Παπουτσοπούλου Σταματία – Συνεπιβλέπουσα

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

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία διενεργήθηκε έπειτα από συμφωνία συνεργασίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας, κυρία Καλαλά Φανή, για την ευκαιρία και την τιμή που μου έδωσε να συμμετάσχω σε αυτό το νέο ερευνητικό εγχείρημα που προσπαθεί να ξεκινήσει και στο οποίο της εύχομαι ολόψυχα να καταλήξει σε γόνιμα αποτελέσματα. Την ευχαριστώ επίσης για όλες τις συμβουλές και κατευθυντήριες γραμμές που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον κύριο Σπελέτα Ματθαίο που δέχθηκε να αποτελεί μέλος της τριμελούς επιτροπής μου κάνοντας μου αυτή την τιμή να τον έχω δίπλα μου σε αυτή την προσπάθειά μου. Οι συμβουλές του και τα λεγόμενα του στον χώρο του εργαστηρίου ήταν καθοριστικά για την διαμόρφωση ενός ακαδημαϊκού ήθους που πασχίζω να διαμορφώσω.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην αποτιμήσω ειδική μνεία στην συνεπιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, κυρία Παπουτσοπούλου Σταματία. Την ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου για όλη την ψυχολογική στήριξη που μου παρείχε, καθώς και για τις ακαδημαϊκές και εργαστηριακές συμβουλές που μου πρόσφερε. Αποτελεί τον λόγο που θα προσπαθήσω να ακολουθήσω και εγώ το επάγγελμα της διδακτικής και δεν θα μπορέσω ποτέ να την ευχαριστήσω αρκετά για το γεγονός ότι με έκανε να αγαπήσω τόσο πολύ την διδασκαλία.

Ύστερα από την τριμελή μου επιτροπή, θα ήθελα να απευθύνω ένα γενικότερο ευχαριστώ αλλά και μια βαθιά ευγνωμοσύνη σε κάθε μέλος του εργαστηρίου που ήρθα σε επαφή, καθώς ήταν εκείνοι που με την εύθυμη διάθεσή τους αλλά και με την ανιδιοτελή βοήθειά τους διασφάλισαν ένα κλίμα απaráμιλλης συνεργασίας και συλλογικότητας στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους, που ήταν εκεί, δίπλα μου, από την αρχή έως το τέλος, όπως ελπίζω υπήρξα και εγώ για αυτούς και ιδιαίτερα στον συνάδελφο μου και αδερφικό φίλο Νικολάου Νεόφυτο με τον οποίο εκπονήσαμε μαζί αυτή την εργασία και που χωρίς αυτόν σίγουρα δεν θα βρισκόμουν στην ίδια θέση που βρίσκομαι σήμερα.

Κλείνοντας, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην μητέρα μου, τον πατέρα μου και την γιαγιά μου που χωρίς αυτούς οι γραμμές αυτές σίγουρα δεν θα μπορούσαν να γραφτούν

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
I. Εισαγωγή	8
1. Ενδομήτριο	8
1.1. Η δομή του ενδομητρίου	8
1.2. Ο ρόλος του ενδομητρίου στην φυσιολογική κύηση	10
1.2.1. Ενδομητριακή δεκτικότητα	10
1.2.2. Φθαρτοποίηση	11
1.3. Διαταραχή του ενδομητριακού περιβάλλοντος – Περιπτώσεις παθολογίας ..11	
1.3.1. Καθ' ἑξιν αποβολές	12
1.3.2. Αποτυχημένες εμφυτεύσεις	13
1.3.3. Προεκλαμψία	14
2. Ανοσοποιητικό σύστημα στην αναπαραγωγική οδό	16
2.1. Το ανοσοποιητικό σύστημα υπό φυσιολογικές συνθήκες	17
2.1.1. Τ λεμφοκύτταρα	17
2.1.2. Φονικά κύτταρα της μήτρας	18
2.1.3. Μακροφάγα	19
2.2. Διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος σε παθολογικές καταστάσεις ..	19
3. Δενδριτικά κύτταρα	20
3.1. Ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων	20
3.2. Κατηγορίες δενδριτικών κυττάρων	24
3.3. Προέλευση των δενδριτικών κυττάρων – διαφοροποίηση	25
3.4. Ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων στο ενδομήτριο	27
3.5. Παρουσία των δενδριτικών κυττάρων στο ενδομήτριο	30
II. Σκοπός	33
III. Μέθοδοι & Υλικά	34
1. Προετοιμασία του δείγματος	34
2. Κυτταρομετρία	36
2.1. Πειραματική διαδικασία	39

2.2. Αντισώματα	41
3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων	45
4. Στατιστική ανάλυση	45
IV. Αποτελέσματα	46
1. Μελέτη των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων	46
2. Μελέτη του πληθυσμού των δενδριτικών κυττάρων	48
V. Συζήτηση	50
VI. Βιβλιογραφία	53

Περίληψη

Η κύηση αποτελεί αδιαμφισβήτητα μια πολυδιάστατη διαδικασία, κατά την οποία ανά πάσα στιγμή μπορεί να προκύψει επιπλοκή. Για αυτόν τον λόγο, το ερευνητικό έργο προς την κατανόηση της είναι διάπλοτο. Τα άτομα που αντιμετωπίζουν προβλήματα τεκνοποίησης εξαιτίας επιπλοκών είναι αναρίθμητα και έτσι η ανάγκη κατανόησης και επίλυσης τους είναι επιτακτική. Στην βάση όλων των παραπάνω, η ερευνητική κοινότητα έχει στρέψει την προσοχή της ουκ ολίγες φορές στην συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος στην έκβαση των κήσεων. Είναι γνωστό πως η μητρική-εμβρυική διεπαφή είναι υπεύθυνη για την ανοχή του ημι-αλλογενούς εμβρύου αλλά και για την διατήρηση της αμυντικής ικανότητας έναντι παθογόνων στην περιοχή, και για αυτό το σκοπό είναι διάχυτη από ανοσιακά κύτταρα. Το κάθε ένα επιτελεί επιμελώς τον ρόλο του ώστε ενορχηστρωμένα το έμβρυο αφενός να εμφυτευθεί και αφετέρου να επιζήσει. Ένας βασικός πληθυσμός κυττάρων που συμμετέχει σε όλο αυτό το εγχείρημα «διάσωσης» του εμβρύου από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρα, είναι τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells – DCs). Τα DCs αποτελούν εξειδικευμένα κύτταρα-φρουρούς, τα οποία επάγουν την έναρξη τόσο της φυσικής όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας, παρέχοντας μια γέφυρα μεταξύ τους μέσω της αντιγονοπαρουσιαστικής τους ικανότητας. Ακόμη, τα DCs κατέχουν και άλλους σημαντικούς ρόλους στο ενδομήτριο όπως η συμμετοχή τους και σε άλλες φυσιολογικές προσαρμογές που συμβαίνουν μετά την γονιμοποίηση, όπως η δημιουργία του φθαρτού υμένα και η αγγειογένεση. Στην εν λόγω έρευνα λοιπόν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής ώστε να διενεργηθεί ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των DCs στο ενδομήτριο, καθώς και η ποσοτική τους ανάλυση στον ιστό αυτό. Το παρόν ερευνητικό εγχείρημα είναι πρωτότυπο και ανοίγει διάπλοτους δρόμους για νέες επιστημονικές ανακαλύψεις στον τομέα της ανοσολογίας της κύησης.

Abstract

Pregnancy is undoubtedly a complex process, in which a complication may occur at any given time. For this reason, many researching groups are trying to unveil its mysteries. The number of people who experience problems in conceiving due to complications is innumerable and so the need to understand and resolve them is imperative. Considering all the above, the scientific community has often turned its attention to the involvement of the immune system in the outcome of pregnancies. It is known that the maternal-embryonic interface is responsible for the tolerance of the semi-allogeneic embryo and for maintaining the defense against pathogens in the area, and for this purpose it is diffused by immune cells. Each one diligently performs its role so that the embryo is successfully implanted and able to survive. A key population of cells involved in this whole attempt to 'rescue' the embryo from the mother's immune system are dendritic cells (DCs). DCs are specialized guardian cells that induce the initiation of both natural and adaptive immunity, providing a bridge between them through their antigen-presenting capacity. Furthermore, DCs have other important roles in the endometrium other than antigen-presenting and that includes their involvement in other physiological adaptations that occur after fertilization. For example, the formation of the decidua and the process of angiogenesis. In this study, we tried to perform a qualitative and quantitative characterization of dendritic cells (DCs) at the endometrium with the help of flow cytometry. The present research project is original and opens wide avenues for new scientific discoveries in the field of immunology of pregnancy.

I. Εισαγωγή

1. Ενδομήτριο

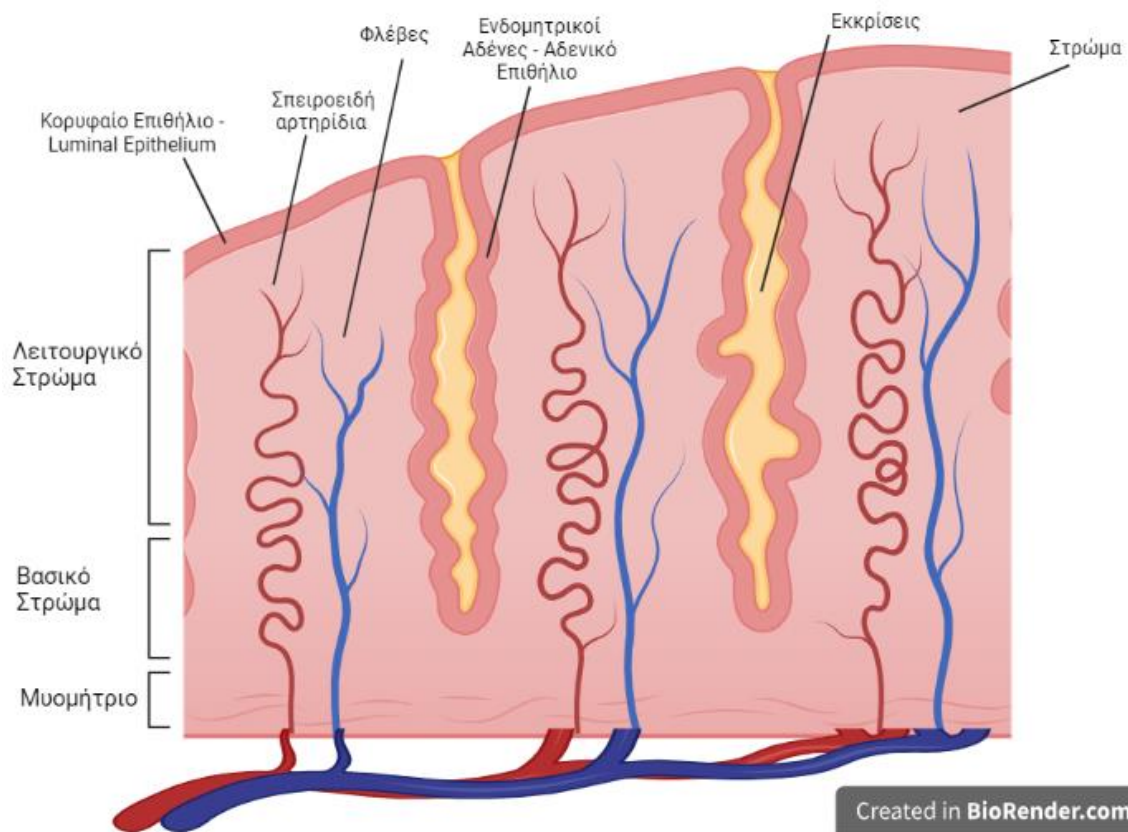
Το ενδομήτριο αποτελεί έναν πολύπλοκο πολυκυτταρικό ιστό, πλήρως ελεγχόμενο από στεροειδείς ορμόνες (κατά κύριο λόγο οιστρογόνα και προγεστερόνη), ο οποίος σε περιπτώσεις μη επιτυχημένης εμφύτευσης αποβάλλεται κάθε μήνα (εμμηνόρροια) και αναδιαμορφώνεται χωρίς να δημιουργείται ουλή ούτε να χάνεται η λειτουργία του (Critchley et al., 2020). Παρά την αδιαμφισβήτητη σημασία του, ο ιστός αυτός θεωρείτο ανά τα χρόνια ως η «κακή βλέννα» ενός οργάνου μη ζωτικής σημασίας, υπεύθυνου για την εμμηνόρροια, ενός όχι και τόσο δημοφιλούς γεγονότος. Συνεπώς, η έρευνα γύρω από το ενδομήτριο ήταν πολύ περιορισμένη σε σχέση για παράδειγμα με αυτή του εγκεφάλου ή της καρδιάς (Vilella et al., 2021). Βιολογικές διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο ανθρώπινο ενδομήτριο, όπως η καταστροφή του ιστού, η επιδιόρθωση του χωρίς κάποια υπολειπόμενη ουλή καθώς και η αντιμετώπιση μιας φλεγμονής αποτελούν εξειδικευμένες διεργασίες που συμβαίνουν και σε άλλους ιστούς του σώματος (Evans et al., 2016). Γενικότερα λοιπόν θα μπορούσε να ειπωθεί πως οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εμμηνόρροια στο ενδομήτριο, μαζί με την διαδικασία επιδιόρθωσης αυτού του ιστού διαμορφώνουν ένα *in vivo* ανθρώπινο μοντέλο φλεγμονής και επιδιόρθωσης ιστού. Για αυτό τον λόγο το ενδομήτριο αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα φυσιολογίας, ενός «τραυματισμένου» ιστού που πρέπει να είναι σε θέση γρήγορα και αποτελεσματικά να επιδιορθώνεται σε μηνιαία βάση (Critchley et al., 2020).

1.1. Η δομή του ενδομητρίου

Δομικά η ενδομητριακή επίστρωση της μήτρας παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομοιότητα με την αντίστοιχη που συναντάται στις εντερικές λάχνες και για αυτό τον λόγο ίσως να εμφανίζει και παρόμοιο μηχανισμό αναγέννησης (Sasson & Taylor, 2008). Το ανθρώπινο ενδομήτριο διαιρείται σε δύο διαφορετικές στιβάδες, το άνω λειτουργικό στρώμα και το κάτω βασικό στρώμα, το οποίο βρίσκεται πάνω από το μυϊκή στιβάδα του μυομητρίου (Spencer et al., 2005), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Το βασικό στρώμα παραμένει με κάθε εμμηνορροϊκό κύκλο που περνάει κατά την αναπαραγωγική

ζωή, ενώ το λειτουργικό στρώμα εκφυλίζεται και αποβάλλεται σε κάθε κύκλο. Τέλος, αναγεννάται ώστε να διασφαλιστεί ένα περιβάλλον έτοιμο για μια επικείμενη εμφύτευση (Padykula, 1991). Η αιματική ροή στην βασική στιβάδα του ενδομητρίου γίνεται κατευθείαν από τις βασικές αρτηρίες ενώ αντίστοιχα στην λειτουργική στιβάδα αυτό επιτυγχάνεται μέσω των σπειροειδών αρτηριδίων. Η κυτταρική σύσταση του ενδομητρίου είναι η εξής (Keefe & Wright, 2007):

1. Κορυφαίο επιθήλιο
2. Αδενικό επιθήλιο
3. Στρωματικοί ινοβλάστες
4. Αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα
5. Λευκοκύτταρα



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των στιβάδων του ανθρώπινου ενδομητρίου.

(Created with BioRender.com)

1.2 Ο ρόλος του ενδομητρίου στην φυσιολογική κύηση

Οι φυσιολογικές λειτουργίες του ενδομητρίου είναι οι εξής:

- προετοιμασία για την εμφύτευση
- διατήρηση της κύησης εάν η εμφύτευση είναι επιτυχής
- εμμηνόρροια απουσία κυήσεως

Τα παραπάνω αναδεικνύουν τον μείζονα ρόλο που κατέχει το ενδομήτριο στην αναπαραγωγή και γενικά στη συνέχεια του ανθρώπινου είδους (Critchley et al., 2020).

Η διαδικασία της εμφύτευσης, η οποία προαπαιτεί την ύπαρξη γονιμοποίησης, φαίνεται πως είναι αρκετά πολύπλοκη, αφού για να ολοκληρωθεί θα πρέπει να διασφαλιστεί μία ενδεδειγμένη αμφίδρομη επικοινωνία και ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ του σωστά αναπτυγμένου εμβρύου, συγκεκριμένα της βλαστοκύστης, και του ώριμου, δηλαδή του δεκτικού πλέον, ενδομητρίου (Neykova et al., 2022). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως παρόλο που τα έμβρυα μπορούν να εμφυτευθούν σε διάφορους ιστούς (εκτοπικές εμφυτεύσεις), το ενδομήτριο είναι ο ιστός με την μοναδική ικανότητα να εμποδίζει την εμφύτευση, εκτός από μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο, που ονομάζεται «παράθυρο εμφύτευσης» (Window of implantation – WOI) (Wilcox et al., 1999) και διαρκεί 30-36 ώρες (Ruiz-Alonso et al., 2021).

1.2.1 Ενδομητριακή δεκτικότητα

Η ικανότητα του ενδομητρίου να επιτρέπει την φυσιολογική εμφύτευση ορίζεται ως δεκτικότητα και η όπτιμη δεκτικότητα οδηγεί σε φυσιολογικές εμφυτεύσεις, οι οποίες αποτελούν το εφελτήριο για μια υγιή κύηση (Lessey & Young, 2019). Η ενδομητριακή δεκτικότητα αντιπροσωπεύει την πολύπλοκη διαδικασία που επιδέχεται το τοίχωμα της μήτρας για να προετοιμαστεί για την πιθανή εμφύτευση του εμβρύου. Ο πλέον κοινώς αποδεκτός ορισμός για την ενδομητριακή δεκτικότητα είναι «η περίοδος της ωρίμανσης του ενδομητρίου κατά την οποία το τροφοεξώδερμα της βλαστοκύστης μπορεί και προσκολλάται στα ενδομητριακά επιθηλιακά κύτταρα και σε δεύτερο χρόνο εισβάλλει στο στρώμα του ενδομητρίου, παράλληλα με την έναρξη της αγγειογένεσης σε εκείνο το σημείο» (Blanco-Breindel et al., 2023).

Κατά την ενορχήστρωση όλης αυτής της προετοιμασίας, καίριο ρόλο διαθέτουν οι ωοθηκικές ορμόνες, με την προγεστερόνη πλέον να θεωρείται ως η ορμόνη-κλειδί για την εγκυμοσύνη, δρώντας στον ενδομητριακό ιστό που προηγουμένως έχει

προετοιμαστεί με δράση της οιστραδιόλης (E2), μιας μορφής οιστρογόνων (Neykova et al., 2022). Θεωρείται πως ο ρόλος της προγεστερόνης, ως αντιφλεγμονώδες, είναι να προάγει την ανοσιακή ανοχή κατά την εμφύτευση και την πρώιμη κύηση (Lessey & Young, 2019) με τα επίπεδα της να επιδέχονται μια δυναμική ρύθμιση καθ' όλη την διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Taraborrelli, 2015).

1.2.2 Φθαρτοποίηση

Η φθαρτοποίηση (ή αλλιώς φθαρτοειδής αντίδραση) αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την διάρκεια της οποίας το τοίχωμα της μήτρας αναπτύσσεται ραγδαία και αλλάζει με δραματικό τρόπο ανάλογα με τις εκάστοτε ωθητικές ορμόνες. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται στο σύνολο των λειτουργικών και μορφολογικών αλλαγών που θα συμβούν στην περιοχή του ενδομητρίου ώστε να σχηματιστεί η επιφάνεια στην οποία η βλαστοκύστη θα μπορέσει να εμφυτευθεί (Ng et al., 2020).

Για να στεφθεί η εμφύτευση του εμβρύου από επιτυχία και να ολοκληρωθεί, προαπαιτούμενο συνιστά η διαδικασία της φθαρτοποίησης (Haller et al., 2019). Στους ανθρώπους, η διαδικασία της ενδομητριακής φθαρτοποίησης λαμβάνει χώρα κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο και τελικά δημιουργείται ο φθαρτός ή φθαρτός υμένας, ο οποίος θα αποδομηθεί και απομακρυνθεί με την εμμηνόρροια, εάν δεν συμβεί γονιμοποίηση ή η εμφύτευση δεν πετύχει (Sojka, 2020). Διαφορετικά, εάν η βλαστοκύστη εμφυτευθεί τότε η διαδικασία φθαρτοποίησης θα συνεχιστεί και ο φθαρτός θα παραμείνει (Moffett & Loke, 2006).

Ο φθαρτός υμένας συνιστά το μητρικό τμήμα του πλακούντα και βρίσκεται σε άμεση επαφή με την εμβρυική τροφοβλάστη. Είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της ανοσιακής ανοχής της μητέρας προς το έμβρυο καθώς και για τον έλεγχο της διείσδυσης της τροφοβλάστης (Ruiz-Magaña et al., 2022), με τον σχηματισμό του να συμβαίνει κατά την εκκριτική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Jégou & Skinner, 2018). Αποτελείται από αδένες, κύτταρα του ανοσοποιητικού, αιμοφόρα αγγεία, λεμφαδένες και στρωματικά κύτταρα φθαρτού (decidual stromal cells – DSCs) (Mori et al., 2016).

1.3. Διαταραχή του ενδομητριακού περιβάλλοντος – Περιπτώσεις παθολογίας

Η κύηση αποτελεί αδιαμφισβήτητα μια πολυδιάστατη διαδικασία, κατά την οποία ανά πάσα στιγμή μπορεί να προκύψει επιπλοκή. Για αυτόν τον λόγο, το ερευνητικό έργο προς την κατανόηση της είναι διάπλοτο. Παρ' όλα αυτά μεγάλο ενδιαφέρον της

επιστημονικής κοινότητας στρέφεται και στην διαδικασία έναρξης της κύησης, δηλαδή την εμφύτευση, διότι αποτελεί το πρώτο βήμα επικοινωνίας του εμβρύου με το ενδομήτριο και συνιστά το κλειδί για μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη. Ορισμένα παραδείγματα παθολογικών καταστάσεων στο περιβάλλον του ενδομητρίου, άρα συνεπαγόμενα και της πορείας της κύησης, είναι οι καθ' ἑξιν αποβολές, οι αποτυχημένες εμφυτεύσεις, καθώς και η προεκλαμψία.

1.3.1. Καθ' ἑξιν αποβολές

Γενικά με τον όρο «αποβολή» γίνεται αναφορά στον τερματισμό μιας κύησης πριν το έμβρυο καταφέρει να επιζήσει (La et al., 2021) και γίνεται λόγος για «αυτόματες» αποβολές (spontaneous abortions) και συνεπώς παλίνδρομες κυήσεις όταν μια αποβολή είναι αιφνίδια, μέχρι τις 20-24 εβδομάδες της κύησης (Bender Atik et al., 2018). Εκτιμάται πως 1 στις 4 γυναίκες έχει έρθει αντιμέτωπη με ένα τέτοιο φαινόμενο και πως ο επιπολασμός των αυτόματων αποβολών ανέρχεται στο 12-14% των κλινικά διαγνωσμένων κυήσεων (Y.-X. Wang et al., 2021). Γίνεται λοιπόν αμέσως αντιληπτός ο προφανής αντίκτυπος στην ψυχολογία και γενικότερα στην υγεία μιας γυναίκας που μόλις έχει παρέλθει από μια αποβολή (Devall & Coomarasamy, 2020) καθώς και η αναγκαιότητα για την ανακάλυψη των αιτιών πίσω από τέτοιες αποβολές, ώστε να προσφέρουν στους ασθενείς και τις οικογένειές τους τουλάχιστον την γνώση της αιτίας πίσω από αυτό που τους συνέβη (Hardy et al., 2016).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE) και την Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής (American Society for Reproductive Medicine - ASRM), οι καθ' ἑξιν αποβολές (Recurrent Spontaneous Abortions – RLA) ορίζονται ως η αποτυχία δύο ή περισσότερων κλινικά διαγνωσμένων κυήσεων (Dimitriadis et al., 2020). Αν και ακόμη οι παράγοντες που οδηγούν σε επαναλαμβανόμενες αποβολές δεν είναι πλήρως καθορισμένοι, εντούτοις υπάρχουν ορισμένοι οι οποίοι ξεχωρίζουν στην ερευνητική κοινότητα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

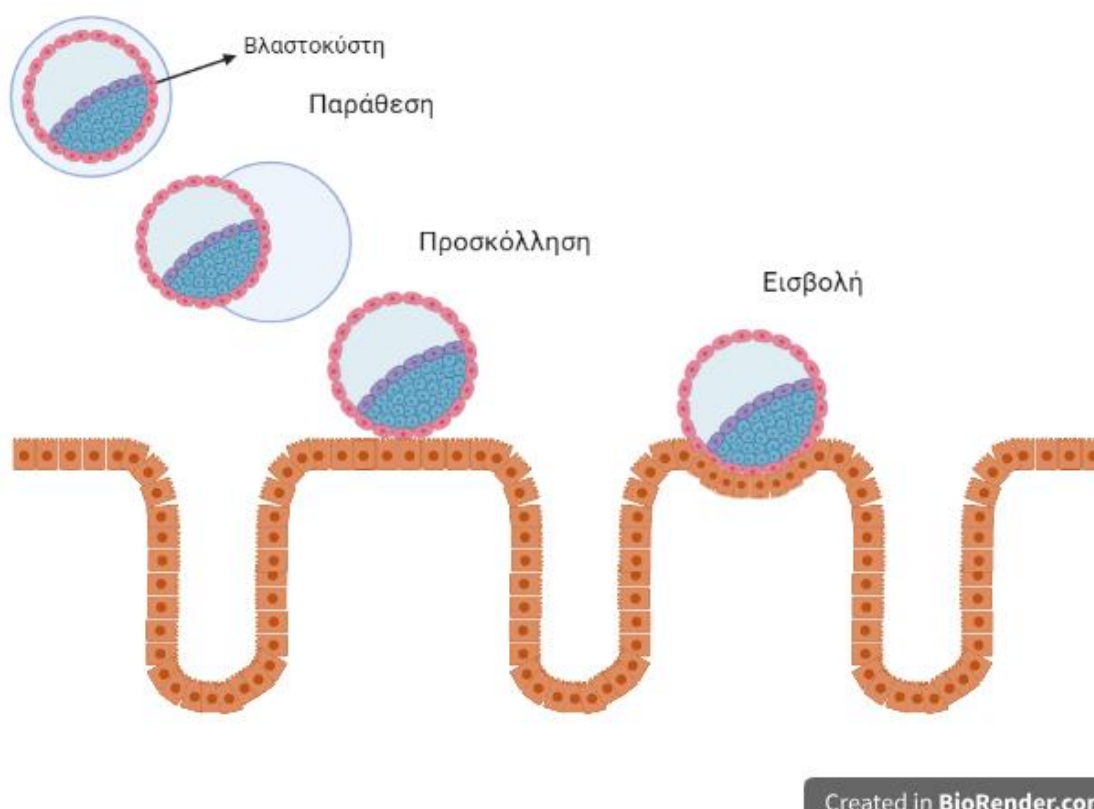
1.3.2. Αποτυχημένες εμφυτεύσεις

Η εμφύτευση αποτελεί το πρώτο βήμα επικοινωνίας του εμβρύου με το ενδομήτριο και αποτελεί το κλειδί για μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη. Περιλαμβάνει το στάδιο της παράθεσης ή προσανατολισμού του εμβρύου (*apposition*), της προσκόλλησης του εμβρύου (*adhesion*) και τελικά της εισβολής του εμβρύου (*invasion*) στον φθαρτό του ενδομητρίου (Ma et al., 2023), όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Ο όρος «αποτυχημένες εμφυτεύσεις» μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ασθενείς οι οποίοι προσπαθούν να συλλάβουν είτε μέσω υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είτε χωρίς κάποια βοήθεια (Bashiri et al., 2018).

Πίνακας 1: Η παθολογία πίσω από τις καθ' ἑξιν αποβολές και τις επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις.

<u>Αίτια</u>	<u>Παραδείγματα</u>
Καθ' ἑξιν αποβολές (<i>La et al., 2021</i>)	
Γενετικοί παράγοντες	Χρωμοσωμικές ανωμαλίες
Δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος	Αυτό-άνοσα νοσήματα της μητέρας Άλλο-άνοσα νοσήματα
Παράγοντες φλεγμονής	Παθογόνα (π.χ. γλαμύδια, μυκόπλασμα)
Ανατομικές ανωμαλίες	Λειομύωμα μήτρας
Περιβαλλοντικοί παράγοντες	Τοξικές ουσίες, ραδιενέργεια, ηλικία
Ενδοκρινολογικοί λόγοι	Διαβήτης, PCOS, υπερ/υποθυρεοειδισμός
Ψυχολογικοί παράγοντες	Στρες
Επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις (<i>Bashiri et al., 2018</i>)	
Παράγοντες κινδύνου	Ηλικία της μητέρας, δείκτης μάζας σώματος, στρες
Ανοσολογικοί παράγοντες	Επίπεδα των κυττάρων NK, TNF-α, λόγος Th1/Th2
Φλεγμονή	Χρόνια ενδομητρίτιδα
Ανατομικές ανωμαλίες	Πολύποδες, μύωματα

Οι επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης (recurrent implantation failure – RIF) αποτελούν ένα κλινικό φαινόμενο το οποίο αναφέρεται μόνο σε περιπτώσεις που μια γυναίκα είχε τρεις αποτυχημένες προσπάθειες in vitro γονιμοποίησης (in vitro fertilization – IVF), με τον ορισμό αυτό να λαμβάνει ωστόσο υπόψη την ηλικία της εκάστοτε γυναίκας καθώς και το στάδιο του εμβρύου (Orvieto et al., 2015). Διάφοροι είναι εκείνοι οι παράγοντες που έχουν καταγραφεί πως ίσως συνεισφέρουν στις RIF και παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.



Εικόνα 2: Η διαδικασία εμφύτευσης της ανθρώπινης βλαστοκύστης.

(Created with BioRender.com)

1.3.3. Προεκλαμψία

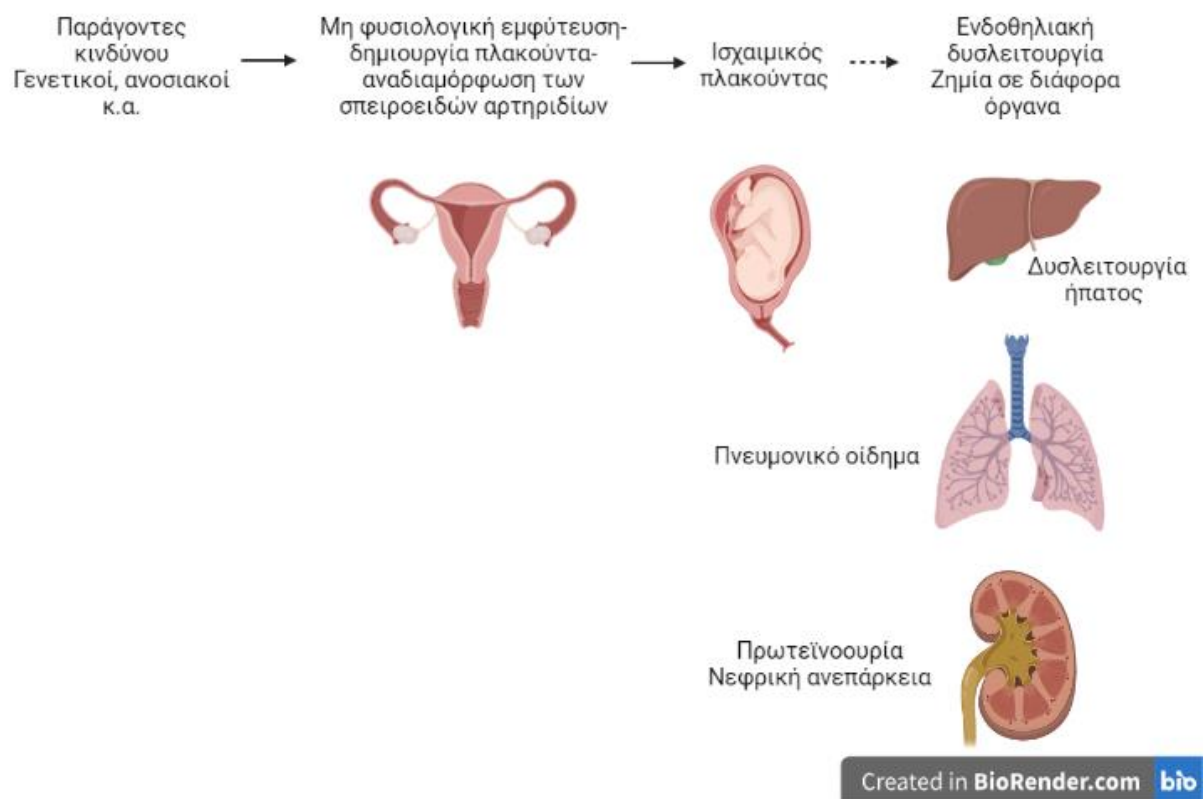
Σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG), η προεκλαμψία ορίζεται ως η παρουσία υπέρτασης και πρωτεϊνουρίας μετά τις 20 εβδομάδες της κύησης, σε έναν προηγουμένως νορμοτασικό ασθενή (Rana et al., 2019). Παραταύτα, έχει παρατηρηθεί ένα αξιόλογο ποσοστό γυναικών οι οποίες αναπτύσσουν συμπτώματα προεκλαμψίας σε

συστημικό επίπεδο, όπως χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων ή ηπατικών ενζύμων, πριν να γίνει η πρωτεϊνουρία ανιχνεύσιμη (Barton et al., 2001), κάτι το οποίο οδηγεί σε αργοπορημένες διαγνώσεις. Ο εκτιμώμενος αριθμός θανάτων από προεκλαμψία ανέρχεται στους 50.000 παγκοσμίως κάθε χρόνο, με μία αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στην συχνότητα εμφάνισης ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (Ghulmiyyah & Sibai, 2012).

Διάφοροι είναι οι παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της νόσου, με μερικά παραδείγματα να αποτελούν το κάπνισμα, η ηλικία της μητέρας, το οικογενειακό ιστορικό, ανοσιακοί παράγοντες, η γενετική προδιάθεση καθώς και η πρωτύτη ύπαρξη υπέρτασης ή η χρόνια νεφρική νόσος (Bartsch et al., 2016). Η μέχρι πρότινος οριστική θεραπεία για την προεκλαμψία είναι επί της ουσίας μόνον η τελική γέννηση του εμβρύου και η συνεπαγόμενη απώλεια του πλακούντα (Bokslag et al., 2016).

Οι επιπτώσεις που προκύπτουν από την συγκεκριμένη νόσο αφορούν τόσο το νεογνό όσο και την μητέρα προφανώς είτε σε επίπεδο κήσεως αλλά και μακροπρόθεσμα. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως κήσεις στις οποίες η μητέρα εμφάνισε προεκλαμψία οδήγησαν σε ένα νεογνό με μειωμένο βάρος, έως και 23% σε περιπτώσεις πρόωρης προεκλαμψίας (Ødegård et al., 2000), καθώς και εμφανή περιορισμό της ανάπτυξής του (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2019). Όσον αφορά της κυοφορούσες, εκτός από τις άμεσες – επικίνδυνες για την ζωή – επιπλοκές που μπορεί να προκύψουν κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, έχει παρατηρηθεί πως συντρέχει και κίνδυνος μακροπρόθεσμα να εμφανίσουν αυτές οι γυναίκες καρδιαγγειακές νόσους (Bokslag et al., 2016).

Σχετικά με την παθογένεση της προεκλαμψίας μπορεί να ειπωθεί πως υπάρχουν δύο στάδια: ο ανώμαλος σχηματισμός του πλακούντα και η ανάπτυξη του συνδρόμου της προεκλαμψίας στην μητέρα (Ives et al., 2020). Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία της παθογένεσης της προεκλαμψίας.



Εικόνα 3: Η παθογένεση της προεκλαμψίας.

(Created with BioRender.com)

2. Ανοσοποιητικό σύστημα στην αναπαραγωγική οδό

Η εγκυμοσύνη στον άνθρωπο έχει εξελιχθεί σε μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία μελετάται συνεχώς από τους αναπαραγωγικούς ανοσολόγους σχετικά με τον ρόλο του ανοσιακού συστήματος στην ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα (Sanguansermsri & Pongcharoen, 2008). Είναι γνωστό πως η μητρική-εμβρυική διεπαφή αποτελείται από στρωματικά κύτταρα του φθαρτού, τροφοβλαστικά κύτταρα, καθώς και κύτταρα του ανοσοποιητικού που βρίσκονται στον φθαρτό (decidual immune cells). Αυτή η διεπαφή είναι υπεύθυνη για την ανοχή του ημι-αλλογενούς εμβρύου αλλά και για την διατήρηση της αμυντικής ικανότητας έναντι παθογόνων στην περιοχή (Le Bouteiller & Bensussan, 2017).

Η αναπτυξιακή δυνατότητα της βλαστοκύστης επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από το όπτιμο περιβάλλον της μήτρας, το οποίο με την σειρά του αντικατοπτρίζει την ποιότητα της μητρικής ανοσιακής απόκρισης. Η περιοχή της εμφύτευσης παρομοιάζει με μια

φλεγμονώδη αντίδραση, εξαιτίας της επιστράτευσης ανοσιακών κυττάρων και της επαγωγής φλεγμονωδών γονιδίων (Schumacher et al., 2018). Η ερευνητική ομάδα του Griffith και των συνεργατών του βρήκαν δεδομένα τα οποία υποστηρίζαν την υπόθεση πως η φλεγμονώδης φύση της εμφύτευσης στα ευθήρια συνιστά μια εξελικτική παρακαταθήκη από άλλα θηλαστικά που κυοφορούν ζωντανά ζώα και παράλληλα πως η τροποποίηση αυτών των φλεγμονωδών διαδικασιών ήταν το κλειδί για την εξέλιξη της αναπαραγωγής των ευθηρίων (Griffith et al., 2017). Από τα παραπάνω αναδεικνύεται ο κρίσιμος ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην πορεία της κύησης και πιο συγκεκριμένα ο λειτουργικός φαινότυπος των ανοσιακών κυττάρων, κάτι το οποίο καθορίζει το αν προκύψει μια βιώσιμη κύηση (Schumacher et al., 2018).

2.1. Το ανοσοποιητικό σύστημα υπό φυσιολογικές συνθήκες

Τα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο ενδομήτριο είναι κύτταρα τα οποία «διαμένουν» στον συγκεκριμένο ιστό, με κάποια από αυτά να μεταναστεύουν από την περιφερική κυκλοφορία (Vallné-Juanico et al., 2019). Ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων στην μήτρα επιδέχεται σημαντικές αλλαγές μετά την εμφύτευση και την ανάπτυξη του φθαρτού, μέχρι να αποτελέσει τελικά το 40% όλων των κυττάρων του φθαρτού στο πρώτο τρίμηνο της κύησης (von Rango, 2008). Στα αρχικά στάδια μίας κύησης, παρατηρούνται στην περιοχή του φθαρτού τέσσερις κύριοι πληθυσμοί λευκοκυττάρων: α) Τ λεμφοκύτταρα, β) μητρικά φονικά κύτταρα (uterine natural killer cells), γ) μακροφάγα και δ) δενδριτικά κύτταρα. Η έρευνα προσανατολίζεται στην αποσαφήνιση του φαινοτύπου και των λειτουργικών χαρακτηριστικών του κάθε ανοσιακού κυτταρικού τύπου σε περίπτωση κύησης, ώστε να γίνει προσπάθεια εύρεσης θεραπείας για διάφορες παθολογίες (Sanguansermsri & Pongcharoen, 2008).

2.1.1. Τ λεμφοκύτταρα

Υπό συνθήκες φυσιολογικής κύησης, ο λόγος των CD8+/CD4+ Τ κυττάρων που εκτιμάται είναι ~ 2.5-3:1 (Wongweragiat et al., 1999), με τον αριθμό των Τ κυττάρων να παρουσιάζει μείωση στον πρώιμο φθαρτό από ότι στο ενδομήτριο απουσία κυήσεως (Vassiliadou & Bulmer, 1996). Όσον αναφορά τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (T helper cells), το κλασσικό μοντέλο ανοσιακής ρύθμισης κατά την διάρκεια μιας ανθρώπινης κύησης έχει βασιστεί κυρίως στην μετατόπιση της μητρικής ανοσιακής απόκρισης από ένα φλεγμονώδες πρότυπο Th1 (T helper 1) σε ένα ανοσοκατασταλτικό

πρότυπο Th2 (T helper 2) (Ashkar et al., 2000). Η υπαναχώρηση του προτύπου Th1 ίσως να συμβαίνει εξαιτίας κάποιας μείωσης της έκφρασης των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και T-bet (McCracken et al., 2007). Πάραυτα, έχει πλέον αναγνωριστεί το γεγονός πως οι ανοσιακές αλληλεπιδράσεις που διαδραματίζονται στην μητρική διεπαφή δεν μπορούν να περιοριστούν στα στεγανά που θέτει το δίπολο Th1/Th2 και συνεπώς η κατάσταση είναι ανοσολογικά πολυπλοκότερη (Powell et al., 2017). Τα κύτταρα που πιθανώς κατέχουν ένα κυτταροτοξικό δυναμικό είναι τα γδ T κύτταρα, στα οποία παρουσιάζεται έκφραση του αυξητικού παράγοντα TGF-β1 και ιντερλευκίνης-10 (IL-10), η οποία υποδηλώνει πως τα κύτταρα αυτά κατέχουν και ανοσορρυθμιστικό δυναμικό (Nagaeva et al., 2002). Τέλος, στον φθαρτό παρατηρούνται και ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs), με τα επίπεδα τους στις γυναίκες να επηρεάζονται από τις φυλετικές ορμόνες (Sanguansermsri & Pongcharoen, 2008).

2.1.2. Φονικά κύτταρα της μήτρας

Τα φονικά κύτταρα της μήτρας (uterine Natural Killer cells – uNKs), στα πρώιμα στάδια της κύησης, συνιστούν το 70% των λευκοκυττάρων του φθαρτού, με τα επίπεδα τους να παρουσιάζουν πτώση κατά το δεύτερο μισό της κύησης (Bulmer et al., 1991). Γενικά, τα ποσοστά και οι φαινότυποι των uNKs και των διαφορετικών υποτύπων τους ποικίλλουν ανάλογα με το στάδιο του εμμηνορρυσιακού κύκλου και κατά την διάρκεια της κύησης (Strunz et al., 2021). Τα uNKs είναι λειτουργικά και φαινοτυπικά μοναδικά σε σχέση με τα NKs άλλων ιστών. Εμφανίζουν μια χαρακτηριστική μορφολογία με μεγάλα κοκκία, εκκρίνουν μία συγκεκριμένη ομάδα χημειοκινών και εκφράζουν έναν μοναδικό συνδυασμό επιφανειακών δεικτών (F. Wang et al., 2021). Σε αντίθεση με τον κυτταροτοξικό φαινότυπο που θα ήταν λογικό να εμφανίζουν, αυτό που επί της ουσίας κάνουν είναι να ενεργοποιούν την απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων οι οποίοι προάγουν την αναδιαμόρφωση και τροποποίηση των σπειροειδών αρτηριδίων της μητέρας ώστε να αυξηθεί η αιμάτωση, το οξυγόνο καθώς και η παροχή θρεπτικών στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (Gaynor & Colucci, 2017). Τέτοιοι διαλυτοί παράγοντες αποτελούν για παράδειγμα ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) ή η αγγειοποιητίνη 2 (Moffett & Loke, 2006).

2.1.3. Μακροφάγα

Τα μακροφάγα αποτελούν κύτταρα κλειδιά τόσο στην φυσική ανοσία όσο και στην χυμική, αφού αναγνωρίζουν και φαγοκυτταρώνουν παθογόνα, δρώντας παράλληλα ως αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα. Κατέχουν εμφανή ρόλο στην αναγέννηση διαφόρων ιστών, ένας εκ των οποίων είναι και το ενδομήτριο (Jensen et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, συμμετέχουν στην προετοιμασία ενός δεκτικού ενδομητρίου, κατά την διάρκεια του παραθύρου εμφύτευσης, καθώς και στην επικείμενη φθαρτοποίηση του ενδομητριακού στρώματος (Jena et al., 2019). Ακόμη, εμφανίζουν μια ανοσοκατασταλτική λειτουργία η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂), κάτι το οποίο ίσως να εμποδίζει την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών λευκοκυττάρων που βρίσκονται στον φθαρτό και κατέχουν μια εν δυνάμει λυτική δραστηριότητα προς την τροφοβλάστη (Sanguansermsri & Pongcharoen, 2008).

Στην περίπτωση που δεν υπάρχει κύηση, τα μακροφάγα είναι τα δεύτερα πολυπληθέστερα λευκοκύτταρα στο ενδομήτριο, ενώ την ίδια στιγμή επικρατούν στο μυομήτριο. Στα πρώιμα στάδια της κύησης, συνιστούν το 20% των λευκοκυττάρων και ο αριθμός τους παραμένει σχετικά σταθερός καθ' όλη την διάρκεια της εγκυμοσύνης (Sun et al., 2021).

2.2. Διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος σε παθολογικές καταστάσεις

Πλήθος δεδομένων υποδεικνύουν πως διαταραχές του ενδομητριακού ανοσιακού μικροπεριβάλλοντος συσχετίζονται με σοβαρά αναπαραγωγικά σύνδρομα, όπως οι καθ' έξιν αποβολές και οι αποτυχημένες εμφυτεύσεις, χωρίς ωστόσο να συνοδεύονται πολλές φορές από κάποια αιτιολογία (Li et al., 2021).

Όσον αφορά τα uNKs, έχει καταγραφεί πως γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό uNKs σε σχέση με τους γόνιμους μάρτυρες. Αυτό πιθανώς καταδεικνύει το πως συνδέονται αυτές οι αποβολές με αλλαγές στην ποσότητα των uNKs, αφού τα τελευταία είναι απαραίτητα για τον ομαλό έλεγχο της εισβολής της τροφοβλάστης και του επικείμενου πολλαπλασιασμού της (Lédée et al., 2018).

Η ερευνητική ομάδα των Qian και λοιπών συνεργατών αναφέρει πως υπάρχει αύξηση των ώριμων DCs και παράλληλα μείωση των επιπέδων των ανώριμων DCs σε δείγματα γυναικών με καθ' έξιν αποβολές. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει την επικράτηση μιας ενεργούς ανοσιακής απόκρισης στον φθαρτό (Qian et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν διαφορετικά δεδομένα που δεν τείνουν προς την κατεύθυνση της

προηγούμενης ερευνητικής ομάδας, αφού δεν παρατήρησαν καμία αξιολογη αλλαγή στον αριθμό των DCs (Askelund et al., 2004).

Ένα ισορροπημένο ποσοστό ανάμεσα στα μακροφάγα M1 και M2 κρίνεται απολύτως αναγκαία για μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη, λαμβάνοντας υπόψη τον φλεγμονώδη χαρακτήρα των M1 και τον αντίστοιχο ανοσοκατασταλτικό των M2. Τα M2 μακροφάγα εμφανίζονται σε υψηλά ποσοστά σε μια φυσιολογική κύηση ενώ κάτι τέτοιο φαίνεται πως καταρρίπτεται σε περιπτώσεις προεκλαμψίας και καθ' ἑξιν αποβολών, με τα ποσοστά τους να μειώνονται σημαντικά (Tsao et al., 2018).

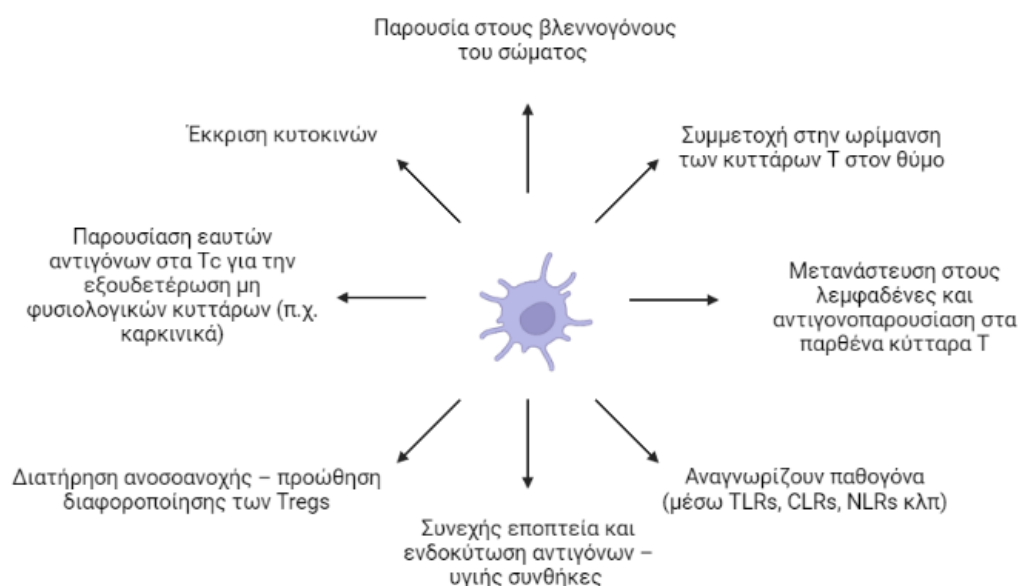
Στις φυσιολογικές κύσεις, οι δράσεις των Th1 και Th2 κυττάρων ενάντια στο ημι-αλλογενές έμβρυο περιορίζονται από την δράση των Tregs. Είναι πρόδηλο λοιπόν πως μια μείωση των επιπέδων των Tregs θα μπορούσε να οδηγήσει σε άμεσα προβλήματα τις κύσεις. Πράγματι, η Care και οι συνεργάτες της απέδειξαν πως μια μείωση στον αριθμό των Tregs μπορεί να οδηγήσει στην προώθηση φλεγμονής καθώς και τροποποιημένης λειτουργίας των αρτηριδίων της μήτρας (Care et al., 2018).

3. Δενδριτικά κύτταρα

3.1. Ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων

Η ανακάλυψη των δενδριτικών κυττάρων (DCs) έγινε για πρώτη φορά από τον Καναδό ιατρό Ralph Steinman το 1973 (Steinman & Cohn, 1973), ο οποίος ήταν ο πρώτος που παρατήρησε σε κύτταρα από περιφερικά λεμφοειδή όργανα ποντικών, κάποιες περίεργες μορφολογίες που έμοιαζαν με κλαδιά δέντρου, και έδωσε σε αυτά τα κύτταρα τελικά το όνομα dendritic cells από την ελληνική λέξη «δέντρο» (Lhuillier & Galluzzi, 2019). Τα DCs αποτελούν εξειδικευμένα κύτταρα-φρουρούς, τα οποία επάγουν την έναρξη τόσο της φυσικής όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας, παρέχοντας μια γέφυρα μεταξύ τους μέσω της αντιγονοπαρουσιαστικής τους ικανότητας (Soltani et al., 2021). Αντιπροσωπεύουν περίπου το 1% και λιγότερο όλων των αιμοποιητικών κυττάρων, κάτι το οποίο αιτιολογεί το ότι σπάνια εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος (Soltani et al., 2021). Εμφανίζουν πεπερασμένη διάρκεια ζωής, η οποία κυμαίνεται από μέρες έως εβδομάδες μετά την είσοδό τους στην περιφέρεια και για αυτό τον λόγο πρέπει συνεχώς να ανανεώνονται μέσω της διαδικασίας της αιμοποίησης (Collin & Bigley, 2018).

Τα DCs αποτελούν κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και επιτελούν γενικότερα τις λειτουργίες που επιτελούν και τα υπόλοιπα κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Αυτό σημαίνει πως κατέχουν πρωταρχικό ρόλο στην ανίχνευση μόλυνσης και εντοπίζονται σε όλα τα πιθανά σημεία που μπορεί ένα παθογόνο να εισέλθει στον οργανισμό (π.χ. βλεννογόνο του εντέρου). Για να μπορέσουν να ανιχνεύσουν τα εκάστοτε παθογόνα και να ανταποκριθούν σε διάφορες συνθήκες στρες σε έναν ιστό, τα DCs κατέχουν στην επιφάνειά τους Pattern Recognition Receptors (PRRs), δηλαδή υποδοχείς έμφυτης ανοσίας (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021). Οι λειτουργίες των DCs συνοψίζονται στην Εικόνα 4.



Created in BioRender.com 

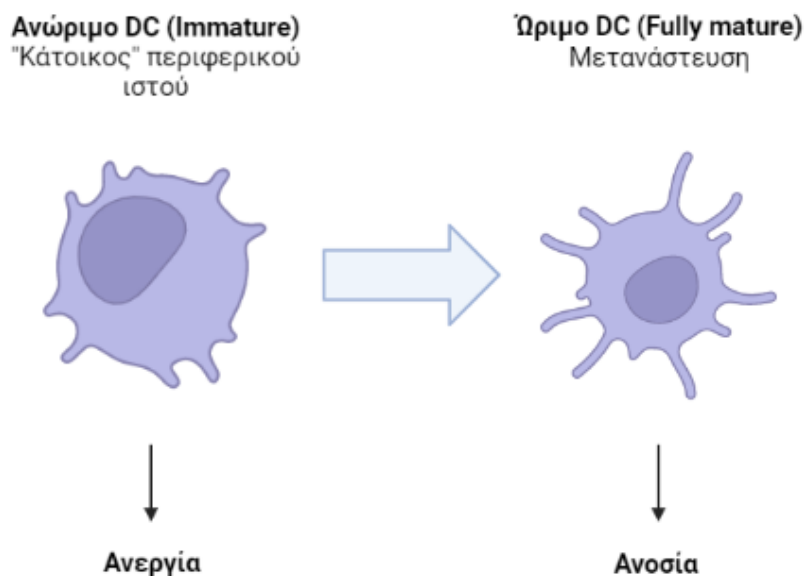
Εικόνα 4: Οι λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων DCs. (TLRs: Toll-like Receptors, CLRs: C-type Lectin Receptors, NLRs: NOD-like Receptors, Tregs: T regulatory cells, Tc: T cytotoxic cells) (Created with BioRender.com)

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες των DCs είναι η αντιγόνοπαρουσίαση. Κλασικά ισχύει πως κατά την αντιγόνοπαρουσίαση τα ενδοκυτταρικά αντιγόνα φορτώνονται στο Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας I (MHC Class I) ενώ τα εξωκυτταρικά επεξεργάζονται ειδικά και παρουσιάζονται στο Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας II (MHC Class II). Όμως, εξειδικευμένα αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα DCs, μπορούν και αντιστρέφουν το τοπίο και παρέχουν την δυνατότητα στα ενδοκυτταρικά αντιγόνα να παρουσιαστούν στο MHC Class II (μέσω

αυτοφαγίας) και αντίστοιχα τα εξωκυτταρικά αντιγόνα να παρουσιαστούν στο MHC Class I (μέσω διαφυγής τους από τα ενδοσώματα). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται στο σύνολό της **διασταυρούμενη παρουσίαση - cross presentation** (Romao et al., 2013). Αυτή τους η μοναδική ικανότητα βρίσκεται πίσω από τον ιδιαίτερο και κρίσιμο ρόλο που κατέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο θα βρεθούν, δηλαδή είτε σε ένα φυσιολογικό περιβάλλον, γεμάτο από εαυτά αντιγόνα, είτε σε ένα περιβάλλον μη φυσιολογικό και διαταραγμένο στο οποίο βρίσκονται μη εαυτά αντιγόνα, τα DCs μπορούν και υπάρχουν σε δύο καταστάσεις, την σταθερή ανώριμη κατάσταση (steady immature state) και την ώριμη κατάσταση (mature state) (Dudek et al., 2013), με τα ανώριμα κύτταρα να προωθούν την ανοσοανοχή-ανεργία των κυττάρων T (T-cell anergy) ενώ τα ώριμα την ανοσογονικότητα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5. Η διαφοροποίηση μεταξύ ανώριμων και ώριμων DCs έγκειται σε δύο επίπεδα, τον φαινότυπο και την λειτουργία τους (Steinman & Idoyaga, 2010). Η φαινοτυπική ωρίμανση λαμβάνει χώρα όταν συμβαίνει αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων επιφανειακών προσδετών ωρίμανσης, όπως το MHC-Class II μόριο καθώς και συνδιεγερτικά μόρια, π.χ. CD80, CD83 κ.α. Όσον αφορά την λειτουργία τους τα DCs ενεργοποιούνται όταν ασκούν την ικανότητά τους να εκκρίνουν κυτταροκίνες, οι οποίες ανάλογα με το περιβάλλον θα είναι ανοσοκατασταλτικές ή φλεγμονώδεις (Reis e Sousa, 2006).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα DCs βρίσκονται στους περιφερικούς ιστούς, αποτελούν κύτταρα φρουρούς και είναι ανώριμα. Η κύρια λειτουργία αυτών των κυττάρων είναι η συνεχής ενδοκύτωση και η αντιγονοπαρουσίαση εαυτών αντιγόνων στα T λεμφοκύτταρα, χωρίς συν διέγερση (αφού απουσιάζουν από την επιφάνειά τους τα συνδιεγερτικά μόρια), η οποία οδηγεί σε ανεργία των κυττάρων T και πόλωσή τους σε μια κατάσταση ανοσοανοχής και ανοσοκαταστολής (Mellman, 2013).



Εικόνα 5: Οι δύο καταστάσεις των DCs. (Created with BioRender.com)

Από την άλλη πλευρά, όταν τα DCs συναντούν παθογόνα ή άλλες οντότητες που κατέχουν (PAMPs) περνούν στην ώριμη κατάστασή τους, μέσω έντονης φαινοτυπικής και λειτουργικής διέγερσής τους. Σταματούν να υιοθετούν μια στρατηγική μόνιμης επιτήρησης μέσω ενδοκύτωσης και αρχίζουν να αντιγονοπαρουσιάζουν, πλέον τα ξένα αντιγόνα – μη εαυτά στα παρθένα T λεμφοκύτταρα (Mellman, 2013), μεταναστεύοντας στους λεμφαδένες. Για να μπορέσουν τα παρθένα T λεμφοκύτταρα να δραστηριοποιηθούν θα πρέπει να δεχθούν τρία διακριτά σήματα (Lutz & Schuler, 2002):

1. Τα σύμπλοκα αντιγόνου-MHC
2. Τα συνδιεγερτικά μόρια στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων
3. Η παρουσία κυτοκινών που έχουν εκκριθεί από τα δενδριτικά κύτταρα, αφού όπως φαίνεται το σήμα που αποτελεί τον καταλύτη μιας ανοσογονικής προσέγγισης από τα DCs αποτελεί η απελευθέρωση προ-φλεγμονώδων κυτοκινών από αυτά

Συνοπτικά τα DCs έχουν τον εξής ρόλο:

- Υπό φυσιολογικές συνθήκες (μη φλεγμονώδεις), βρίσκονται στους περιφερικούς ιστούς ως ανώριμα κύτταρα (iDCs) (Dudek et al., 2013) και συμμετέχουν στην διατήρηση της ανοσιακής ανοχής (Audiger et al., 2017)

- Υπό συνθήκες παρουσίας μη εαυτών αντιγόνων, ενεργοποιούνται μέσω μιας σειράς φαινοτυπικών και λειτουργικών αλλαγών, οι οποίες συνιστούν την λεγόμενη ωρίμανση, επεξεργάζονται τα αντιγόνα και τέλος μεταναστεύουν από τους περιφερικούς ιστούς στους λεμφαδένες ώστε να ενεργοποιήσουν τα παρθένα T λεμφοκύτταρα (naive T cells) και τα τελευταία να δραστηριοποιηθούν (Reis e Sousa, 2006)

Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν τον μείζονα ρόλο που κατέχουν στην διατήρηση της ανοσιακής ανοχής και την συμβολή τους στην ρύθμιση των ανοσογονικών αποκρίσεων μέσω ταυτοποίησης εαυτών ή μη εαυτών αντιγόνων, όπως βακτήρια, μύκητες και ιούς (Soltani et al., 2021).

3.2. Κατηγορίες δένδριτικών κυττάρων και λειτουργίες τους

Οι κατηγορίες των δένδριτικών κυττάρων είναι πολλές και εξαρτώνται από τους εξής παράγοντες:

1. την τοποθεσία στην οποία εντοπίζονται
2. τους μοριακούς δείκτες που εκφράζουν στην επιφάνειά τους
3. τον τύπο διαλυτών μορίων που παράγουν
4. το μεταγραφικό τους προφίλ
5. τις περιβαλλοντικές συνθήκες
6. το στάδιο ωρίμανσης

Επομένως, η κάθε κατηγορία θεωρείται πως έχει και ξεχωριστή λειτουργία (O’Keeffe et al., 2015). Θα πρέπει να τονιστεί όμως πως παρόλο που η κάθε υποκατηγορία DCs κατέχει την δική της λειτουργική εξειδίκευση, η τελική ωρίμανσή τους καθώς και οι λειτουργικές τους ικανότητες επηρεάζονται επίσης από το εκάστοτε περιβάλλον ενός ιστού και από τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους με τους οποίους αλληλοεπιδρούν (Wu & Liu, 2007).

Γενικά, όλα τα ανθρώπινα δένδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλή έκφραση του MHC class II και αντίστοιχα απουσιάζουν μοριακοί δείκτες τυπικοί για διάφορες γενεαλογίες, όπως ο CD3 (T λεμφοκύτταρα), ο CD19/20 (κύτταρα B) και ο CD56 (Φυσικά φονικά κύτταρα – NK) (Collin et al., 2013). Τα DCs αλληλοεπιδρούν με το περιβάλλον τους μέσω μορίων τα οποία εκφράζονται στην επιφάνειά τους και για αυτό τον λόγο ο φαινότυπος τους είναι σημαντικός όχι μόνον για την ταυτοποίησή τους αλλά και για την κατανόηση της λειτουργίας τους (Clark et al., 2019). Ιστορικά, οι κατηγορίες των ανθρώπινων DCs έχουν οριστεί βασισμένες σε έναν μικρό αριθμό

φαινοτυπικών μοριακών δεικτών, μέσα στο πλαίσιο πληθυσμών MHC class II+ Lineage negative κυττάρων (Durand & Segura, 2015). Πρέπει να υπογραμμιστεί πως τα Lin⁻ είναι κύτταρα του μυελού των οστών που είναι αρνητικά επιλεγμένα από διάφορα αντισώματα για λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα και ερυθροκύτταρα (Alexandre et al., 2009)). Παρόλο που οι μοριακοί δείκτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στον χαρακτηρισμό των κατηγοριών DCs δεν θα έπρεπε να θεωρούνται πανάκεια καθώς η φαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων από μόνη της δεν φθάνει για να καθορίσει τις κατηγορίες. Αυτό συμβαίνει για πολλούς λόγους με κάποιους από αυτούς να είναι πως κάποιοι μοριακοί δείκτες μπορεί να μην είναι εξειδικευμένοι για κάποια δεδομένη κατηγορία DCs ενώ μπορεί άλλες φορές η έκφραση κάποιου μοριακού δείκτη να μεταβάλλεται ανάλογα π.χ. με κάποιο ερέθισμα, όπως ενεργοποίηση ενός DC. Ακόμη ένα τροχοπέδη στην διαδικασία της κατηγοριοποίησης των DCs αποτελούν κάποιοι δείκτες π.χ. CD14, που εκφράζονται παράλληλα και στα μακροφάγα και μονοκύτταρα και δυσκολεύουν την ταυτοποίηση των κυττάρων ως αμιγώς δένδριτικά (Durand & Segura, 2015). Είναι σημαντικό να τονιστεί όμως πως ο de facto δείκτης πιθανής προέλευσης των DCs από μονοκύτταρα είναι η διατήρηση του CD14 μοριακού δείκτη (Collin & Bigley, 2018).

Με βάση τα παραπάνω, στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι κύριες κατηγορίες των δένδριτικών κυττάρων μαζί με τους ρόλους τους και την τοποθεσία τους.

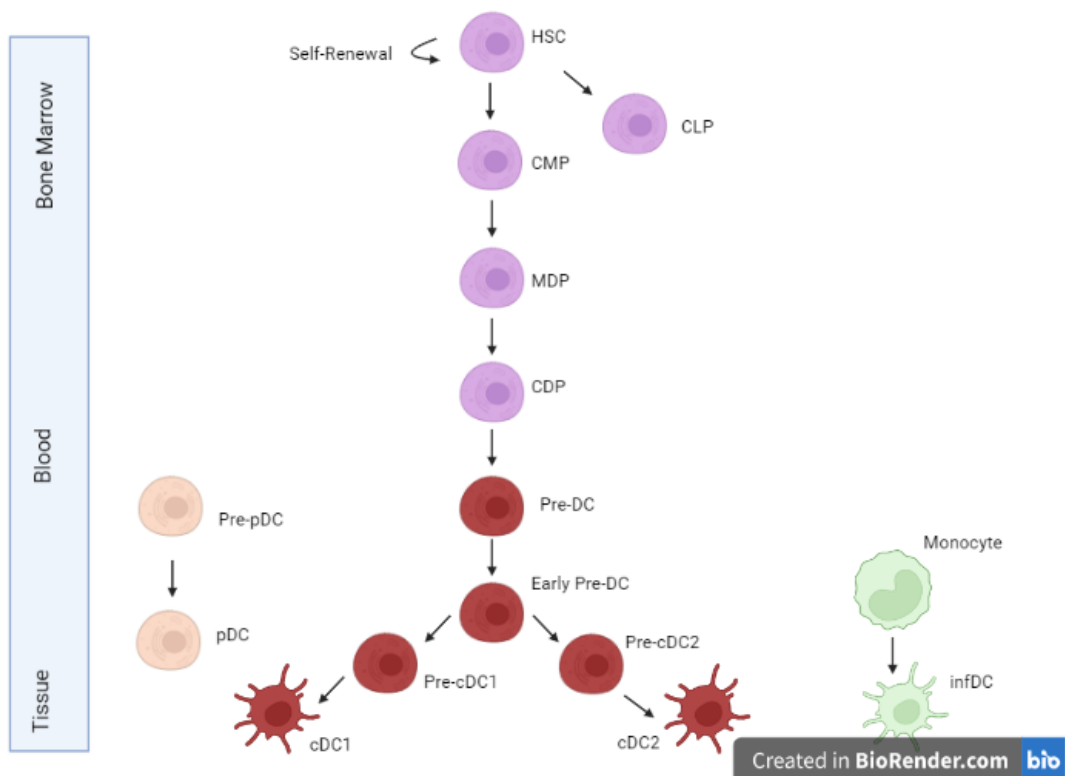
3.3. Προέλευση των δένδριτικών κυττάρων - Διαφοροποίηση

Η διαδικασία της αιμοποίησης, η οποία βασίζεται στην διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs), λαμβάνει χώρα στον μυελό των οστών στην ενήλικη ζωή. Κατά την διάρκεια αιμοποίησης, τελικά δημιουργείται μια πολύπλοκη φαρέτρα κυττάρων του αίματος καθώς και του ανοσοποιητικού. Μέσα σε αυτή συμπεριλαμβάνονται και τα DCs. Μέσω της διαδικασίας της αιμοποίησης τα DCs μπορούν να προκύψουν με τρεις τρόπους: α) από τον κοινό μυελοειδή πρόγονο (Common Myeloid Progenitor – CMP), β) από τον κοινό λεμφοειδή πρόγονο (Common Lymphoid Progenitor – CLP) και γ) από τα ίδια τα μονοκύτταρα. Το κοινό στοιχείο όλων των προγονικών κυττάρων που είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε δένδριτικά κύτταρα είναι η έκφραση στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα Flt3 (Wu & Liu, 2007).

Όσον αναφορά την μυελοειδή σειρά τα cDCs και pDCs διαφοροποιούνται συνεχώς από το HSC σε ένα κοινό αναπτυξιακό μονοπάτι που βασίζεται στο Flt3. Το μονοπάτι αυτό πρέπει να τονιστεί πως είναι ξεχωριστό της διαδικασίας της λεμφοποίησης (Feng et al.,

2022). Η διαδικασία της διαφοροποίησης γίνεται μέσω διαφόρων προγόνων που είναι δεσμευμένοι να δώσουν μόνο δενδριτικά κύτταρα, οι οποίοι έχουν σταδιακά χάσει την δυνατότητα τους να διαφοροποιούνται σε άλλες γενεαλογίες πέραν της μυελοειδούς (Ohteki et al., 2021). Παρόλο που η προέλευση των cDCs από τους CMPs είναι κοινώς αποδεκτή, έχει προταθεί προηγουμένως πως τα cDCs μπορούν και προκύπτουν και από CLPs (Manz et al., 2001). Επίσης έχει παρατηρηθεί πως οι CLPs περιέχουν και προγόνους δεσμευμένους να δώσουν pDCs (Rodrigues et al., 2018). Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο πως ενώ και οι δύο τύποι pDCs, που προκύπτουν από την λεμφική και μυελοειδή σειρά, εκκρίνουν ιντερφερόνες τύπου I, μόνο εκείνα της μυελοειδούς σειράς κατέχουν ικανότητα αντιγονοπαρουσίασης. Σε σταθερή κατάσταση οι CLPs παρέχουν μόνο μια μειονότητα σπληνικών δενδριτικών κυττάρων και περίπου τα μισά δενδριτικά κύτταρα στον θύμο καθώς τα περισσότερα δενδριτικά κύτταρα προέρχονται από την μυελοειδή σειρά (Fogg et al., 2006). Τέλος έχει παρατηρηθεί και πως μονοκύτταρα μπορούν να αποκτήσουν ικανότητες δενδριτικών κυττάρων ύστερα από κατάλληλη ενεργοποίηση σε διάφορους ιστούς. (Ohteki et al., 2021).

Στην Εικόνα 6 συνοψίζεται η διαδικασία διαφοροποίησης των DCs μέσω της μυελοειδούς σειράς κυρίως αλλά όπως φαίνεται και μέσω μονοκυττάρων, συνοψίζοντας τα παραπάνω. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο πως η κλασσική διχοτόμηση της μυελοειδούς και λεμφοειδούς σειράς στην έναρξη της αιμοποίησης έχει αναθεωρηθεί και έχει δώσει την θέση της στην θεώρηση πως στην αρχή της όλης διαδικασίας διαφοροποίησης των HSCs ο διαχωρισμός που συμβαίνει καταλήγει σε ένα δυναμικό μεγακαρυοκυττάρων και ερυθροκυττάρων και ένα αντίστοιχο της μυελοειδούς και λεμφοειδούς σειράς (Notta et al., 2016). Άρα λοιπόν αυτό που πλέον έχει προταθεί είναι πως στην αρχή προκύπτει ένας λεμφοειδής-μυελοειδής πολυδύναμος πρόγονος (Lympho-Myeloid Primed Progenitor - LMPP) ο οποίος δυνητικά μπορεί να δώσει τα κύτταρα της λεμφικής και μυελοειδούς σειράς. Αυτό είναι σημαντικό επειδή λύνει το πρόβλημα που ταλανίζει την ερευνητική κοινότητα σχετικά με το αν τα DCs είναι λεμφικής ή μυελοειδούς προέλευσης (Collin & Bigley, 2018).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης των HSCs στους διαφορετικούς τύπους δενδριτικών κυττάρων. (**HSC**: Hematopoietic Stem Cells, **CMP**: Common Myeloid Progenitor, **CLP**: Common Lymphoid Progenitor, **MDP**: Macrophage/Dendritic Progenitor, **CDP**: Common Dendritic Progenitor, **pDC**: plasmacytoid dendritic cell, **cDC**: conventional dendritic cell, **infDC**: inflammatory dendritic cells) (Created with BioRender.com)

3.4. Ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων στο ενδομήτριο

Τα δενδριτικά κύτταρα κατέχουν μείζονα ρόλο στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας στην κύηση και πιο συγκεκριμένα στην ικανότητα του τελευταίου να ανέχεται το ημι-αλλογενές έμβρυο, ενώ παράλληλα να διατηρεί την ικανότητά του να αμύνεται ενάντια σε παθογόνα (Wei et al., 2021). Ένας τρόπος επίτευξης αυτού του ρόλου είναι μέσω της προσαρμογής διαφόρων κυτοκινών καθώς και με την επαγωγή ρυθμιστικών κυττάρων T (T regulatory cells – Tregs) (Mori et al., 2016) Μέσω ρύθμισης της ισορροπίας Th1/Th2 και πριμοδότηση μιας κατάστασης στην οποία επικρατούν τα Th2, δηλαδή ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που προδιαθέτει για την διατήρηση της κήσεως (Miyazaki et al., 2003).

Επιπρόσθετα, τα DCs διαθέτουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες φυσιολογικές προσαρμογές που συμβαίνουν μετά την γονιμοποίηση, όπως η δημιουργία του φθαρτού υμένα και η αγγειογένεση (Blois et al., 2011) και σε μια γενικότερη αναδιαμόρφωση

του ιστού της μήτρας (Mori et al., 2016). Τέλος, παρατηρείται στενή συνεργασία και με τα άλλα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killers Cells – NK) (Leno-Durán et al., 2014) και οι δραματικές ορμονικές αλλαγές που κάνουν την εμφάνιση τους σίγουρα παίζουν ρόλο στην ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού στον χώρο της μήτρας. Έρευνες έχουν δείξει πως τέτοιες ορμονικές αλλαγές έχουν επίπτωση στον φαινότυπο των DCs ώστε τα τελευταία να αναγνωρίζουν το έμβρυο ως οικείο (Nair et al., 2017).

Τα DCs στον χώρο της μήτρας είναι περιορισμένα στον φθαρτό υμένα, από τον οποίο αναφέρεται πως εκκρίνεται ένας μεγάλος αριθμός διαλυτών ουσιών με τελικό πιθανό αποτέλεσμα τους να είναι μια γενικευμένη ανασταλτική επίδραση στις λειτουργίες των DCs και συνεπώς ένας έλεγχος μιας πιθανής επιζήμιας, για την επιβίωση του εμβρύου, παρουσίας των κυττάρων αυτών (Zarnani et al., 2008). Αυτό είναι σημαντικό διότι γενικά ο πληθυσμός των DCs στην μήτρα, την στιγμή της εμφύτευσης, ίσως να αποτελεί και τον μεγαλύτερο ανοσολογικό κίνδυνο για το έμβρυο αφού τα DCs αποτελούν «επαγγελματίες» APCs (Antigen Presenting Cells) (Yang et al., 2019) και μπορούν πάρα πολύ εύκολα αν απορρυθμιστούν να στραφούν ενάντια στο «ξένο» σώμα, που επί της ουσίας αποτελεί το έμβρυο για το σώμα της μητέρας.

Πίνακας 2: Κύριες υποκατηγορίες ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων. (Soltani et al., 2021)

Κατηγορία	DCs του αίματος			Επιδερμικά DCs		Φλεγμονώδη/Προερχόμενα από μονοκύτταρα DCs (moDCs/infDCs)
	Κλασικά DCs (Conventional DCs – cDC1)	Κλασικά DCs (Conventional DCs – cDC2)	Πλασματοκυτταροειδή DCs – pDCs	Κύτταρα Langerhans	CD14+ DCs	
Τοποθεσία	Αίμα, ιστοί, λεμφοειδή όργανα	Αίμα, ιστοί, λεμφοειδή όργανα	Αίμα, ιστοί, λεμφοειδή όργανα	Επιδερμίδα	Δερμίδα και μη λεμφοειδή όργανα	Σημεία φλεγμονής
Εξειδικευμένη Λειτουργία	Αντιγονοπαρουσίαση, Επαγωγή Th2 σε αντίδραση σε αλλεργιογόνο	Th1 ανοσολογική απόκριση, Cross presentation	Παραγωγή IFN τύπου I ενάντια σε ιική ή μυκητιακή προσβολή	Ανοσιακή ανοχή, Ρύθμιση του ανοσοποιητικού, Επιθηλιακή ομοίσταση	Th1h ανοσιακές αποκρίσεις, σχηματισμός φυλακισμένων βοηθητικών κυττάρων T	Επαγωγή Th1 και Th17 αποκρίσεων

3.5. Παρουσία των δενδριτικών κυττάρων στο ενδομήτριο

Η επιστημονική κοινότητα μέχρι πρότινος αδυνατούσε να σημειώσει ουσιαστική πρόοδο στην μελέτη του ρόλου των DCs ως κύτταρα του ανοσοποιητικού στον χώρο του ενδομητρίου. Αυτό συνέβαινε γιατί δεν υπάρχουν εξειδικευμένοι δείκτες στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών στον άνθρωπο που να τα ξεχωρίζουν από άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού (Wei et al., 2021). Συνήθως τα ανθρώπινα DCs ταυτοποιούνται ως θετικά για το ανθρώπινο αντιγόνο λευκοκυττάρων (HLA-DR+) και αρνητικά για άλλους δείκτες εξειδικευμένους για γενεαλογίες κυττάρων, όπως τα T λεμφοκύτταρα (CD3-), τα B κύτταρα (CD19-), τα μακροφάγα (CD14-) και τα φυσικά φονικά κύτταρα NK (CD56-/CD16-) (Steinman, 1991). Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των DCs στην μήτρα (και πιο συγκεκριμένα στον φθαρτό υμένα) αλλά και στο περιφερικό αίμα, αλλάζουν με δυναμικό τρόπο κατά την διάρκεια της κύησης και με έναν συγκεκριμένο τρόπο για τον ιστό (Bachy et al., 2008). Τα DCs αποτελούν το 1.7% όλων των CD45+ λευκοκυττάρων της μήτρας (Gardner, 2003) κατά την διάρκεια της πρώιμης εγκυμοσύνης, με το ποσοστό τους να μην μεταβάλλεται σημαντικά κατά την διάρκεια της κύησης (Bulmer et al., 2010).

Λαμβάνοντας υπόψιν την διαδικασία διαφοροποίησης των DCs θα πρέπει να αναφερθεί το πως αυτά τα κύτταρα καταλήγουν στην θηλυκή αναπαραγωγική οδό. Ως λευκοκύτταρα και κύτταρα της φυσικής ανοσίας, τα DCs οδηγούνται στον χώρο της μήτρας με τους κάτωθι τρόπους:

1. Μετακίνηση/Διείσδυση λευκοκυττάρων (εν προκειμένω πρόδρομων κυττάρων DCs) από την κυκλοφορία του αίματος με διαπίδυση σε ένα τριχοειδές αγγείο και πιο συγκεκριμένα στο ενδοθηλιακό στρώμα κυττάρων που το περιβάλλει (high endothelial venules – HEV), ώστε να καταλήξουν στον εκάστοτε γειτονικό ιστό, κυρίως σε περιπτώσεις κάποιας φλεγμονής (Beekhuizen & Furth, 1998)
2. Μετανάστευση μέσω γειτονικών λεμφαγγείων στους λεμφαδένες αποστράγγισης (draining lymph nodes) (Teijeira et al., 2014) και
3. Χημειοτακτική ενεργοποίηση και ρύθμιση των DCs μέσω αντιμικροβιακών πεπτιδίων (π.χ. ντιφενσίνες, SP-A) και την πρόσδεση αυτών στους υποδοχείς (π.χ. TLRs) των κυττάρων αυτών (Iijima et al., 2008)

Πέραν της μετακίνησης των DCs στην θηλυκή αναπαραγωγική οδό, για παράδειγμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, πρέπει να τονιστεί πως υπάρχουν και DCs που αποτελούν “κάτοικοι” της περιοχής αυτής (resident-tissue DCs). Επίσης DCs μπορούν

να προκύψουν και από πρόδρομους μονοκυττάρων (mo-DCs) (Iijima et al., 2008). Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται σχηματικά τα παραπάνω.

Παρόλο που στον χώρο της μήτρας εντοπίζονται και οι τέσσερις πιο κύριες κατηγορίες των DCs, δηλαδή τα cDCs, pDCs, mo-DCs και Langerhans, επί της ουσίας οι έρευνες στρέφουν την προσοχή τους κυρίως στα cDCs και pDCs (Wei et al., 2021).

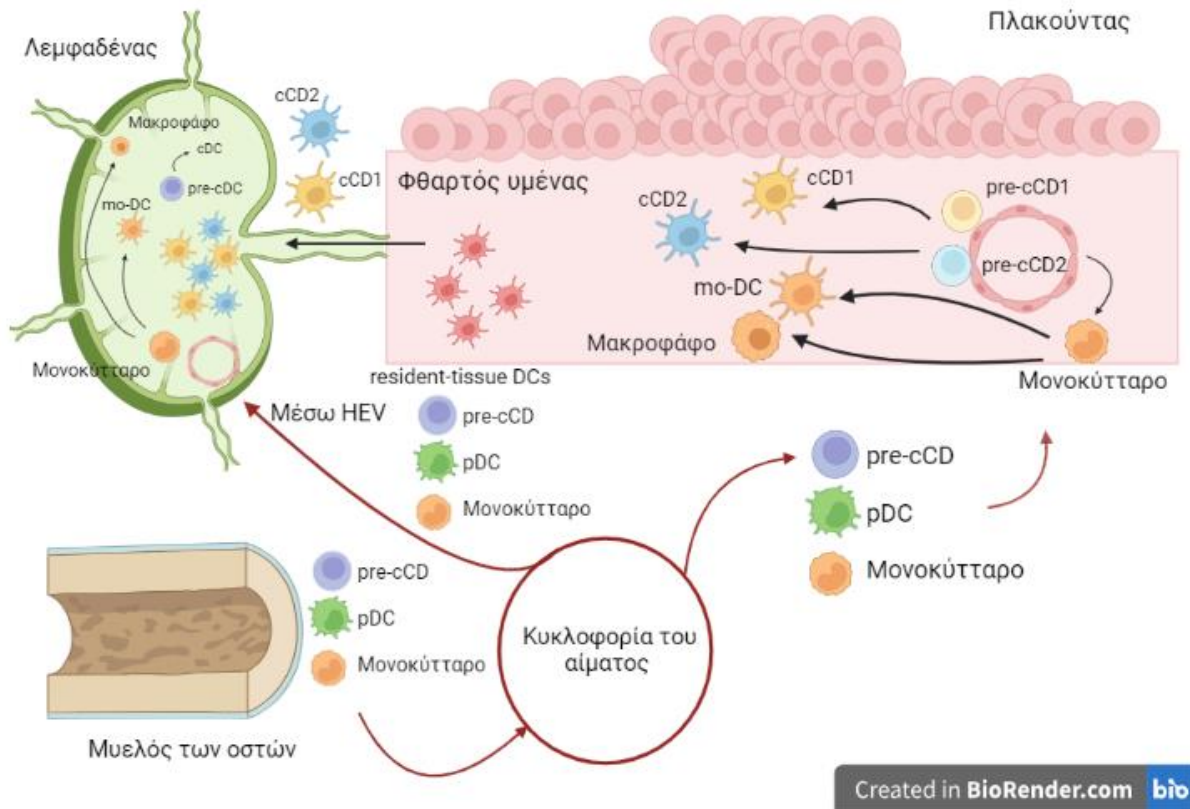
Τα δενδριτικά κύτταρα της μήτρας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε δύο μεγάλες κατηγορίες (Yang et al., 2019):

1. Έναν μεγάλο αριθμό από ανώριμα DC-SIGN⁺ DCs, τα οποία σταδιακά αυξάνονται κατά την διάρκεια της κύησης και
2. Έναν μικρό αριθμό CD83⁺ DCs (CD83: χαρακτηριστικός δείκτης ώριμων DCs (Prechtel & Steinkasserer, 2007))

Πρέπει να σημειωθεί πως τα DC-SIGN⁺ κύτταρα έχει αναφερθεί ότι αποτελούν τους πρόδρομους των μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων και πως τα κύτταρα αυτά στην ουσία είναι απόντα στο μη κύησης ενδομήτριο, ενώ παρατηρείται δραματική αύξησή τους καθ' όλη την διάρκεια της κύησης (Kämmerer et al., 2003). Εν αντιθέσει, μία άλλη έρευνα κάνει λόγο για παρουσία DC-SIGN⁺ κυττάρων στο μη κύησης ενδομήτριο με μια σημαντική όμως αύξηση στην αρχή της κύησης (Rieger et al., 2004). Γενικά λοιπόν παρατηρείται πως σε σχέση με τις μη έγκυες γυναίκες, τα ανώριμα DCs στον φθαρτό υμένα εγκύων κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο καθώς διαφαίνεται ραγδαία αύξηση των επιπέδων τους και αντίστοιχη στασιμότητα στα ώριμα DCs. Αυτή η επικράτηση των ανώριμων DCs ίσως να ευθύνεται για την τροποποιημένη λειτουργία γενικότερα των DCs κατά την κύηση καθώς προωθείται ένα προφίλ ανοχής χωρίς ωστόσο αυτό να είναι μονόδρομος (Wei et al., 2021). Τελικά, η νέα θεώρηση που έρχεται στο προσκήνιο είναι πως η κύηση είναι μια δυναμική και καλά ρυθμισμένη ανοσιακή διαδικασία που επιβάλλει άριστη συνεργασία και των φλεγμονωδών DCs αλλά και αυτών που προωθούν την ανοχή (Segeer et al., 2012).

Όσον αφορά τις διάφορες παθολογίες που παρουσιάζονται στο ενδομήτριο και το πως επηρεάζονται τα DCs σε τέτοιες περιπτώσεις, έχουν διεξαχθεί διάφορες έρευνες. Αναφορικά, η ερευνητική ομάδα των Qian και λοιπών συνεργατών αναφέρει πως υπάρχει αύξηση των ώριμων DCs και παράλληλα μείωση των επιπέδων των ανώριμων DCs σε δείγματα γυναικών με καθ' έξιν αποβολές. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει την επικράτηση μιας ενεργούς ανοσιακής απόκρισης στον φθαρτό (Qian et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν διαφορετικά δεδομένα που δεν τείνουν προς την

κατεύθυνση της προηγούμενης ερευνητικής ομάδας, αφού δεν παρατήρησαν καμία αξιολογή αλλαγή στον αριθμό των DCs (Askelund et al., 2004).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των τρόπων μετανάστευσης των DCs. (Created with BioRender.com)

II. Σκοπός

Η κύηση ως διαδικασία ή συμβάν καθώς και η ανοσολογία της κατέχουν εξέχοντα ρόλο στο ερευνητικό σκηνικό. Μέσα από την διερεύνηση της διαδικασίας της κύησης, η ερευνητική κοινότητα ευελπιστεί να λάβει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για το πως καταφέρνει μία γυναίκα να ανέχεται το επί της ουσίας «ξένο σώμα» που συνιστά το ημι-αλλογενές έμβρυο, όσο και για την φυσιολογία της μεταμόσχευσης. Υπάρχει λοιπόν άπλετο ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από την φυσιολογία της κύησης σε επίπεδο βασικής έρευνας. Παράλληλα, δεν θα μπορούσαν να μην απασχολήσουν την ερευνητική κοινότητα και οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις που παρουσιάζονται σε διάφορες κύσεις. Για αυτόν τον σκοπό, υπάρχει μια μαζική προσπάθεια συλλογής πληροφοριών σχετικά με τα αίτια που οδηγούν αυτήν την τόσο απλή στο γυμνό μάτι διαδικασία, αλλά απaráμιλλα σύνθετη σε επίπεδο φυσιολογίας, που «ακούει» στο όνομα κύηση.

Επιπρόσθετα, η ανοσολογία της κύησης αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της τελικής επιτυχίας αυτής. Είναι ο τρόπος με τον οποίο η γυναίκα θα ανεχτεί το έμβρυο. Επομένως, θεωρείται απαίτηση το να ρίξει άπλετο φως η ερευνητική κοινότητα στις ανοσολογικές διεργασίες και στους «συμμετέχοντες», δηλαδή τα ανοσιακά κύτταρα, σχετικά με το πως ξεκινάει η εμφύτευση μέχρι και την επακόλουθη ομαλή διεξαγωγή της κύησης.

Στο ίδιο μήκος κύματος πορεύθηκε και η εργασία αυτή, κατά την οποία έγινε προσπάθεια ανάλυσης του πληθυσμού δενδριτικών κυττάρων ως προς τον αριθμό και τον φαινότυπό τους, σε δείγματα ενδομητρίου γυναικών που είχαν παρουσιάσει είτε κάποια αποτυχημένη εμφύτευση είτε είχαν καθ' έξιν αποβολές. Για το σκοπό αυτό, ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων από δείγματα γυναικών που δεν παρουσίαζαν κάποιο ζήτημα, με τα αντίστοιχα εκείνων των γυναικών που αντιμετώπιζαν είτε ανεξήγητη υπογονιμότητα είτε αποβολές. Η διαλεύκανση αυτής της ανεξήγητης υπογονιμότητας αποτελεί και τον σκοπό πίσω από αυτή την εργασία, καθώς τα αποτελέσματα αυτής θα μπορούσαν δυνητικά να συνδράμουν στην συλλογική προσπάθεια της ερευνητικής κοινότητας να κατανοήσει τον αναπόσπαστο ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος στην ομαλή πορεία μίας κύησης.

III. Μέθοδοι & Υλικά

Η εν λόγω έρευνα διεξήχθη στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής Λάρισας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ο αριθμός πρωτοκόλλου της έγκρισης που έδωσε η Επιτροπή Ηθικής & Δεοντολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι 375 και δόθηκε στις 8 Μαρτίου 2023. Τα δείγματα της συγκεκριμένης ερευνητικής προσπάθειας συλλέχθηκαν και στάλθηκαν στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από την Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας «Κουτλιμπάνειο και Τριανταφύλλειο» και από το Ιδιωτικό Νοσοκομείο «Μητέρα», στο Μαρούσι Αττικής και υπέστην επεξεργασία αυθημερόν. Όλοι οι συμμετέχοντες συμφώνησαν ενυπόγραφα για την συμμετοχή τους στην παρούσα έρευνα. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί πως ολόκληρη η πειραματική διαδικασία είναι ίδια και απaráλλακτη και για τα φυσιολογικά δείγματα ενδομητρίου και για τα μη φυσιολογικά, για να διασφαλιστεί αξιοπιστία στα αποτελέσματα που θα αντληθούν από την σύγκριση των δύο.

1. Προετοιμασία των δειγμάτων

Τα δείγματα ενδομητρίου των γυναικών που δεν παρουσίαζαν κάποιο πρόβλημα γονιμότητας αλλά και τα δείγματα γυναικών με κάποιο τέτοιο ζήτημα, κατέφθασαν στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας σε σωληνάκια Falcon τα οποία περιείχαν το εκάστοτε δείγμα ενδομητρίου, φυσιολογικού ή μη, σε θρεπτικό υπόστρωμα RPMI 1640 Media, με κωδικό προϊόντος R8758 ή σε θρεπτικό υπόστρωμα IMDM, με κωδικό προϊόντος 12-726F. Συνολικά για την έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα ενδομητρίου μη φυσιολογικά και 10 δείγματα ενδομητρίου φυσιολογικά, τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες – controls. Οι συμμετέχουσες οι οποίες έδωσαν τα μη φυσιολογικά δείγματα εμφάνιζαν αυτόματες αποβολές, παλίνδρομες κυήσεις καθώς και αποτυχημένες εμφυτεύσεις. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων.

Η κατεργασία των εκάστοτε δειγμάτων ενδομητρίου έλαβε χώρα ανάλογα με την σύσταση του ιστού. Ιστοί πολύ συμπαγείς και με μεγάλα κομμάτια ιστού κρίθηκαν πως δεν μπορούσαν να λάβουν μια απλή κατεργασία, οπότε η πειραματική διαδικασία για αυτούς περιλάμβανε ένα επιπλέον βήμα.

Πιο συγκεκριμένα η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- Όλη η διαδικασία έλαβε χώρα σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής υπό πλήρως ασηπτικές συνθήκες ώστε να αποφευχθεί η οποιαδήποτε πιθανή επιμόλυνση
- Εάν στο αρχικό δείγμα, ο ιστός ήταν ιδιαίτερα συμπαγής και μη εύκολα διαχειρίσιμος, τότε πριν την ακολούθηση του πρωτοκόλλου θα πρέπει να προηγηθεί ένα επιπλέον βήμα κατεργασίας του ιστού, που έχει ως εξής:
 - Αρχικά γίνεται ανακίνηση-vortex του δείγματος και απόρριψή του σε ένα τρυβλίο
 - Στην συνέχεια, για να συλλεχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος από το αρχικό falcon, πραγματοποιείται ξέπλυμα των τοιχωμάτων του falcon με HBSS και εν συνεχεία απόρριψη στο τρυβλίο
 - Έπειτα, με αποστειρωμένες λεπίδες γίνεται διάλυση του ιστού σε διαχειρίσιμα κομμάτια και τελικά μεταφορά του με πιπέτα αναρρόφησης σε ένα νέο falcon
 - Έγινε επίσης ξέπλυμα του τρυβλίου και πάλι με HBSS για να συλλεχθεί οτιδήποτε έχει μείνει στα τοιχώματά του, και απόρριψη ξανά στο νέο falcon
 - Από εκεί και πέρα το πρωτόκολλο συνεχίζει όπως περιγράφεται κάτωθι
- Εάν ο ιστός λήφθηκε σε μια πιο διαλυτή μορφή τότε η διαδικασία ξεκίνησε με μια αρχική φυγοκέντρηση του δείγματος στις 1600 rpm/5min και επακόλουθα απόρριψη του υπερκειμένου με πιπέτα αναρρόφησης και ανακίνηση-vortex
- Εν συνεχεία, έγινε προσθήκη HBSS έως τα 8ml που αναγράφονται στο falcon, με μηχανική πιπέτα αναρρόφησης, ανακίνηση και ξανά φυγοκέντρηση στις 1600rpm/5min
- Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου, συμπλήρωση με HBSS έως τα 8ml, ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 1600rpm/5min
- Τέλος, έγινε απόρριψη του υπερκειμένου, επακόλουθα προσθήκη 500μl Liberase TM, ανακίνηση και επώαση σε υδατόλουτρο για 40min/37 °C.

Το σκεύασμα αυτό, αποτελείται από τα ένζυμα κολλαγενάση I και II σε ίση ποσότητα καθώς και από θερμολυσίνη. Συνιστά λοιπόν ένα σκεύασμα από μεταλλοπρωτεάσες (Matrix Metalloproteinases – MMPs) ώστε να επιτευχθεί η διάλυση του ιστού του ενδομητρίου, με στόχο την μεγαλύτερη δυνατή απελευθέρωση κυττάρων και εν τέλει βιωσιμότητα τους. Η επώαση γίνεται στους

37 °C επειδή η συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι η όπτιμη για την σωστή λειτουργία των ενζύμων.

Πίνακας 3: Τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων.

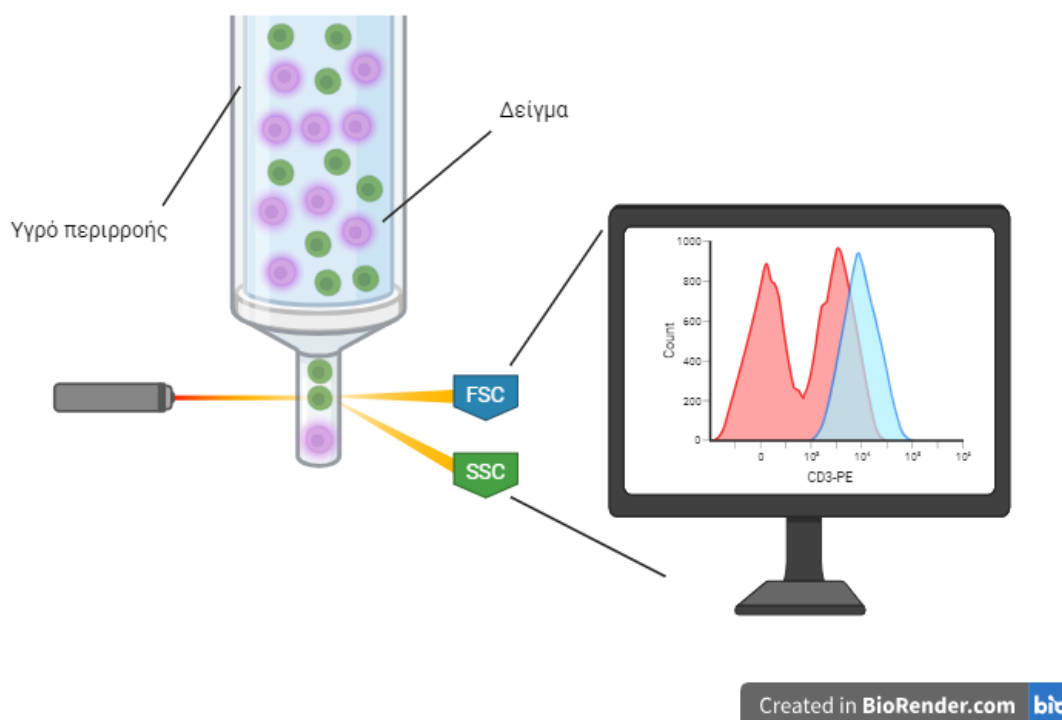
Υλικά	Αντιδραστήρια
Πιπέτα (200-1000μl)	HBSS ρυθμιστικό διάλυμα (ThermoFisher Scientific)
Μηχανική πιπέτα αναρρόφησης	RPMI θρεπτικό υπόστρωμα (Sigma Life Science)
Πιπέτες αναρρόφησης	IMDM θρεπτικό υπόστρωμα (Lonza)
Φυγόκεντρος	Liberase TM Research Grade (Roche)
Σωληνάκια Falcon	
Μηχάνημα Vortex	
Τρυβλία	
Αποστειρωμένες λεπίδες	
Ρύγχη πιπετών	
Υδατόλουτρο	

2. Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής συνιστά μία πολύ ιδιαίτερη και χρήσιμη τεχνική η οποία μπορεί να δώσει πληροφορίες για τις ιδιότητες των εκάστοτε κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να μελετηθεί μεταξύ άλλων, η μορφολογία των κυττάρων, οι κυτταρικές τους ιδιότητες και το στάδιο του κυτταρικού κύκλου (Chantzoura & Kaji, 2017).

Για την πραγματοποίηση ενός πρωτοκόλλου κυτταρομετρίας ροής απαιτείται το μηχάνημα του κυτταρόμετρου. Τα τελευταία χρόνια έχουν εξελιχθεί τα συγκεκριμένα μηχανήματα να παρέχουν και άλλες λειτουργίες πέραν της απλής κυτταρομετρίας. Για παράδειγμα το κυτταρόμετρο απεικόνισης (Imaging Flow Cytometer) το οποίο συνδυάζει την κυτταρομετρία με την μικροσκοπία φθορισμού.

Η κυτταρομετρία ροής στην βάση της αποτελεί ένα συνονθύλευμα μηχανικής ρευστών και φυσικής οπτικής. Παραδοσιακά ένα κυτταρόμετρο αποτελείται από τρία συστήματα: ένα υδροδυναμικό, ένα οπτικό και ένα ηλεκτρονικό σύστημα. Το υδροδυναμικό σύστημα ή σύστημα ρευστών αποτελείται από το υγρό περιροής ή περιβάλλον ρευστό (sheath fluid), το οποίο συνήθως συνιστά ένα ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα, του οποίου η διαφορά πίεσης με το δείγμα εξασφαλίζει την εστίαση του τελευταίου στο σημείο που θα γίνει η ανάλυση. Το οπτικό σύστημα αποτελείται από οπτικά συστήματα διέγερσης - λέιζερ (excitation optics) καθώς και από οπτικά συστήματα συλλογής (collection optics), δηλαδή φακούς συλλογής και διάφορους ανιχνευτές (φωτοдиодοι και φωτοπολλαπλασιαστές). Με τον τρόπο αυτό «συλλέγονται» τα σήματα σκέδασης φωτός αλλά και φθορισμού με τελικό αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε ψηφιακά σήματα μέσω του ηλεκτρονικού συστήματος (McKinnon, 2018). Έπειτα ακολουθεί ανάλυση των αποτελεσμάτων σε κατάλληλο λογισμικό και με την χρήση διαφόρων γραφικών παραστάσεων (π.χ. ιστογράμματα, δισδιάστατο γράφημα – dot plot) γίνεται η παρουσίαση των αποτελεσμάτων για την καλύτερη εξαγωγή συμπερασμάτων (Brehm-Stecher, 2014). Η σύνοψη της λειτουργίας του κυτταρόμετρου παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.

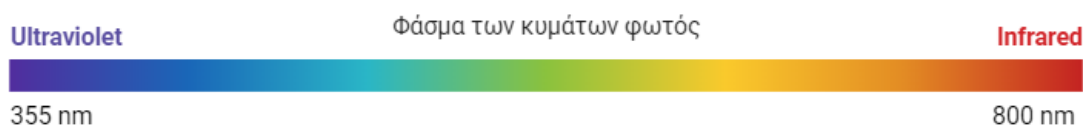


Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του κυτταρόμετρου. (Created with BioRender.com)

Μέσω της κυτταρομετρίας, όπως ακριβώς προϋποθέτει και η ετυμολογία του όρου, γίνεται καταμέτρηση κυττάρων με παράλληλο χαρακτηρισμό τους σε διαφορετικούς πληθυσμούς ανάλογα με τα εκάστοτε χαρακτηριστικά των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα γίνεται προσδιορισμός:

- Της **πρόσθιας σκέδασης** – **forward scattering**, που είναι ανάλογη με το μέγεθος των κυττάρων
- Της **πλάγιας σκέδασης** – **side scattering**, που είναι ανάλογη με την μορφολογία των κυττάρων και
- Των διαφορετικών **σημάτων φθορισμού** που προκύπτουν από την χρώση των κυττάρων με σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα

Η ικανότητα της τεχνικής αυτής να συλλέγει και να αναλύει δεδομένα πολλαπλών κυτταρικών παραμέτρων την καθιστά εξαιρετικά χρήσιμη τεχνική, ειδικά για το πεδίο της βασικής έρευνας. Τα κοινά κυτταρόμετρα μπορούν και ανιχνεύουν έως και οκτώ χρώματα, με την πολυπλοκότητα όμως της χρωματικής πολυπλεξίας να περιορίζεται από δύο παράγοντες: α) την αλληλοεπικάλυψη των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής των σημάτων και β) της διαθεσιμότητας τέτοιων διαγνωστικών φθοριοχρωμάτων - fluorochromes (Brehm-Stecher, 2014). Τα **φθοριοχρώματα** συνιστούν μόρια τα οποία μπορούν και απορροφούν φως, δηλαδή διεγείρονται σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και τελικά εκπέμπουν φως σε ένα υψηλότερο μήκος κύματος από το αρχικό. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται φως στο ορατό φάσμα, δηλαδή από 355 nm υπεριώδες έως τα 800 nm το υπέρυθρο (Maciorowski et al., 2017), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9: Τα μήκη κύματος του ορατού φάσματος του φωτός. (Created with BioRender.com)

2.1 Πειραματική διαδικασία

Εν συνεχεία της προετοιμασίας του δείγματος, το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

- Εφόσον τελείωσε η επώαση στο υδατόλουτρο, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1600rpm/5min
- Μετέπειτα έγινε απόρριψη του υπερκειμένου με πιπέτα αναρρόφηση, προσθήκη PBS έως τα 10ml που αναγράφονται στο falcon και ανακίνηση
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1600rpm/5min με επακόλουθη απόρριψη του υπερκειμένου με τον ίδιο τρόπο και προσθήκη αυτή την φορά 2ml PBS στο falcon
- Έπειτα, με μια σύριγγα μεταφέρθηκε το δείγμα από το falcon σε ένα καινούργιο, περνώντας μέσα από ένα φίλτρο filcon

Το συγκεκριμένο φίλτρο χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των άχρηστων σωματιδίων και την διαφύλαξη μόνον των κυττάρων. Για αυτόν τον σκοπό περιέχει πόρους πολυαιθυλενίου ώστε να περνάει μόνον το βιολογικό υλικό, ώστε να διαφυλαχτεί το κυτταρόμετρο.

- Στην συνέχεια, για να παραληφθεί όλη η ποσότητα από το προηγούμενο falcon, έγινε προσθήκη σε αυτό 1ml PBS και φιλτράρισμα με τον ίδιο τρόπο στο νέο falcon
- Ύστερα, ακολούθησε η χρώση των κυττάρων με τα εκάστοτε αντισώματα. Συνολικά υπήρχαν 2 σωληνάκια για κάθε φυσιολογικό δείγμα και 2 σωληνάκια για κάθε μη φυσιολογικό δείγμα. Στον Πίνακα 4, παρουσιάζεται το πλάνο χρώσης των διαφόρων δειγμάτων. Συνολικά λοιπόν, για τα 10 φυσιολογικά δείγματα, προέκυψαν 20 σωληνάκια, ενώ για τα 12 μη φυσιολογικά δείγματα, προέκυψαν 24 σωληνάκια.

Πίνακας 4: Η χρώση των δειγμάτων φυσιολογικών ή μη, με τα διάφορα αντισώματα.

	Κάθε δείγμα (φυσιολογικό ή μη)
1 ^ο σωληνάκι	CD3, CD4, CD8, CD19, CD45
2 ^ο σωληνάκι	CD14, CD11c, CD123, HLA-DR, CD45

- Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε σωληνάκι Ria προστέθηκαν 200μl από το εκάστοτε δείγμα και ο όγκος του κάθε αντισώματος όπως φαίνεται στον Πίνακα 5

Πίνακας 5: Η χρώση των δειγμάτων φυσιολογικών ή μη και οι όγκοι των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Χρώσεις	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
1 ^ο σωληνάκι	CD3 (10 μL)	CD4 (20 μL)	CD8 (10 μL)	CD19 (10 μL)	CD45 (10 μL)
2 ^ο σωληνάκι	CD14 (10 μL)	CD11c (20 μL)	CD123 (20 μL)	HLA-DR (20 μL)	CD45 (10 μL)

- Ακολούθησε καλή ανακίνηση και επώαση στο σκοτάδι για 15min ώστε να επιτευχθεί η χρώση
- Τέλος, προστέθηκε σε κάθε σωληνάκι Ria, 1ml λυτικού διαλύματος, έγινε ανακίνηση και επώαση για 30min

Το συγκεκριμένο λυτικό διάλυμα, VersaLyse Lysing Solution, χρησιμοποιείται για την λύση των ερυθροκυττάρων ώστε να μπορέσουν να παραμείνουν μόνο τα λευκοκύτταρα ώστε να διερευνηθούν περαιτέρω. Το κύριο συστατικό αυτού του λυτικού, είναι μία κυκλική αμίνη, η οποία όταν έρχεται σε επαφή με την καρβονική ανυδράση που υπάρχει στα ερυθροκύτταρα, μετατρέπεται σε μία μορφή η οποία είναι ιδιαίτερα λυτική για αυτά.

- Επομένως μετά τα δείγματα εισήλθαν στο κυτταρόμετρο για μέτρηση και ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω ειδικού λογισμικού
- Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το πείραμα

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 6: Τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία.

Υλικά	Αντιδραστήρια
Πιπέτες (2-20μl, 20-200μl, 200-1000μl)	PBS ρυθμιστικό διάλυμα (ThermoFisher Scientific)
Ρύγχη πιπετών	VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter Life Sciences)
Πιπέτες αναρρόφησης	<u>Αντισώματα:</u> CD3-FITC, CD4-PE CD8-ECD, CD19-PC5 CD45-PC7, CD14-FITC CD11c-PE, CD123-ECD HLA-DR-PC5 (Beckman Coulter Life Sciences)
Φυγόκεντρος	
Σωληνάκια Falcon	
Μηχάνημα Vortex	
Σωληνάκια Ria	
Φίλτρο Filcon, Non-sterile, syringe type (BD Biosciences)	
Κυτταρόμετρο ροής Cytomics FC500 Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Sciences)	

2.2 Αντισώματα

Μια σημαντική εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής αφορά τον τομέα της ανοσολογίας και πιο συγκεκριμένα την εύρεση ανοσοφαινοτύπου. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται ταυτόχρονη ανάλυση ενός μίγματος πληθυσμών ανοσολογικών κυττάρων για την μελέτη διαφόρων χαρακτηριστικών τους και τελικά τον χαρακτηρισμό των πληθυσμών αυτών. Συνήθως, σε ένα τέτοιο πείραμα πραγματοποιείται σήμανση των κυττάρων με ειδικά αντισώματα συζευγμένα με κάποιο φθοριόχρωμα. Τα αντισώματα αυτά στοχεύουν σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο για κάθε κυτταρικό πληθυσμό, το οποίο αποτελεί και σήμα κατατεθέν για τον συγκεκριμένο. Για παράδειγμα το αντιγόνο CD3 αποτελεί τον συν-υποδοχέα των κυττάρων T και χαρακτηρίζει με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα T στην ανοσολογία (McKinnon, 2018).

Στο ίδιο μήκος κύματος κινήθηκε και η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία. Για αυτό τον σκοπό επιλέχθηκαν διάφορα αντισώματα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων ώστε

να γίνεται κάθε φορά ο επιθυμητός χαρακτηρισμός των κυτταρικών πληθυσμών. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 6 και το κάθε ένα ήταν σημασμένο και με διαφορετικό φθοριόχρωμα. Όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από ποντικό και ήταν μονοκλωνικά, δηλαδή αναγνώριζαν μόνο έναν συγκεκριμένο επίτοπο στο κάθε αντιγόνο, κάτι που τους προσδίδει ιδιαίτερη εξειδίκευση. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν πέντε φθοριοχρώματα:

1. FITC - Fluorescein isothiocyanate, μέγιστη εκπομπή 525 nm
2. PE - R Phycoerythrin, μέγιστη εκπομπή 575 nm
3. ECD - R Phycoerythrin-Texas Red-X, μέγιστη εκπομπή 613 nm
4. PC7 - Phycoerythrin Cyanin 7, μέγιστη εκπομπή 770 nm
5. PC5 - R Phycoerythrincyanin 5.1, μέγιστη εκπομπή 670 nm

CD45-PC7

Το συγκεκριμένο αντίσωμα έχει ως στόχο το κοινό αντιγόνο των λευκοκυττάρων (Leucocyte Common Antigen – LCA), το οποίο συνιστά μια μεμβρανική πρωτεΐνη που συναντάται σε όλα τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα καθώς και ουδετερόφιλα, ενώ απουσιάζει από τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Έτσι λοιπόν, το σήμα του CD45-PC7 **αντικατοπτρίζει τα λευκοκύτταρα**. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο J33 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

CD3-FITC

Το εν λόγω αντίσωμα στοχεύει στον συνυποδοχέα – CD3 του υποδοχέα των T κυττάρων (T-cell Receptor – TCR), ο οποίος αποτελεί ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο απαραίτητο για την δράση του τελευταίου. Αποτελείται από πέντε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την γ, δ, ε, ζ και η, με το συγκεκριμένο αντίσωμα να στοχεύει στην αλυσίδα ζ. Επειδή το συγκεκριμένο αντιγόνο εκφράζεται στην επιφάνεια των ώριμων κυττάρων T, το σήμα του CD3-FITC σηματοδοτεί την **παρουσία κυττάρων T** στο δείγμα. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο UCHT1 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

CD4-PE

Το αντιγόνο CD4 αποτελεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με μία μονή αλυσίδα, η οποία συνδέεται σε μια μη πολυμορφική περιοχή του MHC Class II και βοηθάει στην αντιγονοπαρουσίαση ως συνυποδοχέας. Εκφράζεται στην επιφάνεια των βοηθητικών T κυττάρων και για αυτό τον λόγο χρησιμοποιούνται αντισώματα έναντι αυτού του αντιγόνου, για τον χαρακτηρισμό αυτού του κυτταρικού πληθυσμού. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο 13B8.2 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

CD8-ECD

Το αντιγόνο CD8 συνιστά ένα διμερές που μπορεί να υπάρξει είτε στην ομοδιμερή μορφή του CD8α, είτε στην ετεροδιμερή μορφή CD8α/β. Τα μόρια CD8 δρουν μαζί με τους TCRs ώστε να γίνει η αντιγονοπαρουσίαση στο MHC Class I. Τα αντισώματα εναντίον αυτού του αντιγόνου χρησιμοποιούνται κατά κόρον για **την ανίχνευση κυτταροτοξικών κυττάρων T (Tc)**. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο B9.11 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

CD19-PC5

Το αντιγόνο CD19 αποτελεί μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλα τα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των πρόδρομων B λεμφοκυττάρων. Δεν βρίσκεται στα T λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα. Εμπλέκεται στην ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων B, καθώς και στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση τους. Επομένως, το σήμα CD19-PC5 **χαρακτηρίζει τα B λεμφοκύτταρα** στο δείγμα. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο J3-119 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

CD14-FITC

Το εν λόγω αντίσωμα στοχεύει σε μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μίας αλυσίδας, η οποία λειτουργεί ως υποδοχέας υψηλής συγγένειας για σύμπλοκο λιποπολυσακχαριτών – LPS και την πρωτεΐνη πρόσδεσης σε LPS – LBP. Το αντιγόνο CD14 εκφράζεται στα **μονοκύτταρα, μακροφάγα** καθώς και ασθενώς στα

ουδετερόφιλα, επομένως οδηγεί και στον χαρακτηρισμό αυτών στο δείγμα. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο RMO52 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG2a.

CD11c-PE

Το αντιγόνο CD11c αποτελεί την υπομονάδα αΧ της ιντεγκρίνης λευκοκυττάρων. Αποτελεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται κυρίως στα δενδριτικά κύτταρα, αλλά και στα μονοκύτταρα, μακροφάγα καθώς και στα NK κύτταρα. Για αυτό τον λόγο αποτελούν τα αντισώματα έναντι αυτού του αντιγόνου χρήσιμα για τον **χαρακτηρισμό πληθυσμών δενδριτικών κυττάρων**. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο BU15 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

CD123-ECD

Το συγκεκριμένο αντιγόνο, δηλαδή ο υποδοχέας της ιντερλευκίνης 3 και πιο συγκεκριμένα η α υπομονάδα του, αποτελεί σημείο-στόχο για το εν λόγω αντίσωμα. Εκφράζεται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων της μυελοειδούς σειράς, δηλαδή μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, άλλα και από κάποια κύτταρα Β. Απουσιάζουν από την επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων. Λόγω της παρουσίας του συγκεκριμένου αντιγόνου κυρίως στα pDCs, η χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος ωφελεί στον **χαρακτηρισμό των δενδριτικών κυττάρων και συγκεκριμένα του υπότυπου των pDCs**. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο SSDCLY107D2 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

HLA-DR-PC5

Το αντιγόνο HLA-DR αποτελεί το ανθρώπινο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) το οποίο συναντάται στην επιφάνεια των περισσότερων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα δενδριτικά κύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα κ.α. Στον αντίποδα απουσιάζει από τα ερυθροκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και αιμοπετάλια. Συνεπώς, η στόχευση με το συγκεκριμένο αντίσωμα μαρτυρά ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο και αν μη τι

άλλο έναν φλεγμονώδη φαινότυπο αν παρουσιαστεί υψηλή έκφραση. Ο κλώνος παραγωγής των συγκεκριμένων αντισωμάτων είναι ο Immu-357 και τα αντισώματα είναι τύπου IgG1.

3. Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκε ειδικό λογισμικό επεξεργασίας, της εταιρίας Beckman Coulter Life Sciences, δηλαδή του κατασκευαστή του κυτταρόμετρου που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω ερευνητική εργασία. Επιλέχθηκαν για την παρουσίαση και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων διαγράμματα dot plots και ακολούθησε μια πορεία ανάλυσης μέσω της στρατηγικής gating. Έγινε προσπάθεια επομένως για ταυτοποίηση του επιθυμητού κάθε φορά πληθυσμού μέσω μίας σταδιακής διαδικασίας και με την κατάλληλη χρήση εκάστοτε σημασμένου αντισώματος.

4. Στατιστική Ανάλυση

Στην στατιστική ανάλυση έγινε υπολογισμός μέσω του προγράμματος Excel των μέσων τιμών του κάθε αντισώματος στα φυσιολογικά και μη φυσιολογικά δείγματα, στο 1^ο και στο 2^ο σωληνάκι.

IV. Αποτελέσματα

1. Μελέτη των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων

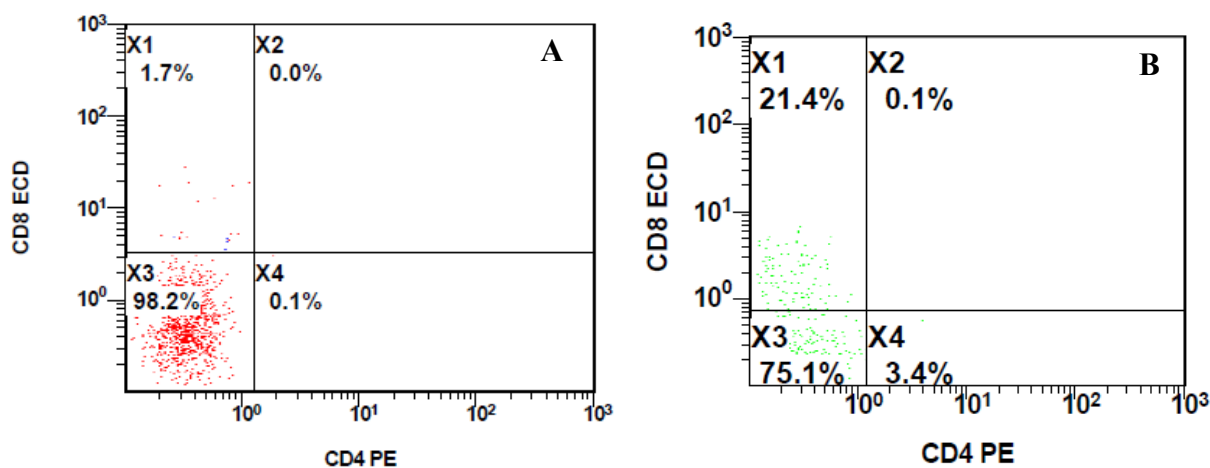
Για την αναλυτική μελέτη της σύστασης των λεμφοκυττάρων στους διάφορους πληθυσμούς τους πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Η ανάλυση λοιπόν αυτή αφορούσε το 1^ο σωληνάκι. Για την σύγκριση των μη φυσιολογικών δειγμάτων διενεργήθηκε παράλληλη ανάλυση και φυσιολογικών ώστε να εξαχθούν ασφαλή αποτελέσματα. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε μέσες τιμές από τα φυσιολογικά και τα μη φυσιολογικά δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί πως για τον προσδιορισμό των τιμών των NK κυττάρων αλλά και των DN T κυττάρων ορίστηκε ο CD3-/CD19- φαινότυπος για τα NKs και ο CD4-/CD8- για τα DNs.

Ο μέσος όρος των λεμφοκυττάρων στα μη φυσιολογικά δείγματα κυμάνθηκε στο 8%, με **υψηλή αύξηση των Tc** στο 33.3 % σε σχέση με το 13.6 % των φυσιολογικών δειγμάτων. Παράλληλα παρατηρήθηκε **μείωση των επιπέδων των DN T κυττάρων** από 86.2 % στα φυσιολογικά δείγματα στο 62.5 % στα μη φυσιολογικά. Λαμβάνοντας υπόψη τον φαινότυπο ανοχής που πριμοδοτούν τα συγκεκριμένα κύτταρα, η μείωση τους μπορεί να μαρτυρά έναν από τους παράγοντες εγκαθίδρυσης ενός κυτταροτοξικού σκηνικού που είναι υπεύθυνο πιθανώς για την τελική έκβαση της εγκυμοσύνης των γυναικών αυτών. Πάραυτα, η **τιμή των DN T κυττάρων** και στα φυσιολογικά και στα μη αποτελεί και αυτή έκπληξη καθώς είναι **αρκετά υψηλή**, κάτι το οποίο μπορεί να υποδηλώνει έναν ισχυρότερο ρόλο για αυτά τα κύτταρα από ότι μέχρι τώρα επικρατούσε στην κοινή γνώμη της ερευνητικής κοινότητας.

Ενδεικτικά στην Εικόνα 10 φαίνεται η σύγκριση σε ένα δείγμα του ποσοστού των DN T κυττάρων σε ένα φυσιολογικών και σε ένα μη φυσιολογικό δείγμα. Χαρακτηριστικά όπως φαίνεται το ποσοστό στο εν προκειμένω φυσιολογικό δείγμα είναι 98.2% ενώ στο μη φυσιολογικό δείγμα είναι 75.1%.

Πίνακας 7: Οι μέσες τιμές όλων των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων στα φυσιολογικά και μη δείγματα.

	Μη φυσιολογικά δείγματα	Φυσιολογικά δείγματα
Κύτταρα T (CD3+)	58 %	51 %
Κύτταρα B (CD19+)	4.9 %	9.9 %
Βοηθητικά T κύτταρα (Th) (CD4+)	5 %	2.3 %
Κυτταροτοξικά T κύτταρα (Tc) (CD8+)	33.3 %	13.6 %
Φυσικά φονικά κύτταρα (NK) (CD3-/CD19-)	36.9 %	39.4 %
Διπλά αρνητικά T κύτταρα (Double Negative T cells – DN T cells) (CD4-/CD8-)	62.5 %	86.2 %
Λεμφοκύτταρα (CD45+)	8 %	13 %



Εικόνα 10: Διαγράμματα dot plots CD4 PE/CD8 ECD σε Α) φυσιολογικό δείγμα και Β) μη φυσιολογικό δείγμα

2. Μελέτη του πληθυσμού των δενδριτικών κυττάρων

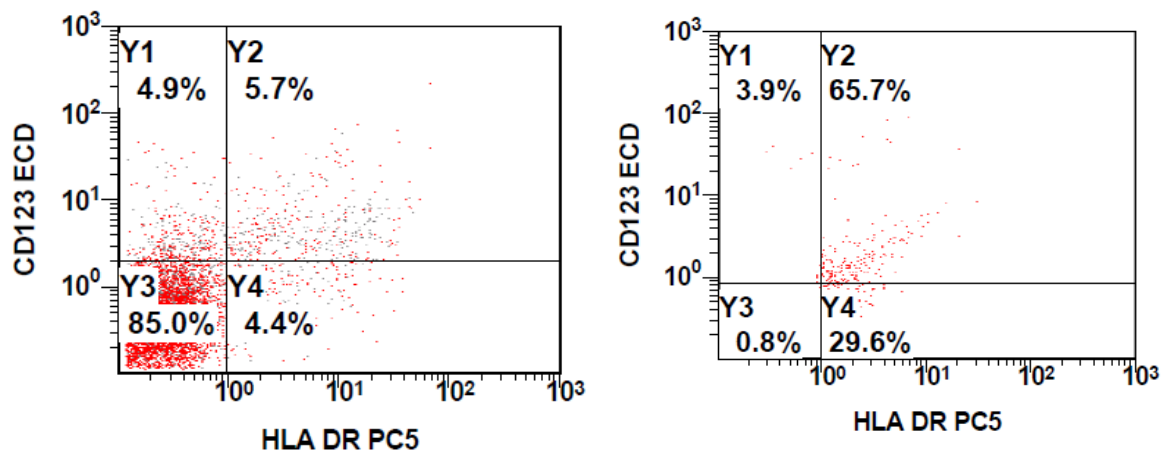
Για την μελέτη του πληθυσμού των δενδριτικών κυττάρων και το ποσοστό της έκφρασης των διαφόρων δεικτών-αντιγόνων τους πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Η ανάλυση αυτή αφορούσε το 2^ο σωληνάκι. Για την σύγκριση των μη φυσιολογικών δειγμάτων διενεργήθηκε και πάλι παράλληλη ανάλυση και φυσιολογικών ώστε να εξαχθούν ασφαλή αποτελέσματα. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε μέσες τιμές από τα φυσιολογικά και τα μη φυσιολογικά δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί πως για τον προσδιορισμό των τιμών των NK κυττάρων αλλά και των DN T κυττάρων ορίστηκε ο CD3-/CD19- φαινότυπος για τα NKs και ο CD4-/CD8- για τα DNs.

Ο συνολικός πληθυσμός των δενδριτικών κυττάρων στα δείγματα, όπου εκπροσωπείται με τον δείκτη CD11c, **δεν παρουσιάζει δραματική αλλαγή** στο μέσο ποσοστό του ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα παθολογικά δείγματα. Από την άλλη πλευρά αυτό που ξεχωρίζει και αλλάζει συλλήβδην είναι ο φαινότυπος των δενδριτικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται **αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν τον HLA-DR**, κάτι το οποίο ίσως υποδηλώνει την επικράτηση ενός φαινοτύπου φλεγμονής, καθώς χρειάζονται περισσότερα μόρια του HLA-DR για να πραγματοποιηθεί η αντιγονοπαρουσίαση. Παράλληλα, παρατηρείται **μείωση** του ποσοστού των δενδριτικών κυττάρων **που εκφράζουν CD123**, κυρίως τα pDCs, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες αντιμετωπίζουν ιικές και μυκητιακές προσβολές. Επομένως, αυτό που διαφαίνεται είναι πως το εσωτερικό του ενδομητρίου έχει καταστεί φλεγμονώδες και πολύ πιθανόν να προοικονομεί την τελική κατάληξη των περισσότερων επιπλοκών στην εγκυμοσύνη ή αυτόματων αποβολών.

Ενδεικτικά στην Εικόνα 11, φαίνεται η αύξηση του ποσοστού έκφρασης του HLA-DR από 4.4 % σε ένα φυσιολογικό δείγμα σε 29.6 σε ένα παθολογικό.

Πίνακας 8: Οι μέσες τιμές των σημάτων των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα δενδριτικά κύτταρα.

	Μη φυσιολογικά δείγματα	Φυσιολογικά δείγματα
CD11c+	3.9%	2.6%
CD123+	1.8 %	20.4 %
CD123+/HLA-DR+	27.4 %	50.1 %
HLA-DR+	63.1 %	20.5 %



Εικόνα 11: Διαγράμματα dot plots HLA-DR PC5/CD123 ECD σε Α) φυσιολογικό δείγμα και Β) μη φυσιολογικό δείγμα

V. Συζήτηση

Στην εν λόγω ερευνητική διαδικασία, έγινε προσπάθεια ανάλυσης των πληθυσμών των λεμφοκυττάρων στο ενδομήτριο και πιο συγκεκριμένα χαρακτηρισμός του πληθυσμού των δενδριτικών κυττάρων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε διενεργήθηκε με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και οδήγησε σε ενδιαφέροντα και απροσδόκητα αποτελέσματα, παρά το μικρό δείγμα που διέθετε.

Προηγούμενες μελέτες κυτταρομετρίας αλλά και ανοσοϊστοχημείας κατέδειξαν πως στο ανθρώπινο ενδομήτριο στο σύνολο των λευκοκυττάρων, τα κύτταρα τα οποία επικρατούν αριθμητικά είναι τα φυσικά φονικά κύτταρα – NK υπάρχουν σε ποσοστό ~70% και τα μακροφάγα, σε ποσοστό ~20%. Επίσης, τα κύτταρα T κυμαίνονται από 10-20%, ενώ τα δενδριτικά κύτταρα και τα B λεμφοκύτταρα ήταν σπάνια. (Erlebacher, 2013).

Τα αποτελέσματα της εν λόγω έρευνας πράγματι βρίσκονται σε συμφωνία με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω. Το παράδοξο εύρημα ήταν το **μεγάλο ποσοστό των DN T κυττάρων** που βρέθηκε είτε στα φυσιολογικά είτε στα παθολογικά δείγματα. Ποσοστό το οποίο μάλιστα παρουσιάζει ενδιαφέρον όχι απλά επειδή είναι υψηλό, αλλά επειδή είναι και **κατά πολύ μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των NK κυττάρων** που περιμέναμε πως θα ήταν τα πολυπληθέστερα. Χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκε ποσοστό κατά μέσο όρο των DNs 86.2% στα φυσιολογικά δείγματα σε σχέση με το αντίστοιχο 39.4% των NK κυττάρων. Παράλληλα η ίδια εικόνα εμφανίζεται και στα παθολογικά δείγματα με ποσοστό των DNs 62.5% ενώ το αντίστοιχο των NKs να ανέρχεται στο 36.9%. Τα αποτελέσματα αυτά μαρτυρούν πως ο ρόλος τελικά των DN T κυττάρων στην εγκυμοσύνη αλλά και γενικότερα στο περιβάλλον του ενδομητρίου ίσως να κρύβει πολλά περισσότερα μυστικά από όσα έχουν ανακαλυφθεί έως τώρα.

Ακόμη ένα σημαντικό εύρημα αποτελεί η **αύξηση του ποσοστού των κυτταροτοξικών T κυττάρων** στα μη φυσιολογικά δείγματα, από 13.6% στα φυσιολογικά δείγματα σε 33.3% μέση τιμή στα παθολογικά δείγματα. Αυτό πιθανώς να αναδεικνύει μια στροφή προς ένα κυτταροτοξικό «πέπλο» που «πέφτει» πάνω από το ενδομήτριο. Επίσης **τα ποσοστά των Tc ήταν εμφανώς μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα των Th**. Ενδεικτικά παρατηρείται στα φυσιολογικά δείγματα μέση τιμή των Th 2.3% ενώ στα φυσιολογικά 13.6%.

Στο ίδιο μήκος κύματος κυμάνθηκε και η ερευνητική προσπάθεια των Chen et al, οι οποίοι βρήκαν πως και στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες αλλά και στις ανεξήγητες καθ’

έξιν αποβολές υπήρχε επικράτηση των κυτταροτοξικών T κυττάρων CD8+, κάτι το οποίο διασταύρωσαν μέσω αλληλούχισης RNA (single cell RNA-seq), μια διαφορετική τεχνική από αυτή που επιλέχθηκε για την παρούσα έρευνα, που όμως καταδεικνύει τα ίδια αποτελέσματα (Chen et al., 2021).

Όσον αναφορά τα **δενδριτικά κύτταρα** τα ποσοστά τους σε σχέση με το σύνολο των λεμφοκυττάρων στα φυσιολογικά αλλά και στα παθολογικά δείγματα κυμάνθηκε όπως αναμενόταν σε **χαμηλά ποσοστά**, με μέση τιμή 2.61% και 3.92% αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες τιμές βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνες των Gardner et al, οι οποίοι ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν τον φαινότυπο και την ιστολογική κατανομή των ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, βρήκαν ποσοστό ανώριμων μυελοειδών DCs στο 1.7%, ποσοστό παρόμοιο με αυτό που βρέθηκε στην εν λόγω έρευνα. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε δραματική **διαφορά** ανάμεσα στο ποσοστό των pDCs, όπου στην έρευνα τους αναφέρουν πως **δεν ανίχνευσαν καθόλου CD123+** πλασμακυτταροειδή DCs (Gardner, 2003) ενώ στην συγκεκριμένη έρευνα στα φυσιολογικά δείγματα βρέθηκαν σε ποσοστό 20.4%.

Αξίζει να σημειωθεί επίσης πως παρατηρείται αξιόλογη αύξηση του ποσοστού των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν HLA-DR στα μη φυσιολογικά από ότι στα φυσιολογικά. Αυτό μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τον φλεγμονώδη φαινότυπο που διακατέχει τις διαταραχές της εγκυμοσύνης που μελετώνται στην συγκεκριμένη εργασία.

Όπως γίνεται αντιληπτό, υπάρχει άπλετος χώρος για την ερευνητική κοινότητα να ρίξει άπλετο φως και να εντυφώσει στο συγκεκριμένο πεδίο, ώστε να διαλευκανθούν πλήρως οι ρόλοι όλων των κυττάρων του ανοσοποιητικού στην πορεία της κύησης. Επίσης, με την παρούσα έρευνα αναδείχθηκε ο ρόλος των DN T κυττάρων που αδιαμφισβήτητα κατέχουν μείζονα ρόλο στην ανοσιακή ανοχή της κύησης, όπως αναδεικνύουν και οι Bafor et al. Παραθέτουν πως τα DN T κύτταρα μπορούν και ρυθμίζουν την λειτουργία των ενεργητικών T κυττάρων (effector T cells), κάτι το οποίο τα καθιστά εξαιρετικά κρίσιμα (Bafor et al., 2022). Παράλληλα, υπάρχει χώρος και για περαιτέρω μελέτη του ρόλου και του φαινοτύπου των δενδριτικών κυττάρων στον χώρο του ανθρώπινου ενδομητρίου, καθώς μέχρι τώρα η έρευνα έχει περιοριστεί κατά κόρον στα NK κύτταρα.

Συμπληρωματικά με την κυτταρομετρία ροής διάφορες άλλες τεχνικές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για μια πιο ολοκληρωμένη διεξαγωγή συμπερασμάτων θα ήταν η ανοσοϊστοχημεία, η οποία θα βοηθούσε και στην οπτική

απεικόνιση των όσων η κυτταρομετρία αναλύει. Επίσης, έχουν αναπτυχθεί και νέες τεχνικές, όπως το single cell RNA-sequencing, οι οποίες θα πρωτοστατήσουν στο ερευνητικό σκηνικό και ενδέχεται να δώσουν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα στο μέλλον.

Βιβλιογραφία

1. Alexandre, C. S., Volpini, R. A., Shimizu, M. H., Sanches, T. R., Semedo, P., Di Jura, V. L., Câmara, N. O., Seguro, A. C., & Andrade, L. (2009). Lineage-Negative Bone Marrow Cells Protect Against Chronic Renal Failure. *Stem Cells*, 27(3), 682–692.
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. (2019). ACOG Practice Bulletin No. 204: fetal growth restriction. *Obstetrics and gynecology*, 133(2), e97-e109.
3. Ashkar, A. A., Di Santo, J. P., & Croy, B. A. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 259–270.
4. Audiger, C., Rahman, M. J., Yun, T. J., Tarbell, K. V., & Lesage, S. (2017). The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *The Journal of Immunology*, 198(6), 2223–2231.
5. Bachy, V., Williams, D. J., & Ibrahim, M. A. A. (2008). Altered dendritic cell function in normal pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, 78(1), 11–21.
6. 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.
7. Barton, J. R., O'Brien, J. M., Bergauer, N. K., Jacques, D. L., & Sibai, B. M. (2001). Mild gestational hypertension remote from term: Progression and outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 184(5), 979–983.
8. Bartsch, E., Medcalf, K. E., Park, A. L., & Ray, J. G. (2016). Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: Systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ*, i1753.
9. Bashiri, A., Halper, K. I., & Orvieto, R. (2018). Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 121.
10. Beekhuizen, H., & Furth, R. V. (1998). Diapedesis. In *Encyclopedia of Immunology* (pp. 757–760). Elsevier.

11. Bender Atik, R., Christiansen, O. B., Elson, J., Kolte, A. M., Lewis, S., Middeldorp, S., Nelen, W., Peramo, B., Quenby, S., Vermeulen, N., & Goddijn, M. (2018). ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction Open*, 2018(2), hoy004.
12. Blanco-Breindel, M. F., Singh, M., & Kahn, J. (2023). Endometrial Receptivity. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
13. Blois, S. M., Klapp, B. F., & Barrientos, G. (2011). Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: Unravelling the functions of DC and NK cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(2), 86–92.
14. Bokslag, A., van Weissenbruch, M., Mol, B. W., & de Groot, C. J. M. (2016). Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate. *Early Human Development*, 102, 47–50.
15. Brehm-Stecher, B. F. (2014). Flow Cytometry. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 943–953). Elsevier.
16. Bulmer, J. N., Longfellow, M., & Ritson, A. (1991). Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 622, 57–68.
17. Bulmer, J. N., Williams, P. G., & Lash, G. E. (2010). Immune cells in the placental bed. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2–3), 281–294.
18. Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira Da Costa, M., & Reis E Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annual Review of Immunology*, 39(1), 131–166.
19. Care, A. S., Bourque, S. L., Morton, J. S., Hjartarson, E. P., Robertson, S. A., & Davidge, S. T. (2018). Reduction in Regulatory T Cells in Early Pregnancy Causes Uterine Artery Dysfunction in Mice. *Hypertension*, 72(1), 177–187.
20. Chantzoura, E., & Kaji, K. (2017). Flow Cytometry. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 173–189). Elsevier.
21. Chen, P., Zhou, L., Chen, J., Lu, Y., Cao, C., Lv, S., Wei, Z., Wang, L., Chen, J., Hu, X., Wu, Z., Zhou, X., Su, D., Deng, X., Zeng, C., Wang, H., Pu, Z., Diao, R., & Mou, L. (2021). The Immune Atlas of Human Deciduas With Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Frontiers in Immunology*, 12.

22. Clark, G. J., Silveira, P. A., Hogarth, P. M., & Hart, D. N. J. (2019). The cell surface phenotype of human dendritic cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 86, 3–14.
23. Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: An update. *Immunology*, 154(1), 3–20.
24. Collin, M., McGovern, N., & Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140(1), 22–30.
25. Critchley, H. O. D., Maybin, J. A., Armstrong, G. M., & Williams, A. R. W. (2020). Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation. *Physiological Reviews*, 100(3), 1149–1179.
26. Devall, A. J., & Coomarasamy, A. (2020). Sporadic pregnancy loss and recurrent miscarriage. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 69, 30–39.
27. Dimitriadis, E., Menkhorst, E., Saito, S., Kutteh, W. H., & Brosens, J. J. (2020). Recurrent pregnancy loss. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 98.
28. Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D., & Agostinis, P. (2013). Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Frontiers in Immunology*, 4.
29. Durand, M., & Segura, E. (2015). The Known Unknowns of the Human Dendritic Cell Network. *Frontiers in Immunology*, 6.
30. Erlebacher, A. (2013). Immunology of the Maternal-Fetal Interface. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 387–411.
31. Evans, J., Salamonsen, L. A., Winship, A., Menkhorst, E., Nie, G., Gargett, C. E., & Dimitriadis, E. (2016). Fertile ground: Human endometrial programming and lessons in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(11), 654–667.
32. Feng, J., Pucella, J. N., Jang, G., Alcántara-Hernández, M., Upadhaya, S., Adams, N. M., Khodadadi-Jamayran, A., Lau, C. M., Stoeckius, M., Hao, S., Smibert, P., Tsirigos, A., Idoyaga, J., & Reizis, B. (2022). Clonal lineage tracing reveals shared origin of conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 55(3), 405-422.e11.
33. Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., Cumano, A., & Geissmann, F. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*, 311(5757), 83–87.

34. Gardner, L. (2003). Dendritic Cells in the Human Decidua. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1438–1446.
35. Gaynor, L. M., & Colucci, F. (2017). Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice. *Frontiers in Immunology*, 8.
36. Ghulmiyyah, L., & Sibai, B. (2012). Maternal Mortality From Preeclampsia/Eclampsia. *Seminars in Perinatology*, 36(1), 56–59.
37. Griffith, O. W., Chavan, A. R., Protopapas, S., Maziarz, J., Romero, R., & Wagner, G. P. (2017). Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(32).
38. Haller, M., Yin, Y., & Ma, L. (2019). Development and utilization of human decidualization reporter cell line uncovers new modulators of female fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(39), 19541–19551.
39. Hardy, K., Hardy, P. J., Jacobs, P. A., Lewallen, K., & Hassold, T. J. (2016). Temporal changes in chromosome abnormalities in human spontaneous abortions: Results of 40 years of analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(10), 2671–2680.
40. Iijima, N., Thompson, J. M., & Iwasaki, A. (2008). Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunology*, 1(6), 451–459.
41. Ives, C. W., Sinkey, R., Rajapreyar, I., Tita, A. T. N., & Oparil, S. (2020). Preeclampsia—Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(14), 1690–1702.
42. Jégou, B., & Skinner, M. K. (2018). *Encyclopedia of reproduction* (Second edition). Elsevier Ltd. : Academic Press.
43. Jena, M. K., Nayak, N., Chen, K., & Nayak, N. R. (2019). Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 67(5), 295–309.
44. Jensen, A. L., Collins, J., Shipman, E. P., Wira, C. R., Guyre, P. M., & Pioli, P. A. (2012). A Subset of Human Uterine Endometrial Macrophages is Alternatively Activated. *American Journal of Reproductive Immunology*, 68(5), 374–386.

45. Kämmerer, U., Eggert, A. O., Kapp, M., McLellan, A. D., Geijtenbeek, T. B. H., Dietl, J., Van Kooyk, Y., & Kämpgen, E. (2003). Unique Appearance of Proliferating Antigen-Presenting Cells Expressing DC-SIGN (CD209) in the Decidua of Early Human Pregnancy. *The American Journal of Pathology*, *162*(3), 887–896.
46. Keefe, D. L., & Wright, K. P. (2007). Reproductive Physiology. In *General Gynecology* (pp. 21–41). Elsevier.
47. La, X., Wang, W., Zhang, M., & Liang, L. (2021). Definition and Multiple Factors of Recurrent Spontaneous Abortion. In H. Zhang & J. Yan (Eds.), *Environment and Female Reproductive Health* (Vol. 1300, pp. 231–257). Springer Singapore.
48. Le Bouteiller, P., & Bensussan, A. (2017). Up-and-down immunity of pregnancy in humans. *F1000Research*, *6*, 1216.
49. Lédée, N., Vasseur, C., Petitbarat, M., Chevrier, L., Vezmar, K., Dray, G., Chenière, S., Lobersztajn, A., Vitoux, D., Cassuto, G. N., & Chaouat, G. (2018). Intralipid® may represent a new hope for patients with reproductive failures and simultaneously an over-immune endometrial activation. *Journal of Reproductive Immunology*, *130*, 18–22.
50. Leno-Durán, E., Muñoz-Fernández, R., García Olivares, E., & Tirado-González, I. (2014). Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation. *Cellular & Molecular Immunology*, *11*(5), 449–455.
51. Lessey, B. A., & Young, S. L. (2019). What exactly is endometrial receptivity? *Fertility and Sterility*, *111*(4), 611–617.
52. Lhuillier, C., & Galluzzi, L. (2019). Preface—Dendritic cells: Master regulators of innate and adaptive immunity. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 348, pp. ix–xiv). Elsevier.
53. 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.
54. Lutz, M. B., & Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*, *23*(9), 445–449.

55. Ma, J., Gao, W., & Li, D. (2023). Recurrent implantation failure: A comprehensive summary from etiology to treatment. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 1061766.
56. Maciorowski, Z., Chattopadhyay, P. K., & Jain, P. (2017). Basic Multicolor Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology*, *117*(1).
57. Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., & Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, *97*(11), 3333–3341.
58. McCracken, S. A., Hadfield, K., Rahimi, Z., Gallery, E. D., & Morris, J. M. (2007). NF-kappaB-regulated suppression of T-bet in T cells represses Th1 immune responses in pregnancy. *European Journal of Immunology*, *37*(5), 1386–1396.
59. McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, *120*(1).
60. Mellman, I. (2013). Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunology Research*, *1*(3), 145–149.
61. Miyazaki, S., Tsuda, H., Sakai, M., Hori, S., Sasaki, Y., Futatani, T., Miyawaki, T., & Saito, S. (2003). Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Journal of Leukocyte Biology*, *74*(4), 514–522.
62. Moffett, A., & Loke, C. (2006). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews Immunology*, *6*(8), 584–594.
63. Mori, M., Bogdan, A., Balassa, T., Csabai, T., & Szekeres-Bartho, J. (2016). The decidua—The maternal bed embracing the embryo—Maintains the pregnancy. *Seminars in Immunopathology*, *38*(6), 635–649.
64. Nagaeva, O., Jonsson, L., & Mincheva-Nilsson, L. (2002). Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *48*(1), 9–17.
65. Nair, R. R., Verma, P., & Singh, K. (2017). Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *General and Comparative Endocrinology*, *242*, 18–23.
66. Neykova, K., Tosto, V., Giardina, I., Tsibizova, V., & Vakrilov, G. (2022). Endometrial receptivity and pregnancy outcome. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, *35*(13), 2591–2605.

67. Ng, S.-W., Norwitz, G. A., Pavlicev, M., Tilburgs, T., Simón, C., & Norwitz, E. R. (2020). Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 4092.
68. Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., Wilson, G., Kaufmann, K. B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C. F., McPherson, J. D., Stein, L. D., Dror, Y., & Dick, J. E. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*, *351*(6269), aab2116.
69. O’Keeffe, M., Mok, W. H., & Radford, K. J. (2015). Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(22), 4309–4325.
70. Ødegård, R. A., Vatten, L. J., Nilsen, S. T., Salvesen, K. Å., & Austgulen, R. (2000). Preeclampsia and Fetal Growth. *Obstetrics & Gynecology*, *96*(6), 950.
71. Ohteki, T., Kawamura, S., & Onai, N. (2021). Commitment to dendritic cells and monocytes. *International Immunology*, *33*(12), 815–819.
72. Orvieto, R., Brengauz, M., & Feldman, B. (2015). A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures – a case report. *Gynecological Endocrinology*, *31*(6), 435–437.
73. Padykula, H. A. (1991). Regeneration in the Primate Uterus: The Role of Stem Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *622*(1 The Primate E), 47–56.
74. Powell, R. M., Lissauer, D., Tamblyn, J., Beggs, A., Cox, P., Moss, P., & Kilby, M. D. (2017). Decidual T cells exhibit a highly differentiated phenotype and demonstrate potential fetal-specificity and a strong transcriptional response to interferon. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *199*(10), 3406–3417.
75. Prechtel, A. T., & Steinkasserer, A. (2007). CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Archives of Dermatological Research*, *299*(2), 59–69.
76. Qian, Z.-D., Huang, L.-L., & Zhu, X.-M. (2015). An immunohistochemical study of CD83- and CD1a-positive dendritic cells in the decidua of women with recurrent spontaneous abortion. *European Journal of Medical Research*, *20*(1), 2.

77. Rana, S., Lemoine, E., Granger, J. P., & Karumanchi, S. A. (2019). Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circulation Research*, *124*(7), 1094–1112.
78. Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*, *6*(6), 476–483.
79. Rieger, L., Honig, A., Sütterlin, M., Kapp, M., Dietl, J., Ruck, P., & Kämmerer, U. (2004). Antigen-Presenting Cells in Human Endometrium During the Menstrual Cycle Compared to Early Pregnancy. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, *11*(7), 488–493.
80. Rodrigues, P. F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G. E., Ivanek, R., & Tussiwand, R. (2018). Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Immunology*, *19*(7), 711–722.
81. Romao, S., Gannage, M., & Münz, C. (2013). Checking the garbage bin for problems in the house, or how autophagy assists in antigen presentation to the immune system. *Seminars in Cancer Biology*, *23*(5), 391–396.
82. Ruiz-Alonso, M., Valbuena, D., Gomez, C., Cuzzi, J., & Simon, C. (2021). Endometrial Receptivity Analysis (ERA): Data versus opinions. *Human Reproduction Open*, *2021*(2), hoab011.
83. Ruiz-Magaña, M. J., Llorca, T., Martinez-Aguilar, R., Abadia-Molina, A. C., Ruiz-Ruiz, C., & Olivares, E. G. (2022). Stromal cells of the endometrium and decidua: in search of a name and an identity. *Biology of reproduction*, *107*(5), 1166–1176.
84. Sanguanserm Sri, D., & Pongcharoen, S. (2008). Pregnancy immunology: decidual immune cells. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, *26*(2-3), 171–181.
85. Sasson, I. E., & Taylor, H. S. (2008). Stem Cells and the Pathogenesis of Endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1127*(1), 106–115.
86. Schumacher, A., Sharkey, D. J., Robertson, S. A., & Zenclussen, A. C. (2018). Immune Cells at the Fetomaternal Interface: How the Microenvironment Modulates Immune Cells To Foster Fetal Development. *The Journal of Immunology*, *201*(2), 325–334.

87. Segerer, S. E., Staib, C., Kaemmerer, U., Frambach, T., Honig, A., Dietl, J., & Rieger, L. (2012). Dendritic Cells: Elegant Arbiters in Human Reproduction. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(8), 1378–1384.
88. Sojka, D. K. (2020). Uterine Natural Killer Cell Heterogeneity: Lessons From Mouse Models. *Frontiers in Immunology*, *11*, 290.
89. Soltani, S., Mahmoudi, M., & Farhadi, E. (2021). Dendritic Cells Currently under the Spotlight; Classification and Subset Based upon New Markers. *Immunological Investigations*, *50*(6), 646–661.
90. Spencer, T. E., Hayashi, K., Hu, J., & Carpenter, K. D. (2005). Comparative Developmental Biology of the Mammalian Uterus. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 68, pp. 85–122). Elsevier.
91. Steinman, R. M. (1991). The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annual Review of Immunology*, *9*(1), 271–296.
92. Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *Journal of Experimental Medicine*, *137*(5), 1142–1162.
93. Steinman, R. M., & Idoyaga, J. (2010). Features of the dendritic cell lineage. *Immunological Reviews*, *234*(1), 5–17.
94. Strunz, B., Bister, J., Jönsson, H., Filipovic, I., Crona-Guterstam, Y., Kvedaraite, E., Sleiers, N., Dumitrescu, B., Brännström, M., Lentini, A., Reinius, B., Cornillet, M., Willinger, T., Gidlöf, S., Hamilton, R. S., Ivarsson, M. A., & Björkström, N. K. (2021). Continuous human uterine NK cell differentiation in response to endometrial regeneration and pregnancy. *Science Immunology*, *6*(56), eabb7800.
95. Sun, F., Wang, S., & Du, M. (2021). Functional regulation of decidual macrophages during pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, *143*, 103264.
96. Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, *94*, 8–16.
97. Teixeira, A., Russo, E., & Halin, C. (2014). Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Seminars in Immunopathology*, *36*(2), 261–274.
98. Tsao, F.-Y., Wu, M.-Y., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., & Ho, H.-N. (2018). M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from

- spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *Journal of the Formosan Medical Association*, 117(3), 204–211.
99. Vallvé-Juanico, J., Houshdaran, S., & Giudice, L. C. (2019). The endometrial immune environment of women with endometriosis. *Human Reproduction Update*, 25(5), 565–592.
100. Vassiliadou, N., & Bulmer, J. N. (1996). Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. *Biology of Reproduction*, 55(5), 1017–1022.
101. Vilella, F., Wang, W., Moreno, I., Quake, S. R., & Simon, C. (2021). Understanding the human endometrium in the 21st century. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 225(1), 1–2.
102. Wang, F., Qualls, A. E., Marques-Fernandez, L., & Colucci, F. (2021). Biology and pathology of the uterine microenvironment and its natural killer cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(9), Article 9.
103. Wang, Y.-X., Mínguez-Alarcón, L., Gaskins, A. J., Missmer, S. A., Rich-Edwards, J. W., Manson, J. E., Pan, A., & Chavarro, J. E. (2021). Association of spontaneous abortion with all cause and cause specific premature mortality: Prospective cohort study. *BMJ*, n530.
104. Wei, R., Lai, N., Zhao, L., Zhang, Z., Zhu, X., Guo, Q., Chu, C., Fu, X., & Li, X. (2021). Dendritic cells in pregnancy and pregnancy-associated diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110921.
105. Wilcox, A. J., Baird, D. D., & Weinberg, C. R. (1999). Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *The New England journal of medicine*, 340(23), 1796–1799.
106. Wongweragiat, S., Searle, R. F., & Bulmer, J. N. (1999). Decidual T lymphocyte activation in hydatidiform mole. *Journal of Clinical Pathology*, 52(12), 888–894.
107. Wu, L., & Liu, Y.-J. (2007). Development of Dendritic-Cell Lineages. *Immunity*, 26(6), 741–750.
108. Yang, F., Zheng, Q., & Jin, L. (2019). Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Frontiers in Immunology*, 10, 2317.

