

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ ΠΟΥ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΕΛΛΟΥΝ
ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ
ΗΜΙΑΛΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ
ΠΑΦΛΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1998

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ την κ. Αθανασάκη Ειρήνη για την εμπιστοσύνη της, την ερευνητική της βοήθεια καθώς και την καθοδήγηση της όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Βασιλειάδη Σίμο για την συνεργασία και ανταλλαγή απόψεων σε όλα τα χρόνια ερευνητικής εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ την Ρανέλλα Ανθή, Παπαδημητρίου Λίνα για τις υποδείξεις στον υπολογιστή καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μπούρη Γεώργιο, Δραγκιώτη Βάσω και Ζαχόπουλο Χριστόφορο για την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία τους.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην Πρωτοπαπαδάκη Εύη που με βοήθησε όχι μόνο τεχνικά αλλά ηθικά και ψυχολογικά στη διεκπεραίωση της ερευνητικής μου διατριβής, καθώς και για την πίστη της σε εμένα.

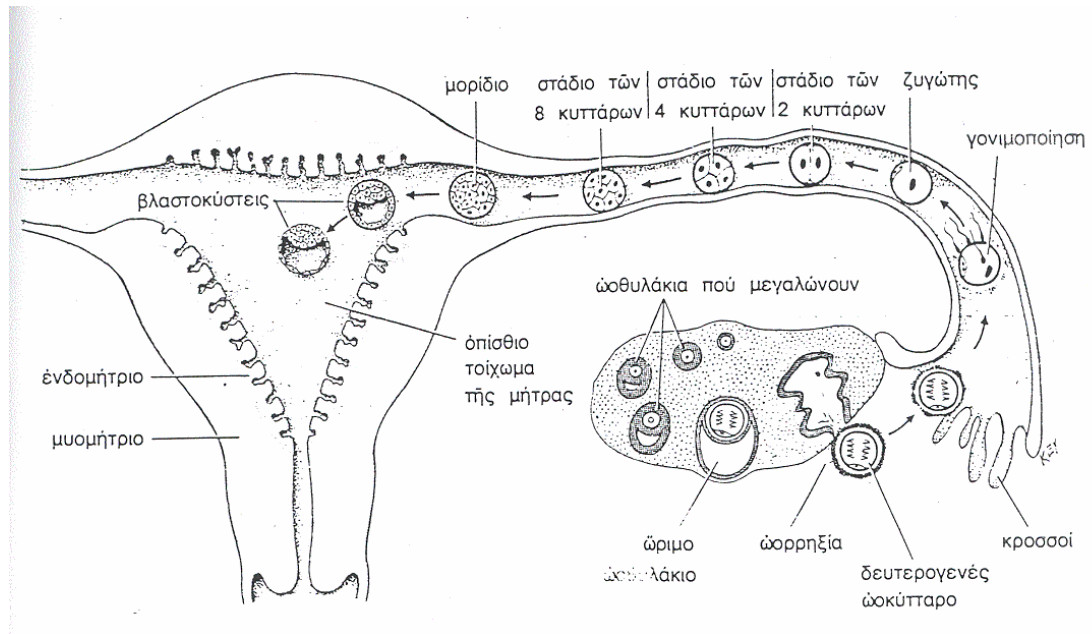
1. Εισαγωγή

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

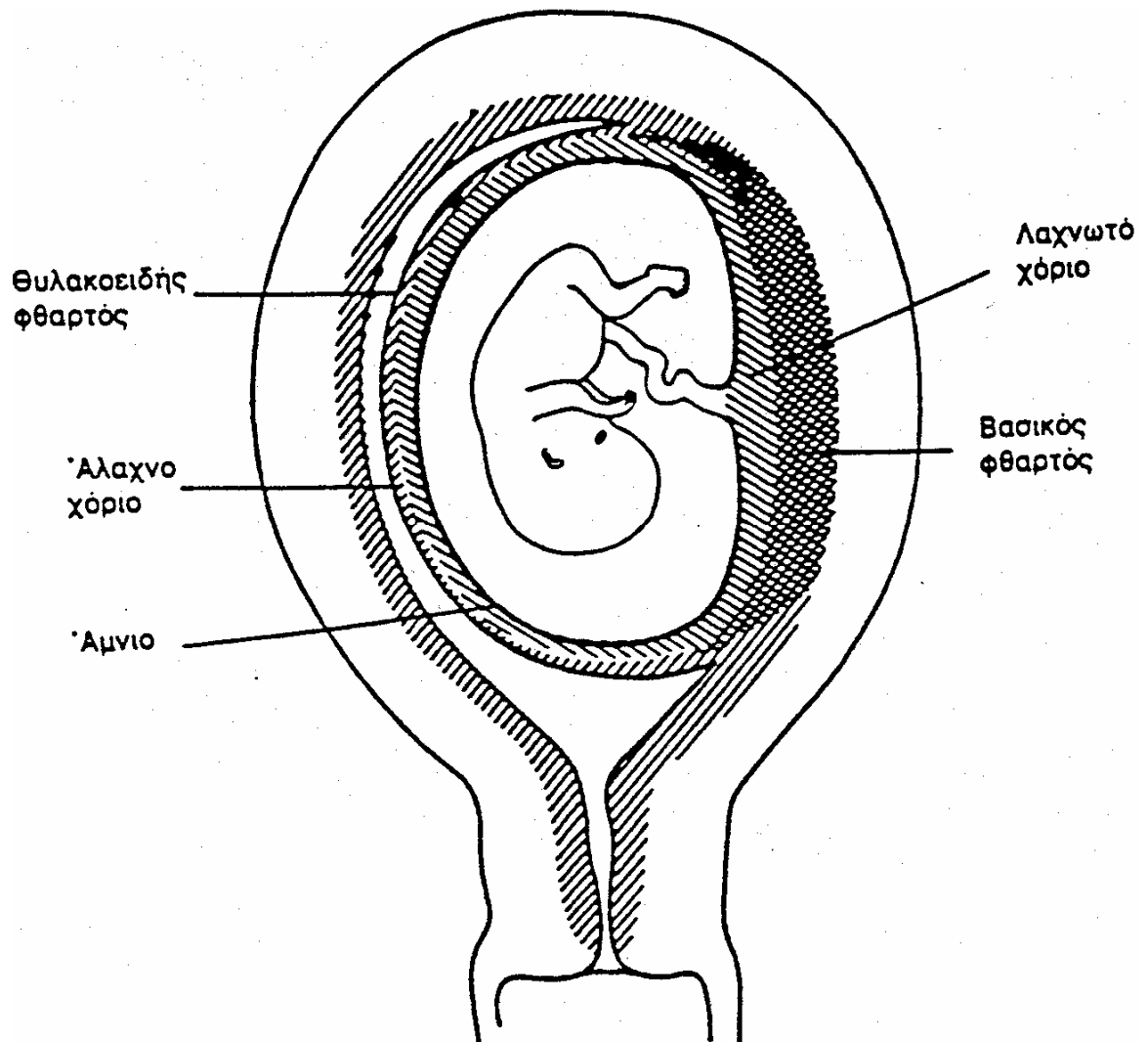
Η ανάπτυξη των θηλαστικών αρχίζει όταν ένα ωάριο γονιμοποιηθεί από ένα σπερματοζωάριο. Η ανάπτυξη είναι μια διαδικασία που μεταβάλλει τελικά το γονιμοποιημένο ωάριο του ζυγώτη σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό.

Η γονιμοποίηση αρχίζει τις πιο πολλές φορές στη λήκυθο του ωαγωγού. Ο ζυγώτης καθώς περνάει από τον ωαγωγό υφίσταται κυτταρική διαίρεση ή αυλάκωση δημιουργώντας έναν αριθμό από μικρότερα κύτταρα που ονομάζονται βλαστομερίδια και καταλήγει στο σχηματισμό ενός μοριδίου. Το μορίδιο μπαίνει στη μήτρα αναπτύσσει κοιλότητα και γίνεται μια βλαστοκύστη η οποία εισχωρεί στο ενδομήτριο της μήτρας μέχρι την πλήρη εμφύτευση του (εικόνα 1). Η σταδιακή ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα οδηγεί στο σχηματισμό ενός ολοκληρωμένου αυτόνομου οργανισμού (εικόνα 2).

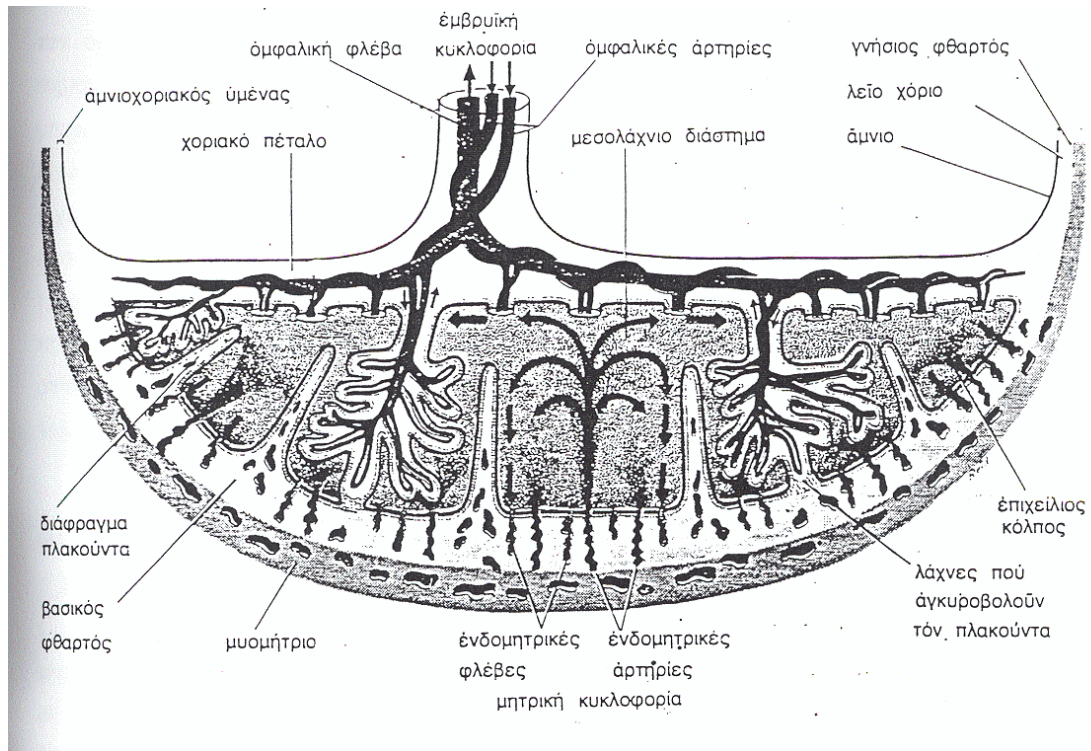
Η επιτυχής όμως έκβαση της εγκυμοσύνης βασίζεται σε ένα πλέγμα αλληλεπιδράσεων τόσο κυτταρικών όσο ορμονικών και ανοσολογικών που συμβαίνουν στην κυκλοφορία μητέρας-πλακούντα-εμβρύου. Ο πλακούντας εκτός από τις τρεις πιο ζωτικές λειτουργίες που είναι η ανταλλαγή αερίων, η προμήθεια θρεπτικών ουσιών και η απομάκρυνση προϊόντων μεταβολισμού αποτελεί και ανοσολογικό φραγμό μεταξύ εμβρύου και μητέρας (εικόνα 3).



Εικόνα1 : Σχηματική περίληψη του ωοθηκικού κύκλου, της γονιμοποίησης και εξέλιξης του ωαρίου στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας. (Moore K., 1978).



Εικόνα 2 : Σχηματική παράσταση του εμβρύου και του ώριμου πλακούντα μέσα στη μήτρα. (Moore K., 1978).



Εικόνα 3 : Σχηματική παράσταση μιας τομής δια μέσου ενός ώριμου πλακούντα. .(Moore K., 1978).

1.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Η περίεργη αλλά τόσο συνηθισμένη ανοχή του ημιαλλογενετικού εμβρύου από τον οργανισμό της μητέρας που είναι για αυτήν ένα αλλομόσχευμα προκαλεί σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον. Το έμβρυο που αποτελείται από πατρικά και μητρικά γενετικά στοιχεία είναι μόσχευμα του ίδιου είδους αλλά όμως είναι γενετικά ξένο ως προς τη μητέρα και τον πατέρα. Έτσι στην πρώτη εγκυμοσύνη πρέπει να ισχύει ο νόμος της απλής απόρριψης και στις επόμενες εγκυμοσύνες ο νόμος της επιταχυνόμενης απόρριψης. Παρ' όλη την έκφραση αλλοαντιγόνων στο εξωτερικό τροφοβλαστικό στρώμα του ημιαλλογενετικού πλακούντα που έρχεται σε επαφή με τη μητρική κυκλοφορία, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια, οι μηχανισμοί απόρριψης του μοσχεύματος δεν λειτουργούν. (Mc Laren 1975, Raghupathy et al 1981).

Το γεγονός ότι το έμβρυο θεωρήθηκε από μερικούς ερευνητές αντιγονικά ανώριμο, και η μήτρα προνομιούχος ανοσολογική περιοχή προστατευμένη από το περιφερικό ανοσολογικό σύστημα της μητέρας, ευνοεί την ανάπτυξη του εμβρύου. Οι επικρατέστερες υποθέσεις που εξηγούν το «παράδοξο» της κύησης είναι ο μηχανισμός της ανοσοκαταστολής (Slapsys et al 1983, Sano et al 1984, Chaouat et al 1984) και του ανοσοτροφισμού (Wegmann TG 1984, Wegmann TG 1987, Athanassakis et al 1987). Σύμφωνα με την πρώτη τα εμβρυϊκά αλλοαντιγόνα στον πλακούντα διεγείρουν ανοσοκαταστολή στη μητέρα έτσι ώστε να αποφεύγεται η αναγνώριση και απόρριψη του εμβρυϊκού ιστού. Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αυτής της αντίδρασης παίζουν και τα κορτικοστεροειδή τα οποία παρεμποδίζουν την ανοσολογική απόκριση. Η θεωρία αυτή τεκμηριώνεται ακόμη με την ανίχνευση κατασταλτικών παραγόντων και κυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Smith et al 1977, Engleman et al 1978, Slapsys et al 1983, Sano et al 1984, Clark et al 1990). Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι τα T λεμφοκύτταρα διεγείρονται από αλλοαντιγόνα του εμβρύου και εκκρίνουν παράγοντες που ενδυναμώνουν την ανάπτυξη του πλακούντα και κατ' επέκταση την εμβρυϊκή επιβίωση (Wegmann 1984, Athanassakis et al 1987). Ενώ κατά την αρχική εκτίμηση οι δυο θεωρίες φάνηκαν αντίθετες, πλέον πιστεύεται ότι και οι δύο ισχύουν σε διαφορετικά στάδια της κύησης με σκοπό να διατηρούν την ισορροπία στον μητρικό οργανισμό.

1.3 Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

Η ανοσοτροφική θεωρία υποστηρίζει ότι τα Τ λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν άμεσα τα εμβρυϊκά αλλοαντιγόνα του πλακούντα «προστατεύουν» το έμβρυο. Σημαντικές εστίες εκκίνησης των Τ λεμφοκυττάρων στη μητρική-εμβρυϊκή αλληλεπίδραση είναι η μητρική σπλήνα και οι παραμήτριοι λεμφαδένες, των οποίων το μέγεθος αυξάνει κατά την εγκυμοσύνη. Πολλοί ερευνητές μελετώντας τα μητρικά σπληνικά λεμφοκύτταρα σε ποντίκια και τα περιφερικά λεμφοκύτταρα σε ανθρώπους και ποντίκια, έχουν δείξει ότι οι Τ λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί όχι μόνο αυξάνουν σε αριθμό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, αλλά παίζουν και σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή επιβίωση (Slapsus and Clark 1983; Sano et al 1984; Athanassakis et al 1990). Αυτά τα κύτταρα εμφανίζονται στο στρώμα του φθαρτού από τη 10η μέχρι τη 15η μέρα της εγκυμοσύνης στα ποντίκια (Bernard et al 1978). Φαίνεται λοιπόν ότι η παρουσίαση των τάξης Ι αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στον ποντικίσιο πλακούντα την 7η μέρα εγκυμοσύνης (Raghupathy et al 1981) δίνει το έναυσμα του μονοπατιού ανάπτυξης/διαφοροποίησης των μητρικών Τ λεμφοκυττάρων τα οποία ωριμάζοντας μεταναστεύουν σε θέσεις όπως η σπλήνα και οι παραμήτριοι λεμφαδένες και εισέρχονται στο φθαρτό την συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Μελέτες των σπληνικών Τ λεμφοκυττάρων, κατά τη διάρκεια της κύησης στα ποντίκια ανιχνεύουν τόσο την παρουσία του υποπληθυσμού CD4 (βοηθητικά), όσο και CD8 κυττάρων (κατασταλτικά/κυτταροτοξικά), με μια ελαφριά υπεροχή του CD4 θετικού πληθυσμού, ενώ θανάτωση αυτών των κυτταρικών πληθυσμών οδηγεί σε μείωση του μεγέθους και της λειτουργίας του πλακούντα (Athanassakis et al 1990). Τα Τ λεμφοκύτταρα στον ανθρώπινο οργανισμό μελετούνται στο περιφερικό αίμα όπου ο Matthiesen και οι συνεργάτες του (1996) έδειξαν ότι η ανοσολογική ζυγαριά κλείνει προς την καταστολή εφόσον αυξάνονται οι αριθμοί των "ουδέτερων" βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων (CD4+CD45RA+), των κατασταλτικών Τ λεμφοκυττάρων (CD8+S6F1) και μειώνονται οι αριθμοί των επαγωγικών βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων

(CD4+CD29+) και των βοηθητικών μνήμης (CD4+CD45RO+), των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CD8+S6F1+) και των φυσικών φονιάδων (CD56+). Επίσης εμφανίζει μιά μείωση του ποσοστού των B λεμφοκυττάρων που συμφωνεί με την πτώση της συγκέντρωσης της IgG στον ορό της εγκύου. Μια άλλη μελέτη των Watanabe et al 1997 αναφέρει ότι στην αρχή της εγκυμοσύνης οι αριθμοί των κατασταλτικών T λεμφοκυττάρων και των φυσικών φονιάδων με ισχυρή κυτταροτοξικότητα (NK+3cell) αυξάνουν ενώ ο αριθμός των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων μειώνεται υποθέτοντας ότι τα γεγονότα αυτά σχετίζονται με την αποδοχή ή εμφύτευση του εμβρύου στο ξεκίνημα της εγκυμοσύνης. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης εμφανίζεται μια μείωση των CD5- και CD5+ B λεμφοκυττάρων καθώς και T(αβ) λεμφοκυττάρων ενώ στο τέλος της εγκυμοσύνης υπάρχει μια μείωση των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων και των NK+3 κυττάρων που μπορεί να σχετίζεται με τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Μετά τον τοκετό, αυξάνονται τα T βοηθητικά και τα T κυτταροτοξικά, τα T(γδ) και τα CD5+ B λεμφοκύτταρα που ίσως σχετίζονται με την αύξηση της άμυνας στη λοχεία για αυτοάνοσες ασθένειες. Νεότερη έρευνα (Kuhnert et al 1998) αναφέρει ότι δεν βρέθηκαν σημαντικές αλλαγές στο επί τοις εκατό ποσοστό των CD4+ και CD8+ λεμφοκυττάρων σε κάποιο στάδιο της εγκυμοσύνης ή της λοχείας, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των HLA-DR+ και CD56+ ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και η σταδιακή μείωση τους. Οι φυσικοί φονιάδες αναφέρεται ότι είναι ελαττωμένοι αλλά όχι σημαντικά. Όλες οι παραπάνω εργασίες συμφωνούν στην αύξηση του ποσοστού των T λεμφοκυττάρων, στη ροπή προς ανοσοκαταστολή και στη μείωση των φυσικών φονιάδων στην εγκυμοσύνη, αποδεικνύοντας τη συνύπαρξη της ανοσοτροφικής και της ανοσοκατασταλτικής θεωρίας για την επιτυχή έκβαση της εγκυμοσύνης.

Τα γδT λεμφοκύτταρα της εγκυμοσύνης τα οποία εντοπίστηκαν στη μητροεμβρυϊκή επαφή (Heyborne et al 1992) έχουν συσχετιστεί με την αναγνώριση αντιγονικών μορίων τάξης Ib στους τροφοβλάστες από γδ T λεμφοκύτταρα (Houlden et al 1989, Bonneville et al 1989, Van Kaer et al 1989). Επεκτείνοντας τις μελέτες και στον άνθρωπο το 1994 οι Mincheva- Nilsson et al παρακολουθώντας τα γδ T λεμφοκύτταρα στον πλακούντα φυσιολογικής εγκυμοσύνης σε αρχικά στάδια, παρατήρησαν ότι η πλειοψηφία

των ενδοεπιθηλιακών και υποεπιθηλιακών κυττάρων ήταν TCRγδ (CD56- & CD56+). Έτσι διατύπωσαν την υπόθεση ότι η τροφοβλαστική ανάπτυξη ελέγχεται από περιορισμένα γδ T λεμφοκύτταρα του φθαρτού. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι στο ανθρώπινο φθαρτό αρχικής εγκυμοσύνης τα γδ T λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται, έχουν φαινοτυπική ετερογένεια και υπερ-θυμική διαφοροποίηση (Mincheva-Nilsson et al 1997). Επίσης ένας ειδικός πληθυσμός των γδ T λεμφοκυττάρων έχει βρεθεί στο επιθήλιο της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού, η λειτουργία του οποίου είναι ακόμα άγνωστη. Οι Vassiliadou & Bulmer (1996) μετά από ποσοτικοποίηση των υποπληθυσμών T λεμφοκυττάρων στο ενδομήτριο εγκύων και μη γυναικών, έδειξαν την ύπαρξη τόσο T(αβ) όσο και T(γδ) λεμφοκυττάρων στην εγκυμοσύνη αλλά ο αριθμός τους ήταν αρκετά μειωμένος στο πρώτο τρίμηνο της κύησης, γεγονός που δείχνει ότι δεν πρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της κύησης.

1.4 ΤΙ ΕΚΚΡΙΝΟΥΝ ΤΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Η θεωρία του ανοσοτροφισμού αναφέρει ότι σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της εγκυμοσύνης παίζουν οι παράγοντες που εκκρίνονται από τα Τ λεμφοκύτταρα, οι λεμφοκίνες, οι οποίες συντείνουν στη διαφοροποίηση του πλακουντικού ιστού και κατ' επέκταση στην ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου.

Οι λεμφοκίνες είναι μια ομάδα πολυπεπτιδίων που ανήκουν στην οικογένεια των κυτοκινών, έχουν χαρακτηριστικά ορμονών (*Hormone like molecules*) και επηρεάζουν ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, καθιστώντας δυνατή την επικοινωνία μεταξύ των κυτταρικών σειρών και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ορμονική και ανοσολογική ρύθμιση, στην αιμοποίηση, στο σχηματισμό των οστών, στον πολλαπλασιασμό των νευρικών κυττάρων, στη δράση του παγκρέατος και στη λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος.

Οι *Mossmann et al* (1986) αρχικά παρατήρησαν ότι η επαναλαμβανόμενη διέγερση των CD4⁺ Τ βοηθών λεμφοκυττάρων με την προσθήκη αντιγόνων έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη περιορισμένης και στερεότυπης παραγωγής λεμφοκινών με δύο φαινοτύπους έκφρασης τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο (*Janeway et al* 1988, *Romagnani et al* 1991) που ορίστηκαν ως Th1 και Th2 λεμφοκίνες. Ποντικίσια Th1 κύτταρα χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ιντερλευκίνης 2 (IL-2), ιντερφερόνης γ (IFN-γ) και λεμφοτοξίνης (LT) ενώ τα Th2 κύτταρα από τους παράγοντες IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 και IL-13. Ενώ τα ανθρώπινα Th1 και Th2 λεμφοκύτταρα παράγουν τις ίδιες λεμφοκίνες η έκκριση των IL-2, IL-6, IL-10, IL-13 δεν μονοπωλείται από έναν κυτταρικό υποπληθυσμό λεμφοκυττάρων. Αρκετές άλλες πρωτεΐνες εκκρίνονται και από τους δύο Th1 και Th2 υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων περικλείοντας την ιντερλευκίνη-3 (IL-3), τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α), τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), (μετ)εγκεφαλίνη καθώς και τα μέλη της οικογένειας των χυμοκινών (CK), πίνακας 1 (*Mosmann et al* 1996)

ΠΙΝΑΚΑΣ1: Κυτταρικοί τύποι που σχετίζονται με έκκριση Th1 και Th2

ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	TH1	ΚΟΙΝΑ	TH2	ΆΛΛΑ
Th1	IL-2,IFN-γ,LT			
Tc1	IL-2,IFN-γ,LT			
Tγδ-1	IFN-γ			
NK	IFN-γ			
Th0	IL-2,IFN-γ,LT	IL-3,GM,TNF CK	IL-4,-5,-6,-10	
Th2		IL-3,GM,TNF CK	IL-4,-5,-6,-10	
Tc2		IL-3,GM,TNF CK	IL-4,-5,-6,-10	
Tγδ-2			IL-4	
B-Λεμφοκύτταρα			IL-4,IL-10	
CD3+CD4+NK1.1+			IL-4	
Μακροφάγα		TNF,CK	IL-6,IL-10	IL-1,IL-12

Τα Th1 κύτταρα συμμετέχουν τόσο στις κυτταρομεσολαβητικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις, όσο και στην επαγωγή της καθυστερημένου τύπου υπερευαισθησίας DTH (Yamamura 1991). Οι Th2 κυτοκίνες προωθούν κυρίως την παραγωγή αντισωμάτων (ιδιαίτερα IgE) και ενισχύουν τον ηωσινοφιλικό πολλαπλασιασμό και λειτουργία.

Οι χαρακτηριστικές κυτοκινικές παραγωγές των Th1 και Th2 κυττάρων είναι αμοιβαία ανασταλτικές για την διαφοροποίηση και αποτελεσματική λειτουργία του φαινοτύπου. Έτσι η IFN-γ εκλεκτικά αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Th2 λεμφοκυττάρων και η IL-10 αναστέλλει την σύνθεση κυτοκινών των Th1 λεμφοκυττάρων (Mosmann et al 1989, Fiorentino et al 1989). Αυτή η διασταυρούμενη ρύθμιση ίσως επιμέρους εξηγεί αυτήν την τάση προς την Th1 και Th2 αντίδραση κατά τη διάρκεια πολλών μολύνσεων σε ποντίκια και ανθρώπους. Τέτοιες αντιδράσεις απεικονίζονται στον πίνακα 2 (Mosmann et al 1996).

Οι δύο υποπληθυσμοί Th1 και Th2 προκύπτουν από ένα κοινό CD4 θετικό πρόγονο που εκκρίνει IL-2. Στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε ένα άλλο κύτταρο που εκκρίνει εκτός IL-2, TNF-β και IFN-γ. Η ανίχνευση mRNA τόσο

για IL-4 όσο και IL-2 δείχνει ότι κατά την ωρίμανση των T βοηθών υπάρχει ένας κοινός πληθυσμός Th0 που εκκρίνει IL-4 και IL-2 (Abehsira-Amar et al 1992). Η διαφοροποίηση του Th0 στους δυο υποπληθυσμούς τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως αντιγονική δόση, μικροπεριβάλλον, παραγωγή κυτοκινών με θετική ή αρνητική δράση, τύπος κυττάρων που παρουσιάζουν το αντιγόνο και επιφανειακά αντιγόνα (B7.1 για Th1 και B7.2, CD30L, CD45RB για Th2) (Mosmann et al 1996, Romagnani et al 1997, Del Prete et al 1995).

Τα CD8 θετικά λεμφοκύτταρα όσον αφορά στην διάκριση τους στους δύο υποπληθυσμούς Tc1 και Tc2 φαίνεται να ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο διαφοροποίησης. Έτσι οι IL-12 και IFN-γ ενισχύουν την διαφοροποίηση σε Tc1 κύτταρα ενώ η IL-4 επάγει την δημιουργία Tc2 κυττάρων (Mosmann et al 1996, Sad et al 1995). Ένα πιθανό μοντέλο διαφοροποίησης των υποπληθυσμών Th1, Th2, Tc1, Tc2 φαίνεται στην εικόνα 4. Είναι φανερό ότι ο οργανισμός επάγει τις ανοσολογικές απαντήσεις Th1 ή Th2 και Tc1 ή Tc2 ανάλογα με την επίθεση που δέχεται από τα παθογονικά αντιγόνα ώστε να έχει αποτελεσματική ανοσία (εικόνα 5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Th1 και Th2 απαντήσεις

Ασθένεια/παράγοντ εξ	Ξενιστής	Απάντηση
PΩ TOZ ΩA		
<i>Leishmania major</i>	M	TH1 θεραπεία
<i>L. donovani</i>	H	TH1 θεραπεία;
<i>L. brasiliensis</i>	H	TH1 θεραπεία;
<i>Trypanosoma cruzi</i>	M	TH1 προστασία
<i>Plasmodium chabaudi</i>	M	TH1 & TH2
AMI NΘ ΕΣ		
<i>Trichuris muris</i>	M	TH2 θεραπεία

<i>Brugia malayi</i>	<i>M</i>	<i>TH2 προστασία</i>
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>M</i>	<i>TH2 απάντηση</i>
<i>OI</i>		
<i>HIV</i>	<i>H</i>	<i>TH1-TH2 εναλλαγή</i>
		<i>TH1 σε TH0</i>
		<i>TH2 ευαισθησία</i>
		<i>TC2 απάντηση</i>
<i>Measles</i>	<i>H</i>	<i>TH2 απάντηση</i>
<i>Influenza virus</i>	<i>M</i>	<i>TH1 προστασία</i>
<i>ΥΚ ΗΤΕ Σ</i>		
<i>Candida</i>	<i>M</i>	<i>TH1 προστασία</i>
<i>ΒΑΚ ΤΗΡ ΙΑ</i>		
<i>Mycobacterium tubercul.</i>	<i>H</i>	<i>TH1 απάντηση</i>
<i>M. Leprae</i>	<i>H</i>	
<i>Chlamydial Infection</i>	<i>M</i>	<i>TH1 προστασία</i>
<i>Listeria monocytogenei</i>	<i>M</i>	<i>TH1 απάντηση</i>
<i>ΥΤ ΟΑ ΝΟ ΣΑ</i>		
<i>Psoriasis vulgaris</i>	<i>H</i>	<i>TH1 απάντηση</i>
<i>Multiple sclerosis</i>	<i>H</i>	<i>TH1 anti-MBP</i>
<i>IDDM</i>	<i>H</i>	<i>TH1;</i>
<i>Rheumatoid arthritis</i>	<i>H</i>	<i>TH1 απάντηση</i>

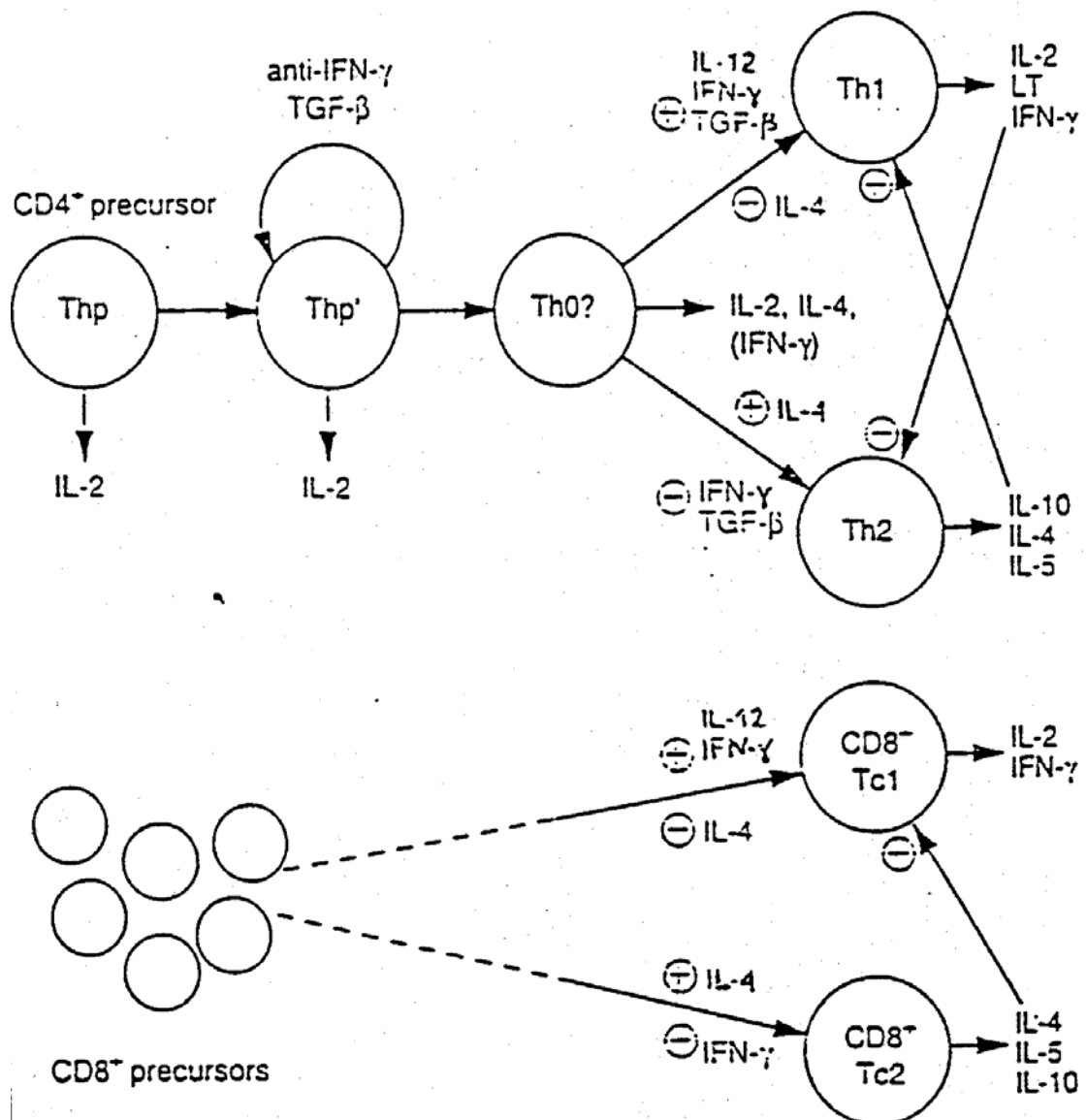
ΛΛΕ ΡΓΙ Α		
<i>Αλλεργία</i>	<i>H</i>	<i>TH2 απάντηση</i>
<i>Ατοπικό άσθμα</i>	<i>M</i>	<i>TH2 απάντηση</i>
ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ / ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ		
<i>Αποβολή μοσχέυματος</i>	<i>M</i>	<i>TH1 απάντηση</i>
	<i>H</i>	<i>TH1 απάντηση</i>
<i>Εγκυμοσύνη</i>	<i>H</i>	<i>TH1 καταστολή</i>
	<i>M</i>	<i>TH1 βλάβη</i>
		<i>TH2 προστασία</i>

M: ποντίκι

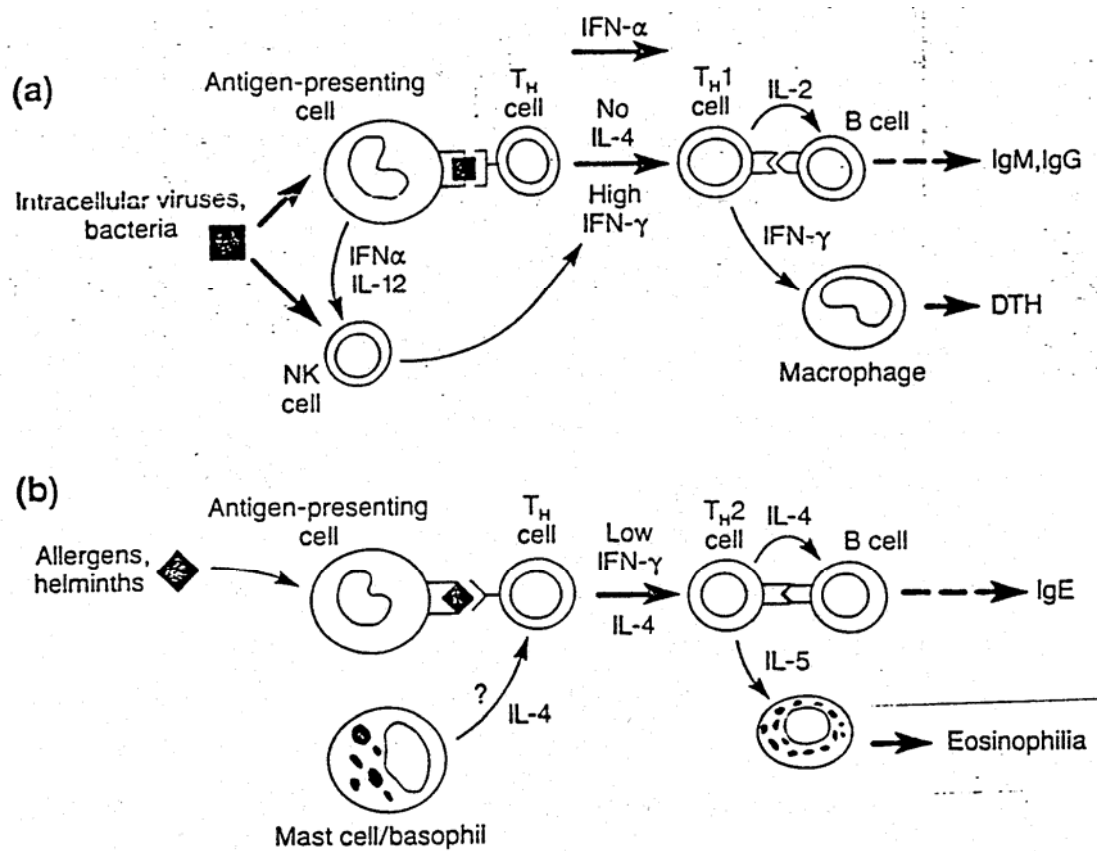
H: άνθρωπος

MBP: Myelin basic protein

IDDM: Insulin-dependent diabetes mellitus



Εικόνα 4: Πρότυπα διαφοροποίησης των CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων από ένα αρχέγονο Thp κύτταρο το οποίο δεν εκκρίνει IL-4, IFN- γ . (Mosmann & Sad, 1996).



Εικόνα 5: Πρότυπο διαφοροποίησης των T_H και NK λεμφοκυττάρων ανάλογα με το πιθανό αντιγόνο που έχουν να αντιμετωπίσουν. (Romagnani S et al 1996).

1.5 ΠΩΣ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΟΙ ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

Όπως είναι γνωστό τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα της μητέρας διεγερόμενα από ημιαλλογενετικά MHC αντιγόνα του πλακούντα εκκρίνουν λεμφοκίνες, καθοδηγώντας έτσι την πορεία της εγκυμοσύνης. Σε μια μελέτη της Athanassakis-Vassiliadis et al (1993) αποδείχθηκε ότι T λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο φθαρτό παράγουν IL-3 και GM-CSF, παράγοντες που προάγουν την τροφοβλαστική ανάπτυξη και την λειτουργία του πλακούντα ενώ έχουν προστατευτικό αποτέλεσμα στο έμβρυο (Athanassakis et al 1987, Chaouat et al 1988, Chaouat et al 1990). Σε αυτή τη θετική για την εγκυμοσύνη επίδραση των IL-3 και GM-CSF φαίνεται να συμβάλλει και η CSF-1 κυτοκίνη που παράγεται, κυρίως από τη μήτρα. Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι οι IL-3, GM-CSF, CSF-1 παράγονται από σπληνικά T λεμφοκύτταρα και εκκρίνονται στον ορό σε συγκεκριμένο χρόνο στο πρώτο ήμισυ της εγκυμοσύνης, ενισχύοντας την άποψη ότι T λεμφοκύτταρα που μετέχουν στις κυτταρομεσολαβητικές αντιδράσεις του πλακούντα-εμβρύου, μεταναστεύουν και από την σπλήνα (Tsoukatos et al, Athanassakis et al 1996).

Οι παραπάνω κυτοκίνες εκκρίνονται όπως έχουμε δει στον πίνακα 1 από τα 'ουδέτερα' T (Th0) και τα Th2 λεμφοκύτταρα. Στην αναζήτηση του τύπου κυτοκινών που εκκρίνονται από τα T λεμφοκύτταρα στην μητρο-εμβρυϊκή επαφή βρέθηκε ότι οι παράγοντες IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 ανιχνεύονται σε υπερκείμενα κυττάρων σε όλα τα τρίμηνα της εγκυμοσύνης. Η IFN-γ βρίσκεται μόνο στα υπερκείμενα από το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, στην συνέχεια μειώνεται σε οριακές τιμές και εξαφανίζεται στο τρίτο τρίμηνο. Η πλακουντική IL-10 προοδευτικά ρυθμίζει την ελάττωση της τοπικής παραγωγής της IFN-γ ίσως και των άλλων Th1 (ή φλεγμονωδών) κυτοκινών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Donnell et al 1995, Lin et al 1993). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν μια ρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος της μητέρας από τις Th2 κυτοκίνες.

Ενίσχυση της θεωρίας ότι η εγκυμοσύνη είναι Th2 φαινόμενο, προκύπτει ακόμη από αποτελέσματα των Athanassakis et al (1996), όπου ενώ ανιχνεύεται IL-4 στο μητρικό ορό εγκύων ποντικών δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα IL-2. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο παράγοντας TNF-α, ο οποίος ανιχνεύεται σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες στο δεύτερο μισό της κύησης και παράγεται είτε από Th0 ή Th2 ή Tc2 (Mossmann & Sad, 1996).

Ο παράγοντας TNF-α που χαρακτηρίζεται κυρίως για τα κυττολυτικά ή κυτταροστατικά του αποτελέσματα παράγεται όχι μόνο από T λεμφοκύτταρα αλλά και από μακροφάγα, NK κύτταρα του φθαρτού (Parr et al 1995), όπως και τα PIBF-θετικά λεμφοκύτταρα (PIBF/progesterone-induced blocking factor) που 'ελέγχουν' την ενεργότητα των NK στα ποντίκια και αυξάνονται σημαντικά κατά την εγκυμοσύνη (Szekeres-Bartho et al 1995). Πάντως ανεξάρτητα από το μηχανισμό επαγωγής, η αύξηση του TNF-α στο δεύτερο μισό της κύησης σχετίζεται με τη συμμετοχή του στον τερματισμό της κύησης καθώς και την έναρξη συσπάσεων στη μήτρα μέσω της διέγερσης του μονοπατιού των προσταγλαδινών για την επαγωγή οδυνών (Wegmann et al 1993) κατά τον τοκετό.

Η παραγωγή πλακουντικών κυτοκινών Th2 δεν μπορεί να έχει μόνο θετικό αποτέλεσμα στις εγκυμοσύνες. Πράγματι η κυριαρχία των Th2 σε σχέση με τις Th1 κυτοκίνες έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της συστηματικής απάντησης απέναντι σε μολύνσεις από μικροοργανισμούς. Έτσι στην εγκυμοσύνη η μητρική άμυνα είναι ανεπαρκής στις Λιστέρια, Τοξόπλασμα, και στα ενδοκυττάρια μυκοβακτήρια της Λέπρας και της Φυματίωσης (Mossmann et al 1996).

Παρ' όλα αυτά ελάττωση των Th2 «κυτοκινών» κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να οδηγήσει σε φτωχή λειτουργία του πλακούντα, ανώμαλη ανάπτυξη και πιθανά εμβρυϊκό θάνατο (Raghupathy et al 1997). Αύξηση των φλεγμονωδών κυτοκινών μπορεί να οδηγήσει σε αντίστοιχα καταστροφικά αποτελέσματα είτε με άμεση εμβρυοτοξική αντίδραση (Hill et al 1991, Haimoniei et al 1993) είτε καταστρέφοντας την τροφοβλαστική ανάπτυξη (Hunt et al 1990) είτε επάγοντας υπερέκφραση κλασσικών αντιγόνων MHC τάξης I στα τροφοβλαστικά κύτταρα (Anderson et al 1985), είτε ενεργοποιώντας NK κύτταρα που επάγουν LAK κύτταρα παρουσία IL-2 (Drake et al 1989). Έτσι η IFN-γ αναστέλλει την ανάπτυξη της τροφοβλάστης *in vitro* και προκαλεί

εκφυλισμό των βλαστοκυστεών (Haimoniei et al 1991) ενώ η χορήγηση της σε μικρές δόσεις κατά την διάρκεια της κύησης οδηγεί σε εμβρυϊκή αποβολή (Athanasakis et al 1996). Η IFN- γ και ο TNF- α αναστέλλει την εμβρυϊκή ανάπτυξη όπως και τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων τροφοβλαστικών σειρών (Berkowitz et al 1988). Πολλοί μηχανισμοί εξηγούν με ποιο τρόπο η IFN- γ οδηγεί σε ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη: α) η IFN- γ ενεργοποιεί τα «βλαβερά» NK κύτταρα, β) αναστέλλει την έκκριση του GM-CSF από το επιθήλιο της μήτρας, γ) καταστρέφει άμεσα τον τροφοβλαστικό ιστό (Wegmann et al 1993), δ) επάγει τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, ε) επάγει μονοξείδιο του αζώτου.

Σε διασταυρώσεις ποντικών με πολύ υψηλή συχνότητα αποβολών (CBA/J x DBA/2), ο πλακούντας προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής των IL-2, IFN- γ , TNF- α από μητρικά λεμφοκύτταρα σε σχέση με φυσιολογικές εγκυμοσύνες CBA/J x BALB/C (Tangri et al 1994, Tangri & Raghupathy, 1993).

Ο ρόλος των Th1 κυτοκινών μελετήθηκε και στις επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές (RSA) που απαντούν στον άνθρωπο σε ποσοστό 31% και χαρακτηρίζονται ως ανοσολογικές αποβολές. Οι Yamanta et al (1994) και Hill et al (1995) έδειξαν ότι τροφοβλαστικά αντιγόνα ενεργοποιούν τα λεμφοκύτταρα στις γυναίκες με RSA και παράγουν εμβρυοτοξικές κυτοκίνες IFN- γ και TNF- β . Περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος (PBMC) σε ένα σημαντικό ποσοστό γυναικών με ιστορικό RSA έδειξαν μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό και έκκριση διαλυτών παραγόντων με τοξικότητα σε έμβρυα ποντικών και ανθρώπινες τροφοβλαστικές κυτταρικές σειρές. Οι Hill et al (1995) μελετώντας 244 γυναίκες με ανεξήγητες RSA έδειξαν ότι σε 160 περιπτώσεις τα PBMC ανταποκρίνονταν *in vitro*, στα τροφοβλαστικά αντιγόνα με παραγωγή υψηλών επιπέδων IFN- γ και TNF- β αλλά χαμηλών IL-4 και IL-10. Οι Kwak et al 1995 έδειξαν ότι αυτά τα περιφερικά λεμφοκύτταρα του αίματος έχουν ενεργότητα NK (CD56+, CD56+/CD16+) ενώ αυξημένα ήταν και τα B λεμφοκύτταρα (CD19+). Σε άλλη εργασία εξετάζοντας γυναίκες με ιστορικό RSA παρατήρησαν ότι ένας αριθμός ασθενών είχε ανεπαρκή 'κατασταλτικά' κύτταρα και υψηλά επίπεδα παράγοντα TGF β -2 (transforming growth factor β -2), υποστηρίζοντας έτσι ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες

εκτός των Th1 κυτοκινών που επηρεάζουν τις επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές (Lea et al 1995).

Όπως είδαμε παραπάνω ο ανθρώπινος οργανισμός προστατεύεται από εξωγενείς ή ενδογενείς παράγοντες ενεργοποιώντας Th1 ή Th2 απαντήσεις. Φαίνεται λοιπόν ότι μια ισχυρή Th1 απάντηση σε κάποια μόλυνση κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή. Πράγματι οι Krishnan et al (1995) έδειξαν σε έγκυα ποντίκια C57BL/6 ότι η Th1 απάντηση σε *Leishmania major* αυξάνει την αποτυχία εμφύτευσης της βλαστοκύστης και επιπλέον αυξάνει τις εμβρυϊκές αποβολές, γεγονότα που συνοδεύονται από αύξηση των επιπέδων της IFN- γ στα πλακουντικά κύτταρα και ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της IL-10. Είναι λοιπόν πιθανόν μια βακτηριακή μόλυνση να αποδιοργανώνει το λόγο Th1/Th2 σε μια εγκυμοσύνη τόσο τοπικά όσο και συστηματικά με αποτέλεσμα την αποβολή του εμβρύου (Picot et al 1994, Peryra et al 1991, Tufano et al 1991, Stuart et al 1989).

Οι Th1 κυτοκίνες δεν είναι βλαβερές σε όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, διότι φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην αρχή και στο τέλος της κύησης. Η εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο είναι μια φλεγμονώδης αντίδραση και ίσως οι Th1 κυτοκίνες έχουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Έτσι παρατηρείται αύξηση της IFN- γ στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης και μείωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Επιπλέον πρέπει να σημειωθεί ότι οι παράγοντες TNF και IFN- γ αργότερα λαμβάνουν μέρος στον τερματισμό της εγκυμοσύνης και έναρξη του φυσιολογικού τοκετού.

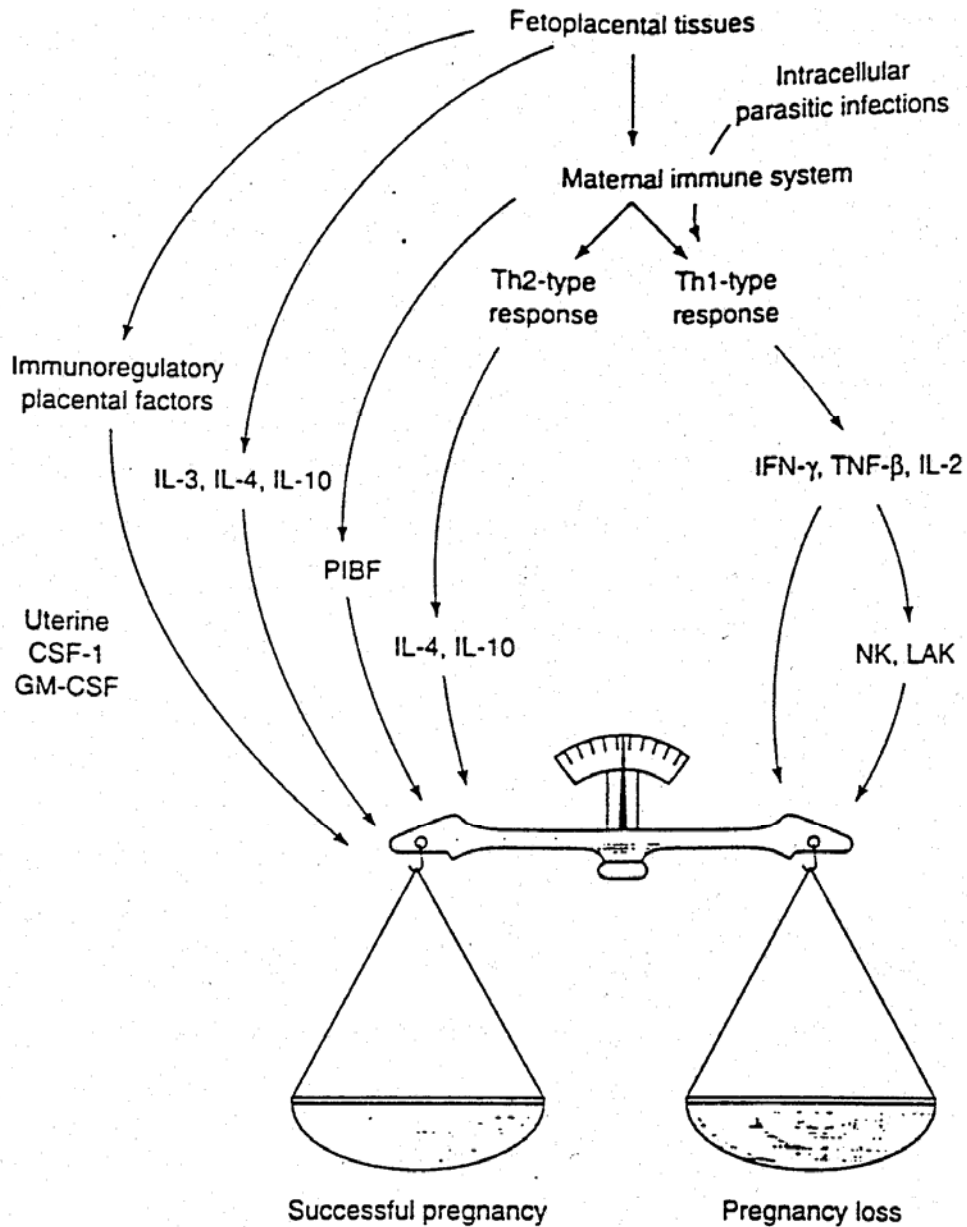
Όλα τα παραπάνω επισημαίνουν το γεγονός ότι για τη διατήρηση της φυσιολογικής εγκυμοσύνης απαιτείται μια ισορροπία παραγωγής μεταξύ των κυτοκινών Th2 και Th1 (εικόνα 6, Raghupathy 1997). Η ανοσολογική ισορροπία της εγκυμοσύνης μπορεί να επηρεαστεί από ορμονικές διαταραχές. Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) προάγει τη διαφοροποίηση των κυτταροβλαστών σε συγκιοτροφοβλάστες. Η προγεστερόνη ευνοεί την εμφύτευση ενώ ενεργοποιεί τα κύτταρα του φθαρτού. Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα η προγεστερόνη επάγει την παραγωγή ενός μορίου 34KDa του PIBF το οποίο καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων όταν διεγείρονται μιτογονικά καθώς και την ενεργοποίηση των NK κυττάρων και την παραγωγή TNF από αυτά (Szekeres-Bartho et al 1989). Οι ορμόνες όπως η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) και προγεστερόνη εκτός από την

σημαντική τους δράση στην έναρξη, εξέλιξη και αποπεράτωση της κύησης, ρυθμίζουν και τα γονίδια των κυτοκινών (π.χ. TNF).

Όπως προαναφέρθηκε οι περισσότερες αυτοάνοσες ασθένειες σχετίζονται με Th1 απαντήσεις και παραγωγή IL-2 και IFN- γ (Romagnani et al 1994) και συνεπώς αλλαγή του προτύπου κυτοκινών (Cowchock et al 1986). Το γεγονός ότι πολλές γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών έπασχαν από αυτοάνοσα νοσήματα (Ruiz et al 1995), οδήγησε στην καθιέρωση του ελέγχου αυτοαντισωμάτων στον ορό (αντιφωσφολιπιδικά αυτοαντισώματα του πλακούντα, αυτοαντισώματα για πυρηνικές, θυροειδικές πρωτεΐνες και αντιπηκτικών αντισωμάτων του λύκου).

Στον ορό γυναικών με προβλήματα επαναλαμβανόμενων αποβολών έχουν ακόμα ανιχνευθεί εμβρυοτοξικά αντισώματα τα οποία αφού διαπεράσουν τον πλακουντικό φραγμό ενεργοποιούν καταστροφικούς μηχανισμούς στο έμβρυο. Οι Leach et al 1996 πρότειναν ότι τα εμβρυοτοξικά και γενικά τα μητρικά IgG αντισώματα μεταφέρονται από τον πλακούντα στην εμβρυϊκή κυκλοφορία με ένα μεταφορέα IgG που δεν έχει ταυτοποιηθεί, αν και ένα ανθρώπινο ετεροδιμερές με IgG συγγένεια εξαρτώμενη από το pH, δομικά όμοια με το MHC τάξης I και ομόλογο του Fc μορίου του νεογνού αρουραίου (FcRn) είναι ένας πιθανός υποψήφιος. Το πλακουντικό hFcRn (human FcRn) ετεροδιμερές ίσως μεταφέρει το IgG αντίσωμα στο έμβρυο με μηχανισμό όπου το μητρικό IgG ενδοκυττώνεται μη ειδικά και έπειτα μεταφέρεται στους εμβρυϊκούς ιστούς μέσω μιας διαβάθμισης του pH από όξινα ενδοσώματα σε ουδέτερη πλαγιοβασική μεμβράνη της σπυγκυτιοτροφοβλάστης. Επιπλέον τα γνωστά χαρακτηριστικά του FcRn υποθέτουν ότι αυτός ο MHC τάξης I σχετιζόμενος υποδοχέας έχει ευρύτερη λειτουργία (Ghetie & Ward, 1997).

Τέλος η κατάσταση του νευρικού συστήματος επηρεάζει την δράση και παραγωγή κυτοκινών. Είναι άλλωστε ευρέως γνωστή η επίδραση του συστηματικού άγχους (stress) στην έκβαση της εγκυμοσύνης, όπου παρατηρείται είτε αύξηση των αποβολών είτε υπογονιμότητα.



Εικόνα 6: Απεικόνιση της σχέσης των Th2 και Th1 λεμφοκυττάρων σε μια επιτυχή εγκυμοσύνη. (Raghupathy et al 1997).

1.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ

Από τη στιγμή που η εμβρυο-πλακουντική μονάδα εκφράζει ένα μεγάλο αριθμό αλλοαντιγόνων και αυτοαντιγόνων, θα μπορούσε να γίνει η υπόθεση ότι αυτή η μητρική ευαισθητοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων που με τη σειρά τους διεγείρουν αυτοενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα για αύξηση ή παλίνδρομη ρύθμιση της ανοσοαπάντησης (Wolf-Levin et al 1996, Gill et al 1986, Clark et al 1986, Masset et al 1980).

Ένας μεγάλος αριθμός αναφορών έχει αποδείξει την ύπαρξη ανοσοκατασταλτικών παραγόντων στον ορό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Οι Roclin et al (1976) είχαν αποδείξει ότι ο ορός εγκύου περιέχει έναν ανοσοσφαιρινικό G (IgG) παράγοντα που εμποδίζει την παραγωγή του μεταναστευτικού κατασταλτικού παράγοντα (MIF) από μητρικά λεμφοκύτταρα. Ακολούθως αυτός ο παράγοντας είχε δειχθεί να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων σε μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση (Roclin et al 1982), ενώ δεν είναι περιορισμένος για MHC (non-MHC restricted). Οι Nicholas et al (1984) αναφέρουν ότι παράγοντες του ορού της εγκύου είναι ικανοί να καταστέλλουν την παραγωγή της IL-2 κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων, ενώ οι Domingo et al (1988) αναφέρουν ότι οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν την ικανότητα της IL-1 να διεγείρει την έκφραση της IL-2.

Ο ορός της εγκυμοσύνης φαίνεται να περιέχει μη ειδικούς ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες ικανούς να σταματήσουν την αντίδραση της κυτταρικής κυτταροτοξικότητας *in vitro* (Fizet & Bousquet 1983, Letellier et al 1994), να ενεργοποιήσουν τα μη κυτταροτοξικά "προστατευτικά" αντιπατρικά αντισώματα (Power et al 1983), να διεγείρουν την παραγωγή αυτο-αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων σε anti-HLA υποδοχείς (Sucia-Foca et al 1983).

Οι ορμόνες επίσης φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοκαταστολής. Η προγεστερόνη αναφέρεται ως τοπικός ανοσοκατασταλτικός παράγοντας στην μητρικό-εμβρυϊκή επαφή, πιθανά επηρεάζοντας την αναγνώριση και αυξητική φάση των ανοσολογικών αντιδράσεων (Van Vlasselear et al 1986, Gurka & Rockling 1987). Η ωχρινότροπος ορμόνη (LH) και χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) έδειξαν μια αξιοσημείωτη καταστολή στην ενεργότητα των NK λεμφοκυττάρων (Sulke et al 1985, Uksila et al 1985). Ακόμα και σύνθετες ορμόνες όπως η r.oTR [recombinant ovine interferon-tau(trophoblastin)] ή P₄ μπορούν να καταστείλλουν την ανοσοαπάντηση προστατεύοντας το έμβρυο από απόρριψη (Assal-Meliani et al 1995, Fizet et al 1990).

Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες πιστεύεται ότι και άλλες ουσίες παίζουν ρόλο στην καταστολή. Έτσι έχουν εντοπιστεί στην αρχή της εγκυμοσύνης παράγοντες EPFs (early pregnancy factors), οι οποίοι δρώντας στα λεμφοκύτταρα διεγείρουν την απελευθέρωση διαλυτικών παραγόντων που ενεργοποιούν τις T εξαρτώμενες λεμφοκυτταρικές αντιδράσεις, και καταστέλλουν την αντίδραση καθυστερημένης υπερευαισθησίας. Στο ποντίκι τέτοιοι παράγοντες είναι ο mEPF-S1 (15000 D), ο οποίος είναι περιορισμένος για MHC (MHC-restricted) και ο παράγοντας mEPF-S2 (55000 D) που είναι περιορισμένος σε ένα τόπο έξω από το MHC. Οι αντίστοιχοι παράγοντες στον άνθρωπο είναι οι hEPF-S1 (14-18000 D) και hEPF-S2 (50-60000 D) όπου ο πρώτος αντιστοιχεί σε λεμφοκυτταρικό αντιγόνο περιορισμένο στο HLA και ο δεύτερος εμφανίζεται περιορισμένος σε τόπο εκτός του HLA (Rolfe et al 1988, Rolfe et al 1989).

Επίσης έχει βρεθεί ένας θερμοανθεκτικός παράγοντας που καταστέλλει αντιστρεπτά την ενεργοποίηση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε καλλιέργεια ανθρώπινου πλακουντικού χορίου και καταστέλλει τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό σε απάντηση πολυκλωνικών μιτογόνων και σε μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση. Αυτός ο παράγοντας είναι ευαίσθητος στην πρωτεΐνωση K, πεψίνη, παγκρεατική πρωτεΐνωση βοοϊδών, εμποδίζει την έκφραση των IL-2 υποδοχέων και των τάξης II MHC γλυκοπρωτεϊνών (HLA-DR) στα διεγερμένα PBMC κύτταρα από φυτοαιμογγλουτινίνη αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση των MHC τάξης I μορίων (Skibin et al 1989).

Τέλος οι κυτοκίνες στις οποίες έχει γίνει εκτεταμένη αναφορά στις προηγούμενες σελίδες παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατασταλτική δράση του μητρικού ορού έμμεσα ή άμεσα.

1.7 ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΠΩΣ ΑΥΤΟ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

A) ΓΕΝΙΚΑ

Όπως προαναφέραμε τα εμβρυϊκά MHC αλλοαντιγόνα παρουσιάζονται από τον πλακούντα στο ανοσολογικό σύστημα της μητέρας, δίνοντας ανοσοκατασταλτικά ή ανοσοτροφικά σήματα για την ολοκλήρωση της εγκυμοσύνης ή τη διακοπή της. Στην επιφάνεια των κυττάρων τα τάξης I μόρια αναγνωρίζονται από CD8+T λεμφοκύτταρα (Tc/s) ενώ τα τάξης II μόρια αναγνωρίζονται από CD4+T λεμφοκύτταρα (Th) και τα δύο μέσω ειδικών υποδοχέων TCR (α/β ή γ/δ) των παραπάνω λεμφοκυττάρων.

Τα μόρια MHC τάξης I και II είναι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες με σχετικά κοινή δομή και λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, τα τάξης I μόρια αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες την α (ή βαριά αλυσίδα) και την β_2 μικροσφαιρίνη (β_2 -microglobulin) ενώ τα τάξης II μόρια σχηματίζονται από δύο αλυσίδες τις α και β (Bell et al 1985, Strominger et al 1995, Cresswell et al 1994).

Τα γονίδια του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) βρίσκονται στο χρωμόσωμα 17, ενώ το γονίδιο που κωδικοποιεί για την β_2 μικροσφαιρίνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 στο ποντίκι ενώ το ανάλογο σύστημα στον άνθρωπο ονομάζεται HLA και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 ενώ η β_2 μικροσφαιρίνη στο χρωμόσωμα 15. Και στα δύο είδη υπάρχουν τρία κλασικά γονίδια τάξης I τα οποία ονομάζονται HLA-A, -B, -C στον άνθρωπο και H2-K, -D, -L στο ποντίκι. Στον άνθρωπο βέβαια έχουν βρεθεί και τρία μη κλασικά γονίδια τάξης I ή Ib που όλα έχουν την β_2 μικροσφαιρίνη και ονομάζονται HLA-E, -F, -G (Wei et al 1990). Στο ίδιο σύμπλοκο βρίσκονται και τα γονίδια τάξης II HLA-DR, -DQ, -DP, -DM για τον άνθρωπο ενώ για το ποντίκι τα H2-A, -E, -M,

-Ο. Τέλος υπάρχει και μια γονιδιακή περιοχή τάξης III όπου κωδικοποιούνται πρωτεΐνες συμπληρώματος (C_4) και οι κυτοκίνες $TNF\alpha, \beta$.

Το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας έχει δυο βασικά πλεονεκτήματα για την άμυνα του οργανισμού απέναντι στην επίθεση πληθώρας παθογόνων.

Πρώτον είναι πολυγονιδιακό, δηλαδή έχει πολλά διαφορετικά τάξης I και II γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με διαφορετική ειδικότητα σύνδεσης αντιγονικών επιτόπων και δεύτερον είναι πολυμορφικό, δηλαδή υπάρχουν πολλαπλά αλληλία για κάθε γονίδιο με αποτέλεσμα να αυξάνει περισσότερο το φάσμα πεπτιδίων που αναγνωρίζονται.

B) MHC ΚΑΙ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του πλακούντα είναι η απουσία έκφρασης τάξης II αντιγόνων του κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τόσο από την σπογγιοτροφοβλαστική όσο και τη λαβυρινθική τροφοβλαστική ζώνη (Raghupathy et al 1981, Blummer & Johnson, 1985). Η διέγερση της έκφρασης των τάξης II πρωτεϊνών οδηγεί σε αποβολή (Athanasakiss-Vassiliadis & Paramatheakis, 1991). Είναι γνωστό ότι η έκφραση των τάξης II MHC ρυθμίζεται από την $IFN-\gamma$ θετικά, από τον $TGF-\beta_2$ αρνητικά ενώ θετικά και αρνητικά από τον $TNF-\alpha$ σε μεταγραφικό επίπεδο (Athanasakiss-Vassiliadis et al 1989, Panek et al 1992). Η επαγωγή μορίων τάξης II στην σπογγιοτροφοβλαστική ζώνη από $IFN-\gamma$ και $poly I-C$ ή στην λαβυρινθική ζώνη από 5-Azac έχει δειχθεί να οδηγεί σε εμβρυϊκή αποβολή ή σε υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (Vassiliadis et al 1994, Athanasakiss-Vassiliadis 1990, Chaout & Athanasakiss, 1992). Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στον άνθρωπο όπου έκφραση HLA-DR στον πλακούντα συνοδεύεται με εμβρυϊκές αποβολές και αυξημένη παραγωγή ανοσοσφαιρινών (Athanasakiss, 1995). Είναι φανερό ότι η αλληλεπίδραση της λαχνώδους σπογγιοτροφοβλάστης με τάξης II αντιγόνα, τόσο σε φυσιολογικό πλακούντα, όσο και σε πλακούντα από γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αυτόματων αποβολών οφείλεται σε πρόσδεση τάξης II αντιγόνων σε υποδοχείς που αναπτύσσονται στην περιοχή των λαχνών (Labarrere & Faulk, 1990).

Ενώ η απουσία τάξης II αντιγόνων από τους τροφοβλάστες εξασφαλίζει την ανοχογονικότητα του πλακούντα, η ύπαρξη μη κλασσικών τάξης I μορίων εξασφαλίζει την αλλοαναγνώριση του εμβρύου και την ενεργοποίηση του

μητρικού οργανισμού. Το HLA-G μη κλασσικό τάξης Ib αντιγόνο εκφράζεται στην κυτοτροφοβλαστική ζώνη του ανθρώπινου πλακούντα (Kovats et al 1990, Carosella et al 1995), όπως και στον αμνιακό σάκκο (Houlihan et al 1995).

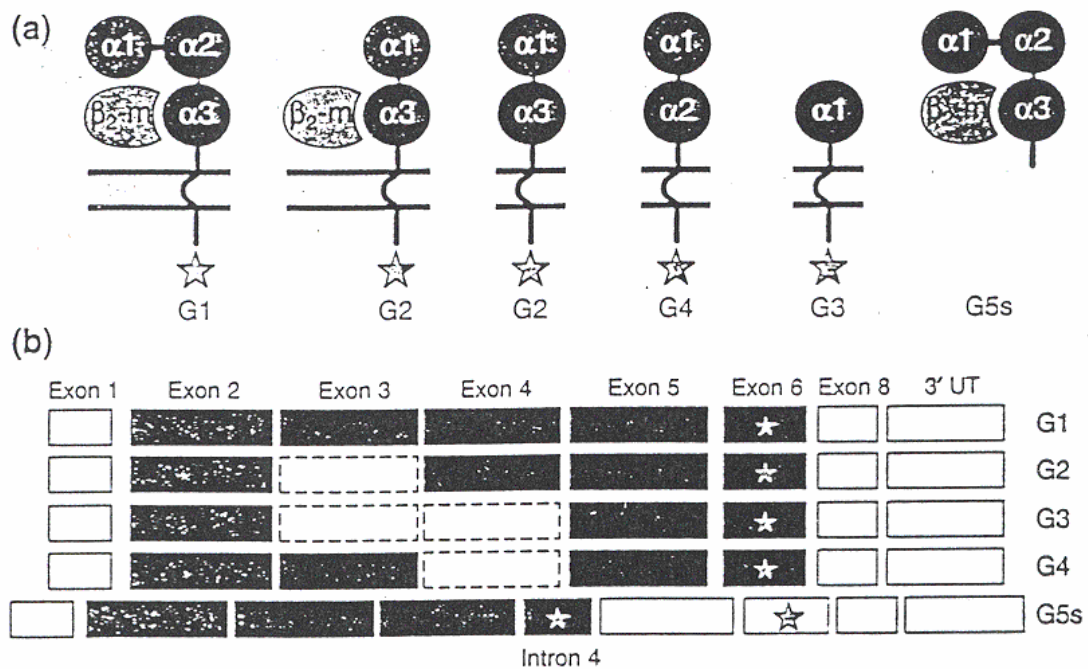
Το γονίδιο HLA-G έχει δομή και ακολουθία υψηλής ομολογίας με τα κλασσικά γονίδια HLA τάξη I με 8 εξόνια, 7 ιντρόνια και μια 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή. Το αρχικό μετάγραφο του HLA-G γονιδίου έχει εναλλακτικό μάτισμα (splicing) σε 6 μορφές mRNA (HLA-G1 ως HLA-G6) [εικόνα 7], δύο εκ των οποίων κωδικοποιούν για διαλυτές μορφές των HLA-G αντιγόνων (HLA-G5 & HLA-G6) ενώ όλες οι μορφές ανιχνεύονται στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (Carosella et al 1995, Carosella et al 1996, Kitszenbaum et al 1994). Πιθανοί διαφορετικοί μοριακοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί ελέγχουν την έκφραση των τάξης Ia και τάξης Ib μορίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το στάδιο διαφοροποίησης και το στάδιο της εγκυμοσύνης (Le Bouteiller et al 1996).

Οι Le Bouteiller P & Mallet (1997) ανίχνευσαν 2 ισομορφές του HLA-G, ικανές για πρόσδεση του ίδιου αριθμού ενδοκυττάρων πεπτιδίων. Ο υποδοχέας τους περιέχει τρία αμινοξέα -άγκυρες- που είναι όμοια με τα κλασσικά HLA I μόρια. Οι διαφορετικές αυτές μορφές πιθανόν να αντανakλούν τη διαφορετική ικανότητα επαγωγής κυτοτοξικών T λεμφοκυττάρων ή καταστολής της λειτουργίας των φυσικών φονιάδων (NK) τουλάχιστον στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (Burt et al 1991, Deniz et al 1994). Η χαμηλή πολυμορφικότητα του γονιδίου όπως αναφέρεται από τους παραπάνω συγγραφείς υποθέτει ότι το HLA-G είναι ένα κοινό δεσμευτικό μόριο για τον υποδοχέα των NK λεμφοκυττάρων το οποίο προστατεύει τους τροφοβλάστες και προσφέρει ανοσολογική ανοχή στον εμβρυϊκό ιστό. Επίσης η αλληλεπίδραση των Tγ/δ λεμφοκυττάρων του φθαρτού με τα μη κλασσικά τάξης I αντιγόνα HLA-G (Porcellis et al 1989, Faure et al 1990) είναι πιθανόν να προστατεύει από μολυσμένους ή μεταμορφωμένους εξωλαχνικούς τροφοβλάστες (Mincheva- Nilsson et al 1994).

Η ικανότητα του HLA-G να διεγείρει CD8+ T λεμφοκύτταρα και να αναγνωρίζει μάρτυρες διαφοροποίησης στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών, υποθέτει ότι το HLA-G μπορεί να λειτουργεί ως αναγνωριστικός και ως ενεργοποιητικός

παράγοντας για τα CD8+ κατασταλτικά/κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. (Stoynowski I. & Lindahl 1994, Sanders et al 1991).

Τα αντιγόνα τάξης I και II βρίσκονται και ως διαλυτά αντιγόνα στον ορό. Οι μελέτες είναι εκτεταμένες κυρίως στον άνθρωπο. Έτσι έχει βρεθεί ότι διαλυτά τάξης I αντιγόνα αυξάνονται στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, ενώ μειώνονται σε χαμηλότερα από τα φυσιολογικά όρια στο τρίτο τρίμηνο, για να ομαλοποιηθεί η τιμή τους στη μεταλόχεια περίοδο (Inostroza et al 1997). Φαίνεται επίσης ότι τα διαλυτά HLA αντιγόνα προκαλούν την παραγωγή αλλο- και αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων που καταστέλλουν τα πρώτα (Reed et al 1991).



Εικόνα 7: Προτεινόμενες δομές των HLA-G πρωτεϊνών. (Carosella et al 1996).

1.8 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΟ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

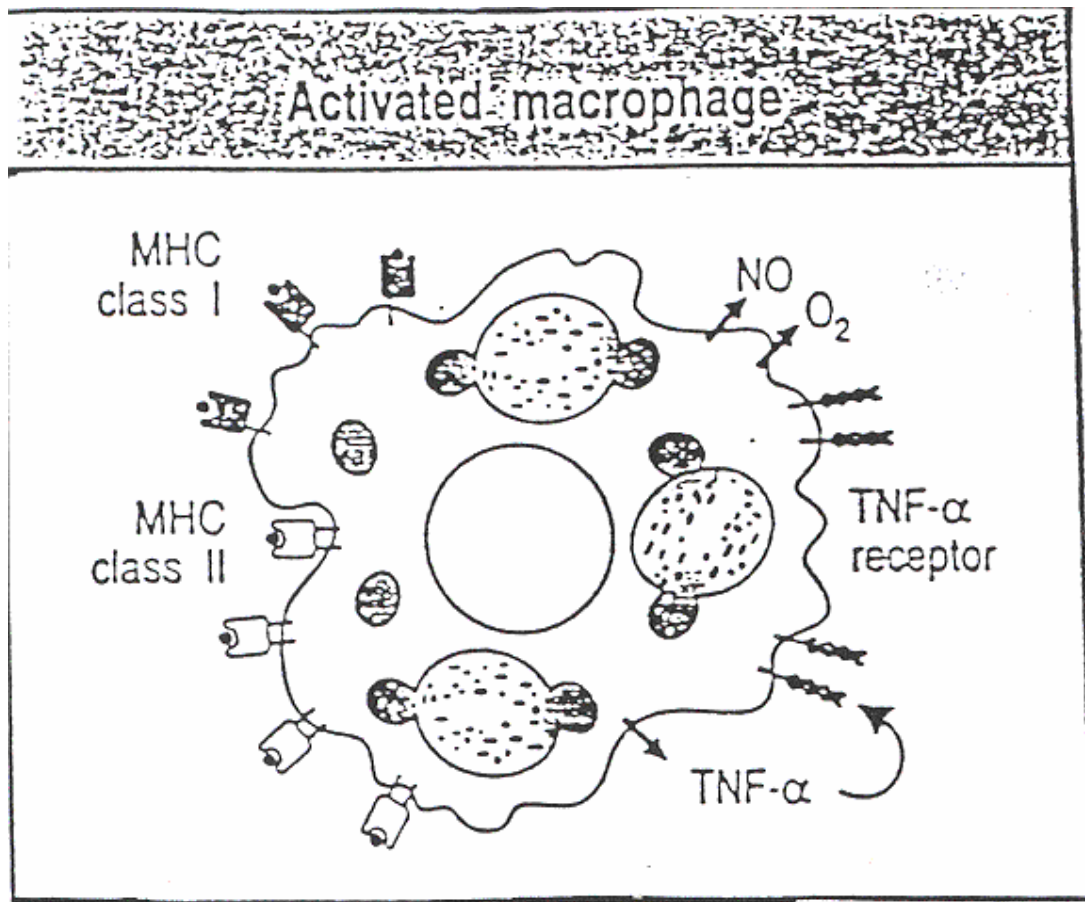
Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι ένα μόριο που παράγεται από μεγάλο αριθμό κυττάρων και συμμετέχει στο μεταβολισμό και φυσιολογία του οργανισμού. Το NO παράγεται κατά την οξειδωση των αμινοξέων L- αργινίνης και L-κιτρουλίνης παρουσία του ενζύμου συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO synthase –NOS). Η συνθάση του NO παρουσιάζεται με τρεις διαφορετικούς ισότυπους καθένας με διαφορετική χρωμοσωμική και ιστική κατανομή (Moncada et al 1992, Lowenstein & Snyder, 1992, Marletta 1993). Έτσι το ένζυμο cNOS (cerebral NOS) εντοπίζεται στο νευρικό ιστό, το eNOS (endothelial iNOS) εντοπίζεται στον ενδοθηλιακό ιστό και το iNOS (inducible iNOS) εκφράζεται σε μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Ο ενδοθηλιακός (eNOS) και νευρικός (cNOS) ισότυπος συσχετίζεται με την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και τη νευροδιαβίβαση, ενώ ο επαγόμενος τύπος (iNOS) έχει συσχετιστεί με τον μακροφαγικό μηχανισμό άμυνας σε μολύνσεις εξαιτίας της καταλυτικής δράσης του στην παραγωγή υψηλών και τοξικών ποσοτήτων (Lowenstein & Snyder, 1992, Lamas et al 1992, Xie et al 1992). Ο iNOS ισότυπος εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στα μακροφάγα όταν αυτά ενεργοποιηθούν από IFN-γ και βακτηριακή LPS. Ωστόσο παράγοντες όπως ο TNF-α (Drapier et al 1988), IL-2 (Cox et al 1992) και πικολινικό οξύ (Melillo et al 1994) σε συνδιασμό με την IFN-γ (Sheffler et al 1995) διεγείρουν την έκφραση iNOS στα μακροφάγα. Άλλοι παράγοντες όπως οι IL-4, IL-10, TGF-β, (Liew et al 1991, Gazzinelli et al 1992, Oswald et al 1992) έχουν αναφερθεί να καταστέλλουν την έκφραση του iNOS στα μακροφάγα σε μικρές ποσότητες LPS.

Φαίνεται λοιπόν ότι το NO ενώ επάγεται στους διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως μακροφάγα (ένα πιθανό μοντέλο φαίνεται στην εικόνα 8), ενδοθηλιακά κύτταρα ή β-παγκρεατικά κύτταρα (Xie et al 1992, Reimers et al. 1994, Oswald et al 1994) και αποτελεί έναν κύριο διαβιβαστή διέγερσης ενάντια σε μικροοργανισμούς όπως χλαμύδια (Igiestem et al 1996), *Staphylococcus aureus* & *Streptococcus pyrogenes* (Sriskandan et al 1996), ελονοσίας (Jacobs et al 1995) κ.α. έχει ανιχνευθεί σε περιπτώσεις απόρριψης του μωσχεύματος και καρκινικά κύτταρα. Η αύξηση της συγκέντρωσης NO φαίνεται ακόμα να ρυθμίζει παλίνδρομα την έκφραση της επαγόμενης NOS για αποφυγή τοξικότητας.

Το NO εξ' αιτίας της αγγειοδιασταλτικής του λειτουργίας συμμετέχει στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Έτσι οι Myatt et al (1991) διατύπωσαν την άποψη ότι το NO που δημιουργείται στην ανθρώπινη έμβρυο-πλακουντική κυκλοφορία συμμετέχει στον έλεγχο του βασικού αγγειακού τόνου και δρά κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης ως αγγειοδιαστολέας (Myatt et al 1992). Επίσης η συνθάση (eNOS) τύπου III εξαρτώμενη από Ca^{+2} ανιχνεύθηκε στις αρτηρίες του χορίου, της συγκιοτροφοβλάστης και του ομφαλού (Myatt et al 1993).

Το γεγονός ότι το NO εμπλέκεται στην εγκυμοσύνη, ώθησε τους επιστήμονες στην ανίχνευση του σε παθολογικές ή φυσιολογικές κυήσεις. Διαπιστώθηκε ότι το NO είναι αυξημένο στην εμβρυοπλακουντική κυκλοφορία, στην ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (Lyll et al 1996) καθώς και σε περιπτώσεις προεκλαμψίας (Lyll et al 1995). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τους ερευνητές να διατυπώσουν την άποψη ότι η αύξηση της παραγωγής NO μπορεί να είναι επανορθωτική απάντηση που οδηγεί στην βελτίωση της ροής αίματος ή στον περιορισμό της συσσώρευσης και προσκόλησης των αιμοπεταλίων καθώς και της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης. Η παρουσία ενεργότητας iNOS στους συγκιοτροφοβλάστες του ανθρώπινου πλακούντα μαζί με το εμβρυοπλακουντικό ενδοθήλιο αναμφίβολα συμβάλλουν στην παραγωγή του NO κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Mc Layghlin & Conrad, 1995), ενώ η μείωση της μυοχαλαρωτικής του δράσης στον τοκετό δηλώνει ότι το NO παίζει ρόλο στην έναρξη οδυνών (Black et al 1996).

Σε παθολογικές καταστάσεις όπως η περίπτωση του διαβήτη εγκυμοσύνης παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της iNOS στον πλακούντα -κάτι που δεν παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες- (Schnefeld et al 1996), συνοδευόμενη από αύξηση αποβολών και επαγωγή κυτταροτοξικότητας οδηγώντας έτσι σε καταστροφή των β-κυττάρων (Corbett & Mc Daniel, 1992).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση ενεργοποιημένου μακροφάγου για την παραγωγή NO.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης διαφόρων παραγόντων στον ορό όπου κατά την διάρκεια της κύησης ανοσοκαταστέλλουν την ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων από ημιαλλογενετικό

πλακούντα. Έτσι εξετάστηκε αν ο ημιαλλογενετικός πλακούντας διεγείρει τα μητρικά σπληνικά T λεμφοκύτταρα. Έγινε απομόνωση των T λεμφοκυττάρων από σπλήνες εγκύων ποντικών στην 12η ημέρα εγκυμοσύνης και ελέγχθηκε η ενεργοποίησή τους από πρωτογενείς τροφοβλάστες. Επίσης έγινε αδρός χαρακτηρισμός του τύπου των λεμφοκυττάρων σπλήνας, των λεμφοκινών που εκκρίνουν και ελέγχθηκε ο ρόλος των παραγόντων του ποντικίσιου ορού από φυσιολογικές εγκυμοσύνες ή περιπτώσεις εμβρυϊκών αποβολών στην διέγερση των T λεμφοκυττάρων από τον πλακούντα.

Σ' ένα δεύτερο στάδιο εξετάστηκε η ύπαρξη διαλυτών τάξης I και τάξης II αντιγόνων τόσο στον ορό ποντικίου όσο και στον ανθρώπινο ορό σε διάφορες εβδομάδες κατά την διάρκεια του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης, μέσα στα πλαίσια της ανοσοτροφικής θεωρίας.

Τέλος ελέγχθηκε αν υπάρχει παραγωγή NO στο μητρικό ορό στο ποντίκι και στον άνθρωπο και αν έχει σημασία η παρουσία του σαν προγνωστικός δείκτης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήσαμε ήταν ποντίκια BALB/cJ (H-2K^d) ηλικίας 5-8 εβδομάδων. Τα ζώα αυτά εκτράφηκαν στη μονάδα πειραματοζώων του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Κάθε θηλυκό BALB/cJ ποντίκι ελέγχθηκε για οίστρο και τοποθετήθηκε σε κλουβί μαζί με ένα αρσενικό BALB/cJ. Η μέρα κατά την οποία θα παρατηρηθεί το κολπικό βύσμα, θεωρείται η μέρα μηδέν της εγκυμοσύνης.

2.3 In vivo χειρισμός των ζώων

Σε BALB/cJ θηλυκά, έγκυα, ενέθηκαν ενδοπεριτονιακά οι εξής παράγοντες: 1) Freund's adjuvant complete with *Mycobacterium tuberculosis* (50μl/ποντίκι συγκέντρωσης 1mg/ml στις ημέρες 5 και 7 της εγκυμοσύνης), 2) Freund's adjuvant incomplete (50μl/ποντίκι συγκέντρωσης 1mg/ml στις ημέρες 5 και 7 της εγκυμοσύνης), 3) Protein A (*Staphylococcus Aureus*) (100μl/ποντίκι συγκέντρωσης 20μg/ml στις ημέρες 6 και 8 της κυήσεως), 4) Muramic acid (*Staphylococcus Aureus*) (100μl/ποντίκι συγκέντρωσης 20μg/ml στις ημέρες 6 και 8 της κυήσεως).

Σε όλες τις περιπτώσεις τα ζώα θυσιάστηκαν την 12η ημέρα της εγκυμοσύνης όπου για κάθε ζώο καταγράφηκε ο αριθμός αποβολών, το βάρος των εμβρύων και του αντίστοιχου για κάθε έμβρυο πλακούντα, καθώς και το βάρος της σπλήνας του.

2.2 Αντιδραστήρια

1) Αντισώματα: Χρησιμοποιήσαμε τα εξής αντισώματα: α) μονοκλωνικά αντισώματα Thy1,2, Ly2, L3T4 (Sigma, St, Louis, MC), β) μονοκλωνικό αντίσωμα anti-mouse IgG FITC (Sigma), γ) μονοκλωνικό αντίσωμα anti-rat Ly5 (Caltag, SO, San Francisco, CA), δ) anti-rat peroxidase (Boehringer Mannheim GmbH), ε) μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Ia^d (IgG2a, Beckton Dickinson, Mechelin, Belgium) στ) μονοκλωνικά α-rat αντισώματα ενάντια στις κυτοκίνες: TNF-α, IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ (Endogen), ζ) υπερκείμενα καλλιέργειας των κυτταρικών υβριδίων HB-3 και HB159-k^d ως αντισώματα τάξης II και I αντίστοιχα στα ποντίκια, η) μονοκλωνικά αντισώματα H-81 και L-11 (Serotec), W6/32 (Serotec) για HLA-II και HLA-I για τον άνθρωπο.

2) Παράγοντες: 1) Freund's adjuvant complete with *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/ml, Sigma) 2) Freund's adjuvant incomplete (Sigma) 3) Protein A (1 mg/ml, Sigma) 4) Muramic acid (5 mg/ml, Sigma).

3) Αντιδραστήρια για το NO: 1) Greiss: το αντιδραστήριο Greiss που αποτελείται από ίσους όγκους, διαλύματος 1% σουλφανιλαμιδίου (sulfanilamide) σε 5% H_3PO_4 και διαλύματος 0.1 διχλωριδίου του ναφθυλεναδιαμιδίου (naphthylenediamide dihydrochloride) σε απιονισμένο H_2O .

2.4 Κυτταροκαλλιέργειες

Για τους πρωτογενείς τροφοβλάστες και τα λεμφοκύτταρα, ομογενοποιήσαμε τον πλακούντα 12^{ης} μέρας εγκυμοσύνης (αφού αφαιρέθηκε το στρώμα του φθαρτού) και τη σπλήνα αντίστοιχα και μετά την απομάκρυνση των ιστών (φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό), φυγοκεντρήσαμε στις 1200 στροφές για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Πετάξαμε το υπερκείμενο, επαναδιαλύσαμε το κυτταρικό ίζημα σε HBSS (Gibco) και επαναλάβαμε δύο φορές ακόμα την διαδικασία. Μετά από μέτρηση τα κύτταρα του πλακούντα τοποθετήθηκαν σε πλάκα Elisa 96 πηγαδιών (Sarstedt), σε συγκέντρωση 10⁶ κύτταρα/ml και σε τελικό όγκο 200 μl DMEM 10% FCS (Gibco). Ακολούθησε επώαση 7 ημερών για τους πλακούντες μέχρι να υπάρξει ένα ομογενές στρώμα κυττάρων. Αντιθέτως έγινε 2 ημερών επώαση στα σπληνοκύτταρα σε τρυβλίο επώασης σε επωαστήρα (Forma Scientific, USA) για προσκόληση των μακροφάγων. Στη συνέχεια έγινε απομάκρυνση των υπερκείμενων κυττάρων και διαχωρισμός T και B λεμφοκυττάρων.

2.5 Διαχωρισμός T- και B- λεμφοκυττάρων με έμμεση ανοσοπροσρόφηση (panning)

Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας επωάζονται με anti-Th1.2 για μισή ώρα. Μετά το τέλος της επώασης τα τρυβλία πλένονται με PBS για απομάκρυνση του αντισώματος που δεν έχει προσκολληθεί. Έπειτα τα απομονωμένα T και B σπληνοκύτταρα επωάζονται στα τρυβλία με το κολλημένο αντίσωμα για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης στο υπερκείμενο

υγρό της καλλιέργειας θεωρούμε ότι υπάρχουν τα B λεμφοκύτταρα ενώ τα T λεμφοκύτταρα παραμένουν προσκολλημένα. Ξεκολλούνται τα T λεμφοκύτταρα και φυγοκεντρούνται (5 min–800rpm) και ξεπλένονται με PBS για τρεις φορές.

2.6 Διαχωρισμός T- και B- λεμφοκυττάρων με μαγνητικά σφαιρίδια

Τα μαγνητικά σφαιρίδια είναι κολλημένα με ανοσοσφαιρίνη IgG (Goat anti-mouse IgG, Dynabeads M-40, Dynal A.S., Oslo, Norway) που με την σειρά της κολλάει με το ανάλογο αντίσωμα. Ακολουθώντας τη διεργασία αρνητικής επιλογής (απομάκρυνση των Ly5 θετικών κυττάρων) απομονώνονται τα T λεμφοκύτταρα. T και B λεμφοκύτταρα επωάζονται με διάλυμα anti-Ly5 για μισή ώρα. Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα πλένονται με PBS και φυγοκεντρούνται. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα 5ml θρεπτικού υγρού RPMI (Gibco) με τα μαγνητικά σφαιρίδια με συγκέντρωση $7\text{ml}/10^6$ κύτταρα και αναδεύονται για 15 λεπτά. Τοποθετούμε το δοκιμαστικό σωλήνα στο μαγνήτη, αφήνουμε για 10 λεπτά και αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο με τα T λεμφοκύτταρα τα οποία αφού πλυθούν δύο φορές με HBSS είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα.

2.7 Διαχωρισμός T- και B- λεμφοκυττάρων με την μέθοδο του nylon wool

Σε αυτήν τη μέθοδο το μείγμα T και B λεμφοκυττάρων διαπερνά ειδική κολώνα nylon wool. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην ιδιότητα των B λεμφοκυττάρων να εγκλωβίζονται σε αυτή την ειδική κολώνα ενώ τα T λεμφοκύτταρα περιέχονται στο εκλούόμενο υγρό.

A) Δημιουργία «κολώνας»

Αρχικά βάζουμε ένα κομμάτι του nylon wool σε μια σύριγγα των 20ml έτσι ώστε να φθάσει τα 15 ml. Στη συνέχεια κλείνεται αεροστεγώς και αποστειρώνεται μαζί με το πιστόνι. Μέσα από τις αποστειρωμένες σύριγγες περνάμε 10 ml RPMI 5% σε ορό και αφήνεται να τρέξει και να διαβρέξει όλο το περιεχόμενο της σύριγγας. Βάζοντας το πιστόνι αναρροφάμε τα 10ml θρεπτικού υγρού που είχαν διαπεράσει αρχικά την στήλη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 5 φορές ώστε να διαβραχεί πλήρως το nylon wool. Στην τελευταία επανάληψη αφήνουμε το υγρό μέσα στη σύριγγα για 30 λεπτά. Μετά

το πέρας του χρόνου βγάζουμε το πιστόνι και προσθέτουμε 10ml θρεπτικό υγρό να τρέξει μόνο του.

B) Απομόνωση T λεμφοκυττάρων

Τα συνολικά λεμφοκύτταρα από τη σπλήνα έχουν απομονωθεί από τα μακροφάγα όπως περιγράφηκε παραπάνω. Αυτά τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται και αναδιαλύονται σε 2-3 ml RPMI με ορό 5% και τα φορτώνουμε στη «κολώνα». Αφού τα κύτταρα τρέξουν κατά μήκος της κολώνας, κλείνουμε το κάτω άκρο της σύριγγας χωρίς να περάσουν προς τα έξω. Ύστερα τοποθετούμε την σύριγγα για 30 λεπτά στους 37⁰ C. Μαζί με την σύριγγα τοποθετούμε και το θρεπτικό υγρό με τον ορό στους 37⁰ C. 25ml από το προθερμασμένο θρεπτικό υγρό το περνάμε μέσα από την στήλη ανά 5 ml και μαζεύουμε το εκλουόμενο υγρό. Το εκλουόμενο υγρό περιέχει 95% T λεμφοκύτταρα (το nylon wool κατακρατεί τα B λεμφοκύτταρα). Στη συνέχεια αδειάζουμε το nylon wool από τη σύριγγα και πλένεται καλά με το προθερμασμένο θρεπτικό υλικό για να ελευθερώσουμε τα B λεμφοκύτταρα.

2.8 Επίδραση των T-λεμφοκυττάρων στον πλακούντα

Απομονωμένα T λεμφοκύτταρα συγκαλλιεργούνται με πλακουντικά κύτταρα αφού προηγουμένως έχουν αδρανοποιηθεί με επίδραση διαλύματος μιτομυκίνης C 25μg/ml. Το στρώμα των πλακουντικών κυττάρων επωάζεται για 30 λεπτά στους 37⁰C με 100μl mitC και αφού σταματήσει η αντίδραση με 20μl ορό, ξεπλένεται το κυτταρικό στρώμα με DMEM 20% ορό τρεις φορές και προστίθενται 200μl T λεμφοκύτταρα (2×10^5 κύτταρα / πηγαδάκι).

2.9 Εξωτερικός ανοσοφθορισμός

Μετά το διαχωρισμό 1×10^6 T λεμφοκύτταρα τοποθετούνται σε πλάκα erpendorfs και μετά από φυγοκέντρηση προστίθεται 0.1% PBS-BSA-AZIDE (0.1% Bovine Serum Albumin και 0.02% αζίδιο) για την αντιμετώπιση μη ειδικής χρώσης. Μετά από επώαση 15 λεπτών, φυγοκεντρούμε (5 min -800 rpm), και επωάζουμε με PBS-BSA 2% (2% Bovine Serum Albumin σε PBS) ή PBS-NGS (normal goat serum) για 20 min στους 4⁰C για την εξουδετέρωση

των Fc υποδοχέων. Μετά από φυγοκέντρηση προστίθεται το 1^ο αντίσωμα α-Ia^d (αραίωση 1/100) και επωάζεται στους 4^οC για 30 min. Και μετά από επαναλαμβανόμενα πλυσίματα επωάζουμε με το 2^ο αντίσωμα α- mouse FITC (αραίωση 1/100 στο διάλυμα του 0,1% PBS-BSA-AZIDE στους 4^οC για 30min. Τοποθετούμε 25ml γλυκερόλη σε κάθε erpendorf, κάνουμε ανασύσταση της πελέτας και βάζουμε μια σταγόνα σε αντικειμενοφόρο. Τέλος μετράμε την ένταση του φθορισμού με την χρήση μικροσκοπίου φθορισμού (Zeiss, Oberkochtien, Germany). Κύτταρα με ασθενές βάψιμο, καθώς και κύτταρα χωρίς βάψιμο λογίζονται ως αρνητικά.

2.10 Εσωτερικός ανοσοφθορισμός

Εσωτερικό ανοσοφθορισμό εφαρμόζουμε όταν θέλουμε να ανιχνεύσουμε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε την διαδικασία αυτή για τον εντοπισμό των ενδοκυτταρικών κυτοκινών IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α και IFN-γ

Διαδικασία:

Φρέσκα σπληνοκύτταρα ή καλλιέργειες 2 εβδομάδων σπληνοκυττάρων μετά από επώαση με conA (εμπλουτισμός σε T λεμφοκύτταρα), φυγοκεντρούνται στις 1200 στροφές για 6 λεπτά και στο ίζημα προσθέτουμε 0.5ml κρύου PFA (4% παραφορμαλδεΰδη σε PBS) με ταυτόχρονη ανάδευση και επωάζουμε τα κύτταρα σε πάγο για 5 λεπτά με ενδιάμεσες αναδεύσεις. Διακόπτουμε την μονιμοποίηση των κυττάρων προσθέτοντας 4ml δ/τος BSS (HBSS 0.01% HEPES) και ξεπλένουμε με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις στις 1200 στροφές για 5 λεπτά. Προσθέτουμε στα κύτταρα το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο 1/100 σε BSS-Saponin (HBSS 1x, 0.01% hepes, 0.1% Saponin, anti-IL2, -IL4, -IL6, -IL10, -TNFα, -IFNγ) και επωάζουμε 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ξεπλένουμε με BSS-Saponin και προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα (IgGa αραιωμένο σε BSS-Saponin) και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος αφού ξεπλύνουμε, προσθέτουμε 25% γλυκερόλη και μεταφέρουμε τα κύτταρα σε αντικειμενοφόρο για να ακολουθήσει το μέτρημα σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss, Oberkochtien, Germany).

2.11 Ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης

Τα διαχωρισμένα T και B λεμφοκύτταρα τοποθετούνται σε πλάκα Elisa 96 πηγαδιών (Sarstedt) με ή χωρίς πλακουντικό υπόστρωμα. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 10μg/ml LPS (lipopolysaccharide from E.coli, Sigma) και 10μg/ml conA (concanavalin A) ως μιτογόνα B και T λεμφοκυττάρων αντίστοιχα για να δοκιμαστεί η καθαρότητα του πληθυσμού. Σε 24 ή 48 ώρες προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι 10μl ραδιενεργή θυμιδίνη ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) και η πλάκα τοποθετήθηκε στον επωαστήρα για τις επόμενες 18 ώρες. Μετά από συλλογή των δειγμάτων σε ειδικό συλλέκτη (harvesting) και προσθήκη 3 ml τολουενίου, τα δείγματα μετρήθηκαν σε β-liquid scintillation counter όπου η ενσωμάτωση ραδιενεργής θυμιδίνης εκφράζεται σε κρούσεις/λεπτό (c.p.m.).

2.12 Τροποποιημένο έμμεσο MLPR/MLC

Ποντικίσια T λεμφοκύτταρα (2×10^5 κύτταρα/well) από έγκυα ποντίκια BALB/CJ σε εγκυμοσύνη 12 ημερών τοποθετούνται σε τριπλή επανάληψη σε στρώματα πλακούντα που έχει αδρανοποιηθεί μεταβολικά με μιτομυκίνη. Τα κύτταρα βρίσκονται σε καλλιέργεια DMEM με 10 % ορό και με ή χωρίς 10% των ορών από τα εμβολιασμένα ποντίκια με τους παράγοντες LPS, Protein A, LPS+ Protein A, Muramic, Mycobacterium, TNF- α , IFN- γ σε τελικό όγκο 200 $\mu\text{l}/\text{well}$. Επώαστηκαν στους 37⁰ C για τέσσερις ημέρες όπου στη συνέχεια προστέθηκε η $[^3\text{H}]\text{TdR}$ και ακολουθήθηκε το παραπάνω πρωτόκολλο.

2.13 ELISA

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

Coating Buffer: σε 500 ml H₂O διαλύουμε 2.1 gr NaHCO₃ και σε άλλα 500 ml H₂O διαλύουμε 2.65 gr Na₂CO₃ και αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα σε τελικό pH ίσο με 9.6.

PBS-Tween 20: 0.005% Tween 20 σε PBS.

Χρωμογόνο: 2.1gr Κιτρικού οξέος, 5gr μανιτόλης, 100mg 3,3',5,5',tetramethyl benzene dihydrochloride, σε τελικό όγκο 100ml νερού. Χωρίζουμε σε όγκους 1.5ml και ψύχουμε στους -20°C.

Υπόστρωμα: 4.1g NaCOOH, 300ml H₂O₂ (30%) σε 100ml H₂O.

Αραιώσεις 1/2 ,1/5, 1/10 ορών σε coating buffer προστίθενται ανά 100 μl/well σε 96 well πλάκα και επωάζονται για 18-24 ώρες στους 4⁰C. Την επόμενη ημέρα αφού αδειάσουμε τα πηγάδια, πλένουμε 3 φορές με PBS-Tween 20 (100-200 μl/well) και επωάζουμε με PBS-BSA 4% (100 μl/well) για 1.5h. Αφού πλύνουμε 3 φορές με PBS-Tween 20 προσθέτουμε το 1⁰ αντίσωμα 100 μl/well (αραίωση 1/1000 σε 0.1% PBS-BSA) και επωάζουμε για 1.5h. Πλένουμε 3 φορές με PBS -Tween 20, προσθέτουμε το 2⁰ αντίσωμα (α-rat peroxidase σε αραίωση 1/9000 σε 0.1% PBS-BSA) 100 μl/well και επωάζουμε για 1.5h στο σκοτάδι. Προσθέτουμε το υπόστρωμα (100 μl/well χρωμογόνο /υπόστρωμα: 3/1) και το αφήνουμε περίπου 20 min στο σκοτάδι. Τέλος, σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 50 μl H₂SO₄ και η οπτική απορρόφηση (OD) μετράται στα 450 nm σε ένα Titertec ELISA photometer (Multiskan Plus).

2.14 Ανίχνευση επιπέδων NO σε ορό έγκυων ποντικών κατόπιν ένεσης τους με Protein A και Muramic acid και σε ορούς εγκύων γυναικών

Παίρνουμε τους ανθρώπινους και ποντικίστους ορούς και κάνουμε αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/1000 σε PBS 1X και τα τοποθετούμε σε 96-well πλάκα. Προσθέτουμε ίσο όγκο Greiss σε κάθε πηγαδάκι το οποίο φτιάχνεται από ανάμιξη επίσης ίσων όγκων των αντιδραστηρίων α και β (& 2.4) που το συνθέτουν. Στην συνέχεια φωτομετρούμε στα 546nm (ορατό φως) σε ένα Titertec ELISA photometer (Multiskan Plus). Η συγκέντρωση του NO υπολογίστηκε με την βοήθεια πρότυπων καμπυλών. Οι καμπύλες αυτές κατασκευάστηκαν σύμφωνα με το φάσμα οπτικής απορρόφησης που μας έδωσαν οι εξής συγκεντρώσεις NaNO₃: 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM στα διάφορα φωτόμετρα που χρησιμοποιήσαμε κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Η συγκέντρωση του NO σε κάθε πείραμα υπολογίστηκε βάση της πρότυπης καμπύλης της αντίδρασης $2 \text{NO} \rightarrow \text{NO}^{-3} + \text{NO}^{-2}$. Οι τιμές του NO αποδίδονται σε μM .

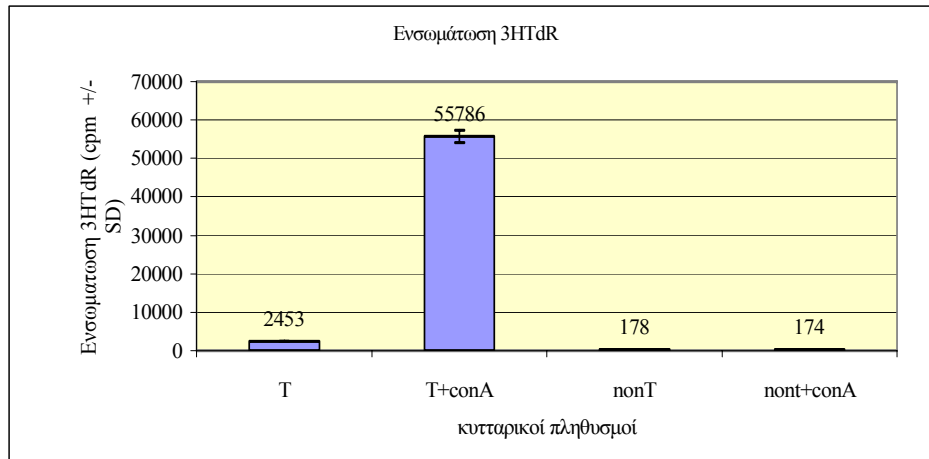
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΠΛΗΝΙΚΩΝ T ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

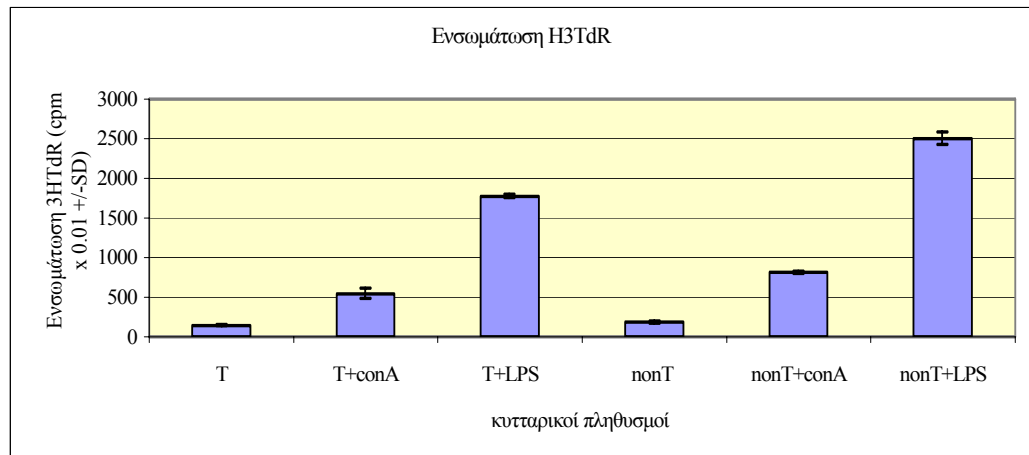
Όπως προαναφέραμε μητρικά T λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στην εμβρυοπλακουντική μονάδα όπου και δρουν στην προστασία και αποφυγή της απόρριψης του εμβρύου. Εφ' όσον ο σπλήνας αντανακλά πλήρως την ανοσολογική κατάσταση της μητέρας κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή σαν πηγή T λεμφοκυττάρων. Ο σπλήνας αποτελείται από α) ινώδη κάψα και δοκίδες, β) σπληνικό πολφός, γ) αγγεία και νεύρα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες φιλοξενεί κύτταρα των λεμφοκυτταρικών σειρών T και B (λευκός πολφός), όπως και μακροφάγα, ερυθροκύτταρα και λευκοκύτταρα. Μετά την απομάκρυνση των μακροφάγων, τα T και B λεμφοκύτταρα της σπλήνας εγκύων ποντικών 12 ημερών απομονώθηκαν με τρεις μεθόδους: α) με μαγνητικά σφαιρίδια, β) με nylon wool, γ) με rapping. Οι τρεις μέθοδοι επιλέχθηκαν για να βρεθεί η μέθοδος με την μεγαλύτερη ειδικότητα και την μικρότερη απώλεια κυττάρων κατά την απομόνωση. Όπως φάνηκε από προηγούμενη εργασία η αποδοτικότερη διαδικασία απομόνωσης ήταν αυτή με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων ενώ η οικονομικότερη αυτή με τη χρήση του nylon wool. Η μέθοδος rapping δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η δοκιμασία απομόνωσης των T λεμφοκυττάρων ελέγχθηκε με την ικανότητα απάντησης σε ειδικά μιτογόνα με την μέθοδο ενσωμάτωσης $^3\text{HTdR}$ (διαγράμματα 3.1α, β, γ) και ανάλυση των επιφανειακών μαρτύρων με ανοσοφθορισμό (πίνακας 3.1). Μετά τον διαχωρισμό με μαγνητικά σφαιρίδια, ο πληθυσμός των T λεμφοκυττάρων παρουσιάζει μία 23-fold αύξηση στην ενσωμάτωση $^3\text{HTdR}$ μετά από διέγερση με conA (διάγρ. 3.1α) ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα (non T) δεν παρουσίαζαν ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Τα αποτελέσματα στη δοκιμασία απομόνωσης T λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο rapping δίνονται στο διάγραμμα 3.1β. Όπως φαίνεται οι πληθυσμοί T και non T κυττάρων διεγείρονται εξίσου ικανοποιητικά από conA και LPS (μιτογόνο για B λεμφοκύτταρα και μακροφάγα), γεγονός που υποδηλώνει ότι ο διαχωρισμός είναι ελλιπής. Όπως φαίνεται και από πειράματα ανοσοφθορισμού μόνο τα μισά από τα T λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν με αυτή την τεχνική (πίνακας

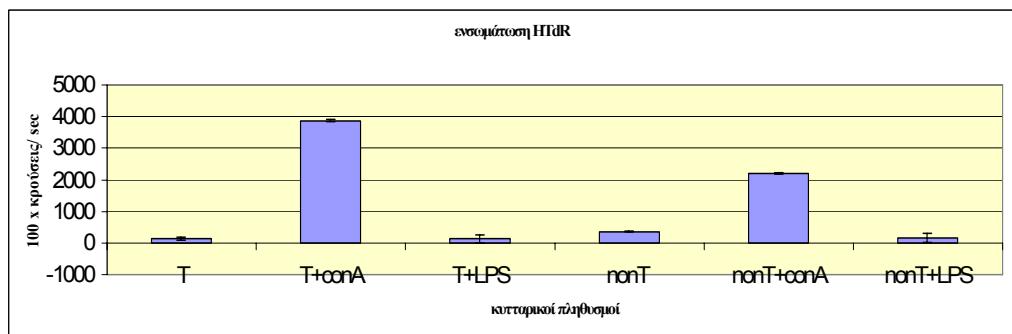
3.1A). Τέλος η χρήση της κολώνας nylon wool απομόνωσε καθαρό πληθυσμό *T* λεμφοκυττάρων (20-fold αύξηση ενσωμάτωσης $^3\text{HTdR}$ μετά από διέγερση με *conA*, 80% *Thy-1* θετικά κύτταρα), αλλά με σημαντικές απώλειες εφ' όσον στα *nonT* κύτταρα επάγεται ο πολλαπλασιασμός με *conA*.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.1α: Ενσωμάτωση $^3\text{HTdR}$ από *T* λεμφοκύτταρα σπλήνας διαχωρισμένα με τη μέθοδο των μαγνητικών σφαιριδίων.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.1β: Ενσωμάτωση $^3\text{HTdR}$ από T λεμφοκύτταρα σπλήνας διαχωρισμένα με τη μέθοδο ranning.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.1γ: Ενσωμάτωση $^3\text{HTdR}$ από T λεμφοκύτταρα σπλήνας διαχωρισμένα με τη μέθοδο nylon wool.

A

	% ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ
-----	18+/-1	16+/-3
Anti-thy-1	86+/-11	52+/-8
Anti-Ly2	48+/-17	43+/-18
Anti-L3T4	51+/-13	37+/-10

B

	% ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΤΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ
-----	7+/-7	3+/-4
Anti-thy-1	88+/-12	80+/-16
Anti-Ly2	52+/-2	45+/-11
Anti-L3T4	51+/-13	53+/-11

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Μέτρηση ανοσοφθορισμού B και T λεμφοκυττάρων σπλήνας ποντικίου διαχωριζόμενα με μέθοδο rapping (A) και τη μέθοδο nylon wool (B). Έγιναν τρεις επαναλήψεις πριν και μετά τον διαχωρισμό των κυττάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν % θετικών κυττάρων +/-SD.

3.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Για να μελετηθεί η ικανότητα των πλακουντικών κυττάρων να διεγείρουν T μητρικά κύτταρα μέσω κυτταρικών επαφών, απομονωμένα σπληνικά T λεμφοκύτταρα από ποντίκια 12 ημερών εγκυμοσύνης τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια αδρανοποιημένου μεταβολικά πλακούντα, και όπως φαίνεται στον πίνακα 3.2 η παρουσία τροφοβλαστών αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων κατά 319%. Ο χαρακτηρισμός των T λεμφοκυττάρων έγινε με τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, όπου παρατηρήθηκε ότι τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε ποσοστό 38-64% (anti- L3T4), ενώ τα κατασταλτικά/κυτταροτοξικά σε ποσοστό 37-45% (anti- Ly2).

Συνθήκες καλλιέργειας	Ενσω μάτωση	³ HTd R ConA
	----- ---	
T λεμφοκύτταρα	669+/-	1495+
	557	/-329
B λεμφοκύτταρα	315+/-	353+/-
	41	203
Μακροφάγα	370+/-	549+/-
	99	229
πλακούντας	234+/-	302+/-
	124	86
T +πλακούντας	2805+	4607+
	/-723	/-786

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2: Επίδραση παραγόντων του πλακούντα στον πολλαπλασιασμό των μητρικών T και B λεμφοκυττάρων της σπλήνας απομονωμένα με τη μέθοδο των μαγνητικών σφαιριδίων.

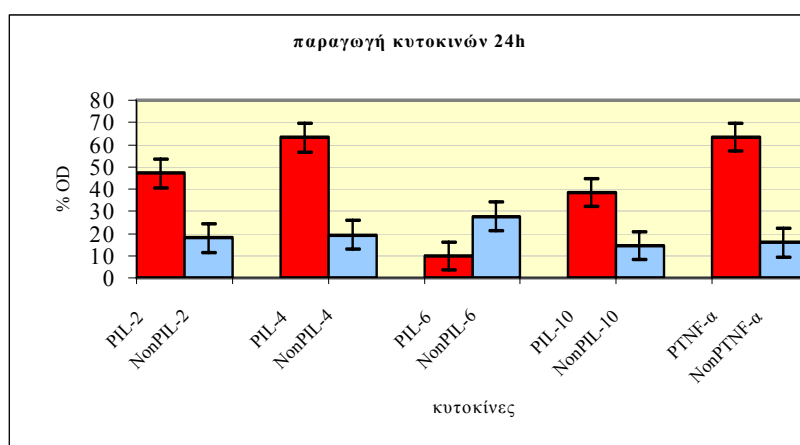
3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ Thy-1+ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΝ 12^Η ΗΜΕΡΑ ΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ

Όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο τα T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από τα πλακουντικά κύτταρα κατά την διάρκεια της κύησης. Για να ελέγξουμε το κυτοκινικό τους προφίλ μελετήσαμε τις εκκρινόμενες κυτοκίνες με ELISA και την ενδοκυττάρια παραγωγή τους με ανοσοφθορισμό.

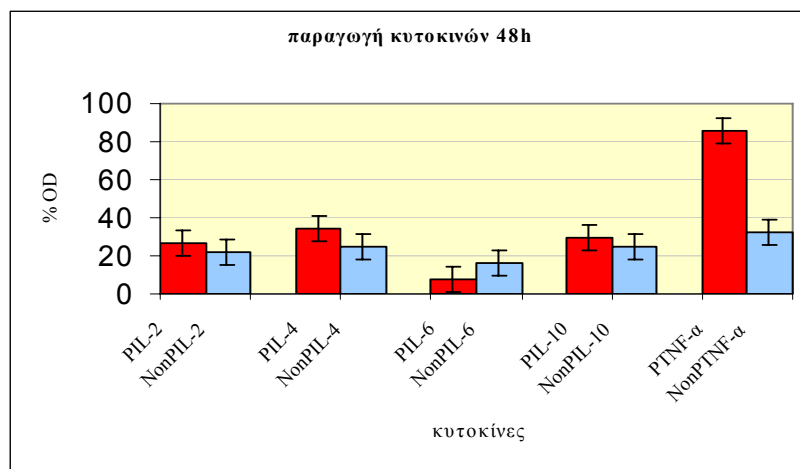
Τ λεμφοκύτταρα από έγκυα και ή μη έγκυα ποντίκια καλλιεργήθηκαν για 24 h και 48h και τα υπερκείμενα ελέγχθηκαν για την παρουσία IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, TNF-α. Μετά από 24h καλλιέργειας φαίνεται μία αύξηση κατά την εγκυμοσύνη τόσο των Th1 κυτοκινών (IL-2, TNF-α) όσο και των Th2 κυτοκινών (IL-4, IL-10) ενώ παρατηρείται μια μείωση της IL-6 της τάξεως του 64,8% σε σχέση με τα μη έγκυα ποντίκια (διάγραμμα 3.3A), ενώ μετά από 48h καλλιέργειας μόνο τα ποσοστά του παράγοντα TNF-α διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα περίπου 167,53% σε σχέση με τα μη έγκυα ποντίκια (διάγραμμα 3.3B).

Τα αποτελέσματα του εσωτερικού ανοσοφθορισμού όπως απεικονίζονται στον πίνακα 3.3 δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ εγκύων και μη εγκύων πειραματοζώων εκτός από την IL-2 η οποία παρουσιάζει αύξηση κατά 122% στα T λεμφοκύτταρα από έγκυα σε σχέση με τα μη έγκυα ποντίκια μετά από 48h καλλιέργειας. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει συνεχιζόμενη παραγωγή κυτοκινών από τα T λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και εφ' όσον οι παράγοντες αυτοί εκκριθούν (αποτελέσματα ELISA), η σύνθεσή τους επανέρχεται στην εκτός κύησης κατάσταση.

A



B



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.3: Μέτρηση παραγωγής κυτοκινών με ELISA από υπερκείμενα σπληνικών T λεμφοκυττάρων ποντικίου 12ης μέρας εγκυμοσύνης και φυσιολογικού θηλυκού ποντικίου μετά από 24h (A) και 48h (B) καλλιέργειας. Τα υπερκείμενα δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις 1:1 και 1:2 σε 4 επαναλήψεις σε δύο ποντίκια έγκυα διασταύρωσης BALB/c x BALB/c (Απεικόνιση μόνο των συγκεντρώσεων 1:1 των υπερκειμένων δίνονται στο παραπάνω διάγραμμα).

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	% ΚΑΘΑΡΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΚΥΤΤΑΡΩΝ	
	Έγκυα 24h	Ποντίκια 48h	Μη έγκυα 24h	Ποντίκια 48h
-----	0	0	0	0
Anti-IL 2	20+/-4	20+/-2	12+/-1	9+/-7
Anti-IL 4	27+/-3	23+/-5	36+/-7	25+/-5
Anti-IL 6	14+/-3	4+/-1	11+/-3	11+/-2
Anti-IL 10	26+/-7	11+/-7	19+/-8	24+/-6
Anti-TNF-α	48+/-17	32+/-7	45+/-12	41+/-16
-----	0	0	0	0
Anti-Th1,2	39+/-9	40+/-3	31+/-3	45+/-2
Anti-Ly5	2+/-1	14+/-8	6+/-5	24+/-5

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3: Μέτρηση ενδοκυττάρων κυτοκινών με εσωτερικό ανοσοφθορισμό σε σπληνικά μητρικά T λεμφοκύτταρα 12 ημερών εγκυμοσύνης σε σχέση με φυσιολογικά θηλυκά ποντίκια BALB/c μετά από 24 ώρες και 48 ώρες καλλιέργειας σε 4 επαναλήψεις (σε 2 ποντίκια).

3.4 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΕΜΦΟΚΙΝΩΝ ΑΠΟ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ “ΚΛΩΝΟΥΣ”

Για την μελέτη τόσο του λεμφοκυτταρικού μοντέλου έκκρισης κυτοκινών από τα σπληνικά T λεμφοκύτταρα εγκύων ποντικών 12ης ημέρας εγκυμοσύνης όσο και του χαρακτηρισμού αυτών των κυττάρων προσπαθήσαμε να δημιουργήσουμε T κυτταρικούς κλώνους έτσι ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα καθαρότητας και αριθμού T λεμφοκυττάρων.

Μετά από μιτογονική διέγερση T λεμφοκυττάρων από σπλήνες εγκύων ποντικών 12ης ημέρας (προσθήκη ConA κάθε 4 ημέρες) για 3 εβδομάδες προέκυψαν 7 κυτταρικοί “κλώνοι”, οι οποίοι εξετάστηκαν για παραγωγή των κυτοκινών IL-2, IL-4 και IL-10. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 3.4 σε 5 κλώνους από τους 7 υπήρχε υπεροχή στην έκκριση της IL-4 έναντι της IL-2 ενώ σε 6 από τους 7 κλώνους η IL-10 ήταν αυξημένη σε σχέση με την IL-2. Μόνο σ' ένα κλώνο που προήλθε από εγκυμοσύνη με αυξημένες αποβολές, παρατηρήθηκε αύξηση της IL-2. Επίσης σε 4 από τους 7 κλώνους η IL-10 είχε υψηλότερα επίπεδα τιμών σε σύγκριση με τις τιμές της IL-4.

% ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΥΞΗΣΗΣ IL-2	ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ IL-4	ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ IL10	ΑΠΟΒΟΛΕΣ
ΚΛΩΝΟΙ				
T1	32,23	31,15	45,59	1/5
T2	28,35	56,61	31,12	0/6
T3	22,09	45,21	35,1	2/6
T4	39,67	12,76	31,72	3/7
T5	34,25	43,16	51,63	1/3
T6	-----	79,50	21,59	0/5
T7	14,60	39,53	42,46	0/4
ΣΥΝΟΛΟ	28,53+/-8	43,99+/-19	37,03+/-9	

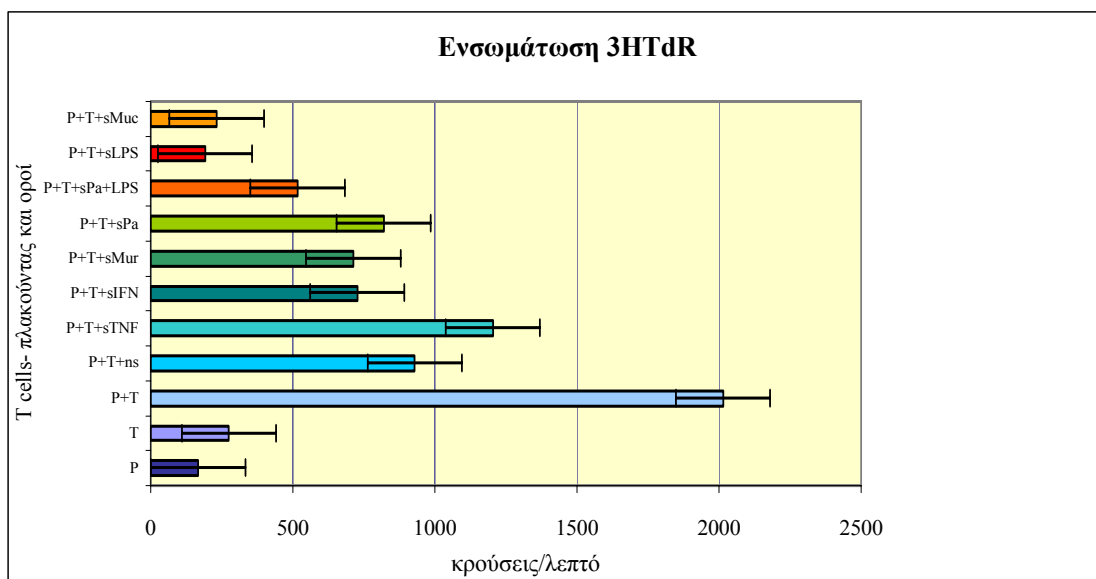
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4: Μέτρηση παραγωγής κυτοκινών με ELISA από υπερκείμενα καλλιιεργειών επτά T λεμφοκυτταρικών “κλώνων” ποντικίου BALB/c x BALB/c 12ης μέρας εγκυμοσύνης. Τα υπερκείμενα δοκιμάστηκαν σε δύο συγκεντρώσεις με αραιώση 1/2 και 1/4 σε 3 επαναλήψεις. (Τα αποτελέσματα της αραιώσης 1/4 δεν δείχνονται εδώ).

3.5 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΟΡΟΥ ΣΤΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ T ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Όπως έχουμε αναφέρει παράγοντες στον ορό της εγκύου μπορούν να προσφέρουν ένα μηχανισμό ρύθμισης της μητρικής απάντησης. Ένας μεγάλος αριθμός αναφορών έχει αποδείξει την ύπαρξη ανοσοκατασταλτικών παραγόντων στον ορό. Στην προσπάθειά μας να ελέγξουμε εάν οι παράγοντες αυτοί καταστέλουν τα μητρικά T λεμφοκύτταρα που όπως έδειξαν τα πειράματα στα προηγούμενα κεφάλαια ενεργοποιούνται από πλακουντικά κύτταρα, δοκιμάσαμε την ικανότητα ορών τόσο από φυσιολογικές εγκυμοσύνες όσο και από περιπτώσεις αποβολών να καταστέλλουν τον πλακουντοεξαρτώμενο πολλαπλασιασμό των μητρικών T λεμφοκυττάρων. Εκτός των φυσιολογικών ορών, ελέγχθηκαν 3 περιπτώσεις επιμόλυνσης εγκύων ποντικών: α) Με παράγοντες που οδηγούν σε αποβολή όπως LPS, IFN-γ, TNF-α. Το LPS είναι ισχυρός τοξικός παράγοντας με ανοσοκατασταλτική δράση όπως και η IFN-γ

και ο TNF- α που οδηγούν σε υψηλό ποσοστό αποβολών, β) Με παράγοντες που προστατεύουν από αποβολές *Protein A*, *Myramic acid*, *Mycobacterium* όπως έχει δειχθεί στο εργαστήριο μας καθώς και γ) με συνδιασμό του παράγοντα με LPS και *Protein A* που από αποτελέσματα του εργαστηρίου μας φαίνεται να μειώνεται η ανοσοκατασταλτική δράση του LPS με επακόλουθο τη μείωση των αποβολών.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.5 η επίδραση όλων των ορών στην αλληλεπίδραση πλακούντα – T λεμφοκυττάρων είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή της διέγερσης των T λεμφοκυττάρων. Μικρότερη καταστολή είχε ο ορός από έγκυα ποντίκια που είχαν ενεθεί με TNF- α (40,07%), ενώ μεγαλύτερη είχε ο ορός από έγκυα ποντίκια που είχαν επιμολυνθεί με ένεση από LPS (90,51%). Επίσης φαίνεται ότι ο ορός από ταυτόχρονη χορήγηση LPS και *protein A* ελαττώνει την ισχυρή καταστολή από LPS (74,32%), ενώ ο ορός από χορήγηση της *protein A* δεν καταστέλλει ισχυρά όπως τα προηγούμενα (59,28%). Ο χειρισμός του ορού από IFN- γ δεν φαίνεται να κάνει τόσο ισχυρή καταστολή των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων από τον πλακούντα (63,9%), ενώ αρκετά ισχυρή καταστολή προκαλεί ο ορός από μόλυνση με μυκοβακτηρίδιο (88,48%). Πάντως όλες οι ενέσεις με τους “φλεγμονώδεις” παράγοντες εκτός από τον TNF- α προκαλούν μια καταστολή των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων από το πλακούντα ισχυρότερη από αυτήν την καταστολή που προκαλεί ο ορός φυσιολογικής εγκυμοσύνης (53,88%).



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.5: Ενσωμάτωση $^3\text{HTdR}$ μετά από αλληλεπίδραση πλακούντα (P) με T λεμφοκύτταρα (T) εγκύων ποντικών 12ης ημέρας και ορών από έγκυα ποντίκια 12ης ημέρας επίσης φυσιολογικών (ns) ή μετά από ένεση με $\text{TNF-}\alpha$ (sTNF- α), $\text{IFN-}\gamma$ (sIFN- γ), LPS (sLPS), LPS+Protein A (sLPS+Pa), Protein A (sPa), Mycobacterium (sMuc), muramic acid (sMur). Τα πειράματα έγιναν σε τρεις επαναλήψεις. Τα T λεμφοκύτταρα βρίσκονταν σε αναλογία Th από 38-64% (anti-L3T4) και Tc σε αναλογία 37-45% (anti-Ly2). (Οι οροί που χρησιμοποιήθηκαν είχαν παραχθεί στο εργαστήριο από τους: Πρωτοπαπαδάκη Ε., Ρανέλλα Α., Αυφαντή Ι.)

3.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΤΑΞΗΣ I ΚΑΙ ΤΑΞΗΣ II ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

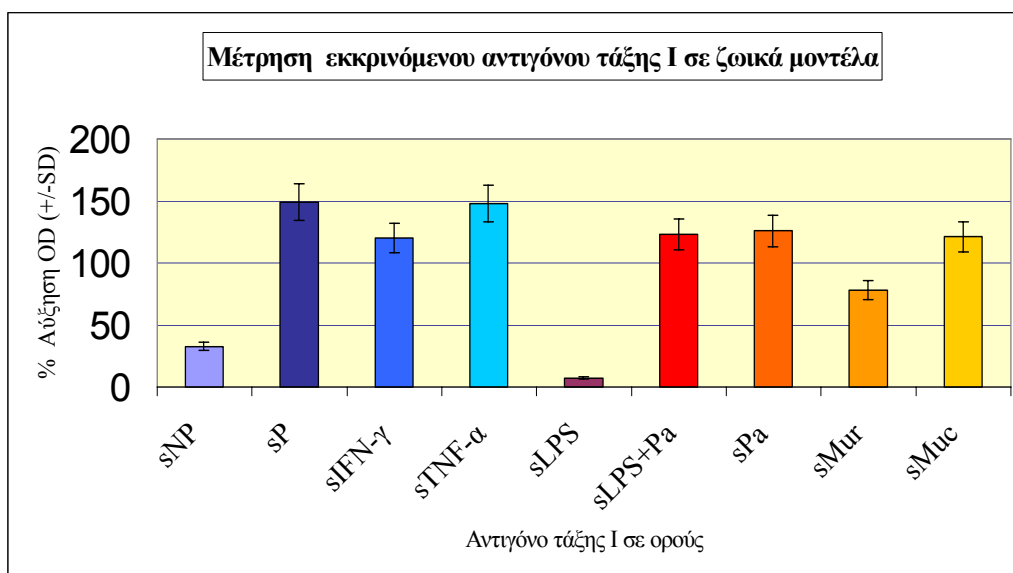
Η εκκρινόμενη μορφή των τάξης I αντιγόνων ιστοσυμβατότητας αναφέρθηκε ότι έχει ανοσοκατασταλτική δράση στον οργανισμό (Kovats et al 1990, Carosella et al 1995) ενώ αντίθετα τα τάξης II οδηγούν σε ανοσοδιέγερση του οργανισμού (Athanasakis-Vassiliadis & Papamatheakis, 1991). Για να διερευνήσουμε εάν υπάρχει σχέση μεταξύ των παρατηρηθέντων ποσοστών καταστολής και της παρουσίας ή όχι εκκρινόμενων τάξης I και II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας μελετήσαμε τα επίπεδα εκκρινόμενων τάξης I και II αντιγόνων κατά την διάρκεια της κύησης τόσο στα πειραματικά μοντέλα αποβολών στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο.

A. Ανίχνευση εκκρινόμενων τάξης I και II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στους ορούς έγκυων ποντικίων

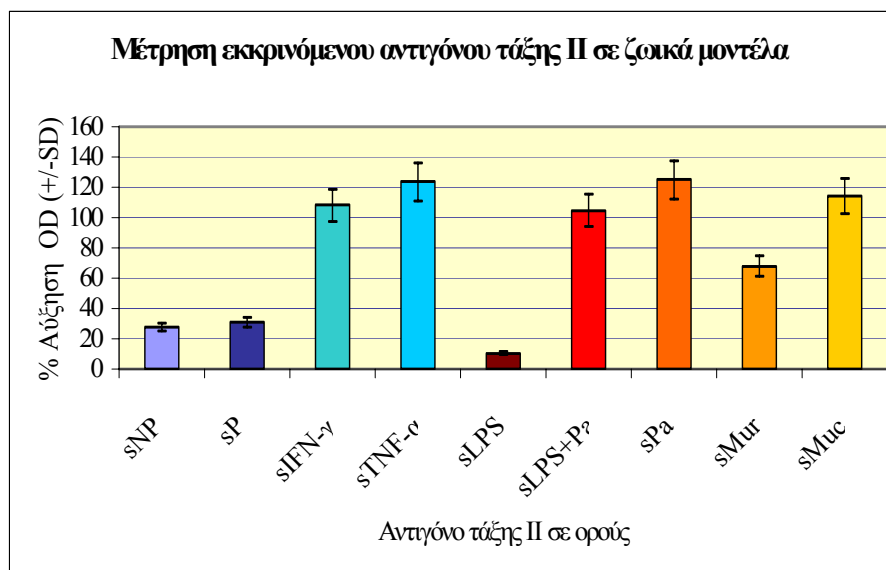
Οροί από φυσιολογικές εγκυμοσύνες όπως και περιπτώσεις πειραματικών αποβολών συλλέχθηκαν κατά 12η ημέρα κύησης και μετρήθηκαν με την μέθοδο της ELISA τα επίπεδα των εκκρινόμενων τάξης I και II. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.6α, το αντιγόνο τάξης I του ορού σε έγκυα ζώα βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό (149,12%) σε σχέση με τα μή έγκυα ποντίκια (32,76%). Από όλα τα πειραματικά μοντέλα που μελετήθηκαν η πρωτεΐνη τάξης I φαίνεται να υπερέχει ποσοτικά στις εγκυμοσύνες που τα ζώα ενέθηκαν με TNF-α (147,12%). Στους ορούς των ποντικίων που έχουν ενεθεί με IFN-γ, Protein A, LPS+Protein A και Mycobacterium, το αντιγόνο τάξης I βρισκόταν στα ίδια περίπου υψηλά επίπεδα γύρω στα 120-125%. Στα ποντίκια που είχαν ενεθεί με Muramic acid παρατηρήθηκε μέτρια επαγωγή του αντιγόνου τάξης I περίπου 78,02 ενώ πολύ χαμηλή επαγωγή ανιχνεύθηκε στους ορούς των ποντικίων που είχαν δεχθεί ενέσιμα LPS (7.31%).

Στα διαγράμματα 3.6α και 3.6β απεικονίζονται συγκριτικά οι οροί εγκύων και μη ποντικίων ως προς το εκκρινόμενο τάξης II αντιγόνο ιστοσυμβατότητας. Ενώ σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες τα επίπεδα του αντιγόνου τάξης II (30,08%) δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτά των μη εγκύων ποντικίων (27,82%), στον

ορό των εγκύων ποντικών που είχαν ενεθεί με *TNF-α* και *Protein A* συναντάμε αύξηση περίπου της τάξης 311% και 315% αντίστοιχα σε σχέση με τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες. Στους ορούς εγκύων ποντικών μετά από χορήγηση *IFN-γ*, *Mycobacterium*, *LPS+Protein A*, *muramic acid* παρατηρείται αύξηση 259%, 129%, 248% αντιγόνου τάξης II στον ορό σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές αντίστοιχα. Την χαμηλότερη τιμή στον ορό του αντιγόνου τάξης II την είχαν τα έγκυα ποντίκια που είχαν ενεθεί με *LPS* (μείωση 65,39% σε σχέση με την φυσιολογική κύηση).



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.6α: Μέτρηση εκκρινόμενων τάξης I αντιγόνων στους ορούς εγκύων 12ης ημέρας μολυσμένων με *IFN* (sIFN), με *TNF* (sTNF), με *TNF* (sLPS), με *LPS+Protein* (sLPS+Protein A), με *Protein A* (sProtein A), με *Muramic acid* (sMur.), με *Mycobacterium* (sMuc.), φυσιολογικής εγκυμοσύνης (sP) καθώς και μή εγκύων ποντικών (sNP) με τη μέθοδο της *ELISA* με τους ορούς αραιωμένους 1/100. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν % αύξηση OD σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.



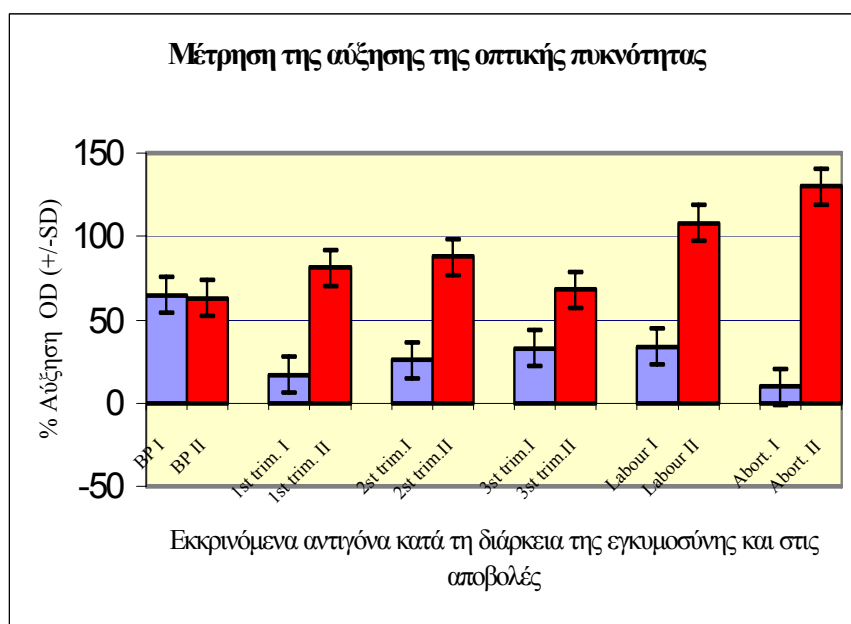
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.6b: Μέτρηση εκκρινόμενων τάξης II αντιγόνων στους ορούς εγκύων 12ης ημέρας μολυσμένων με IFN (sIFN), με TNF (sTNF), με TNF (sLPS), με LPS+Protein (sLPS+Protein A), με Protein A (sProtein A), με Muramic acid (sMur.), με Mycobacterium (sMuc.), φυσιολογικής εγκυμοσύνης (sP) καθώς και μή εγκύων ποντικίων (sNP) με τη μέθοδο της ELISA με τους ορούς αραιωμένους 1/100. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν % αύξηση OD σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

B. Ανίχνευση εκκρινόμενων τάξης I και II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στους ανθρώπινους ορούς.

i) Μελέτη των εκκρινόμενων αντιγόνων κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εγκυμοσύνης και αποβολής

Παρακολουθώντας τις μελέτες των άλλων ερευνητών για την ύπαρξη των διαλυτών αντιγόνων τάξης I, το εργαστήριο μας εστίαστηκε στη συγκριτική μελέτη των εκκρινόμενων τάξης I και II στους ανθρώπινους ορούς και σε αποβολές.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.6i λοιπόν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τα εκκρινόμενα αντιγόνα τάξης I στον ορό μειώνονται από 65 σε 17% στο πρώτο τρίμηνο, ενώ αυξάνουν στα διαδοχικά τρίμηνα της εγκυμοσύνης (26% στο δεύτερο τρίμηνο, 33% στο τρίτο τρίμηνο) παίρνοντας τη μεγαλύτερη τιμή τους στη λοχεία (34%). Στις αποβολές τα εκκρινόμενα τάξης I αντιγόνα έχουν πολύ χαμηλή τιμή (10%), όπου είναι χαμηλότερη σε σχέση και με την φυσιολογική εγκυμοσύνη. Από την άλλη τα εκκρινόμενα στον ορό τάξης II αντιγόνα αυξάνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Έτσι πριν την εγκυμοσύνη τα αντιγόνα τάξης II στον ορό βρίσκονται στα χαμηλότερα επίπεδα 63%, αυξάνονται στο πρώτο 81% και δεύτερο τρίμηνο 88% και ελαττώνονται στο τρίτο τρίμηνο 68% για να πάρουν την μεγαλύτερη τιμή τους στη λοχεία 108%. Στις αποβολές το ποσοστό των εκκρινόμενων τάξης II στον ορό σε αντίθεση με τα αντίστοιχα των αντιγόνων τάξης I αυξάνεται παρά πολύ 130% έχοντας το υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3.6i: Συγκριτική παρουσίαση του ποσοστού αύξησης των εκκρινόμενων αντιγόνων στον ορό τάξης I και II πριν την εγκυμοσύνη (BP I, BP II), στο πρώτο τρίμηνο (1st trim. I, 1st trim. II), στο δεύτερο τρίμηνο (2nd trim.

I, 2nd trim. II), στο τρίτο τρίμηνο (3rd trim. I, 3rd trim. II), στη λοχεία (Lab. I, Lab. II), στις αποβολές (Abor. I, Abor. II) αντίστοιχα.

(Τα αποτελέσματα έχουν παραχθεί στο εργαστήριο μας από την Ρανέλλα Α.)

ii) Μελέτη των εκκρινόμενων αντιγόνων κατά τη διάρκεια των διαφόρων εβδομάδων του πρώτου τριμήνου της ανθρώπινης εγκυμοσύνης.

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα φαίνεται ότι το πρώτο τρίμηνο της ανθρώπινης εγκυμοσύνης είναι πολύ σημαντικό για τη συνέχεια αυτής, αφού κατά τη διάρκεια του παρατηρείται η μεγαλύτερη συχνότητα αποβολών. Αναζητώντας διαφορές στην έκκριση των πρωτεϊνών τάξης I και II στις διάφορες εβδομάδες κύησης πρώτου τριμήνου, ελέγχθηκαν 22 έγκυες γυναίκες από την 5η ως την 23η εβδομάδα κύησης.

Στον πίνακα 3.6ii φαίνονται οι μέσοι όροι της % αύξησης της οπτικής πυκνότητας των εκκρινόμενων τάξης II (ανιχνεύονται με τα αντισώματα 7H3, H81) και τάξης I (ανιχνεύονται με το αντίσωμα W6/32) στους ορούς από διάφορες εβδομάδες του 1ου τριμήνου της ανθρώπινης εγκυμοσύνης. Αντίδραση με το 7H3 αντίσωμα παρουσιάζει μια μικρή αύξηση ως την 23^η εβδομάδα κύησης. Αντίθετα το αντίσωμα του H81 δείχνει ότι το αντιγόνο είναι σταθερό και ελαφρώς μειώνεται μετά την 9η ως την 21η εβδομάδα όπου αυξάνει ελαφρώς. Τέλος το εκκρινόμενο τάξης I (W6/32) δεν φαίνεται να μεταβάλλεται αξιοσημείωτα κατά τη διάρκεια των εβδομάδων του πρώτου τριμήνου.

% ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ	ΕΚΚΡΙΝ ΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ	ΑΝΤΙΓΟ ΝΩΝ ΑΝΘΡΩ ΠΙΝΗ	ΣΤΟ 1ο ΕΓΚΥΜ ΟΣΥΝΗ	ΤΡΙΜΗ ΝΟ
ΕΒΔΟΜ ΑΔΕΣ	ΑΡΙΘΜ ΟΣ ΟΡΩΝ	7H3	H81	W6/32
7-8	10	37,8+/- 9	67,35+/- 6	17+/-3
9-10	7	27,5+/- 5	63+/-7	19+/-5
11-14	13	35+/-10	61+/-8	18+/-4
15-20	13	44+/-13	60+/-9	18+/-3
21-23	4	63+/-9	76+/-7	16+/-2

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6ii: Μέτρηση της % αύξησης της οπτικής πυκνότητας του ορού για τα αντισώματα 7H3 (antiHLA-DR), H81(antiHLA-DR), W6/32(antiHLA-I) στις διάφορες εβδομάδες ανθρώπινης εγκυμοσύνης του πρώτου τριμήνου. Οι οροί ήταν αραιωμένοι 1/100 ή 1/1000 και οι επαναλήψεις έγιναν τρεις φορές. (Τα αποτελέσματα των αραιωμένων ορών 1/1000 δεν δείχνονται εδώ).

3.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή το ΝΟ εμπλέκεται στην εγκυμοσύνη τόσο σε παθολογικές όσο και σε φυσιολογικές περιπτώσεις. Επίσης είναι γνωστή η παραγωγή του ΝΟ ως μηχανισμός άμυνας σε μολυσματικές περιπτώσεις. Σε πειραματικά μοντέλα μόλυνσης με *Protein A*, *muramic acid*, *LPS* έχει δειχθεί στο εργαστήριο μας (Πρωτοπαπαδάκη Ε., Ρανέλα Α) ότι υπάρχει ενεργοποίηση παραγωγής ΝΟ (πίνακας 3.7α). Η *protein A* φαίνεται ότι επάγει τα υψηλότερα επίπεδα ΝΟ ενώ υψηλά επίπεδα φαίνεται να υπάρχουν και στα ζώα μολυσμένα με *muramic acid* σε σχέση με τα μη έγκυα και έγκυα ποντίκια.

ΕΠΙΠΕΔΑ	ΝΟ	ΣΕ	ΟΡΟΥΣ	ΕΓΚΥΩΝ	ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ
	ΟΡΟΙ ΖΩΩΝ		ΟΠΤΙΚΗ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ	ΜΜ
	NMS			0,160	0,320
	NPS			0,180	0,360
	s prot. A			5,100	10,200
	s mur.			1,050	2,100

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7α: Μέτρηση επιπέδων ΝΟ σε ορούς εγκύων ποντικών 12 ημερών BALB/c x BALB/c μετά από ένεση τους με μολυσματικούς παράγοντες με *muramic acid* (*s mur.*), *protein A* (*s prot. A*) καθώς και σε έγκυα ποντίκια (*normal pregnancy serum*, *NPS*) και μη έγκυα ποντίκια (*normal mouse serum*, *NMS*)
(Αποτελέσματα από την Πρωτοπαπαδάκη Ε.)

Για να ελέγξουμε εάν αυτό το ΝΟ εμπλέκεται στην ανοσοκατασταλτική δράση των ελεγχθέντων ορών μελετήθηκε η διακύμανση παραγωγής ΝΟ στην εγκυμοσύνη στα διάφορα τρίμηνα στην φυσιολογική κύηση και σε αποβολές στον άνθρωπο.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.7β, κατά την διάρκεια του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης η παραγωγή του ΝΟ είναι αυξημένη σε σχέση με τα επίπεδα πριν την εγκυμοσύνη και στην συνέχεια ελαττώνεται στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο για να αυξηθεί πάλι στη λοχεία. Εντυπωσιακή είναι η αύξηση της

παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου σε 3 από τις 13 γυναίκες με αποβολές που συνέβησαν μέχρι τον 4ο μήνα εγκυμοσύνης. Στις υπόλοιπες γυναίκες με αποβολές, τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου στον ορό ήταν περίπου όσο και τα επίπεδα του NO στο πρώτο τρίμηνο.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΝΟ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ	ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ	ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ
ΠΕΡΙΟΔΟΣ	ΣΥΝΟΛΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ	μM NO
ΧΩΡΙΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ	6	0,084+/-0,001
1ο ΤΡΙΜΗΝΟ	15	0,130+/-0,018
2ο ΤΡΙΜΗΝΟ	15	0,090+/-0,008
3ο ΤΡΙΜΗΝΟ	15	0,092+/-0,016
ΛΟΧΕΙΑ	12	0,1000+/-0,001
ΑΠΟΒΟΛΕΣ(1)	10	0,104+/-0,018
ΑΠΟΒΟΛΕΣ(2)	3	0,302+/-0.1

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7B: Μέτρηση NO σε μM σε ανθρώπινους ορούς πριν την εγκυμοσύνη, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, 1ου τριμήνου, 2ου τριμήνου, 3ου τριμήνου στη λοχεία και στις αποβολές σε αραιώση 1/10.

ΑΠΟΒΟΛΕΣ (1): Περιπτώσεις αποβολών με τιμή NO σε “φυσιολογικά πλαίσια” στον ορό.

ΑΠΟΒΟΛΕΣ (2): Περιπτώσεις αποβολών με πολύ υψηλή τιμή NO στον ορό

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης όλων των ευθήριων θηλαστικών το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας έχει να εκπληρώσει ειδικές απαιτήσεις όπως την αποδοχή του ημιαλλογενετικού εμβρύου, την ανάπτυξη της τροφοβλαστικής στοιβάδας και χοριονικών λαχνών για εξασφάλιση της θρέψης, τον έλεγχο διείσδυσης της συγκιοτροφοβλάστης, καθώς και την προστασία της εμβρυομητρικής μονάδας από μολύνσεις. Για την ανταπόκριση του ανοσολογικού συστήματος της μητέρας στις αυξημένες απαιτήσεις του αλλογενετικού εμβρύου απαιτείται η συμμετοχή των T λεμφοκυττάρων. Στην εργασία μας εστιαστήκαμε στον χαρακτηρισμό των T λεμφοκυττάρων που ρυθμίζουν την εξέλιξη της ποντικίσιας κύησης σε πειραματικά ζωικά μοντέλα. Προσπαθήσαμε επίσης να χαρακτηρίσουμε τον υπότυπο αυτών των λεμφοκυττάρων ελέγχοντας αδρά το εκκρινόμενο μοντέλο των λεμφοκινών και του ρόλου τους στην εγκυμοσύνη. Επίσης ελέγχθηκε η ανοσοκατασταλτική ικανότητα του ορού της εγκυμοσύνης στην διέγερση της κυτταρομεσολαβητικής ανοσίας. Τέλος διερευνήσαμε το κατά πόσο η περιεκτικότητα του ορού εγκυμοσύνης σε αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης I, τάξης II καθώς και μονοξειδίου του αζώτου συσχετίζεται με τους ανοσοκατασταλτικούς μηχανισμούς κατά την κύηση. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο σπλήνας σαν πηγή T λεμφοκυττάρων ο οποίος με τους παραμήτριους λεμφαδένες αποτελούν τις κύριες εστίες των μεταναστεύσιμων στην εμβρυοπλακουντική μονάδα T λεμφοκυττάρων. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την απομόνωση των T λεμφοκυττάρων είναι η χρήση των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων (Cottler-Fox *M et al* 1990) όπου η καθαρότητα και ενεργότητα των T λεμφοκυττάρων με ανοσοφθορισμό και ενσωμάτωση ³HTdR ανέρχεται σε 95%. Εξ' ίσου ικανοποιητικός διαχωρισμός (80% καθαρότητα) έγινε με τη μέθοδο του τεχνικού μαλλιού (nylon wool) (Havenith *CE et al* 1992), μέθοδος που προτιμήθηκε για τα πειράματά μας λόγω χαμηλού κόστους. Επίσης δοκιμάστηκε λόγω χαμηλού κόστους και η μέθοδος της έμμεσης ανοσοπροσρόφησης (panning) (Hoang *T et al* 1983) αλλά δεν υπήρχε καλός διαχωρισμός των T και B λεμφοκυττάρων (50% καθαρότητα).

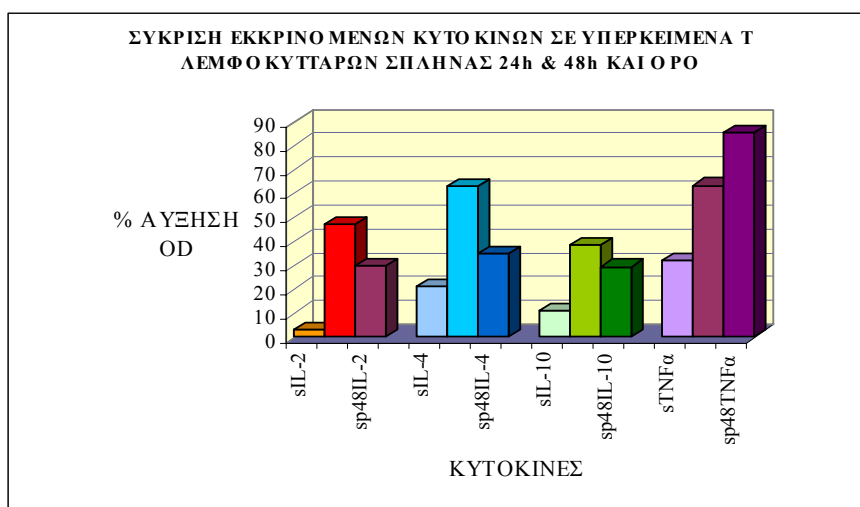
Στην προσπάθεια μας να ελέγξουμε το κατά πόσο οι τροφοβλάστες μπορούν μέσω επιφανειακών πρωτεϊνών να διεγείρουν τους μητρικούς T πληθυσμούς, απομονώθηκαν T λεμφοκύτταρα από σπλήνες εγκύων ποντικών 12 ημερών και αφού τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα τροφοβλαστικών κυττάρων, ελέγχθηκε με ενσωμάτωση $^3\text{HTdR}$ η ικανότητα πολλαπλασιασμού τους. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία (Yagel S et al 1989) ότι τροφοβλάστες πρώτου τριμήνου και τα υπερκείμενα αυτών διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Αναφέρεται επίσης, ότι υπερκείμενα πλακουντικών κυττάρων ρυθμίζουν κυρίως τον αντιγονικό ή μιτογονικό πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων (Duc HT et al 1990). Αν οι τροφοβλάστες στο ποντικίσιο μοντέλο διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των σπληνικών λεμφοκυττάρων τότε πολύ πιθανόν να επιβεβαιωθεί η θεωρία ότι ο σπλήνας αποτελεί πηγή των T λεμφοκυττάρων που μεταναστεύουν στην εμβρυοπλακουντική μονάδα. Τα αποτελέσματά μας, έδειξαν ότι πράγματι ο πλακούντας διεγείρει τα σπληνικά T λεμφοκύτταρα στα ποντίκια που βρίσκονται στη μέση της εγκυμοσύνης τους (12 ημερών). Αυτή η διέγερση των T λεμφοκυττάρων (Πίνακας 3.2) είναι αποτέλεσμα τόσο της έκκρισης από τον πλακούντα θετικών μορίων για τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων όσο και κυτταρικών επαφών. Οι τροφοβλάστες εκκρίνουν μια σειρά παραγόντων όπως CSF-1 (Jokhi PP et al 1995), GM-CSF, (Jokhi PP et al 1994), IFN- γ (Yamamoto Y et al 1992), TGF- β (Graham G.H et al 1992), προσταγλαδίνη E (Shimonovitz S et al 1995), PP14 (Pockley A.G et al 1989), protein 43 kD & 67kD (Matsui S et al 1989). Άλλοι από αυτούς τους παράγοντες έχουν θετική επίδραση (CSF-1, GM-CSF), και άλλοι (προσταγλαδίνη E, protein 43 kD & 67kD) αρνητική δράση τόσο στον πολλαπλασιασμό και λειτουργική διέγερση των T λεμφοκυττάρων όσο και στην πλακουντική ανάπτυξη και αύξηση. Ίσως λοιπόν ο πλακούντας με ένα παρακρινή ή αυτοκρινή τρόπο αυτοδιεγείρεται και διεγείρει τα λεμφοκύτταρα που έχουν μεταφερθεί στην μητρική-εμβρυϊκή μονάδα. Η διέγερση των T λεμφοκυττάρων από τον πλακούντα ευνοείται από το γεγονός ότι υπάρχει μια ελαφριά υπεροχή των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων στην αλληλεπίδραση με τους τροφοβλάστες, αφού οι τελευταίοι δεν ευνοούν την αύξηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (Blank M et al 1987).

Συνεχίζοντας την διερεύνηση των σπληνικών T λεμφοκυττάρων προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε το κυτοκινικό τους πρότυπο. Με δοκιμασίες ELISA ελέγχθηκαν τα υπερκείμενα φρέσκων T λεμφοκυττάρων από 24h και 48h καλλιέργειας ως προς την περιεχόμενο τους σε Th1 κυτοκίνες (IL-2, TNF-α) και Th2 κυτοκίνες (IL-4, IL-6, IL-10). Βασιζόμενοι στην υπόθεση του Mosmann TR (1996) ότι η εγκυμοσύνη είναι Th2 φαινόμενο, θα περιμέναμε οι προστατευτικές κυτοκίνες IL-4, IL-6, IL-10 να είναι αυξημένες. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι στην ποντικίσια εγκυμοσύνη 12 ημερών η παραγωγή των λεμφοκινών IL-4, IL-10 από τα T λεμφοκύτταρα είναι πολύ αυξημένη σε σχέση με τα ποσοστά αυτών πριν από την εγκυμοσύνη. Αντίθετα παρατηρήθηκε μείωση της IL-6 στην εγκυμοσύνη σε σχέση με τα μη έγκυα ποντίκια η οποία όπως είναι γνωστό δρά μεταξύ άλλων στην διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων (Shizuo A et al 1995). Τα μητρικά T λεμφοκύτταρα όντας ήδη διαφοροποιημένα στη 12η ημέρα δεν την είχαν ανάγκη και πιθανά γι' αυτό η παραγωγή της είναι μειωμένη.

Η αύξηση όμως των TNF-α και IL-2 κατά την περίοδο αυτή της κύησης δεν επιβεβαιώνει την υπόθεση του Mosmann και ενδέχεται να συμμετέχει στον τερματισμό της κύησης και στον τοκετό (Wegmann TG et al 1996). Η ενδοκυττάρια παραγωγή κυτοκινών ελέγχθηκε με εσωτερικό ανοσοφθορισμό όπου με εξαίρεση τις IL-4 και IL-6 οι υπόλοιπες κυτοκίνες ακολουθούν αντίστοιχο προφίλ με αυτό των εκκρινόμενων παραγόντων. Η IL-4 εμφανίζει μείωση στην παραγωγή της, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανά να μην χρειάζεται *de novo* σύνθεση μετά την 12η ημέρα εγκυμοσύνης. Αντίθετα η αύξηση ενδοκυττάριας IL-2 σε σχέση με την εκκρινόμενη πιθανά σημαίνει ότι ο παράγοντας αυτός θα εκκριθεί σε μετέπειτα στάδιο της κύησης, όπως στον τοκετό.

Στο διάγραμμα 4.α γίνεται μια συγκριτική παρουσίαση των ποσοστών των εκκρινόμενων κυτοκινών IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α από υπερκείμενα καλλιέργειας σπληνικών T λεμφοκυττάρων σε εγκυμοσύνη 12ης ημέρας ποντικίων σε 24 και σε 48 ώρες σε σχέση με τις αντίστοιχες κυτοκίνες που εκκρίνονται την συγκεκριμένη μέρα στον ορό (Athanasakis I et al 1996). Φαίνεται ότι οι IL-4, IL-10, TNF-α από τα σπληνικά T λεμφοκύτταρα ακολουθούν ακριβώς το ίδιο πρότυπο έκκρισης όπως οι εκκρινόμενες

κυτοκίνες στον ορό. Η IL-2 φαίνεται να έχει πολύ μικρή τιμή στον ορό, ενώ στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών στο πρώτο και δεύτερο 24ωρο των T λεμφοκυττάρων υπάρχει μια αρκετά υψηλή παραγωγή. Η παρατητούμενη υψηλή παραγωγή IL-2 μπορεί να χρησιμοποιείται στην διαφοροποίηση των Thp (precursors) στην σπλήνα ή ακόμα να εξυπηρετεί την καταστολή της παραγωγής Th2 κυτοκινών (Mosmann & Sad 1996). Πάντως τόσο στα υπερκείμενα των σπληνικών T κυτταροκαλλιιεργειών όσο και στον ορό η IL-2 έχει μικρότερη τιμή από τις IL-4 και TNF-α κυτοκίνες.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4.α: Σύγκριση εκκρινόμενων κυτοκινών σε υπερκείμενα T λεμφοκυττάρων σπλήνας καλλιιεργείας 24h και 48h και σε ορό από 12η ημέρα ποντικίσιας κήσης.

sIL-2, sIL-4, sIL-10, sTNF-α: κυτοκίνες ορού

sp24 IL-2, sp24 IL-4 , sp24 IL-10, sp24 TNF-α: κυτοκίνες υπερκειμένων σπληνικών T λεμφοκυττάρων εγκυμοσύνης 24h καλλιιεργείας.

sp48 IL-2, sp48 IL-4 , sp48 IL-10, sp48 TNF-α: κυτοκίνες υπερκειμένων σπληνικών T λεμφοκυττάρων εγκυμοσύνης 48h καλλιιεργείας.

Δοκιμάζοντας αν το σπληνικό λεμφοκυτταρικό μοντέλο έκκρισης των κυτοκινών μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου δημιουργήσαμε 7 “κλώνους ” T λεμφοκυττάρων από έγκυα ποντίκια 12ης ημέρας. Στα υπερκείμενα των 6 από τους 7 κλώνους υπήρχε μια υπεροχή των IL-4, IL-

10 έναντι της IL-2 λεμφοκίνης, ενώ σε 1 κλώνο υπήρχε υπεροχή της λεμφοκίνης IL-2. Φαίνεται λοιπόν πάλι να υπάρχει μια υπεροχή των Th2 κυτοκινών και μια ισορροπία μεταξύ των επιπέδων IL-4 και IL-10 έτσι ώστε το άθροισμα των ποσοστών τους να διατηρείται σ'ένα σταθερό επίπεδο (Wegmann TG et al 1995). Στους 6 από τους 7 κλώνους το άθροισμα των ποσοστών των IL-4 και IL-10 ήταν 80-92% περίπου και όπου υπήρχε μεγάλη αύξηση της IL-4 υπήρχε αντίστοιχη μείωση της IL-10 κυτοκίνης και το αντίστροφο. Από την μελέτη των "κλώνων" T λεμφοκυττάρων φαίνεται ότι τα μητρικά T λεμφοκύτταρα διατηρούν μια επιλεκτική μνήμη διαφοροποίησης προς Th2 υποπληθυσμό.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί κατά τη διάρκεια της κύησης εκτός των θετικών παραγόντων, σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της εγκυμοσύνης παίζουν και οι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες του ορού. Όπως αναμενόταν οι οροί από έγκυα ποντίκια 12ης ημέρας προκαλούν καταστολή της διέγερσης των T λεμφοκυττάρων από τον πλακούντα. Στον άνθρωπο από την 8η εβδομάδα κύησης αναπτύσσονται παράγοντες στον ορό της μητέρας που καταστέλλουν από 23-28 % την διέγερση των λεμφοκυττάρων.

Διαταραχές καταστολής έχουν σαν αποτέλεσμα τη δυσαναλογία της ανάπτυξης του εμβρύου και αποβολές.

Χρησιμοποιώντας διάφορα πειραματικά μοντέλα εξετάστηκε εάν η καταστολή στον ορό επηρεάζει την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων ενώ προσπαθήσαμε να εξηγήσουμε την έκβαση της κύησης στις διάφορες περιπτώσεις. Στο σύστημα διέγερσης T λεμφοκυττάρων από υπόστρωμα πλακούντα προσθέσαμε ορό από έγκυα ζώα 12 ημερών που είχαν μολυνθεί με LPS, LPS + protein A, protein A, muramic acid, Mycobacterium tuberculosis, IFN- γ , TNF- α , και παρατηρήθηκε ότι οι οροί (εκτός του TNF) είχαν μεγαλύτερη κατασταλτική δράση από αυτήν της φυσιολογικής εγκυμοσύνης. Αυτή η απόκλιση του επιπέδου ανοσοκαταστολής που προκαλούν οι παραπάνω οροί των εγκύων ζώων συνοδεύεται από διαταραχή της ομαλής εγκυμοσύνης. Ο παράγοντας LPS είναι ο πιο τοξικός και περιέχει ανοσοκατασταλτικές κυτοκίνες όπως TNF- α , IFN- γ ενώ οι κυτοκίνες IL-4, IL-10 βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα (Athanasakis I et al in preparation). Αυτή η ισχυρή ανοσοκαταστολή του

LPS ορού οδηγεί όπως είναι γνωστό σε υψηλό ποσοστό αποβολών. Επίσης οι οροί *TNF-α*, *IFN-γ* που οδηγούν σε αυξημένες αποβολές σε ποντίκια καθώς και σε λιποβαρή έμβρυα και μείωση του βάρους του πλακούντα, προκαλούν ισχυρή καταστολή στη διέγερση των *T* λεμφοκυττάρων. Η ανοσοκαταστολή αυτών των ορών είναι μικρότερη από αυτή του *LPS* ορού και ίσως ο ορός αυτός περιέχει αθροιστικά περισσότερες κατασταλτικές πρωτεΐνες και κυτοκίνες. Η παράλληλη χορήγηση του *LPS* και *protein A* έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της τοξικότητας του ορού *LPS*, η οποία αντανακλάται από τη διατήρηση των αποβολών σε φυσιολογικά επίπεδα. Όμως η απόκλιση από τα κινούμενα πλαίσια της ανοσοκαταστολής του ορού φυσιολογικής εγκυμοσύνης οδηγεί σε ελαφρή μείωση του μεγέθους του πλακούντα και μείωση του μεγέθους του εμβρύου (Athanasakis I & Protopapadakis E, in preparation). Χορήγηση των *muramic acid*, *protein A*, *Mycobacterium tuberculosis* δεν επηρεάζει το ποσοστό των αποβολών ενώ η παρατηρούμενη ανοσοκαταστολή αποκλίνει από τα φυσιολογικά επίπεδα, γεγονός που πιθανά υποδεικνύει ότι η ανοσοκαταστολή των ορών αυτών δεν περιορίζεται μόνο στην επίδραση στα *T* λεμφοκύτταρα. Από αποτελέσματα του εργαστηρίου μας είναι γνωστό ότι οροί *sMyc.*, *sProt. A*, *sMur.*, προκαλούν μείωση πολλαπλασιασμού στις καλλιέργειες πλακουντικών κυττάρων *BALB/c* x *BALB/c* 40%, 65%, 75% αντίστοιχα. Αυτή η σειρά καταστολής των πλακουντικών καλλιιεργειών έρχεται σε συμφωνία με την σειρά ανοσοκαταστολής των ορών στην διέγερση των *T* λεμφοκυττάρων από τους τροφοβλάστες, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση των ορών στους πλακούντες ίσως επηρεάζει την έκκριση παραγόντων που καταστέλλουν έμμεσα τα *T* λεμφοκύτταρα.

Στους ορούς εγκυμοσύνης εκτός από ρυθμιστικές κυτοκίνες (Hill & Anderson 1990), αντισώματα (Sucia-Foca et al 1983), ορμόνες (Assal-Meliani et al 1995) εκκρίνονται και αντιγόνα μείζονος τάξης ιστοσυμβατότητας τάξης *I* και *II* με σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ομαλής εγκυμοσύνης τα οποία ίσως λαμβάνουν μέρος στην προαναφερόμενη ανοσοκαταστολή. Για τα εκκρινόμενα αντιγόνα τάξης *I* η πρώτη πληροφορία διατυπώθηκε από τους Van Rood J et al (1970). Αναφέρεται λοιπόν ότι τα αντιγόνα αυτά έχουν παρόμοια δομή με μεμβρανικά και ότι ο

ρόλος τους είναι η δέσμευση των ειδικών αλλοαντιγόνων, επιβίωση του αλλομοσχεύματος, παραγωγή αλλοαντισωμάτων. Αύξηση των επιπέδων τους εμφανίζεται στην απόρριψη μοσχευμάτων και ίσως στην εγκυμοσύνη (Purro F et al 1997).

Όσον αφορά στα εκκρινόμενα τάξης II αντιγόνα δεν αναφέρεται ένας σαφής ρόλος παρότι η περιγραφή τους έγινε για πρώτη φορά προ εικοσαετίας. Η αυξημένη παραγωγή τους σε αυτοάνοσες περιπτώσεις όπως και σε περιπτώσεις σπληνομεγαλίας, θρόμβωσης, χαμηλού αιματοκρίτη στη μητέρα και μη φυσιολογικής αιμάτωσης, προβληματικής ανάπτυξης του οφθαλμού και υπολειπόμενης εμβρυϊκής ανάπτυξης (Hoff C et al 1993, Purro F et al 1997), προσδίδουν σε αυτές τις πρωτεΐνες ανοσοδιεγερτικό χαρακτήρα.

Αποτελέσματα από το εργαστήριο μας δείχνουν αύξηση των τάξης I αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στον ορό φυσιολογικής εγκυμοσύνης τα οποία πιθανώς εμποδίζουν την πρόσδεση των αντισωμάτων στα σύμπλοκα τάξης I αντιγόνων που εκφράζονται από τα πλακουντικά κύτταρα. Πιστεύουμε ότι κάθε παρέκκλιση από τα επίπεδα της φυσιολογικής εγκυμοσύνης τόσο των τάξης I όσο και των τάξης II αντιγόνων οδηγεί σε προβληματική εγκυμοσύνη.

Έτσι ο ποντικίσιος ορός LPS δείχνει χαμηλό ποσοστό τάξης II και I αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Από έρευνα του εργαστηρίου μας είναι γνωστό ότι σε ποντίκια που έχει χορηγηθεί LPS παρατηρείται υψηλό ποσοστό αποβολών (αύξηση 100%) και σπληνομεγαλία. Όταν όμως γίνει παράλληλη χορήγηση LPS και *protein A* τα επίπεδα αντιγόνων τάξης I αυξάνονται περίπου στα φυσιολογικά επίπεδα οπότε δεν υπάρχουν αποβολές, ενώ τα αντιγόνα τάξης II είναι πολύ πιο αυξημένα από αυτά της φυσιολογικής εγκυμοσύνης γεγονός που εξηγεί την σπληνομεγαλία της μητέρας. (Athanasakis I et al in preparation).

Επίσης σε έγκυα ποντίκια που χορηγήθηκαν ο TNF-α ή IFN-γ παρατηρείται μεγάλη απόκλιση στα τάξης II αντιγόνα του ορού από τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες, ενώ ο ορός με IFN-γ έδειχνε επιπλέον μια απόκλιση από τα επίπεδα τάξης I σε σχέση με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη. Στους ορούς από ζώα με μόλυνση με το *Mycobacterium tub.* υπάρχει μία αύξηση των αντιγόνων τάξης II στα διπλάσια επίπεδα από αυτά της

φυσιολογικής εγκυμοσύνης και μια μείωση των αντιγόνων τάξης I στο μισό της φυσιολογικής κύησης. Στα ποντίκια αυτά παρατηρείται σπληνομεγαλία περίπου 50% και μια μικρή αύξηση των αποβολών της τάξης 3% (Athanassakis I, Protoparadakis E in preparation).

Οι οροί με *protein A* και *muramic acid* έχουν αντιγόνα τάξης I στα ίδια επίπεδα με αυτά της φυσιολογικής εγκυμοσύνης (ελάττωση αποβολών) ενώ τα αντιγόνα τάξης II είναι τριπλάσια περίπου από τα επίπεδα της φυσιολογικής εγκυμοσύνης (εμφάνιση σπληνομεγαλίας 30% και 15% αντίστοιχα).

Στον άνθρωπο τα αποτελέσματα για τα εκκρινόμενα τάξης I και II αντιγόνα στον ορό δεν φαίνεται να διαφέρουν. Τα εκκρινόμενα αντιγόνα τάξης I και τάξης II κυμαίνονται σε ένα ποσοστό 7-34% και 81-108%, αντίστοιχα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Με την έναρξη της κύησης το αντιγόνο τάξης I δείχνει να μειώνεται κατά 10% σε σχέση με την κατάσταση πριν την εγκυμοσύνη, ενώ η πτώση της τιμής του κάτω από ένα επίπεδο οδηγεί σε αποβολές. Οι *Maugyama T et al* (1994) υπέθεσαν ότι η επιτυχής θεραπεία με ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές αγνώστου αιτιολογίας μπορεί να δεσμεύει τα *anti-HLA* αντισώματα ή να αυξάνει το διαλυτό *HLA*.

Από την άλλη γενικά τα τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας είναι βλαβερά όταν αυξάνονται πάνω από κάποιο όριο και αυτό συνδιάζεται με έκφραση αντιγόνου τάξης II στην επιφάνεια τροφοβλαστών που είναι σηματοδότης των αποβολών (Athanassakis-Vassiliadis I Paramattheakis, 1991). Έτσι ποσοστό *HLA-DR* μεγαλύτερο από 108 περίπου (στα πειράματα οι αποβολές είχαν τιμή 130 %) οδηγούσε σε απόρριψη του εμβρύου. Πρώ της εγκυμοσύνης το εκκρινόμενο αντιγόνο τάξης II φαίνεται να βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα (63%) από αυτά της εγκυμοσύνης γεγονός που είναι αναμενόμενο εάν δεχθούμε ότι τα εκκρινόμενα τάξεως II έχουν διεγερτικό χαρακτήρα.

Μελετώντας τα εκκρινόμενα αντιγόνα τάξης I και II κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, φαίνεται ότι το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης είναι το πιο σημαντικό για την εξέλιξη της. Έτσι παρατηρείται μεγάλη πτώση των εκκρινόμενων αντιγόνων τάξης I (17%) κατά το πρώτο τρίμηνο, επίπεδα που αυξάνονται κατά την διάρκεια της εξέλιξης της κύησης μέχρι τη λοχεία

(34%), ενώ μεγάλη πτώση του εκκρινόμενου αντιγόνου οδηγεί σε αποβολές. Από την άλλη στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης υπάρχει μια σημαντική αύξηση των αντιγόνων τάξης II (81%) που αυξάνεται στο δεύτερο τρίμηνο (88%) και ελαττώνεται κοντά στα φυσιολογικά όρια στο τρίτο τρίμηνο (65%) για να πάρει τη μέγιστη τιμή του στη λοχεία. Σε περιπτώσεις αποβολών που συμβαίνουν κατά πλειοψηφία στο πρώτο τρίμηνο κύησης, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των τάξης II (130%) και πτώση των τάξης I.

Παρατηρώντας την σπουδαιότητα του πρώτου τριμήνου ερευνήσαμε την πιθανότητα ύπαρξης διαφορών στα παραπάνω αντιγόνα σε ορούς από διάφορες εβδομάδες κύησης 1ου τριμήνου (5η έως 23η εβδομάδα).

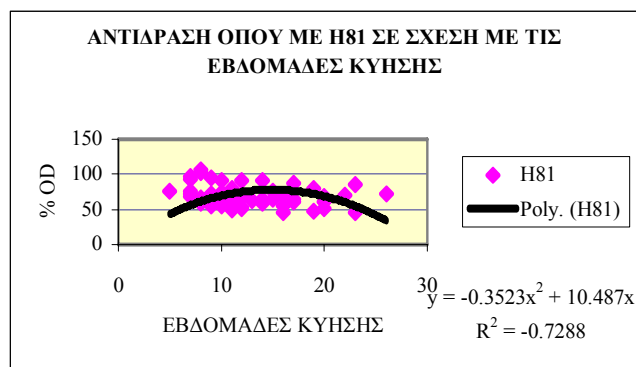
Ελέγχθηκαν οροί από 23 γυναίκες με αντίσωμα 7H3, H81 (για τα αντιγόνα τάξης II) και W6/32 (για τα αντιγόνα τάξης I). Η αντίδραση με 7H3 έδειξε ότι το αντιγόνο τάξης II παρουσιάζει μια μικρή και διαδοχική αύξηση του ποσοστού του από 27,5% ως 63%. Χρησιμοποιώντας το αντίσωμα H81 παρατηρείται μείωση του ποσοστού του αντιγόνου μετά την ένατη εβδομάδα κύησης (από 67,35 σε 63%) ενώ παραμένει σταθερό (περίπου στο 60-63%) από την 9η ως την 20η εβδομάδα για να αυξηθεί ελαφρώς μετά την 21η. Οι διαφορές που παρατηρούνται με τα δύο αντισώματα των τάξης II αντιγόνων υποδεικνύουν ότι ή εκκρινόμενη μορφή των πρωτεϊνών αυτών διαφέρει από τις κλασσικές μεμβρανικές τάξης II πρωτεΐνες. Το εκκρινόμενο τάξης I αντιγόνο δε δείχνει καμία αξιοσημείωτη μεταβολή μετά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου κύησης.

Στα διαγράμματα 4β, 4γ, 4δ αναζητείται πιθανή στατιστική σχέση μεταξύ των εβδομάδων κύησης και ποσοστού αύξησης της O.D. για τα αντισώματα 7H3, H81, W6/32. Είναι φανερό ότι το 7H3 αντίσωμα εμφανίζει μια γραμμική αύξηση σε αναλογία με τις εβδομάδες κύησης. Η μαθηματική σχέση που τα συνδέει δίδεται από την εξίσωση $y = 2,7563 x$. Το αντίσωμα W6/32 εμφανίζει μια σταθερή γραμμική απεικόνιση σε σχέση με τις εβδομάδες κύησης του πρώτου τριμήνου και εκφράζεται μαθηματικά από την εξίσωση $y = 0,0015 x + 17,478$. Η σχέση του H81 με τις εβδομάδες κύησης σε αυτήν την ανάλυση δεν είναι γραμμική αλλά πολυωνυμική και δίδεται από την εξίσωση $y = -0,3523x^2 + 10,487x$.

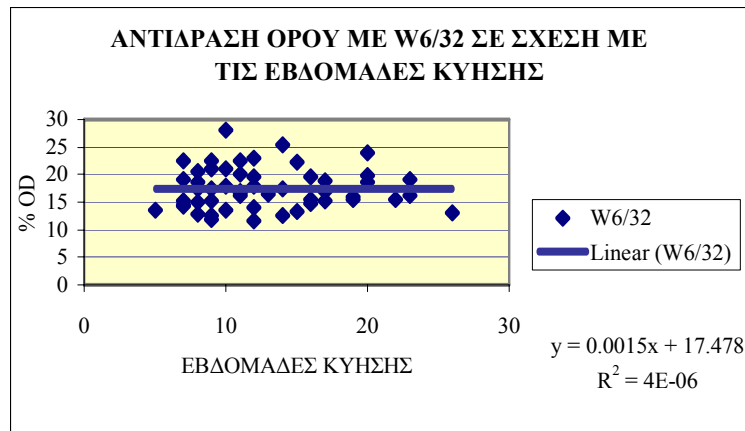
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4β



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4γ

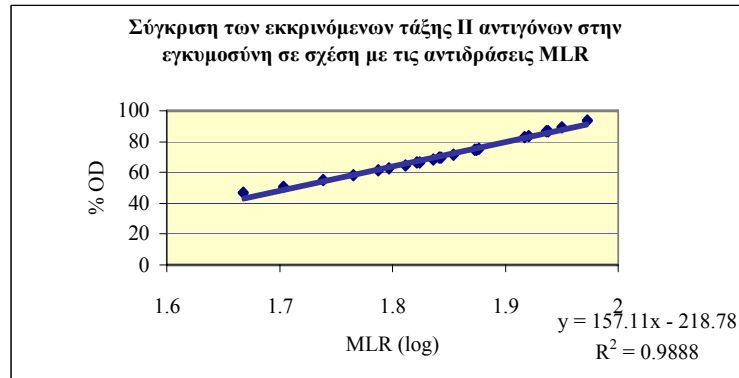


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4δ

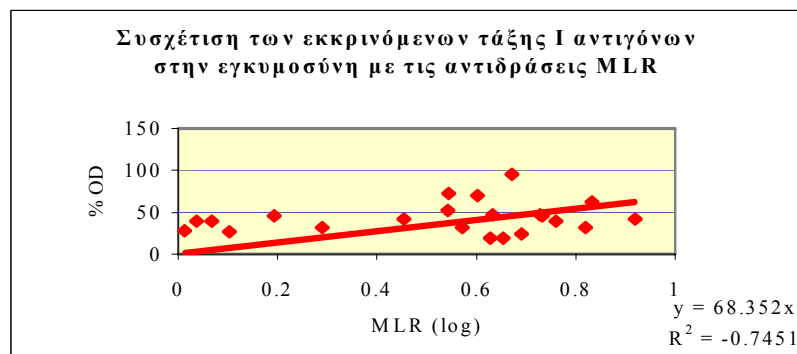


Επίσης στα διαγράμματα 4ε, 4στ απεικονίζεται στατιστικά η σχέση των εκκρινόμενων αντιγόνων τάξης I (W6/32) και τάξης II (H81) στον ορό εγκυμοσύνης πρώτου τριμήνου σε διάφορες εβδομάδες κύησης με τις αντιδράσεις MLR (Mixed Lymphocytes Reaction). Το τάξης II αντιγόνο εμφανίζει μια γραμμική αύξηση με τις λογαριθμικές τιμές του MLR του ορού όπου η σχέση τους δίνεται από την εξίσωση $y = 157,11x - 218,78$ με συντελεστή παλινδρόμησης $R^2 = 0,9888$. Από την άλλη το εκκρινόμενο αντιγόνο τάξης I εμφανίζει μια γραμμική αύξηση σε αναλογία με τις λογαριθμικές τιμές των ορών στις αντιδράσεις MLR που δίνεται από την σχέση $y = 68,352x$.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4ε



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4στ



Το NO όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, τη νευροδιαβίβαση και τον μακροφαγικό μηχανισμό άμυνας σε μολύνσεις (Lowenstein & Snyder, 1992, Lamas et al 1992, Xie et al 1992). Στη φυσιολογική εγκυμοσύνη αναφέρεται ότι η παραγωγή NO από την εμβρυοπλακουντική μονάδα παίζει σημαντικό ρόλο τόσο κατά τη διάρκεια της κύησης αλλά και στην έναρξη του τοκετού (Black et al 1996, Mc Layghlin and Conrad, 1995).

Στα πειραματικά μοντέλα των εγκύων ζώων μόλυνσης με *protein A* και *muramic acid* που έχουμε χαμηλό ποσοστό αποβολής ενώ περιμέναμε χαμηλό επίπεδο NO παρατηρήθηκε αύξηση NO στον ορό. Αντίθετα χορήγηση LPS σε έγκυα ποντίκια που δημιουργεί υψηλά ποσοστά αποβολών συνοδεύεται και από παραγωγή υψηλών επιπέδων NO στον ορό (Athanassakis and Ranella in preparation). Πιθανόν η επαγωγή NO στην εγκυμοσύνη να έχει ένα κατώφλι συγκέντρωσης πάνω από το οποίο ο οργανισμός δημιουργεί μια δικλείδα ασφαλείας, ενώ επιτρέπει την παραγωγή NO μόνο όταν αυτό απαιτείται (μολύνσεις). Θα πρέπει λοιπόν να διερευνηθεί ευρύτερα η συσχέτιση του NO με τις αποβολές εμβρύων καθώς και να μελετηθεί η διακύμανση της παραγωγής του κατά την διάρκεια της κύησης.

Στα πλαίσια της μελέτης της δράσης του NO σε περιπτώσεις αποβολών και της διακύμανσης της έκφρασης του κατά τη διάρκεια της κύησης ελέγχθηκε η παραγωγή του NO στον ορό στη διάρκεια της ανθρώπινης εγκυμοσύνης και στις αποβολές. Φαίνεται λοιπόν ότι στο πρώτο τρίμηνο κύησης η έκφραση αυξάνει κατά 54,76% ενώ στο 2ο τρίμηνο μειώνεται στο 7,14% για να αυξηθεί διαδοχικά στο τρίτο τρίμηνο (9,52%) και στη λοχεία (19,05%).

Η υψηλή τιμή του NO στο πρώτο τρίμηνο ίσως να αποτελεί την αντίδραση της μητέρας σε αυτήν τη « φλεγμονώδη » αντίδραση που προκαλεί το έμβρυο.

Κατά τη διάρκεια των αποβολών που συμβαίνουν συνήθως στο πρώτο τρίμηνο κύησης σε 10 από τις 13 γυναίκες, η αύξηση της παραγωγής του NO ήταν 23,81% λίγο πιο χαμηλά από τα φυσιολογικά επίπεδα παραγωγής NO.

Στις υπόλοιπες τρεις γυναίκες υπήρχε μια εντυπωσιακή αύξηση των επιπέδων του NO της τάξης του 359,52%. Γίνεται φανερό ότι το NO εμφανίζεται να έχει ένα κατώφλι συγκέντρωσης στο πρώτο τρίμηνο όπου η μείωση της συγκέντρωσης του (στις 10 γυναίκες περίπου στο μισό) ή η πολύ μεγάλη αύξηση της (περίπου 7πλάσιο στις υπόλοιπες 3 γυναίκες) οδηγεί σε αποβολές.

Λαμβάνοντας υπόψη την ανοσοτροφική και ανοσοκατασταλτική θεωρία, τα μέχρι στιγμής δεδομένα μας οδηγούν στην διατύπωση της θεωρίας, σύμφωνα με την οποία τα σπληνικά T λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στην εμβρυοπλακουντική μονάδα μετά από διέγερση από τα αλλοαντιγόνα του εμβρύου. Τα T λεμφοκύτταρα είναι CD4+ στην πλειοψηφία τους όπου στη μητροεμβρυική επαφή τα T λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τον πλακούντα

και οδηγούνται τόσο σε πολλαπλασιασμό όσο και σε έκκριση λεμφοκινών. Οι λεμφοκίνες έχουν μια ροπή προς τις Th2 κυτοκίνες, τουλάχιστον στο μέσον της εγκυμοσύνης, όπου αυξάνονται οι IL-4, IL-10 και λιγότερο η IL-2. Η IL-6 φαίνεται να μην παίζει κάποιο σπουδαίο ρόλο στο μέσον της εγκυμοσύνης ενώ ο TNF-α παράγοντας φαίνεται να αυξάνει από τη μέση ως το τέλος της κύησης.

Οι κυτοκίνες όπως και εκκρινόμενα αντιγόνα τάξης I και II βρίσκονται σε συγκεκριμένα ποσοτικά επίπεδα για να ρυθμίζουν την ανοσοκαταστολή/ανοσοδιέγερση της μητέρας. Διάφοροι μικροβιακοί παράγοντες μπορούν να διαταράξουν αυτήν την ισορροπία των τάξης I και των τάξης II μεταβάλλοντας την κατασταλτική δράση του ορού. Η μεταβολή των τάξης I και II αντιγόνων οποιασδήποτε αιτιολογίας συνοδεύεται από προβλήματα στην κύηση, ενώ τα αποτελέσματά μας δείχνουν να σχετίζονται με το μονοπάτι του NO. Οι πολύ μεγάλες αυξομειώσεις του επιπέδων του NO στον ορό της γυναίκας σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα αυτού, θα μπορούσε να αποτελεί παράγοντα προγεννητικού ελέγχου σε μια εγκυμοσύνη.

Στο μέλλον θα μπορούσε να γίνει απομόνωση και λεπτομερής χαρακτηρισμός των σπληνικών T λεμφοκυττάρων της εγκυμοσύνης ως προς τους επιφανειακούς μάρτυρες και τους υποδοχείς TCR. Επίσης θα μπορούσε να γίνει απομόνωση και καθαρισμός του εκκρινόμενου τάξης II αντιγόνου που θα βοηθούσε να αντιληφθούμε την ικανότητα έκφρασης και έκκρισης του διαλυτού αντιγόνου και το μηχανισμό δράσης. Τέλος θα μπορούσε να διερευνηθεί εκτενέστερα ο μηχανισμός λειτουργίας του εκκρινόμενου αντιγόνου τάξης I της εγκυμοσύνης. Με αυτόν τον τρόπο θα είναι δυνατόν να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στο ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη. Η γνώση αυτή θα βοηθήσει στην καλύτερη αντιμετώπιση των πιθανών αποβολών και διαφόρων επιπλοκών της κύησης. Θα μπορούσε να γίνει παρακολούθηση της εξέλιξης της κύησης με απλές ορολογικές εξετάσεις που μπορεί να περιλάμβαναν την μέτρηση NO, αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, κυτοκινικού προτύπου. Έτσι θα γινόταν έγκυρη θεραπευτική αντιμετώπιση και προφύλαξη σε γυναίκες με υψηλό κίνδυνο αποβολής. Ήδη τα τελευταία χρόνια η ανοσοθεραπεία λαμβάνει χώρα σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abehsira-Amar O., Gilbert M., Jolij M. (1992). IL-4 plays a dominant role in differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells, J. Immunol. 148;3820-3829

Ahmann G.B., et al (1978). Requirement for Ia-bearing accessory cell in conA-induced T-cell proliferation, J. Immunol., 121(5); 1981-1989

Anderson D.J., Berkowits R.S. (1985). Gamma interferon enhances expression of class I MHC antigens in the weakly HLA-positive human choriocarcinoma cell line BeWo but does not induce MHC expression in the HLA-negative choriocarcinoma cell line Jar, J. Immunol. 135;2489-2501

Assal-Meliani A., Kinsky R., et al (1995). In vivo immunosuppressive effects of recombinant ovine interferon-tau (trophoblastin): r.o. TP (r. oIFN-tau) inhibits local GVH reaction in mice (PLN assay prevents fetal resorptions, and favors embryo survival and implantation in the CBA/J x DBA/2 mice combination, Am. J. Reprod. Immunol., 33;267-275

Athanassakis I., Wegmann T.G. (1986). The immunotrophic interaction between maternal T cell and fetal trophoblasts/macrophages during gestation, Reprod. Immunol. ;99-105

Athanassakis I., Bleackley C.R., Paetkau V., et al (1987). The immunostimulating effects of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells, J. Immunol. 138;37-44

Athanassakis I., Chaouat G., Wegmann T.G. (1990). The effects of anti-CD4 and anti-CD8 antibody treatment of placental growth and function in allogeneic and syngeneic murine pregnancy, Cellular Immunol. ,129;13-21

Athanassakis-Vassiliadis I., Papamatheakis J. (1991). Modulation of the class II negative state of murine placenta leads to fetal abortion, Cellul. & Mol. Biol. of the materno-fetal relationship, 212;69-80

Athanassakis-Vassiliadis I. (1993). Lymphokine production by decidual cells in allogeneic and syngeneic murine pregnancy, Cytokine, 5; 354-361

Athanassakis I., Aifantis Y., et al (1996). Production of embryotoxic IgG antibodies during IFN-gamma treatment of pregnant mice, Am. J. Reprod. Immunol., 36(2); 111-117

Athanassakis I., Iconomidou B. (1996). Cytokine production in serum and spleen of mice from day 6 to 14 of gestation, Develop. Immunol. , 4; 247-255

Basham T.Y., et al (1977). Cross-linking of T cell mitogens: effects on B and T cell proliferation and immunoglobulin synthesis, J. Immunol., 118(3); 863-868

Bell J.I. (1985). Structure and polymorphism of murine and human class II major histocompatibility antigens, Immunol. Rev., 84; 51-71

Berkowits R.S., Hill J.A., Krytz C.B. et al (1988). Effects of products of activated leukocytes (lymphokines and monokines) on the growth of malignant trophoblast cells in vitro, Am. J. Obstet. Gynecol., 151;199-203

Bernard O., Schied M., Ropoche et al (1978). Immunological studies on mouse decidual cells I. Membrane markers of decidual cells in the days after implantation, J. Exp. Med., 148;580-596

Billing R.J., et al (1977). sHLA antigen present in normal human serum, Tissue Antigen, 10;(2)75-84

Black R.S., Flint S., et al (1996). Preterm labour and delivery, Eur. J. Pediatr., 155 [Suppl 2]; S₂-S₇

Blank M., et al (1987). Trophoblast does not cause the cytotoxic T lymphocyte generation due to the lack of ability to stimulate interleukin-2 production, Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol., 14(2); 49-53

Bulmer J.N. & Johnson P.M (1985). Antigen expression by trophoblast populations in the human placenta and their possible immunobiological relevance, Placenta , 6;121-141

Burt D., Johnston M., et al (1991). Cellular immune recognition of HLA-G expressing choriocarcinoma cell line Jeg-3, Int. J. Cancer, 6;17

Carosella E., Moreau P., Cluckman E. (1995). Alternative transcripts of the MHC of the non-classical class I HLA-G gene in the trophoblast during the first pregnancy trimester and in the placenta at term, C. R. Acad. Sci. III, 837-842

Carosella E.D., Dausset J., Kirszeenbaum M (1997). HLA-G revisited, Immunol. Today , 17(9);407-409

Chaouat G., Kolb J.P. and Riviere M (1984). Immunoactive products of murine placenta II. Afferent suppressive of maternal cell-mediated by supernatants from short-term cultures of murine trophoblast-enriched cell suspension, Ann. Immunol.(Paris), 135(2);205-218

Chaouat G., Menu E., Athanassakis I., et al (1988). Maternal T cell regulate placental size and fetal survival Regional Immunol., (1);143-148

Chaouat G., Menu E., Dy M., et al (1990). Control of fetal survival in CBA \times DBA/2 mice by lymphokine therapy, J. of Fertility and Sterility, 89;447-458

Chaouat G., Wegmann T.G., et al (1995). IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA \times DBA/2 mating combination and local defect in IL-10

production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- γ , J. Immunol., 154:4261-4268

Clark D.A., Flanders K.C., Banwatt D. et al (1990). Murine pregnancy decidua produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor B-2, J. Immunol., 144; 3008

Clark D.A., Slapsys R., Chaput A., et al (1986). Immunoregulatory molecules of trophoblast and decidual suppressor cell origin at the maternal fetal interface, Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol., 10;100-104

Claus R. et al (1990). Are soluble monocyte-derived HLA class II molecules candidates for immunosuppressive activity? Immunol. Lett., 26(3);203

Corbett J.A., and Mc Daniel M.L. (1992). Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of B-cell? Possible therapeutic intervention in IDDM, Diabetes, 41;879-903

Cottler-Fox M. et al (1990). Isolation of Hemopoietic precursor cells from human marrow by negative selection using monoclonal antibodies and immunomagnetic beads, Prog. Clin. Biol. Res., 333; 277-284

Cowchock F.S. (1986). Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortions, Am. J. Obst. Gynecol., 155;1002-1010

Cox G.W., Melille G., et al (1992). Tumor necrosis factor- α -dependent production of reactive nitrogen intermediates IFN- γ plus IL-2 induced murine macrophage tumoricidal activity, J. Immunol., 149;3290

Cresswell P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules, Annu. Rev. Immunol., 12;259-293

Cuturi M.C., Murphy M., et al (1987). Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 165;1581-1588

Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F. (1995). Preferential expression of CD30 by human CD4+ T-cell producing Th2-type cytokines, *FASEB J.*, 9;81-86

Deniz G., Christman S.E. (1995). Phenotypic and functional cellular differences between human CD3 decidua and peripheral blood leukocytes, *J. Immunol.*, 152(9);4255-4267

Domingo G.D., Moreno A., Palomino P. (1983). The effect of human pregnancy serum on the synthesis and action of interleukin-1, *Reprod. Immunol.*, 13;17-30

Drake B.L., Head J.R. (1989). Murine trophoblast cells can be killed by a Lymphokine Activated Killer (LAK) cells, *J. Immunol.*, 143;9-17

Drapier J.C., Wietzerbin J., Hibb J.B. (1988). Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages, *Eur. J. Immunol.*, 18;1587

Duc H.T., et al (1990). Differential modulation of the *in vitro* lymphocyte activation pathways by soluble and solubilized placental substances, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 24(3);73-79

Ellis S.A., Palmer M.S., McMichael A.J. (1990). Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule, *J. Immunol.*, 144;731-735

Fiorentino D.F (1989). Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones, *J. Exp. Med.*, 170;2081-

Fizet D., Bousquet J. (1983). Absence of a factor blocking a cellular cytotoxicity reaction in serum of women with recurrent abortions, *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 90;435-456

Fizet D., Bourgarrou R., Vezon G (1990). Lymphocyte immunization generates immunosuppressive factors in women with recurrent abortion , *Gynecol Obstet. Invest.*, 30;8-11.

Gazzinieli R.T., Oswald R.T., et al (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ activated macrophages, *J. Immunol.*, 148;1792.

Ghetie & Ward (1997). FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter, *Immunol. Today*, 18(12);592-8.

Gill T.G. (1986). Immunological and genetic factors influencing pregnancy and development, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 10;116-120

Graham G.H., et al (1992). Localization of transforming growth factor beta at human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation, *Biol. Reprod.*, 46(4); 561-572.

Gurka G., Rockling R.E (1987). Reproductive immunology, *JAMA*, 258;2983-2987.

Haimovici F., Anderson D.J (1991). The effects of soluble products of activated leukocytes and macrophages on blastocysts implantation events in vitro, *Biol. Reprod.*, 44;69-75.

Haimovici F., Anderson D.J (1993). Cytokines and growth factor in implantation, *Microscopy Res. Tech.*, 25;201-207.

Havenith C.E., Beelen R.H., et al (1992). An improved and rapid method for the isolation of rat lymph node or spleen T lymphocytes for T-cell proliferation assays, *J. Immunol. Methods*, 153(1-2); 73-79.

Hill J.A., Anderson D.J. et al (1990). Evidence for the existence and significance of immune cells in male and female reproductive tissues, *Immunol. Allerg. Clin. North. Am.*, 10;1-12.

Hill J.A., et al (1991): Implications of cytokines in male and female sterility, In *Cellular and molecular biology of maternal-fetal relationship*, Chaouat G., Mowbray J.F., (eds). Paris. INSERM/John Libbey Eurotext, 1991, 269-275.

Hill J.A., Polgar K. et al (1995). T helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion, *JAMA*, 273(4)1933-1936.

Hoang T., Gilmore D., et al (1983). Separation of hemopoietic cell from adult mouse marrow by use of monoclonal antibodies, *Blood*, 61(3); 580-588.

Hobel V., Straube W., Loh M., et al (1989). Human early pregnancy factor and early pregnancy associated protein before and after therapeutic abortion in comparison with beta-hCG, estradiol, progesterone and 17-hydroxyprogesterone, *Exp. Clin. Endocrinol.*, 94:171-176.

Hoff C., Peevy K.J. et al (1993). Association between maternal-fetal HLA-DR relationships and fetal growth, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 30(4);246-253.

Houlihan J.M., Biro P.A., Harper H.M., (1995). The human amnion is a site of MHC class Ib expression evidence for the expression of HLA-E and HLA-G, *J. Immunol.* 154(11);5665-5674.

Hunt J.A., Atherton R.A., (1990). Differential responses of rat trophoblast cells and embryonic fibroblasts to cytokines that regulate proliferation and class I MHC antigen expression, *J. Immunol.*, 145;184-189.

Igiestem J.M., et al (1996). *The molecular mechanism of T cell control of Chlamydia in mice role of nitric oxide*, *Immunology*, 87;1-8.

Inostroza J., Ferrada J., et al (1997). *Soluble histocompatibility class I antigens and beta 2-microglobulin in pregnant females and cord blood samples*, *Hum. Immunol.*, 54(1);63-68.

Jacobs P., Rodziah D., Stenenson M.M., (1995). *Nitric oxide expression in the spleen but not in the liver, correlates with resistance to blood –stage malaria in mice*, *J. Immunol.*, 155;5306-5313.

Janeway C.A., Carding S., Jones B., et al (1988). *CD4+ T cells: specificity and function*, *Immunol. Rev.*, 101;39-80.

Jokhi P.P., et al (1994). *Production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes*, *Human Reprod.*, 9(9): 1660-1669.

Jokhi P.P., et al (1995). *Secretion of colony stimulating factor by human first trimester placental and decidual cell populations and the effect of this cytokine on trophoblast thymidine uptake in vitro*, *Human Reprod.*, 10(10); 2800-2807.

Kahn-Perles B., Barra C., Jehan J., et al (1989). *Cytotoxic T lymphocyte recognition of secreted HLA class I molecules*, *J. Immunol.*, 142(9);3021-3025.

Kirszenbaum M., Morcau P., Gluckeman E., et al (1994). *An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocyte*, *Natl. Acad. Sci. USA*, 91;4209-4213.

Kovats S., Main E.K., Librach C. et al (1990). *A class I antigen HLA-G, expressed in human trophoblasts*, *Science*, 248; 220-223.

Kover K., et al (1995). *Differential expression and regulation of cytokine gene in mouse uterus*, *Endocrinology* 136; 1666-1673.

Krishan Lakshmi, Guilbert L.J., Wegmann T.G., (1993). *T helper 1 response against Leishmania major in pregnant C57BL/6 mice increase implantation failure and fetal resorptions*, *J. Immunol.*, 156;652-653.

Kunhert M., Stromeier R. et al (1998). *Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy*, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 72(2); 147-151.

Kwak J. YH., Beaman K.D. et al (1995). *Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+ and CD19+ cell in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses*, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34;93-99.

Labarreze C.A., Faulk W.P., (1990). *MHC class II reactivity of human villous trophoblast in chronic inflammation of unestablished etiology*, *Transplantation*, 50(5);812-816.

Lamas S., Marsden P.A., et al (1992). *Endometrial nitric oxide synthase molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89;6348-6352.

Lata J.A., Tuan R.S., Shepley K.J., et al (1992). *Localization of major histocompatibility complex class I and II mRNA in human first- trimester chorionic villi by in situ hybridization*, *J. Exp. Med.*, 175;1027-1032.

Lea R.G., Underwood J., Flanders K., et al (1995). *A subset of patients with recurrent spontaneous abortion is deficient in transforming growth factor B-2-producing "Suppressor Cell" in uterine tissue near the placental attachment site*, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34;52-64.

Leach J.L., Sedmak D.D., et al (1996). *Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn and localization to the syncytiotrophoblast: implication for maternal-fetal antibody transport*, *J. Immunol.*, 157 (8);3317-20.

Le Boutieiller P., Rodriguez A.M., et al (1996). Placental expression of HLA class I genes, Am. J. Reprod. Immunol., 35(3);216-225.

Le Boutieiller P & Mallet V., (1997). HLA-G and pregnancy, Rev. Reprod., 2(1);7-13.

Letellier C., Fizet D., et al (1994). Immunosuppressive activity of sera pregnant women on cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity. I. Characterization of the active fraction, Gynecol Obstet. Invest., 37(1);1-5.

Liew F.Y., Li Y., et al (1991). A possible novel pathway of regulation by murine T helper type 2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages, Eur. J. Immunol., 21;2489.

Lin H., Mosmann T.R., Guilbert L. et al (1993). Synthesis of T helper 2- type cytokine at the maternal-fetal interface, J. Immunol., 151;4562-4573.

Lowenstein C.J., and Snyder S.H, (1992). Nitric oxide, a novel biological messenger, Cell , 70;705-707.

Lyall F., Myatt I., et al (1995). Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in intrauterine growth retardation, Placenta,17;165-168.

Lyall F., Young A., Greer I.A., (1995). Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia, Am. J. Obstet. Gynecol., 173;714-718.

Marletta M.A., et al (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism, J. Biol. Chem., 268;12231-12234.

Masset B., Cuevas M., Girard J.P., (1980). Analysis of serum-mediated immunosuppression in normal pregnancy, abortion and contraception, *Alergol. Immunopathol.*, 8;569-578.

Matthiesen L., Berg G., et al (1996). Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in normal pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 35(2);70-79.

Matsui S., et al (1989). Characterization and analysis of soluble suppressor factor from early human decidual cells, *Transplantation*, 47(4);678-683.

Mc Laughlin K.M., and Conrad K.P., (1995). Nitric oxide biosynthesis during pregnancy: implication for circulatory changes, *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 22;164-171.

Mellilo G., Cox G.W., et al (1994). Regulation of nitric-oxide synthase mRNA expression by interferon γ and picolinic acid, *J. Biol. Chem.*, 269;8128.

Mincheva-Nilsson L., Baranov V., et al (1993). Immunotrophologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy, *J. Immunol.*, 152(4);2020-2032.

Mincheva-Nilsson L., Kling M., et al (1997). Gamma/delta T cells of human early pregnancy decidua evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity and extrathymic differentiation, *J. Immunol.*, 151;3266-3277.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A., (1992). Nitric oxide physiology pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, 43;109-142.

Mosmann T.R. & Coffman R.L., (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different function properties, *Annu. Rev. Immunol.*, 7;145-173.

Mosmann T.R. & Sad S., (1996). *The expanding universe of T- cell subsets Th1, Th2 and more. Immunol. Today* , 17(3);139-147.

Murayama T., Nozawa S., et al (1994). *The influence of intravenous immunoglobulin treatment on maternal immunity in women with unexplained recurrent miscarriage, Am. J. Reprod. Immunol.*, 31(1);7-18.

Myatt I., Sooraana S.R., et al (1991). *The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation, Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161;687-692.

Myatt I., Brewer A.S., et al (1992). *Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal placental circulation, Am. J. Obstet. Gynecol.*, 166;224-230.

Myatt I., Broockman D., et al (1993). *Constitutive calcium dependent isoform of nitric oxide synthase in the human placental vascular tree, Placenta*, 17;165-168.

Nandi D., and Allison J.P., (1991). *Phenotypic analysis and $\gamma\delta$ T- cell receptor repertoire of murine T cells associated with vaginal epithelium, J. Immunol.*, 147;1773.

Norin A.J. et al (1982). *Replicative properties of lipopolysaccharide induced murine B lymphocytes: detection of three different responses to mitogenic restimulation, J. Immunol.*, 129(6);2377-2381.

Nicholas N.S., Panay G.S., Nouri A.ME., (1984). *Human pregnancy serum inhibits interleukin-2 production, Clin. Exp. Med.*, 58;587-595.

Oswald I.P., Cazzineli R.T., (1992). *IL-10 synergies with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity, J. Immunol.*, 148;3578.

Oswald I.P., Eltaim I., et al (1994). Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite *Schistosoma mansoni* through production of nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91; 999-1005.

Parr E.L., Chen H-L., et al (1995). Synthesis and granular localization of tumor necrosis factor-alpha in activated NK cells in pregnant mouse uterus, *J. Reprod. Immunol.*, 28;31-40.

Parhar R.S., et al (1989). PGE-2 mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in decidua with potential anti-trophoblast activity, *Cell Immunol.*, 120(1);61-74.

Pereyra B.S. et al (1991). IFN induction by *Lactobacillus bulgaticus* and *Streptococcus thermophilus* in mice, *Eur. Cytok. Netw.*, 2;229-303.

Pfeffer K.I., et al (1993). Mice deficient for the 55kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxin shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection, *Cell*, 73;457-467.

Picot S., et al (1994). Signal transduction pathways involved in tumor necrosis factor secretion by *Plasmodium falciparum* stimulated human monocytes, *Immunology*, 83;70-74.

Pockley A.G., et al (1989). Placental protein 14 (PP14) inhibits the synthesis of interleukin-2 and the release of soluble interleukin-2 receptors from phytohaemagglutinin- stimulated lymphocyte , *Clin. Exp. Immunol.*, 77(12);252-256.

Poppo F., Ferrone S., et al (1997). Soluble HLA antigen: new roles and uses, *Immunol. Today* , 18;154.

Power D.A., Mason R.J., et al (1983). The fetus as an allograft , evidence for protective antibodies to HLA-linked paternal antigens, *Lancet*, 701-704.

Qin Z.H., Zheng Z.Q.,(1987). Detection of early pregnancy factor in human sera, *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 13;15-18.

Raghupathy R., Singh B., Leigh J.B. et al (1981). The ontogeny and turnover kinetics of paternal H-2K antigenic determinants on the allogeneic murine placenta, *J. Immunol.*, 127;2070-2073.

Raghupathy R., Tangri S., (1996). Immunodystrophism, T cell, cytokines and pregnancy failure, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 35;291-296.

Raghupathy R., (1997). Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy, *Immunol. Today* , 18(10);478-482.

Reed E., Beer A.E., Hutcherson H., et al (1991). The alloantibody response of pregnant women and its suppression by soluble HLA antigen and anti-idiotypic antibodies, *J. Reprod. Immunol.*, 20(2);115-128.

Reimers J.I., Bjerre U., et al (1994). Interleukin 1 β induces diabetes and fever in normal rats by nitric oxide via induction of different nitric oxide synthases, *Cytokine*, 6;512-520 .

Roclin R.E., Kitzmiller J.L., et al (1976). Maternal-fetal relation. Absence of an immunologic blocking factor from serum of women with chronic abortions, *N. Engl. J. Med.*,295;1209-1213.

Roclin R.E., Kitzmiller J.L., et al (1982). Maternal fetal relation II: Further characterization of an immunologic blocking factor that develops during pregnancy, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 22;305-315.

Rolfe B.E., Cavanagh et al (1988). Identification of two suppressor factors induced by early pregnancy factor, *Clin. Exp. Immunol.*, 73(2);219-225.

Rolfe B.E., Quin K., et al (19). Genetically-restricted effector molecules released by human lymphocytes in response to early pregnancy factor, *Immunol. Cell. Biol.*, 63(Pt 3);203-208.

Romagnani S, (1991). Human TH1 and TH2: doubt no more, *Immunol. Today*, 12;256-257.

Romagnani S, Parroonchi P., D'Elis MM et al(1997). An uptake on human Th1 and Th2 cells, *Int. Arch. Allerg. Immunol.*, 113;153-156.

Romagnani S, (1992). Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response?, *Immunol. Today*, 13(10);379-381.

Romagnani S, (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states, *Annu. Rev. Immunol.*, 12;227-257.

Ruiz J.E. et al (1995). Autoantibodies to phospholipids and nuclear antigens in non-pregnant and pregnant Colombian women with recurrent spontaneous abortions, *J. Reprod. Immunol.*, 28;41-51.

Sad S., Marcotte R., Mosmann T.R., (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines, *Immunity* 2 ;271-279.

Sanders S.K., Giblin P.A., Kavathas P., (1991). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility complex Class I molecules on cytotrophoblasts, *J. Exp. Med.*, 174;737-746.

Sano M., Miake S., Yashikai Y., et al(1984). Existence of suppressor cells in the spleen of allogeneic and syngeneic primiparous pregnant mice, *J. Reprod. Immunol.*, 6;239.

Schnefelder G., Mathias J., et al (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes, *FASEB J.*, 10-777.

Sheffler L.A., Cox W.G., et al (1995). Exogenous nitric oxide regulates IFN- γ plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages, *J. Immunol.*, 155;886.

Shizuo A., Kanji Y., et al (1995). Targeted disruption of the IL-6 related genes:gp. 130 and NF-IL-6, *Immunol. Rev.* , 148;221.

Skibin A., Quastel M.R., et al (1989). Suppression of lymphocyte activation by a soluble factor released from human placental chorionic membrane: chemical analysis and functional characterization, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 36(2); 111-117.

Slapsys R. and Clark D.A.,(1983). Active suppression of host-versus-graft-reaction in pregnant mice V. Kinetics, specificity and in vivo activity of non T suppressor cells localized to the genital tract of mice during first pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 3;65.

Smith M.J., Norihisa Y., Ortaldo J.R., (1992). Multiple cytolytic mechanisms displayed by activated human peripheral blood T cell subsets, *J. Immunol.*, 148;55-65 .

Sriskandans S., et al (1996). Bacterial superantigen-induced human lymphocyte responses are nitric oxide dependent and mediated by IL-12 and IFN- γ , *J. Immunol.*, 156;2430-2435.

Stoynowski I., and Lindahl K.F., (1994). Antigen presentation by non-classical class I molecules, *Curr. Opin. Immunol.*, 6;38-44.

Stuart P.M., et al (1989). Induction of class II antigen expression in macrophages by *Mycoplasma* species, *J. Immunol.*, 142;3392 .

Strominger J.L., (1995). The class I and class II proteins of human major histocompatibility complex, *JAMA*, 274;1074-1076.

*Sucia-Foca N., Reed E., et al*1983. *Anti-idiotypic antibodies to anti-HLA receptors induced by pregnancy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80;830-834.*

Sulke A.N., Jones D.B., Wood P.J., (1985). Hormonal of human natural killer cell activity in vitro, J. Reprod. Immunol., 7;105-110.

Szekers-Bartho J.,Autran B., et al (1989). Immunoregulatory effects of a suppressor factor from health pregnant women's lymphocytes after progesterone induction, Cellular Immunol. ,122;281-294.

Szekers-Bartho J., Faust Z.S., Varga P., (1995). The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes, Am. J. Reprod. Immunol. 34;342-348.

Tangri S., Raghupathy R., et al (1993). Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions, Biol. Reprod., 49(4);850-856.

Tangri S., Wegmann T.G., et al (1994). Maternal anti-placental reactivity in natural immunologically-mediated spontaneous fetal resorptions, J. Immunol., 152;4903-4912.

Tsoukatos D., Skarpelis G. & Athanassakis I., (1994). Placenta-specific growth factor production by splenetic cells during pregnancy, Placenta, 15;467-476.

Tufano M.A., et al (1991). Protein A and other surface components of Staphylococcus aureus stimulated production of IL-1a, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , Europ. Cyt. Netw., 2;361-336.

Van Vlasselear P., Coebels J., Vadeputte M., (1985). Inhibition of human natural killer cell activity in vitro, J. Reprod. Immunol., 7;105-110.

Uksila J., et al (1985). Human NK cell activity is not inhibited by pregnancy and cord serum factors and female steroid hormones in vitro, J Reprod. Immunol., 7;111-120.

Van Koer L., Wu L., Ito K., et al (1989). Recognition of MHC TL gene products by $\gamma\delta$ T cells, Immunol. Rev., 120;89.

Rood J.J. van, et al (1970). Anti HL-A₂ inhibitor in normal human serum, Nature, 226;366.

Vassiliadou N. & Bulmer J.N., (1996). Quantitative analysis of T lymphocytes subsets in pregnant and non pregnant human endometrium, Biol. Reprod., 55(5);1017-1022.

Wang H.N., Zheng Z.Q., (1990). Detection of early pregnancy factor in fetal sera, Am. J. Reprod. Immunol., 23;69-72.

Watanabe M., Iwatani Y., et al (1997). Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy, Am. J. Reprod. Immunol. 37(5);368-377.

Wegman T.G., (1984). Placental immunotrophism: maternal T cell enhance placental growth and function, Am. J. Reprod. Immunol., Microbiol., 15;67-70.

Wegman T.G., (1984). Fetal protection against abortion, Annu. Immunol., 1351;309-311.

Wegman T.G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T.R., (1993). Bidirectional cytokine interactions in maternal-fetal relationship: is succesfull pregnancy a Th2 phenomenon?, Immunol. Today , 14(7);353-356.

Wei X.H. & Orr H.T., (1990). Differential expression of HLA-E, HLA-F and HLA-G transcripts in human tissue, Human Immunol., 29;131-142.

Wolf Levin R., Aoki K., et al (1996). Human pregnancy serum suppress the proliferative response of lymphocytes to autologous PHA-activated T lymphoblasts, Am. J. Reprod. Immunol. 35(2);63-69.

Xie Q., Cho H.J., et al (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages, Science, 256;225-228.

Yagel S., et al (1989). Trophic effects of first- trimester human trophoblasts and human chorionic gonadotropin on lymphocyte proliferation, Am. J. Obstet. Gynecol., 160(4);946-953.

Yamada H., Polgar K., Hill J., (1995). Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent abortion, Am. J. Obstet. Gynecol., 170;1339-1344.

Yamamoto Y. et al (1989). Localization of type I interferon in murine trophoblast and decidua during decidual formation, J. Reprod. Fertin., 95(2);559-565.

Yamamura M., (1991). Defining protective responses to pathogenes: cytokine profiles in Leprosy lesions, Science, 245; 277-279.

Zubler R.H et al (1984). Polyclonal B cell responses in presence of defined filler cells: complementary effects of lipopolysaccharide and anti-immunoglobulin antibodies, Eur. J. Immunol., 14(4);357-363.