

Praca naukowa finansowana ze
Środków Ministerstwa Nauki
i Szkolnictwa Wyższego
Projekt badawczy nr K/PBP/00238

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Anna Knafel

Ocena komórek układu immunologicznego w miejscu implantacji
ciąży pozamaciczej

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Antoni Basta

Pracę wykonano w:

Katedrze Ginekologii i Położnictwa

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. n.med. Antoni Basta

Kraków, 2010

Podziękowania

W sposób szczególny pragnę podziękować mojemu promotorowi Profesorowi Antoniemu Baście, dzięki któremu ta praca mogła powstać, za inspirację, cenne wskazówki, dobre rady i poświęcony czas.

Serdeczne słowa podziękowania kieruję na ręce moich Rodziców za wychowanie, wiarę we mnie i podtrzymywanie motywacji.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	5
1.1. Cięża pozamaciczna- występowanie i klinika.....	5
1.2. Tolerancja immunologiczna a cięża i poród.....	9
1.3. Komórki Treg-klasyfikacja.....	13
1.4. Komórki Treg w ciąży.....	15
1.5. Układ immunologiczny związany z błoną śluzową jajowodu.....	18
1.6. Molekularne zmiany u kobiet z ciężą pozamaciczną	19
1.7. Poronienie samoistne a zaburzenia układu immunologicznego.....	24
2. ZAŁOŻENIA I CEL ROZPRAWY.....	26
2.1. Założenia pracy.....	26
2.2. Cel pracy.....	28
3. MATERIAŁ I METODY BADANIA.....	29
3.1. Materiał kliniczny.....	29
3.1.1. Charakterystyka kliniczna kobiet z ciężą pozamaciczną.....	31
3.1.2. Charakterystyka kliniczna kobiet z poronieniem samoistnym.....	33
3.1.3. Charakterystyka kliniczna kobiet nieciążarnych.....	34
3.2. Materiał tkankowy.....	35
3.3. Metodyka.....	36
3.3.1. Izolacja komórek.....	36
3.3.2. Identyfikacja limfocytów Treg i komórek cytotoksycznych.....	36
3.3.3. Analiza cytofluorometryczna.....	37
3.4. Analiza statystyczna.....	39
4. WYNIKI.....	40
5. DYSKUSJA.....	64
6. WNIOSKI.....	75
7. ABSTRACT.....	76
8. STRESZCZENIE.....	80
Piśmiennictwo.....	85
Indeks skrótów.....	100
Spis rycin.....	101
Spis tabel.....	103
Aneks.....	104

1. WSTĘP

1.1. CIAŻA POZAMACICZNA- WYSTĘPOWANIE I KLINIKA

Ciąża pozamaciczna, powstająca na skutek implantacji zapłodnionej komórki jajowej poza błoną śluzową jamy macicy, została po raz pierwszy opisana w 936 roku przez arabskiego lekarza Albucasisa [1]. Kolejne doniesienie na temat tej patologii pochodzi z 1693 roku, w którym Boucier opisuje niepękniętą ciążę jajowodową rozpoznaną u kobiety, na której wykonano wyrok śmierci [2]. Częstość występowania ciąży pozamacicznej, określana jest na około 100-175 przypadków na 100 000 ciąż u kobiet w wieku 15-44 lat [3]. W ciągu ostatnich trzech dekad w wielu krajach (m.in. Norwegia, Wielka Brytania) zaobserwowano trend 2-3 krotnego wzrostu częstości występowania ciąży pozamacicznej w populacji generalnej kobiet, po którym doszło do jego zahamowania oraz spadku [4-8]. Ten początkowy wzrost może być, przynajmniej częściowo, tłumaczony zwiększeniem częstości występowania czynników ryzyka ciąży pozamacicznej m.in. infekcji *Chlamydia trachomatis*, a spadek jest odzwierciedleniem wdrożenia skutecznej prewencji [3,7-10]. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej liczba przypadków ciąży pozamacicznej w latach 90-tych uległa potrojeniu w porównaniu do roku 1970 [9,11].

W Polsce ostatnie dostępne w literaturze badania epidemiologiczne dotyczące częstości występowania ciąży pozamacicznej były przeprowadzone w Wielkopolsce w latach 1980 – 1985. W badaniach tych wykazano niewielki wzrost częstości występowania ciąży pozamacicznej tj. z 4,36 do 5,05 na 1000 porodów [12]. Mimo że w ostatnich latach zaobserwowano spadek śmiertelności spowodowanej ciążą pozamaciczną, to nadal ponad 75% zgonów w pierwszym trymestrze ciąży i 9-13% ogółem zgonów w ciąży związanych jest z występowaniem tej patologii [4,13].

Nieprawidłowa implantacja jaja płodowego w blisko 98,3% przypadków dotyczy jajowodu, 0,15% jajnika, 0,15% szyjki macicy, rzadziej jamy brzusznej [14]. W obrębie jajowodu ciąża pozamaciczna najczęściej zlokalizowana jest w jego części bańkowej (80%), rzadziej w cieśni (12%), najrzadziej w odcinku śródściennym jajowodu [14]. Zidentyfikowano liczne czynniki zwiększające ryzyko powstania ciąży jajowodowej, które potwierdzono w wielu badaniach [15-18]. Wykazano, że przebyte operacje w obrębie jajowodów, leczenie niepłodności, stosowanie wkładki wewnątrzmacicznej powyżej 2 lat i przebyta ciąża ektopowa znacznie zwiększają ryzyko wystąpienia ciąży pozamacicznej [15]. Kobiety z dodatnim wywiadem w kierunku przebytego stanu zapalnego miednicy (PID; Pelvic Inflammatory Disease), z potwierdzonymi nieprawidłowościami budowy i funkcji jajowodu, palące papierosy oraz mające więcej niż jednego partnera seksualnego należą do grupy umiarkowanego ryzyka wystąpienia nieprawidłowej implantacji zarodka [15,17,19]. Zabieg sterylizacji, zwłaszcza z użyciem elektrokoagulacji, u kobiet poniżej 30. roku życia wiąże się z 9-krotnym wzrostem ryzyka wystąpienia ciąży jajowodowej [20]. Wykazano, że zarówno barierowe, jak i hormonalne metody antykoncepcji zapobiegają ciąży pozamacicznej [21]. Jednak wyniki analiz przeprowadzonych w przypadku nieskutecznej antykoncepcji wykazały, że ciąża jajowodowa występuje częściej u kobiet stosujących antykoncepcję gestagenową, implanty progestagenowe i wkładki wewnątrzmaciczne [22].

Odpowiednio wczesne rozpoznanie ciąży pozamacicznej zlokalizowanej w jajowodzie zwiększa prawdopodobieństwo, że ściana jajowodu nie jest jeszcze nieodwracalnie uszkodzona, dzięki czemu jajowód może być zachowany podczas leczenia. Na tym etapie rozwoju ciąży pozamacicznej istnieje duża szansa powodzenia terapii zachowawczej z podaniem metotreksatu lub postępowania operacyjnego - laparoskopowej ewakuacji jaja płodowego bez konieczności usunięcia fragmentu jajowodu. Pęknięcie ciąży jajowodowej

w zdecydowanej większości przypadków stwarza konieczność wykonania częściowej lub całkowitej resekcji jajowodu poprzez laparotomię, co w przypadku współistniejącej patologii drugiego jajowodu znacznie ogranicza płodność kobiet [23,24]. Krwotok w przebiegu ciąży pozamacicznej jest główną przyczyną zgonów kobiet w pierwszym trymestrze ciąży [11,25-27]. W krajach rozwiniętych [Norwegia, Wielka Brytania, USA] stanowi on 3.4% zgonów w ogólnej populacji ciężarnych [28,29], a w rejonach, gdzie opieka medyczna nie jest powszechnie dostępna śmiertelność dochodzi nawet do 27% [30,31].

Chociaż w ciągu ostatniego trzydziestolecia w medycynie nastąpił intensywny rozwój diagnostyki obrazowej i laboratoryjnej, które to metody są niezwykle pomocne w rozpoznaniu ciąży jajowodowej, nadal patologia ta, a raczej predykcja wystąpienia jej powikłania, jakim jest pęknięcie jajowodu, pozostaje jednym z trudniejszych problemów klinicznych. Obecnie coraz częściej pacjentki zgłaszają się do lekarza, kiedy objawy kliniczne są słabo nasilone. Typowa triada objawów: brak miesiączki, krwawienie z dróg rodnych, ból brzucha, są mało charakterystyczne i mogą występować również w poronieniu. Co więcej 1/3 kobiet nie zgłasza dolegliwości związanych z ciążą pozamaciczną, a 9% nie manifestuje żadnych objawów klinicznych [32,33]. U większości kobiet ciąża jajowodowa nie jest rozpoznana w trakcie pierwszej wizyty [32,34], co wynika z faktu, iż szacowana dokładność oceny klinicznej uwzględniająca dolegliwości zgłaszane przez pacjentkę, czynniki ryzyka i badanie przedmiotowe oceniana jest na około 50% [35]. Wprowadzenie dodatkowych metod diagnostycznych, zarówno laboratoryjnych jak i obrazowych, znacznie poprawiło rozpoznawalność ciąży jajowodowej. Obecnie jako metody diagnostyczne i diagnostyczno-terapeutyczne najczęściej stosuje się ultrasonografię dopochwową (USG TV; Transvaginal Ultrasound), oznaczenie stężenia β -podjednostki gonadotropiny kosmówkowej (β -hCG; beta subunit of human Chorionic Gonadotropin:) oraz laparoskopię.

Obecność ciąży wewnątrzmacicznej w badaniu USG TV z reguły wyklucza ciążę pozamaciczną. Wyjątek stanowią kobiety, u których można podejrzewać współistnienie ciąży heterotopowej, np. leczone z powodu niepłodności [36]. Badania wykazały, że USG TV w wykrywaniu zmian o mieszanej echogeniczności w obrębie przydatków odznacza się czułością - 84,4% i swoistością- 98,9% [37]. Jednak obraz ultrasonograficzny ciąży pozamacicznej może być bardzo różnorodny. Obecność w obrębie przydatków pęcherzyka ciążowego z żywym zarodkiem pozwala na postawienie jednoznacznej diagnozy. Taki obraz ultrasonograficzny ciąży jajowodowej obserwowany jest jednak rzadko [37,38]. W 50% przypadków widoczna jest mało charakterystyczna zmiana lita lub lito-torbielowata o zatartych granicach [39].

Wynik badania USG TV jest niejednoznaczny w 20% przypadków kobiet z podejrzeniem ciąży ektopowej, u których seryjne oznaczenie β -hCG jest niezbędne do zaplanowania dalszego postępowania diagnostycznego [40]. Podwojenie stężenia β -hCG w ciągu 48 godzin jest charakterystyczne dla prawidłowej, żywej ciąży [41,42], jakkolwiek, wielośrodkowe badania wykazały, że najwolniejszy wzrost stężenia β -hCG, również związany z żywą ciążą wynosi 53% w ciągu dwóch dni [43]. Mniejszy wzrost stężenia β -hCG lub jego spadek może być obserwowany w przypadku nieprawidłowej implantacji jaja płodowego, jednak nie pozwala jednoznacznie różnicować między ciążą pozamaciczną a poronieniem. W połączeniu z USG TV pomiar stężenia β -hCG umożliwia rozpoznanie ciąży pozamacicznej z czułością i swoistością sięgającą 90% [44]. Kwestią sporną pozostaje nadal najniższe, graniczne stężenie β -hCG, przy którym ciąża powinna być widoczna w badaniu USG TV. Ciąża wewnątrzmaciczna widoczna jest zazwyczaj przy stężeniu 1500 mIU/ml, jednak przy braku zmian w badaniu obrazowym, tj. guza w obrębie przydatków lub płynu w zatoce Douglasa, wymagana jest wyższa, graniczna wartość - 2000 mIU/ml. Z kolei w ciąży wielopłodowej

poziom β -hCG będzie wyższy niż 2000 mIU/ml, zanim jeszcze pęcherzyki ciążowe w jamie macicy będą widoczne w badaniu USG TV [45].

Stosowane obecnie testy diagnostyczne, m.in. ocena poziomu β -hCG w surowicy krwi, poziomu hemoglobiny, ciśnienia tętniczego krwi, średnicy zmiany czy też obecność czynników ryzyka ciąży pozamacicznej, nie są wystarczające do postawienia jednoznacznego rozpoznania, a tym bardziej do różnicowania między pękniętą i niepękniętą ciążą jajowodową [46-49]. Co więcej, przeprowadzone dotąd badania mające na celu ocenę czynników ryzyka perforacji jajowodu w ciąży pozamacicznej na podstawie danych z wywiadu i badań przedoperacyjnych nie dały jednoznacznych odpowiedzi [19,46,47,50-53].

Obecnie prowadzone badania z zakresu immunologii prezentują obiecujące wyniki, na podstawie których można wnioskować, że rozwojowi ciąży jajowodowej towarzyszą zmiany w liczebności komórek układu immunologicznego, będące efektem zaburzeń tolerancji immunologicznej w organizmie matki. Dlatego uzasadnionymi wydają się dalsze badania mające na celu poznanie zasad immunologicznej homeostazy ściany jajowodu, co może pozwolić na poprawę diagnostyki ciąży pozamacicznej przy zastosowaniu technik biologii molekularnej.

1.2. TOLERANCJA IMMUNOLOGICZNA A CIAŻA I PORÓD

Ciąża stanowi immunologiczne wyzwanie, kiedy organizm matki rozwija tolerancję na tkanki płodu mimo obecności alloantygenów pochodzących od ojca na powierzchni trofoblastu. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują na złożone mechanizmy tego zjawiska, lecz, niestety, nie zostały one do końca poznane. W 1953 roku Medawar i Billingham zapoczątkowali dyskusję dotyczącą rozwoju ciąży przez porównanie płodu do allotransplantu. Autorzy ci zaproponowali cztery hipotezy, dzięki którym rozwój semiallogenicznego płodu jest możliwy w organizmie matki: 1) płód nie jest immunogeny,

2) odpowiedź immunologiczna w ciąży jest obniżona, 3) macica jest narządem uprzywilejowanym immunologicznie, 4) łożysko stanowi barierę immunologiczną [54]. Jak dotąd trzy pierwsze założenia zostały odrzucone. Badania Hoskina i Murgity wykazały bowiem reakcję przeciw komórkom płodu u myszy, dowodząc ich immunogenności. Obserwacja odpowiedzi immunologicznej na różne antygeny dowiodła, że odpowiedź immunologiczna ciężarnych nie jest obniżona w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży [55]. Natomiast możliwość rozwoju ciąży pozamaciczej dowodzi tego, że macica nie jest jedynym, uprzywilejowanym miejscem dla rozwoju płodu. Czwarta hipoteza sugerująca istnienie bariery immunologicznej wytwarzanej przez łożysko przetrwała do dnia dzisiejszego, ale w zmodyfikowanej formie. Początkowo uważano, że jest ono jedynie bierną, neutralną ‘zaporą’. Jednak Petraglia i wsp. przedstawili łożysko jako miejsce aktywnej interakcji komórek maczyno-płodowych, której efektem jest rozwój tolerancji immunologicznej [56]. W ten sposób hipoteza, że ciąża jest stanem immunosupresji, została zweryfikowana i zdefiniowana jako stan tolerancji zależny od współdziałających ze sobą mechanizmów zarówno obwodowych, jak i lokalnych, tj. w miejscu styku maczyno-płodowego, który wydaje się być najbardziej istotnym.

W trakcie implantacji blastocysty, w zmienionej ciążowo części czynnej błony śluzowej jamy macicy (zwanej doczesną), przerwana zostaje ciągłość naczyń włosowatych, przez co po raz pierwszy dochodzi do kontaktu antygenów komórek trofoblastu z immunokompetentnymi komórkami układu immunologicznego matki. Pochodzące od zarodka komórki trofoblastu pozakosmkowego dokonują inwazji w obręb doczesnej, co powoduje umocowanie się łożyska i zwiększenie przepływu maciczno-łożyskowego w rezultacie zmian w tętnicach spiralnych [57]. Zdolności inwazyjne komórek trofoblastu pozakosmkowego są największe w pierwszym trymestrze ciąży (1-12 tydzień ciąży), a kontakt maczyno-płodowy ograniczony jest wówczas do doczesnej. Na początku drugiego trymestru ciąży perfuzja krwi zaczyna obejmować

przestrzeń międzykosmkową [58,59], a złuszczone komórki trofoblastu dostają się do krążenia matki [60]. Stąd początkowo miejscowy kontakt maczyno-łożodowy zostaje rozszerzony na cały organizm matki.

Rozwój tolerancji immunologicznej w stosunku do łożodu zależy zarówno od lokalnych czynników auto- i parakrynych w miejscu kontaktu maczyno-łożodowego, jak również od ogólnej odpowiedzi immunologicznej ustroju matki. Mimo rozpoznania antygenów łożodu odpowiedź organizmu matki w warunkach prawidłowych nie ma dla jego rozwoju negatywnych konsekwencji, lecz służy do ograniczenia inwazji trofoblastu, i tym samym ochrony organizmu kobiety. Możliwość implantacji zarodka poza jamę macicy dowodzi tego że doczesna nie jest jedynym miejscem umożliwiającym rozwój ciąży. Jednak wykazano, że komórki trofoblastu w ciąży pozamacicznej charakteryzują się większą inwazyjnością, co w przypadku uszkodzenia naczyń może skutkować zagrażającym życiu krwawieniem u matki. Stąd można wnioskować, że lokalne środowisko doczesnej – w przeciwieństwie do pozbawionej jej ściany jajowodu - reguluje i hamuje inwazję trofoblastu [61,62].

Przeciwstawne zjawiska na granicy maczyno-łożodowej - tj. tolerancja komórek trofoblastu i ograniczenie jej inwazji, muszą być w równowadze dla zapewnienia prawidłowego rozwoju ciąży. Wykazano, że peptydy komórek apoptotycznych powstające po ich fagocytozie przez komórki prezentujące antygen (APC; Antigen Presenting Cells) indukują swoistą tolerancję w stosunku do typu komórek, z których pochodzą [63]. Jest to przyjęty ogólnie mechanizm immunologiczny warunkujący utrzymanie tolerancji wobec antygenów własnych organizmu, który może być również właściwy dla stanu ciąży [57,64].

Na podstawie badań na modelach zwierzęcych i ludzkich zaproponowano kilka mechanizmów, które mogą przyczyniać się do zapoczątkowania i utrzymania stanu tolerancji. Wykazano bowiem, że komórki trofoblastu kosmkowego nie wykazują ekspresji klasycznych antygenów głównego układu zgodności tkankowej (MHC; Major Histocompatibility

Complex) klasy I i II. Z drugiej strony trofoblast pozakosmkowy posiada na swej powierzchni tzw. nieklasyczne molekuly MHC klasy I jak ludzkie antygeny leukocytarne C, E i G (HLA-C, HLA-E i HLA-G; Human Leukocyte Antigen), które są swoistymi ligandami dla komórek NK (Natural Killers) [65,66]. Funkcje efektorowe komórek NK w obrębie doczesnej są regulowane przez znajdujące się na ich powierzchni receptory hamujące i aktywujące. Sygnały aktywujące odpowiedzialne są za wytwarzanie przez doczesnowe komórki NK (dNK; decidual Natural Killers) dużych ilości cytokin promujących proliferację i różnicowanie komórek trofoblastu oraz czynników angiogennych [67]. Natomiast aktywność cytotoksyczna tych komórek jest regulowana przez sygnały hamujące zależne od immunoglobulinopodobnych receptorów hamujących (KIR)2DL4 (killer immunoglobulin-like receptors), swoistych dla HLA-G lub KIR2DL2,3 oraz KIR2DL1 rozpoznających HLA-C. Stąd równowaga pomiędzy mechanizmami aktywacji i regulacji jest niezbędna dla utrzymania ciąży.

Po odkryciu w latach 80-tych ubiegłego stulecia heterogeniczności pomocniczych limfocytów T (Th; T helper) tolerancja immunologiczna była rozpatrywana w kontekście relacji Th1/Th2, gdzie w warunkach prawidłowych limfocyty Th2 i zależne od nich cytokiny stanowiły przewagę w stosunku do odpowiedzi Th1-zależnej, prowadzącej do poronienia [68,69]. Jednak obecnie ten model wydaje się być niewystarczający, gdyż w mechanizmie tolerancji zaangażowane są również inne czynniki wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej [70-73]. Dlatego w świetle dzisiejszej wiedzy teoria Th1/Th2 została zastąpiona modelem Th1/Th2/Th3/Tr1/ CD4+CD25⁺[70].

Na uwagę zasługuje głównie rola wyspecjalizowanej populacji komórek T- limfocytów T regulatorowych. Komórki te biorą udział w hamowaniu reakcji zapalnej oraz odpowiedzi skierowanej przeciw antygenom swoistym organizmu. Rola regulatorowych komórek T jest dwojaka, z jednej strony kontrolują limfocyty T, które, pomimo iż reagują

z antygenami własnymi organizmu, nie zostały wyeliminowane w procesie negatywnej selekcji w grasicy, z drugiej strony ograniczają odpowiedź immunologiczną aktywowanych pod wpływem alloantygenów limfocytów T. Z uwagi na to regulatorowe **komórki T mogą być uznane za „strażników” integralności tkankowej organizmu zapobiegając szkodliwemu działaniu, jakie niesie ze sobą nadmierna i niekontrolowana odpowiedź immunologiczna.** Regulacja homeostazy immunologicznej jest niezbędna w obrębie tkanek, których antygeny nie są rozpoznawane przez komórki immunokompetentne jako „własne” z powodu tkankowo-swoistej ekspresji, ale też na powierzchni nabłonka, gdzie tolerancja obcych, nieszkodliwych antygenów jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Unikalne właściwości populacji regulatorowych komórek T, a zwłaszcza ich zdolności do selektywnego hamowania odpowiedzi w stosunku do własnych i obcych antygenów sprawiają, że ich obecność jest nieodzowna do powstania i prawidłowego przebiegu ciąży.

1.3. KOMÓRKI TREG -KLASYFIKACJA

Termin „komórki T regulatorowe” odnosi się do populacji limfocytów T charakteryzujących się właściwościami supresorowymi i regulacyjnymi, niezbędnymi do utrzymania tolerancji w stosunku do specyficznych antygenów tkankowych. Jak dotąd zostały opisane co najmniej trzy podtypy regulatorowych komórek T CD4⁺: (1) limfocyty T regulatorowe typu I (Tr1; type I regulatory T cells), (2) limfocyty T pomocnicze 3 (T-helper 3; Th3), i (3) CD4⁺CD25⁺ limfocyty T-regulatorowe (T regulatory lymphocytes: Treg) - które różnią się między sobą fenotypem, profilem wytwarzanych cytokin i pochodzeniem tkankowym [74,75]. Wszystkie komórki tych populacji cechuje charakterystyczna dla nich zdolność hamowania zarówno proliferacji, jak również funkcji efektorowych limfocytów T

[76]. Ostatnio wykazano, że funkcje supresorowe posiadają również niektóre komórki T CD8⁺ i komórki NK, ale ich dokładne poznanie wymaga dalszych badań [77].

Po raz pierwszy dane dotyczące istnienia populacji komórek supresorowych linii T limfocytarnej zostały opisane w literaturze w latach 70-tych przez Gershona i wsp. [78]. Jednak z powodu braku specyficznego dla nich markera powierzchniowego zainteresowanie nimi było niewielkie do czasu opisanie ich przez Sakaguchi i wsp. jako linii komórek T CD4⁺ wykazujących ekspresję łańcucha alfa receptora dla interleukiny 2 (IL-2, CD25), których obecność jest niezbędna dla utrzymania tolerancji organizmu w stosunku do własnych antygenów [79].

Komórki T CD4⁺CD25⁺ stanowią populację heterogenną, z których CD4⁺CD25^{high/bright} mają funkcje regulatorowe, w przeciwieństwie do CD4⁺CD25^{low/dim} [80,81]. Ponad 95% subpopulacji komórek CD4⁺CD25^{high} Treg cechuje ekspresja molekuł powierzchniowych m.in. CD25 [80] oraz receptorów GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor [81] i CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associate protein 4) [82], a także CD95, CD45RO, CD62L, CD122 i niska ekspresja CD127 [83,84]. Jednak każda z tych molekuł może występować również na powierzchni innych komórek immunokompetentnych [85], dlatego za najbardziej wiarygodny marker **komórek CD4⁺ Treg uznano czynnik transkrypcyjny Foxp3 (Forkhead Box 3)** [86,87]. Możliwy związek między ekspresją genu Foxp3 i funkcją komórek Treg został opisany przez Fontenot i wsp., którzy stwierdzili, że ilość mRNA Foxp3 była zwiększona w supresorowych komórkach CD4⁺CD25⁺, a myszy z mutacją genu Foxp3 nie wykazywały obecności komórek Treg [87]. Co więcej, transfer limfocytów CD4⁺CD25⁺ chronił Foxp3-ujemne myszy przed rozwojem chorób autoimmunologicznych [88,89]. Gdy gen Foxp3 ulega ekspresji w komórkach CD4⁺CD25⁻, różnicują się one w kierunku komórek immunoregulatorowych Treg [86,88,89]. Badania z użyciem allelu knock-in Foxp3^{gfp}

potwierdziły, że jest on głównym genem typu „master-switch” dla rozwoju komórek Treg [88,89].

1. 4. KOMÓRKI TREG W CIĄŻY

Komórki T regulatorowe są niezbędnym czynnikiem w utrzymaniu tolerancji układu immunologicznego matki w stosunku do alloantygenów pochodzących od ojca. Ich znamienne rolę w rozwoju i utrzymaniu ciąży potwierdzono doświadczalnie, po transferze kompletnej populacji limfocytów T lub populacji bez limfocytów $CD4^+CD25^+$ do ciężarnych myszy pozbawionych komórek T. Zauważono, że przy nieobecnych komórkach Treg allogeniczne ciąży ulegały poronieniu, a syngenicznie rozwijały się prawidłowo [90]. Te obserwacje zostały potwierdzone w innym badaniu, w którym zastosowano CD25-reaktywne monoklonalne przeciwciało PC61 w celu usunięcia komórek $CD25^+$ [91]. W dniu skrzyżowania myszy z allogenicznymi lub syngenicznymi samcami podano PC61 i zauważono ekspansję aktywowanych limfocytów $CD8^+$ i $CD4^+$ w węzłach chłonnych drenujących macicę. Co więcej, tylko niewielka liczba allogenicznych płodów przeżyła do terminu porodu, podczas gdy płody syngeniczne rozwijały się bez komplikacji [91]. Przytoczone badania sugerują, że komórki Treg są elementem niezbędnym do rozwoju prawidłowej ciąży, a także do supresji matczynej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw antygenom zgodności tkankowej pochodzenia ojcowskiego [92]. Jednak nie zidentyfikowano do tej pory w sposób jednoznaczny antygeny, który rozpoznawany jest przez komórki Treg. Uważa się, że mogą one rozpoznawać matczyne „swoiste / własne” antygeny na powierzchni semiallogenicznego trofoblastu, a potem hamować alloreaktywne komórki efektorowe na zasadzie „bystander suppression”. Ponieważ izolowane komórki Treg Foxp3 hamowały odpowiedź efektorową skierowaną przeciw allogenicznym komórkom dendrytycznym (DC; Dendritic Cells) [93], nie można wykluczyć możliwości bezpośredniego

rozpoznania alloantygeny przez komórki Treg [92]. Może to potwierdzić także fakt, że transfer komórek $CD4^+CD25^+$ Treg do grupy myszy, które zostały pozbawione komórek Treg i w efekcie czego roniły, zapobiegł utracie ciąży, ale tylko w przypadku, gdy komórki Treg pochodziły od normalnych, ciężarnych myszy [94]. Sugeruje to, że jedynie te komórki supresorowe, które były ekspozycje na alloantygeny ojcowskie, mogą wywierać działanie hamujące na układ immunologiczny matki [94,95].

U kobiet ciężarnych zwiększoną ekspresję antygeny powierzchniowego CD25 na limfocytach w doczesnej w porównaniu do krwi obwodowej opisano w roku 1992, jednak nie w kontekście innych markerów powierzchniowych typowych dla komórek Treg [96]. Kolejne obserwacje dotyczące doczesnowych komórek $CD4^+CD25^+$ udokumentowały ich wzrost we wczesnym etapie ciąży [97], który rozpoczyna się jeszcze przed implantacją [98]. Hekinnen i wsp. wykazali, że w okresie okołoporodowym komórki $CD4^+CD25^+$ stanowią 14% populacji limfocytów $CD4^+$ w obrębie doczesnej [99]. Co więcej, we krwi obwodowej ich poziom był wyższy w pierwszym i w drugim trymestrze ciąży w porównaniu z krwią kobiet nieciążarnych [99]. Podobne wyniki opisano w innych badaniach, w których wykazano wzrost poziomu komórek $CD4^+CD25^+$ we krwi obwodowej we wczesnej ciąży, osiągających szczyt w drugim trymestrze ze spadkiem po porodzie [93]. Dynamika zmian liczebności komórek Treg, z ich wzrostem w pierwszych trymestrach ciąży i spadkiem przedporodowym [100], została jednoznacznie potwierdzona po dokładnej identyfikacji limfocytów Treg jako subpopulacji komórek $CD25^{\text{high}}$ [101,102]. U kobiet ciężarnych komórki Treg we krwi obwodowej stanowią 8% populacji $CD4^+$, a w obrębie doczesnej 20% [93,101], czemu towarzyszy również wzrost ekspresji $Foxp3^+$ [90].

Steinborn i wsp. wykazali jednak różnice w porównaniu do poprzednich doniesień [100-102]. W ich badaniu całościowo liczba komórek $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ we krwi obwodowej nie zwiększała się we wczesnej ciąży, lecz raczej wykazywała dwufazowy spadek

z krótkotrwałym wzrostem w połowie ciąży [103]. Do 23. tygodnia ciąży stwierdzono spadek liczby komórek $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ze znacznym wzrostem liczebności tej populacji między 24.-30. tygodniem ciąży, po którym następował kolejny spadek ich liczby aż do porodu. Dynamika zmian liczby komórek Treg sugerowała, że populacja $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nie jest jednorodna. Stąd dalsze badania z oceną ekspresji CD25, Foxp3 w obrębie populacji limfocytów T $CD4^+$ [103]. Mimo kontrowersji dotyczących liczby komórek $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ w poszczególnych okresach ciąży niewątpliwym pozostaje fakt działania hamującego komórek Treg i konieczność ich obecności dla utrzymania prawidłowej ciąży. Podkreślają to także badania dotyczące stanów patologicznych, wnikających przebieg ciąży (zespół HELLP, stan przedrzucawkowy) jak i tych dotyczących porodu, w czasie których obserwowano zmiany w liczebności komórek Treg [103,104].

Początek porodu jest procesem dynamicznym zależnym od aktywności układu immunologicznego matki, jak również od odpowiedzi immunologicznej organizmu płodu. W poprzednich badaniach prowadzonych w Katedrze Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego wykazano, że postępowi porodu towarzyszą zmiany w nacieku i aktywności komórek $CD3^+$ i $CD56^+$ w obrębie doczesnej [105]. Co więcej, w czasie porodu we krwi matki rośnie stężenie białek hamujących m.in. sHLA-G, MT, RCAS1 z następowym wzrostem ich ekspresji tkankowej w obrębie doczesnej, co ma na celu zahamowanie aktywowanej odpowiedzi cytotoksycznej układu immunologicznego matki [106, 107]. **W trakcie porodu zaobserwowano** zmiany w stężeniu cytokin m.in. TGF- β czy IL-6. Pierwsza z nich TGF- β - jest główną cytokiną umożliwiającą dojrzewanie limfocytów T i **konwersję fenotypową $CD4^+CD25^-$ do $CD4^+CD25^+Foxp3^+$** [108]. We wstępnych doniesieniach zauważono, że **komórki te są obecne w trakcie porodu, ale ich liczebność spada wraz z jego zaawansowaniem** [109]. Może być to spowodowane znacznym wzrostem stężenia IL-6 pochodzącej z monocytów płodu, które jest nieobecne w trakcie porodu

przedwczesnego lub indukowanego [110]. Interleukina 6, która wytwarzana jest także przez komórki błon płodowych, wywiera hamujące działanie na limfocyty Treg i wpływa na uruchomienie odpowiedzi pro-zapalnej, zależnej od limfocytów Th17 [110]. Efektem tego jest przesunięcie stanu równowagi Treg/Th17 w kierunku tych ostatnich, co warunkuje reakcję immunologiczną niezbędną dla inicjacji porodu [111,112].

Podobne zjawisko do zmian tolerancji immunologicznej zachodzących w trakcie porodu zaobserwowano również w stanach wikłających ciążę, m.in. w trakcie rozwoju ciąży pozamacicznej i w poronieniu [113].

1. 5. UKŁAD IMMUNOLOGICZNY ZWIĄZANY Z BŁONĄ ŚLIZOWĄ JAJOWODU

Mikrośrodowisko jajowodu stanowi „wyzwanie” immunologiczne wymagające równowagi dla czynników umożliwiających zapłodnienie komórki jajowej i obronnych, chroniących ten odcinek narządu rodnego oraz jamę otrzewnową przed potencjalną infekcją wstępującą. Błona śluzowa jajowodu stanowi część układu immunologicznego związanego z błoną śluzową (MALT; Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) narządu rodnego i zaliczana jest do tak zwanego trzeciorzędowego układu immunologicznego niezależnego od grasicy [114]. Może być ona związana z procesem tolerancji immunologicznej, zapewniającej transport plemników oraz blastocysty w jajowodzie, bez aktywacji miejscowej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw obcym antygenowo komórkom [115]. Pośrednim dowodem funkcjonalnej całości układu immunologicznego związanego z błoną śluzową narządu rodnego są zmiany ilościowe i jakościowe w populacji komórek układu immunologicznego endometrium towarzyszące zmianom patologicznym w jajowodzie.

W przypadkach wodniaka jajowodu profil naciekających endometrium komórek układu immunologicznego jest wyraźnie różny od tego, stwierdzanego w fizjologicznym cyklu miesięczkowym. Po operacji chirurgicznego usunięcia wodniaka zaobserwowano zmiany

typu naciekających endometrium komórek cytotoksycznych na charakterystyczne dla fizjologicznego cyklu [116].

Podobnie jak w endometrium jednojądrowe CD45⁺ komórki układu immunologicznego dominują w błonie śluzowej jajowodu, jednak proporcje poszczególnych typów tych komórek w jajowodzie różnią się od obserwowanych w endometrium. W jajowodzie najliczniej reprezentowane są limfocyty cytotoksyczne CD3⁺ (30-60%), znajdują się tam również neutrofile, makrofagi i komórki NK. Neutrofile błony śluzowej jajowodu różnią się fenotypowo od tych we krwi obwodowej, m.in. większą ekspresją antygenu CD64, HLA-DR, IFN- γ i VEGF [117]. Natomiast komórki NK wykazują dodatnią ekspresję antygenów CD94, CD69 i niewielką CD16, co upodabnia je do komórek CD16^{bright} we krwi obwodowej o mniejszej aktywności cytolitycznej [118]. Komórki NK^{bright}, które dominują w endometrium, są w jajowodzie nieliczne, co więcej, w przeciwieństwie do endometrium w jajowodzie prawie zupełnie jest brak agregatów komórek limfocytarnych [119,120]. Mimo funkcjonalnej integralności błony śluzowej jajowodu z endometrium wykazano, że zarówno skład [118], jak i aktywność komórek układu immunologicznego znajdujących się w jajowodzie nie ulega cyklicznym zmianom wraz ze zmianami hormonalnymi w cyklu miesięczkowym [114].

1. 6. MOLEKULARNE ZMIANY U KOBIET Z CIAŻĄ JAJOWODOWĄ

W pierwszym trymestrze ciąży wewnątrzmacicznej w miejscu implantacji jaja płodowego dochodzi do inwazji trofoblastu pozakosmkowego, która w warunkach prawidłowych ogranicza się do jednej trzeciej części miometrium [121]. Proces inwazji jest ściśle kontrolowany, jednak jego molekularne podłoże nie zostało do końca poznane. Prawdopodobnie odgrywają tu rolę genetyczne uwarunkowania trofoblastu pozakosmkowego regulujące apoptozę lub parakryne czynniki w obrębie penetrowanej warstwy doczesnej

[122]. W trakcie rozwoju ciąży pozamacicznej w jajowodzie inwazja trofoblastu jest głębsza, a jego komórki wykazują większą zdolność proliferacji [123]. Przy założeniu, że program genetyczny komórek trofoblastu jest identyczny bez względu na miejsce implantacji, to czynniki immunologiczne i/lub parakryne ectopowego miejsca zagnieżdżenia powinny warunkować ich potencjał inwazyjny, m.in. zmniejszenie ruchliwości komórek, zaburzenie przylegania [124], ekspresję metaloproteinaz [113], wpływ na tworzenie zespólni komórkowych, poliploidyzację czy apoptozę [123]. W przeprowadzonych dotąd badaniach wykazano różnice ilościowe i jakościowe komórek układu immunologicznego w błonie śluzowej jajowodu w czasie implantacji w stosunku do doczesnej w jamie macicy. Badania Von Rango i Vassiliadou dowiodły, że w jajowodzie, w sąsiedztwie implantującego się zarodka, dominują komórki $CD8^+$, makrofagi $CD68^+$ i limfocyty B $CD20^+$, a ich dystrybucja i liczba nie wykazują różnic w stosunku do eutopowego miejsca zagnieżdżenia [125,126]. Ponadto w ścianie jajowodu sporadycznie wykazano obecność obwodowych komórek NK($CD56^+CD16^+$), w przeciwieństwie do endometrium, w którym dominujący składnik populacji limfocytów stanowią komórki $CD56^+dNK$ [125, 126]. W obrębie jajowodu brak jest komórek $dNK(CD56^+CD16^-)$, co może tłumaczyć mniejszą liczbę leukocytów $CD45^+$ w porównaniu do ciąży wewnątrzmacicznej. Jakkolwiek liczba i dystrybucja komórek układu immunologicznego w obrębie doczesnej w ciąży pozamacicznej nie wykazuje różnic w porównaniu do doczesnej w ciąży prawidłowej. Może to sugerować, że rekrutacja leukocytów do jamy macicy nie jest zależna od obecności implantującego się zarodka i kontrolowana jest przez inne czynniki [61,126]. W analizie przypadków ciąży pozamacicznej zależnie od czasu jej trwania w porównaniu do poronienia ciąży wewnątrzmacicznej wykazano, że pęknięcie ściany jajowodu może być zjawiskiem wtórnym do wzrostu liczby komórek cytotoksycznych matki ($CD56^+$) w obrębie ściany jajowodu. Ich liczba w przypadkach klinicznie potwierdzonej perforacji jajowodu była znamienne wyższa

niż w przypadkach, gdy interwencja terapeutyczna zastała wykonana jeszcze przed pęknięciem ściany jajowodu. Pęknięciu jajowodu towarzyszył również wzrost immunoreaktywności antygenu CD69 w obrębie błony śluzowej [113]. Ponieważ wykazano, że komórki CD56⁺CD16⁺ są wyjątkowo wrażliwe na chemotaktyczne działanie IL-8 [127], wzrost jej stężenia w surowicy krwi kobiet z ciążą jajowodową wskazuje na możliwość udziału tej cytokiny w chemotaksji limfocytów naciekających ścianę jajowodu [128]. Co więcej, Soriano i wsp. wykazali, że u kobiet z ciążą pozamaciczną stężenie IL-8 wzrastało znamiennie w surowicy krwi w przypadkach stwierdzenia obecności wynaczynionej krwi w zatoce Douglasa [128]. Wzrost aktywności komórek układu immunologicznego i niejasna rola immunomodulującej zdolności komórek doczesnej wymagają oceny możliwości immunoregulacyjnych błony śluzowej jajowodu, a zwłaszcza oceny jej zdolności do specyficznego hamowania odpowiedzi cytotoksycznej i oporności na apoptozę. Mogą w tym zjawisku uczestniczyć czynniki modulujące m.in. Fas, Fas-L, IL-12, IL-15, LIF, HLA-G, RCAS1, MT, których obecność stwierdzono wcześniej w doczesnej w czasie rozwoju ciąży eutopowej [129-132].

Ekspresja białka RCAS1, odpowiedzialnego za ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego organizmu gospodarza i warunkującego progresję choroby w doczesnej, wiąże się ze zjawiskiem selektywnego ograniczenia aktywności komórek cytotoksycznych [133,134]. Metalotioneina to białko odgrywające kluczową rolę w regulacji takich procesów jak proliferacja, dojrzewanie czy też apoptoza komórek [135,136]. Ekspresja metalotioneiny w komórkach endometrium wydaje się mieć związek z wysoką opornością na apoptozę komórek błony śluzowej macicy.

Wicherek i wsp. wykazali, że kumulacji aktywnych komórek cytotoksycznych (CD56⁺ i CD3⁺) w błonie śluzowej jajowodu w początkowym etapie rozwoju ciąży pozamaciczej towarzyszy wzrost immunoreaktywności RCAS1 i metalotioneiny [137]. Jednak opisana już

dalsza kumulacja aktywnych komórek cytotoksycznych CD56⁺, towarzysząca pęknięciu ściany jajowodu, wiąże się z obniżeniem immunoreaktywności RCAS1 i brakiem dalszego wzrostu ekspresji MT.

Miejsce implantacji w ścianie jajowodu, w przeciwieństwie do endometrium, wykazuje brak obecności komórek dNK i związaną z tym zmniejszoną apoptozę komórek trofoblastu. Znajdujące się na linii frontu inwazji trofoblastu komórki efektorowe NK⁺ i T CD8⁺ mogą indukować apoptozę przez TNF- α lub FasL, która równoważona jest przez ekspresję antygeny HLA-G na powierzchni trofoblastu pozakosmkowego [138]. Apoptoza komórek trofoblastu nie wywołuje odpowiedzi zapalnej, ponieważ fragmenty komórkowe ulegają fagocytozie przez makrofagi i komórki dendrytyczne, a następnie prezentacji komórkom T bez sygnałów kostymulujących. Trofoblast pozakosmkowy w ciąży pozamacicznej dokonuje inwazji w obręb ściany jajowodu, w którym miejsce implantacji pozbawione jest doczesnej [139]. Jednak obecność HLA-G w jego obrębie świadczy o tym, że ekspresja tego antygeny jest swoistą cechą komórek trofoblastu, a nie miejsca implantacji. Wykazano, że ekspresja HLA-G, zwiększa się wraz z głębokością inwazji [140]. Co więcej, w czasie rozwoju ciąży pozamacicznej stwierdzono podobne zmiany w stężeniu sHLA-G w stosunku do nacieku komórek NK. Odzwierciedlają one wzajemny dialog komórek penetrującego ścianę jajowodu trofoblastu z komórkami NK ograniczającymi ich inwazyjność. Jednak tuż przed perforacją jajowodu dochodzi do gwałtownego załamania mechanizmów regulujących, co ma swoje odzwierciedlenie w spadku zarówno liczby komórek NK, jak i poziomu sHLA-G [113].

Dowiedziano, że rozwojowi ciąży pozamacicznej towarzyszy, podobnie jak ciąży wewnątrzmacicznej, zjawisko tolerancji immunologicznej matki względem antygenów płodu. Jednak **pozostaje bez odpowiedzi pytanie, jak w porównaniu do ciąży eutopowej, zachowują się nadrzędne komórki odpowiedzi immunologicznej – limfocyty**

T regulatorowe w ciąży pozamacicznej, które są ostatnim ogniwem, po komórkach efektorowych NK i antygenach HLA-G, odpowiedzialnym za homeostazę między płodem a organizmem matki. **Jak dotąd nie zbadano ich roli w kształtowaniu tolerancji immunologicznej w trakcie rozwoju ciąży jajowodowej. Ocena komórek Treg może w niezwykle dużym stopniu przyczynić się do poprawy diagnostyki ciąży pozamacicznej.** Wykazano bowiem dodatnią korelację między ich kumulacją w miejscu implantacji a poziomem β -hCG produkowanego przez komórki trofoblastu. Związek ten może być wytłumaczeniem lepszych wyników pacjentek po zapłodnieniu in vitro leczonych wcześniej HCG, jak również występowaniem spontanicznych poronień przy spadającym poziomie β -hCG [141].

Należy podkreślić, że mimo rozwoju diagnostyki laboratoryjnej i technik obrazowania, rozpoznanie ciąży pozamacicznej oraz zagrażającego pęknięcia jajowodu należą nadal do trudniejszych problemów klinicznych. Przeprowadzono już wiele badań mających na celu znalezienie markera swoistego dla zagrażającego pęknięcia jajowodu. Wstępnie wykazano, że poziom antygenu Ca-125 w surowicy koreluje z częstością perforacji jajowodu. Nie znalazł on jednak zastosowania klinicznego [142]. Soriano i wsp. zaobserwowali, że poziom IL-6, IL-2R, TNF- α i IL-8 jest znamienne wyższy w surowicy pacjentek z ciążą pozamaciczną [128], jakkolwiek przy stałym stężeniu β -hCG w 28. dniu po zabiegu in vitro, niski poziom IL-8 korelował z wystąpieniem ciąży jajowodowej [143]. Ostatnie badania Col-Madendag i wsp. donoszą, że trójlinijny obraz endometrium koreluje z ryzykiem pęknięcia ciąży pozamacicznej [144], co, biorąc pod uwagę powszechność stosowania USG TV, może mieć zastosowanie w codziennej praktyce. Natomiast dalsze badania z uwzględnieniem molekularnych podstaw tolerancji immunologicznej w ciąży jajowodowej mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej ciąży pozamacicznej.

1.7. PORONIENIE SAMOISTNE A ZABURZENIA UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Etiologia poronień spontanicznych jest wieloczynnikowa, ale można podzielić ją na przyczyny zależne od płodu (głównie z powodu nieprawidłowego kariotypu) i od matki - tj. związane z nieprawidłowościami endometrium i rozwoju łożyska, oraz z zakażeniami [145]. Wśród znanych przyczyn matczynych można również wyróżnić zaburzenia krzepnięcia, choroby autoimmunologiczne i endokrynologiczne [145]. W przypadku poronień nawykowych etiologia może być w dużym odsetku związana z zaburzeniami układu immunologicznego [146]. Krew obwodowa kobiet z poronieniami spontanicznymi zawiera większą liczbę komórek cytotoksycznych $NK56^+$ w porównaniu z ciążą prawidłową, co więcej, wykazywały one cechy zwiększonej aktywacji przez ekspresję molekuł CD69 i CD25 [147,148]. W przeciwieństwie do ciąży prawidłowej, w obrębie doczesnej zauważono mniejszą liczbę komórek NK, która była zależna również od kariotypu zarodka. Nieprawidłowy kariotyp związany był z mniejszym naciekiem komórek NK w porównaniu do prawidłowego chromosomalnie zarodka [147]. Zaburzenia tolerancji immunologicznej w poronieniu spontanicznym mogą być również związane z niskim poziomem sHLA-G, niezbędnym do ochrony płodu przed atakiem komórek immunokompetentnych matki [149, 150]. Przedimplantacyjny wzrost stężenia sHLA-G i jego wysoki poziom do ok. 9 tygodnia ciąży były niezbędne do prawidłowego rozwoju zarodków po zapłodnieniu in vitro, czego nie obserwowano w trakcie rozwoju ciąż zakończonych poronieniem [151]. Chociaż Vasiliadou i wsp. wykazali zwiększoną liczbę komórek $CD25^+$ w doczesnej kobiet z poronieniem w porównaniu do tych pochodzących z terminacji ciąży [148], jednak proporcja komórek $CD4^+CD25^{bright}$ wśród nich była zmniejszona zarówno w doczesnej [152,153], jak i we krwi obwodowej [153] w porównaniu do kobiet nieciążarnych i ciąży prawidłowej [154].

Predyspozycja do poronienia może mieć też związek zarówno ze zmniejszoną ekspansją

komórek Treg, jak i ich zaburzeniami czynnościowymi [155]. Zwiększony współczynnik ekspresji CTLA-4/CD28 jest charakterystyczny dla ciąży prawidłowej, podczas gdy w poronieniu zwiększeniu ekspresji CD28 towarzyszy spadek CTLA-4 zarówno w doczesnej, jak i na obwodzie [154]. Wyższa ekspresja CD28 w przypadku poronienia może sugerować, że molekula ta jest odpowiedzialna za aktywację komórek immunologicznych matki prowadzącą do odrzucenia semiallogenicznego płodu [154]. Ponieważ zarówno poronienie, jak i ciąża pozamaciczna stanowią powikłanie wczesnej ciąży, a ich etiologia związana jest w dużym stopniu z zaburzeniami odpowiedzi układu immunologicznego wydaje się być uzasadnioną równoczesna ocena obu tych patologii.

2. ZAŁOŻENIA I CEL ROZPRAWY

2.1. ZAŁOŻENIA PRACY

Badania dotyczące zagadnienia układu immunologicznego w ciąży jajowodowej przeprowadzone zostały jak dotąd na niewielkich grupach pacjentek z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych. **W przeprowadzonych do tej pory badaniach nie został poruszony temat komórek T regulatorowych w miejscu implantacji ciąży jajowodowej.**

Badanie z użyciem przyżyciowych technik cytometrii przepływowej może pomóc w uzyskaniu informacji na temat roli tych komórek w kształtowaniu zjawiska tolerancji immunologicznej w ciąży jajowodowej.

Planowana ocena komórek układu immunologicznego będzie dotyczyć miejsca implantacji jaja płodowego w ścianie jajowodu. W ciąży prawidłowej w tym miejscu dochodzi do kontaktu maczyno-płodowego, tj. inwazji trofoblastu pozakosmkowego w obręb doczesnej podstawnej, która w warunkach prawidłowych ulega zahamowaniu przez komórki immunologiczne znajdujące się w jej obrębie. W ciąży pozamacicznej, z uwagi na brak przemiany doczesnej, inwazja trofoblastu nie jest hamowana, a dalsza jego penetracja jest przyczyną pęknięcia ściany jajowodu i w rezultacie zagrażającego życiu krwawienia. Tak jak podczas porodu fizjologicznego, kiedy aktywność układu immunologicznego matki ulega zmianie w kolejnych jego okresach, tak w ciąży pozamacicznej kolejnym fazom pęknięcia ściany jajowodu prawdopodobnie towarzyszyć będą zmiany liczebności komórek Treg. Uwzględniając powyższe założono, że w badaniu wykonana zostanie **ocena komórek Treg w miejscu implantacji jaja płodowego w obrębie ściany jajowodu na różnych etapach rozwoju ciąży pozamacicznej.**

Interesujące wydaje się również wyjaśnienie, jak zachowuje się populacja komórek Treg w jamie macicy w trakcie rozwoju ciąży w ektopowej lokalizacji. Mimo braku zarodka

w jamie macicy przemiana doczesnowa jest nadal obecna jako tzw. zjawisko Arias – Stella i cechuje się podobną do ciąży wewnątrzmacicznej kompozycją komórek układu immunologicznego. W celu wyjaśnienia związku pomiędzy zmianami liczby komórek supresorowych Treg a zmianami aktywności układu immunologicznego **zdecydowano o zbadaniu ich profilu również w obrębie doczesnej eutopowej w trakcie rozwoju ciąży jajowodowej.** Ponieważ zjawisko tolerancji immunologicznej wiąże się nierozzerwalnie ze zmianami liczebności komórek cytotoksycznych w **badanym materiale postanowiono zidentyfikować** nie tylko limfocyty Treg, ale **również komórki cytotoksyczne.** Biorąc pod uwagę, że ilość komórek cytotoksycznych w doczesnej eutopowej zmienia się zależnie od etapu rozwoju ciąży w jajowodzie, ocena komórek T-regulatorowych powinna być dokonana również z uwzględnieniem tego faktu.

W ciąży pozamacicznej, mimo że implantacja jaja płodowego odbywa się poza jamą macicy, w obrębie eutopowego endometrium dochodzi do przemiany doczesnowej, w trakcie której dochodzi do zahamowania odpowiedzi cytotoksycznej mimo nieobecnych tam komórek trofoblastu. Wydaje się być interesującym wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za hamowanie aktywności komórek cytotoksycznych w jamie macicy przy fizycznej nieobecności komponenty zarodka – tj. komórek trofoblastu. W wyjaśnieniu tego zjawiska może być pomocne uwzględnienie innych stanów, w których obserwowana jest przemiana doczesnowa, bez infiltracji komórek trofoblastu - tj. we wczesnej fazie sekrecyjnej cyklu miesięczkowego lub gdzie funkcja trofoblastu zanika – w poronieniu samoistnym. We wszystkich opisanych przypadkach równowaga układu immunologicznego w endometrium zależna jest jedynie od aktywności komórek endometrialnych i komórek układu immunologicznego. Dlatego **w badaniu porównane zostaną limfocyty Treg i komórki cytotoksyczne w obrębie doczesnej eutopowej w trakcie rozwoju ciąży pozamacicznej, endometrium fazy okołooowulacyjnej i doczesnej w poronieniach samoistnych.**

2.2. CEL PRACY

Głównym celem pracy jest ocena limfocytów T regulatorowych (Treg) $CD4^+CD25^+foxp3^+$ i komórek cytotoksycznych - $CD56^+$, $CD57^+$, $CD3^+CD8^+CD57^+$, $CD8^+$ w ciąży pozamaciczej.

Zostanie ona wykonana poprzez:

- Identyfikację komórek **Treg w miejscu implantacji jaja płodowego w ścianie jajowodu** w niepękniętej i pękniętej ciąży pozamaciczej,
- Identyfikację komórek **Treg w obrębie doczesnej** w jamie macicy w ciąży pozamaciczej niepękniętej i pękniętej,
- Charakterystykę populacji **komórek cytotoksycznych w doczesnej** eutopowej **oraz w miejscu implantacji** ciąży pozamaciczej pękniętej i niepękniętej,
- Porównanie próbek sparowanych, pod kątem limfocytów Treg i komórek cytotoksycznych, pobranych z miejsca implantacji zarodka oraz doczesnej osobno w grupie pacjentek z niepękniętą oraz z pękniętą ciążą jajowodową.

Jak również przez:

- porównanie populacji limfocytów Treg i komórek cytotoksycznych w miejscu implantacji ciąży pozamaciczej, doczesnej w poronieniu samoistnym i endometrium sekrecyjnej fazy cyklu.

3. MATERIAŁ I METODY BADANIA

3.1. MATERIAŁ KLINICZNY

Materiał tkankowy pobrano od 90 pacjentek hospitalizowanych w Klinice Ginekologii i Onkologii Katedry Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, w tym od 49 pacjentek z ciążą pozamaciczną, które stanowią grupę badaną oraz łącznie od 41 kobiet (20 pacjentek z poronieniem samoistnym i 21 nieciążarnych), które stanowią grupę porównawczą. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (nr KBET/32/B/2008). Po przeprowadzeniu badań diagnostycznych każdą pacjentkę, zarówno z grupy badanej, jak i porównawczej, poinformowano o planowanym postępowaniu terapeutycznym, ewentualnym ryzyku powikłań związanych z planowaną operacją, spodziewanych wynikach leczenia oraz o alternatywnych metodach terapeutycznych. Ostatecznym warunkiem włączenia pacjentki do badania była jej świadoma zgoda wyrażona w formie pisemnej (Aneks. Formularz świadomej zgody Pacjentki na udział w badaniu „ Ocena układu immunologicznego w miejscu implantacji ciąży pozamacicznej”). Udział w badaniu nie wpływał na zmianę sposobu postępowania terapeutycznego u tych pacjentek, a żadna z pacjentek, którym zaproponowano udział w badaniu, nie udzieliła odpowiedzi odmownej.

Zastosowano następujące kryteria włączenia do badania:

- wiek ≥ 18 lat,
- kwalifikacja do leczenia operacyjnego jako optymalnej metody terapii pacjentki,
- zdolność prawna do wyrażenia zgody na udział w badaniu,
- brak stosowania terapii hormonalnej przez ostatnie 6 miesięcy.

Kryterium wyłączenia stanowiło:

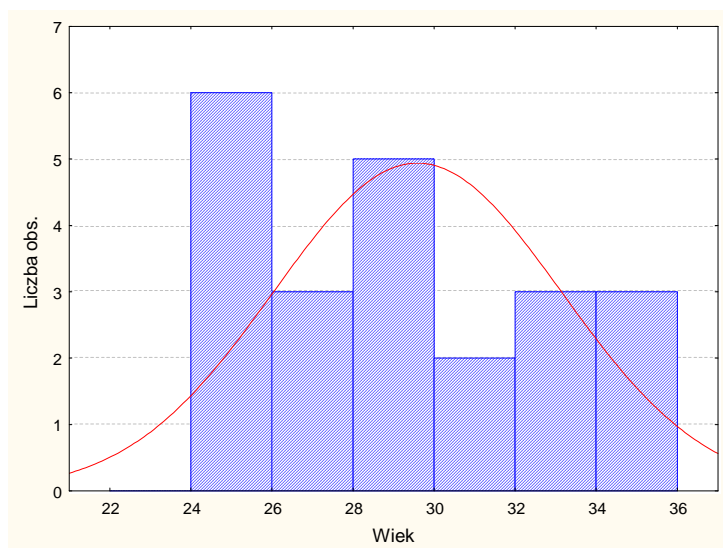
- potwierdzenie stanu zapalnego w badaniu histopatologicznym,
- przebyte leczenie operacyjne w zakresie miednicy mniejszej,
- rozpoznanie lub podejrzenie choroby nowotworowej,
- leczenie zachowawcze metotreksatem,
- dodatni wywiad w kierunku poronień nawykowych, ciąży pozamacicznej, pustego jaja płodowego, cukrzycy, nadciśnienia ciążowego, zagrażającej rzucawki, zapalenia przydatków, przebytego leczenia z powodu niepłodności, operacji w obrębie jajowodu.

Po uwzględnieniu rozpoznania klinicznego, wyniku badania histopatologicznego oraz wymienionych kryteriów włączenia i wyłączenia do ostatecznej analizy zakwalifikowano 80 pacjentek.

Uwzględniając rozpoznanie kliniczne potwierdzone późniejszym badaniem histopatologicznym **badana populacja kobiet została podzielona na 3 grupy. Pierwszą grupę stanowiły pacjentki z CIAŻĄ POZAMACICZNĄ (EP= ectopic pregnancy), która ostatecznie obejmowała 44 pacjentki, a drugą i trzecią grupę -porównawczą, stanowiły pacjentki z PORONIENIEM SAMOISTNYM (AB=abortus , n=18) i pacjentki nieciążarne, u których wykonano biopsję ENDOMETRIUM (E =endometrium, n=18).**

3.1.1.CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA KOBIET Z CIAŻĄ POZAMACICZNĄ

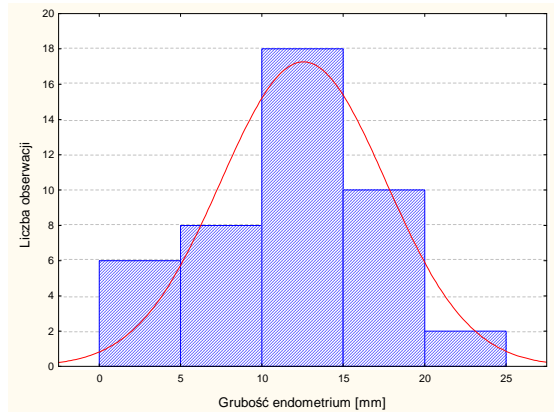
Grupę badaną stanowiło 44 kobiet diagnozowanych i leczonych z powodu ciąży pozamaciczej, potwierdzonej wynikiem badania histopatologicznego. Średnia wieku pacjentek z ciążą pozamaciczną wynosiła 29,6 lat, odchylenie standardowe (SD) $\pm 2,97$ (Rycina 1). Mediana liczby ciąż wynosiła 1 i rozstęp kwartylowy (IQR) był równy 1, mediana liczby porodów wynosiła 0 (IQR=1). Mediana liczby poronień równa była 0 (IQR=0). Mediana wieku ciążowego ustalonego na podstawie daty ostatniej miesiączki wynosiła 8 tygodni (IQR= 1).



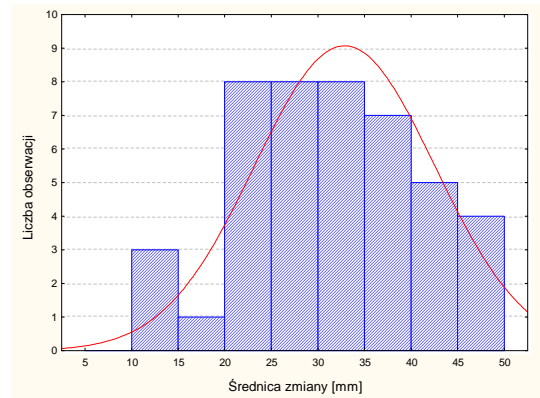
Rycina 1. Histogram - rozkład wieku pacjentek z ciążą pozamaciczną

Rozpoznanie kliniczne ciąży pozamaciczej postawiono na podstawie wywiadu, badania fizykalnego, seryjnego oznaczenia poziomu β -hCG oraz badania USG-TV. Powiększony trzon macicy, tkliwość przydatków, obrona mięśniowa, plamienie z dróg rodnych z dodatnim wywiadem zatrzymania miesiączki i testem β -hCG sugerowały kliniczne podejrzenie ciąży pozamaciczej. Podejrzenie ciąży jajowodowej w badaniu USG TV sugerowały: obecność pęcherzyka ciążowego w okolicy przydatków z echem zarodka z akcją lub bez akcji serca, obecność guza w okolicy przydatków z hiperechogennym pierścieniem wokół pęcherzyka ciążowego oraz zmiany o mieszanej echogeniczności w okolicy przydatków oddzielonej od

jajnika, poszerzone endometrium bez widocznego pęcherzyka ciążyowego w jamie macicy (przy β -hCG > 1500 mIU/ml), wolny płyn w zatoce Douglasa. Rozkłady zmiennych grubości endometrium oraz średnicy zmiany w przydatkach były zbliżone do normalnego (Rycina 2,3).

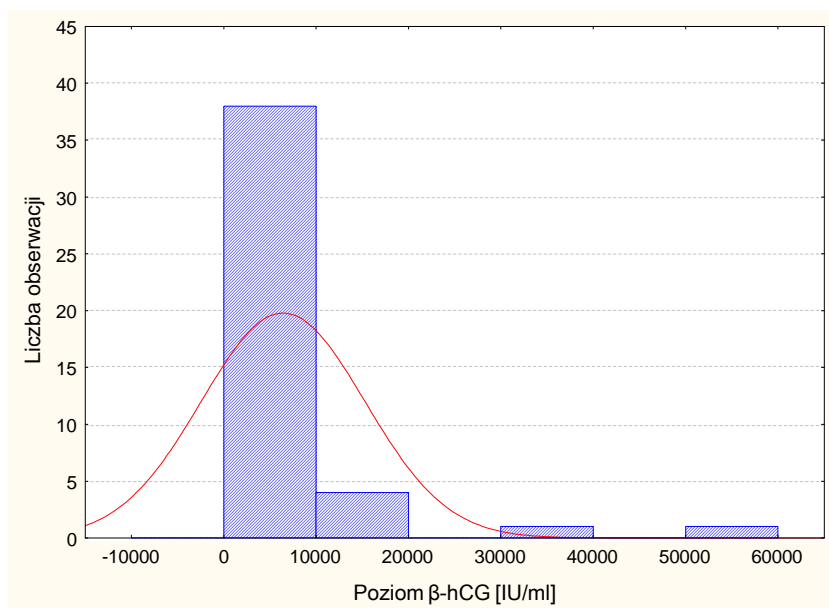


Rycina 2. Histogram- rozkład grubości endometrium pacjentek z ciążą pozamaciczną



Rycina 3. Histogram -rozkład średnicy zmiany w przydatkach pacjentek z ciążą pozamaciczną

Średni poziom β -hCG u pacjentek z ciążą pozamaciczną wynosił $6677,8 \pm 10753,8$ mIU/ml i charakteryzował się rozkładem zmiennej różnym od normalnego (Rycina 4).



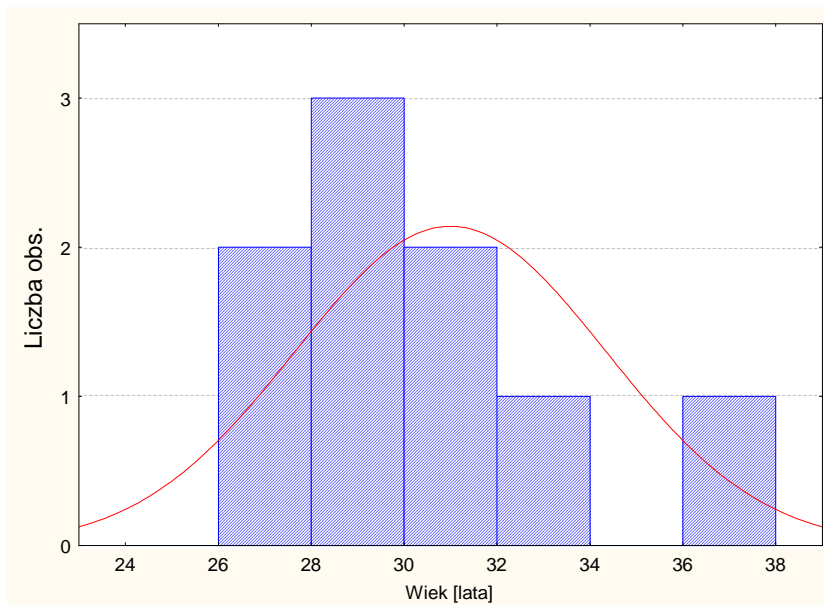
Rycina 4. Histogram – rozkład względnego stężenia β -HCG w surowicy krwi pacjentek z ciążą pozamaciczną

Pacjentki z ciążą pozamaciczną kwalifikowano do leczenia operacyjnego. We wszystkich przypadkach wykonano laparoskopię, potwierdzając wstępną diagnozę. W trakcie każdego zabiegu operacyjnego oceniano integralność ściany jajowodu i obecność krwi w jamie brzusznej. **W zależności od rozpoznania śródoperacyjnego pacjentki zostały podzielone**

na 2 podgrupy: 1. Grupa pacjentek z ciążą pozamaciczną niepękniętą (NP), 2. Grupa pacjentek z ciążą pozamaciczną pękniętą (P). Kryterium podziału pacjentek na 2 grupy ciąży pozamacicznej pękniętej i niepękniętej stanowiło potwierdzenie naruszenia ciągłości ściany jajowodu. Ciążę pozamaciczną pękniętą rozpoznano śródoperacyjnie u 24 pacjentek, co stanowi 54,5% populacji ciąży pozamacicznej. Grupę z niepękniętą ciążą pozamaciczną stanowiło 20 (45,4%) pacjentek. We wszystkich przypadkach w trakcie zabiegu wykonano także wyłyżeczkowanie jamy macicy.

3.1.2. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA KOBIET Z PORONIENIEM SAMOISTNYM W PIERWSZYM TRYMESTRZE CIĄŻY

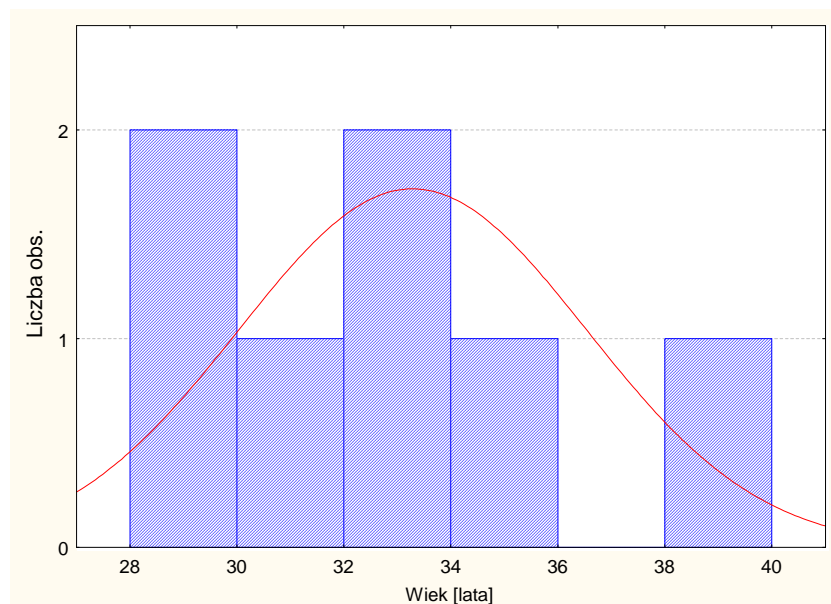
U 18 kobiet wykonano zabieg wyłyżeczkowania jamy macicy z powodu samoistnego poronienia. Średni wiek pacjentek wynosił 31 lat ($SD \pm 3,3$) (Rycina 5). Mediana liczby ciąż wynosiła 2 (IQR=1), mediana liczby porodów wynosiła 1 (IQR= 1). Mediana liczby poronień wyniosła 0 (IQR= 1), a średni wiek ciążowy, w którym wystąpiło poronienie, obliczony z daty ostatniej miesiączki wynosił 9 tygodni (IQR=1). Do badania zostały włączone kobiety z obecnymi objawami poronienia tj. krwawieniem z dróg rodnych, bólem okolicy krzyżowej i podbrzusza, rozwartym zewnętrznym ujściem kanału szyjki widocznym w badaniu we wzornikach. W każdym przypadku oprócz badania klinicznego wykonano badanie USG TV, w którym stwierdzono: nieregularne brzegi pęcherzyka ciążowego, brak akcji serca płodu (Power Doppler). Po ustaleniu rozpoznania wyłyżeczkowano jamę macicy.



Rycina 5. Histogram – rozkład wieku pacjentek z poronieniami

3.1.3. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA KOBIET NIECIĘŻARNYCH

W grupie 18 kobiet wykonano zabieg chirurgiczny tj. miomektomię drogą laparoskopową z powodu mięśniaka macicy. W trakcie zabiegu operacyjnego wykonano biopsję endometrium jako dodatkową procedurę, na co uzyskano zgodę pacjentki. Średni wiek pacjentek wynosił 33 lata ($SD \pm 3,0$) i charakteryzował się rozkładem zbliżonym do normalnego (Rycina 6). Mediana liczby ciąż wynosiła 1 ($IQR=1$). Mediana liczby porodów wynosiła 1 ($IQR=0,5$), a dla liczby poronień 0 ($IQR= 0,5$). Żadna z kobiet w grupie kontrolnej nie poddawana była leczeniu hormonalnemu. U wszystkich kobiet potwierdzono fazę okołooowulacyjną w badaniu histopatologicznym endometrium.



Rycina 6. Histogram - rozkład wieku pacjentek nieciążarnych

3.2. MATERIAŁ TKANKOWY

W trakcie zabiegów operacyjnych pobrano próbki tkankowe z:

1. jajowodu z miejsca implantacji jaja płodowego poprzez :

- a) **częściową resekcję jajowodu** (w przypadku pęknięcia jajowodu),
- b) **nacięcie ściany jajowodu i ewakuację jaja płodowego** (w przypadku niepękniętej ciąży pozamacicznej),

2. wyskrobin z jamy macicy uzyskanych poprzez:

wyłuszczenie jamy macicy – część materiału tkankowego przekazano do badania histopatologicznego, a część tkanki doczesnej została przekazana do analizy cytometrycznej,

3. endometrium uzyskane przy pomocy biopsji.

Próbki tkankowe pobierane do badań z jajowodu, doczesnej i endometrium wynosiły **3-4mm³** co stanowiło ułamek całości materiału wysyłanego do pracowni patomorfologicznej i nie miało wpływu na wynik badania histopatologicznego.

3.3. METODYKA

3.3.1. IZOLACJA KOMÓREK

Uzyskany materiał tkankowy z jajowodów, wyskrobin z jamy macicy i biopsji endometrium, był mechanicznie rozdrabniany poprzez przecieranie przez filtry nylonowe („cell strainers”) o średnicy porów 70 μm (BD Falcon, San Jose, CA, USA). W celu usunięcia debris komórkowego oraz komórek martwych powstałych w trakcie mechanicznej obróbki materiału tkankowego komórki wirowano (10 min., 400 x g) w gradiencie płodowej surowicy cielejącej (Fetal Calf Serum – FCS). Po wirowaniu w takich warunkach komórki martwe oraz debris zostają w warstwie surowicy, a komórki żywe przechodzą do osadu. Uzyskane z osadu komórki odpłukiwano w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (Phosphate Buffer Solution- PBS) i następnie liczone w komorze Bürkera.

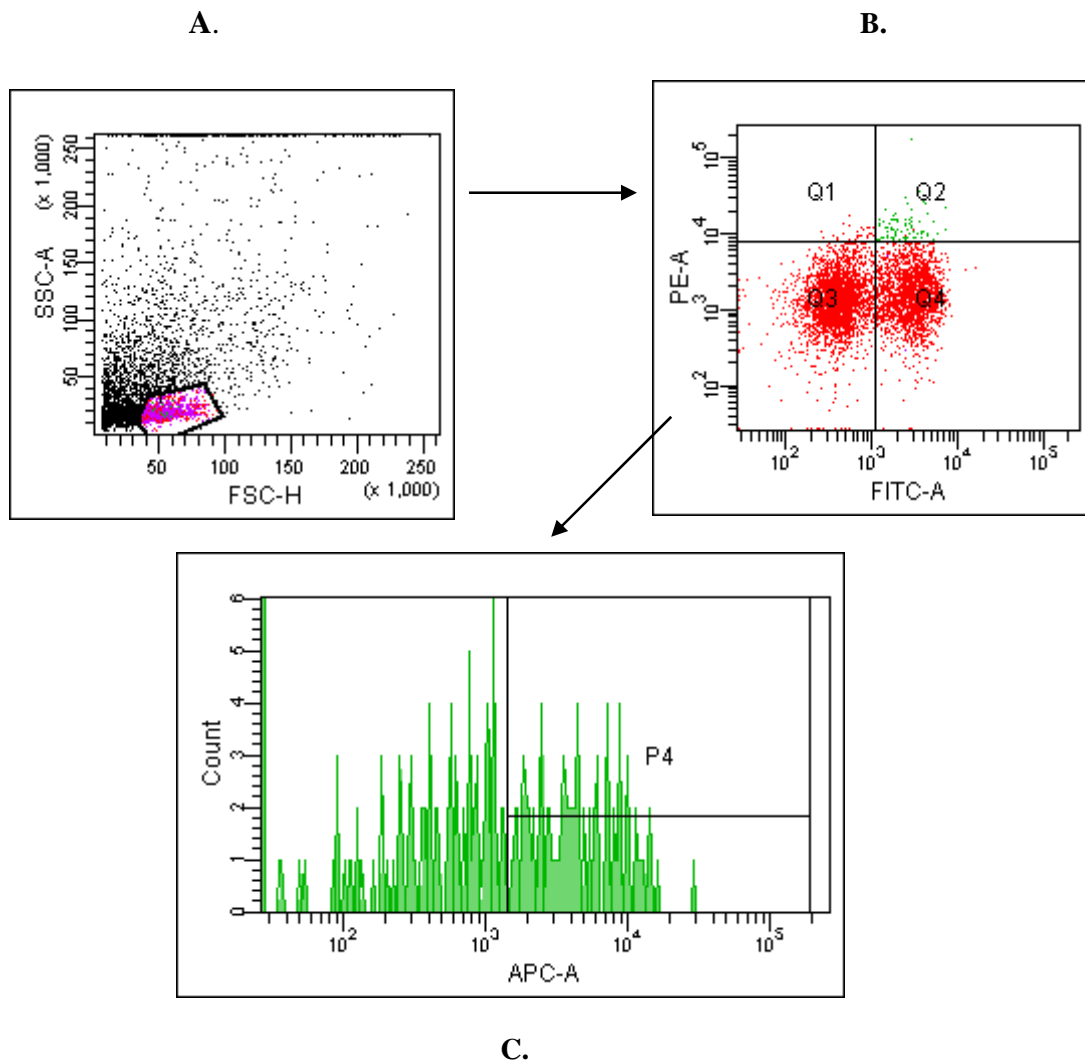
3.3.2. IDENTYFIKACJA LIMFOCYTÓW T REGULATORYWYCH I CYTOTOKSYCZNYCH

Limfocyty T regulatorowe (Treg) i komórki cytotoksyczne identyfikowano metodą cytometrii przepływowej po ich wybarwieniu znakowanymi fluorescencyjnie mysimi lub szczurzymi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw markerom charakterystycznym dla tych komórek. Komórki regulatorowe Treg identyfikowano w oparciu o ekspresję markerów powierzchniowych CD4 i CD25 oraz markera powierzchniowego FoxP3. W tym celu, 1×10^6 komórek zawieszano w 100 μl PBS i znakowano mysimi przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD4 sprzężonymi z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) oraz anti-CD25 sprzężonymi z fikoerytryną (PE) (BD Pharmingen, San Diego, CA). Komórki odpłukiwano w PBS, następnie utrwalano i permeabilizowano w buforze „Wash and Perm” (BD Pharmingen) i inkubowano ze szczurzymi przeciwciałami monoklonalnymi anti-FoxP3 sprzężonymi z allofikocyjaniną

(APC) (eBioscience) w celu powierzchniowej detekcji białka FoxP3. Komórki cytotoksyczne identyfikowano po wybarwieniu powierzchniowym z użyciem mysich przeciwciał monoklonalnych anty-CD8 PE, anty-CD56 APC oraz anty-CD57 FITC. Limfocyty T cytotoksyczne identyfikowano natomiast po wybarwieniu powierzchniowym komórek z użyciem mysich przeciwciał monoklonalnych anty-CD3 PE-Cy5, anty-CD8 PE, oraz anty-CD57 FITC (wszystkie BD Pharmingen). Równolegle, w celu określenia stopnia nieswoistego wiązania przeciwciał przez badane komórki przygotowywano odpowiednie próbki kontrolne, w których komórki inkubowano ze znakowanymi odpowiednimi fluorochromami immunoglobulinami mysimi lub szczurzymi tego samego izotypu co użyte w próbce badanej przeciwciała monoklonalne (kontrolne izotypowe).

3.3.3. ANALIZA CYTOFLUOROMETRYCZNA

Wybarwione komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto (BD Biosciences, Immunocytometry Systems, San, Jose, CA, USA) w programie FACS DiVa v. 6.1 pracującym w środowisku Windows XP. Każdorazowo zbierano dane z 50 000 komórek odpowiadających w oparciu o parametry morfologiczne FSC („Forward scatter”) i SSC („Side scatter”) limfocytom. Wszystkie parametry rejestrowano w skali liniowej i cyfrowo zamieniano na 5-dekadową skalę logarytmiczną przy użyciu 10-bitowej elektroniki. Wynik analizy stanowił odsetek komórek FoxP3 dodatnich spośród komórek CD4⁺CD25⁺ (limfocyty T reg) (Rycina 7) oraz CD8⁺CD56⁺CD57⁺ spośród komórek CD3⁺ (limfocyty T cytotoksyczne).



Rycina 7. Analiza cytometryczna limfocytów Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)

A. Identyfikacja populacji limfocytarnej w oparciu o parametry morfologiczne FSC vs. SSC (komórki obrysowane).

B. Ekspresja antygenu CD4 i CD25 na powierzchni limfocytów. Cytogram przedstawia komórki w układzie fluorescencja zielona (anty-CD4 FITC) vs. fluorescencja pomarańczowa (anty-CD25 PE)

C. Ekspresja antygenu FoxP3 w cytoplazmie limfocytów CD4⁺CD25⁺. Histogram przedstawia intensywność fluorescencji (anty-FoxP3 APC) korelujący z ekspresją antygenu wewnątrz komórek. Odsetek komórek FoxP3 pozytywnych (zaznaczony marker) oceniano w oparciu o odpowiednią kontrolę izotypowo swoistą.

3.4. ANALIZA STATYSTYCZNA

Do określenia rozkładu zmiennych klinicznych o charakterze ciągłym ilościowym (wiek, grubość endometrium, średnica zmiany w przydatkach ocenianej metodą USG-TV oraz poziom β -HCG w surowicy krwi) użyto testu Shapiro-Wilka. Do porównania danych klinicznych zdefiniowanych przez zmienne jakościowe i porządkowe użyto testu U - Manna-Whitneya, a w przypadku zmiennych ilościowych ciągłych w zależności od rozkładu zbliżonego do rozkładu normalnego lub różnego od rozkładu normalnego zostały użyte odpowiednio: test parametryczny oraz nieparametryczny. Porównanie odsetka badanych komórek w przypadku rozkładu zbliżonego do normalnego zostało wykonane przy użyciu testu parametrycznego t-Studenta i przedstawione jako wartość średnia i odchylenie standardowe (SD). W przypadku rozkładu różnego od normalnego ekspresja analizowanych białek została porównana testem nieparametrycznym U – Manna-Whitneya i przedstawiona jako mediana oraz rozstęp kwartyłowy (IQR). Do porównania zmiennych w próbach powiązanych, które charakteryzowały się rozkładem różnym od normalnego został użyty nieparametryczny test kolejności par Wilcoxon dla prób zależnych. Celem testowania hipotezy badawczej w co najmniej 3 grupach użyto jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W przypadku gdy badane zmienne nie spełniły założenia rozkładu normalnego, co oceniono testem Lavrenc`a, do testowania hipotez użyta została ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Do analizy wpływu wieku, liczby ciąż i porodów, czasu trwania ciąży oraz wielkości zmiany w przydatkach na odsetek badanych komórek użyto metody analizy kowariancji (ANCOVA). Poziom istotności statystycznej przy porównywaniu wartości zmiennych został wyznaczony na poziomie $p < 0,05$. Obliczeń dokonano przy pomocy pakietu statystycznego STATISTICA (Data Analysis Software System), wersja 9.0 firmy StatSoft, Inc. (2009). Wykresy wykonano przy użyciu programu SPSS wersja 12.0 firmy SPSS Inc. IBM Company.

4. WYNIKI

Porównanie danych klinicznych grupy kobiet z ciążą pozamaciczną, poronieniem samoistnym oraz nieciążarnych z endometrium fazy sekrecyjnej.

W grupie pacjentek z ciążą pozamaciczną wyróżniono dwie podgrupy w zależności od faktu czy ciąża była pęknięta (P) czy niepęknięta (NP). Nie stwierdzono różnic w średniej wieku ani lokalizacji (po stronie lewej czy prawej) ciąży pozamacicznej. Natomiast wykazano, iż w grupie pacjentek z pękniętą ciążą pozamaciczną było mniej pierwiastek i pierworódek w porównaniu do grupy pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną.

U pacjentek z pękniętą ciążą pozamaciczną stwierdzono dłuższy czas trwania ciąży do momentu jej pęknięcia w porównaniu do czasu trwania ciąży w momencie jej rozpoznania u pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną. Średnica zmiany w badaniu USG TV była również większa u kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną w porównaniu do grupy niepękniętej. Nie stwierdzono różnic w średniej grubości endometrium między badanymi grupami. Wykazano natomiast różnice w stężeniu β -hCG, które było wyższe w grupie pacjentek z pękniętą ciążą jajowodową (Tabela 1).

Ponieważ pomiędzy pacjentkami z grupy ciąży pozamacicznej niepękniętej i pękniętej wykazano istotne różnice dotyczące przede wszystkim liczby ciąż, porodów oraz czasu trwania ciąży, w dalszej analizie danych klinicznych zdecydowano porównywać osobno te dwie grupy z pacjentkami z poronieniem samoistnym oraz pacjentkami nieciążarnymi, u których wykonano biopsję endometrium w sekrecyjnej fazie cyklu.

Tabela 1. Porównanie danych klinicznych kobiet z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną.

	niepęknięta ciąża pozamaciczna (NP)	pęknięta ciąża pozamaciczna (P)	p
Wiek (lata)	28,6± 9,2	30,5 ± 2,9	NS
ciąża pierwsza / ciąża kolejna	16 (80,0%) / 4 (40,0%)	8 (33,3%) / 16 (66,7%)	0,002*
poród pierwszy / poród kolejny	18 (90,0%) / 2 (10,0%)	8 (33,3%) / 16 (66,7%)	0,001*
Czas trwania ciąży (tyg)	6,5 ± 1,09	8,1 ± 0,8	<0,001*
miejsce implantacji jajowód prawy / jajowód lewy	6 (30,0%) / 14 (70,0%)	6 (25,0%) / 18 (75,0%)	NS
średnica zmiany (mm)	28 ±9,2	36,9 ± 8,2	0,001*
grubość endometrium (mm)	12,45 ± 4,9	12,63 ± 5,33	NS
Poziom β-hCG (mIU/ml)	3287,8 ± 3098,65	9021,76 ± 11122,94	0,03*

NS - wartość statystycznie nieistotna; *-wartość statystycznie istotna

W zakresie czterech grup pacjentek, tj. z: ciążą pozamaciczną niepękniętą i pękniętą, poronieniem samoistnym i nieciężarnych z endometrium sekrecyjnym, nie stwierdzono różnic w średniej wieku pacjentek. Analizowane grupy kobiet różniły się w sposób istotny pod względem liczby ciąż i porodów. W grupie pacjentek z poronieniem samoistnym było mniej pierwiastek i pierworódek w porównaniu do grupy pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną. Pacjentki nieciężarne z grupy endometrium sekrecyjnym charakteryzowały się większą liczbą przebytych porodów w porównaniu do pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną (Tabela 2).

Tabela 2. Porównanie danych klinicznych pacjentek z niepękniętą i pękniętą ciążą pozamaciczną, poronieniem samoistnym i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym

	pęknięta ciąża jajowodowa	niepęknięta ciąża jajowodowa	poronienie samoistne	endometrium sekrecyjne	p
wiek	30,5 ± 2,9	28,6 ± 9,2	30,7 ± 2,83	32,3 ± 2,6	NS
ciąża pierwsza / ciąża kolejna	8 (33,3%) / 16 (66,7%)	16 (80,0%) / 4 (40,0%)	4 (22,2%) / 14 (77,7%)	10 (55,5%) / 8 (44,5%)	<0,001*
poród pierwszy / poród kolejny	8 (33,3%) / 16 (66,7%)	18 (90,0%) / 2 (10,0%)	6 (33,3%) /12 (66,6%)	2 (11,1%) / 16 (88,9%)	<0,001*

NS - wartość statystycznie nieistotna; *-wartość statystycznie istotna

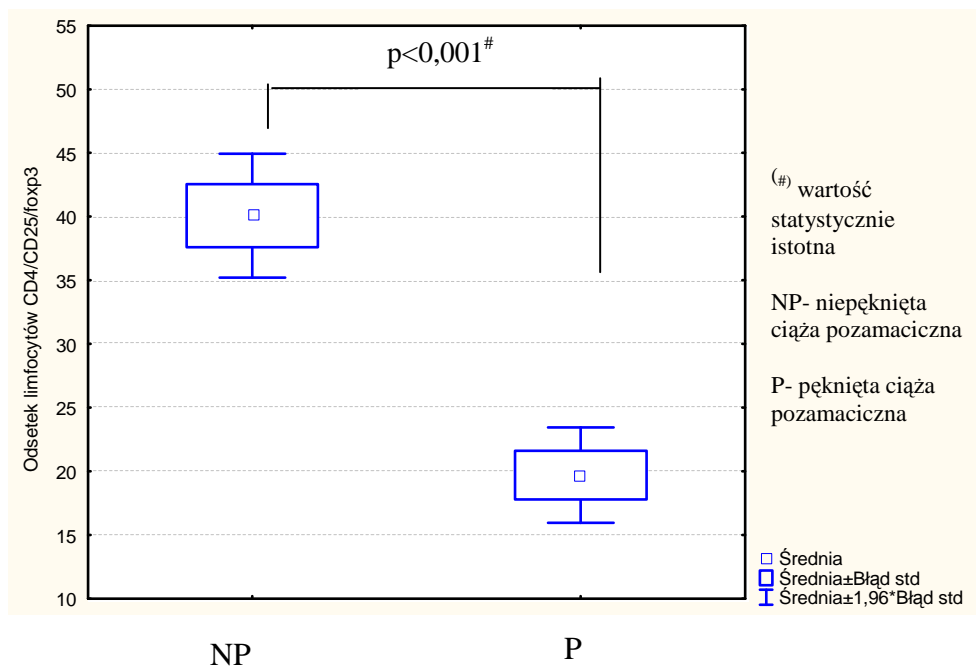
Ocena populacji komórek immunologicznych u pacjentek z ciążą pozamaciczną.

Oceny wybranych populacji komórek układu immunologicznego dokonano u pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną (NP) i pękniętą ciążą pozamaciczną (P) kolejno w miejscu implantacji jaja płodowego (J) oraz w wyskrobinach z jamy macicy (ECU). Następnie porównano próbki sparowane z dwóch wymienionych lokalizacji osobno w grupie pacjentek z pękniętą i niepękniętą ciążą pozamaciczną.

W pobranym materiale tkankowym oceniano populację limfocytów CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, Treg - CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺; a także komórek cytotoksycznych: CD8⁺; CD56⁺; CD57⁺ oraz CD3⁺CD8⁺CD57⁺.

Ocena populacji limfocytów T regulatorowych (Treg)

W grupie pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną w miejscu implantacji zarodka stwierdzono istotnie wyższy średni odsetek komórek Foxp3^+ w subpopulacji limfocytów $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ w porównaniu do kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną ($40,07 \pm 1,09$ vs. $19,69 \pm 9,38$; $p < 0,001$) (Rycina 8).



Rycina 8. Porównanie średniego odsetka komórek Foxp3^+ w subpopulacji limfocytów T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ w miejscu implantacji jaja płodowego w grupie z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną.

W badanych grupach pacjentek z niepękniętą i pękniętą ciążą pozamaciczną nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w średnim odsetku limfocytów T CD4^+ w miejscu implantacji zarodka w jajowodzie ($24,87 \pm 24,97$ vs. $25,28 \pm 13,7$; $p = \text{NS}$). Co więcej, w grupie pacjentek z ciążą niepękniętą, jak i pękniętą zaobserwowano podobny średni odsetek komórek $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ w subpopulacji limfocytów T CD4^+ ($2,05 \pm 1,74$ vs. $1,97 \pm 1,21$; $p = \text{NS}$).

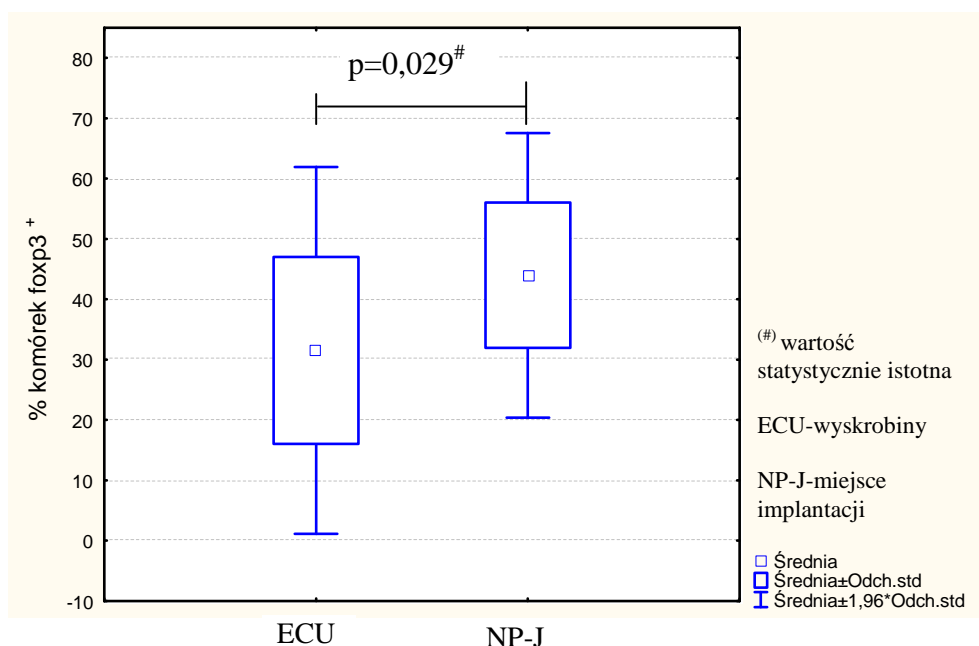
Ocena limfocytów T CD4^+ w wyskrobinach z jamy macicy pacjentek z ciążą pozamaciczną wykazała, że ich średni odsetek w obrębie doczesnej był podobny w grupie pacjentek z niepękniętą i pękniętą ciążą pozamaciczną.

Chociaż stwierdzono wyższy odsetek komórek CD4⁺CD25⁺ w subpopulacji limfocytów T CD4⁺ u kobiet z niepękniętą ciążą pozamaciczną w porównaniu do grupy kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną, to różnica między grupami nie była istotna statystycznie. Zaobserwowano nieznacznie większy naciek limfocytów T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ w obrębie doczesnej w grupie pacjentek z niepękniętą ciążą jajowodową w porównaniu do pacjentek z pękniętą ciążą pozamaciczną. Różnica między badanymi grupami również nie była statystycznie istotna (Tabela 3).

Tabela 3. Analiza średniego odsetka komórek CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, Foxp3⁺ w wyskrobinach w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej (\pm SD, odchylenie standardowe)

	Wyskrobiny z jamy macicy w grupach pacjentek		p
	NP.	P	
Średni odsetek liczby komórek CD4 ⁺ (\pm SD)	24,2 \pm 19,54	26,13 \pm 26,23	NS
Średni odsetek liczby komórek CD4 ⁺ CD25 ⁺ (\pm SD)	2,3 \pm 3,09	1,0 \pm 0,47	NS
Średni odsetek liczby komórek Foxp3 ⁺ (\pm SD)	31,5 \pm 15,5	25,88 \pm 6,17	NS

Porównanie w zakresie średniego odsetka komórek CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ i Foxp3⁺ **sparowanego materiału tkankowego pobranego z miejsca implantacji zarodka (J) oraz doczesnej (ECU) osobno w grupie pacjentek z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną** wykazało w przypadku ciąży niepękniętej istotne różnice w średnim odsetku komórek Foxp3⁺. **Miejsce implantacji w niepękniętej ciąży jajowodowej (NP-J) charakteryzowało się większym naciekiem komórkowym Foxp3⁺ w porównaniu do doczesnej (43,96 \pm 12,0 vs. 31,51 \pm 15,5; p=0,029) (Rycina 9).**



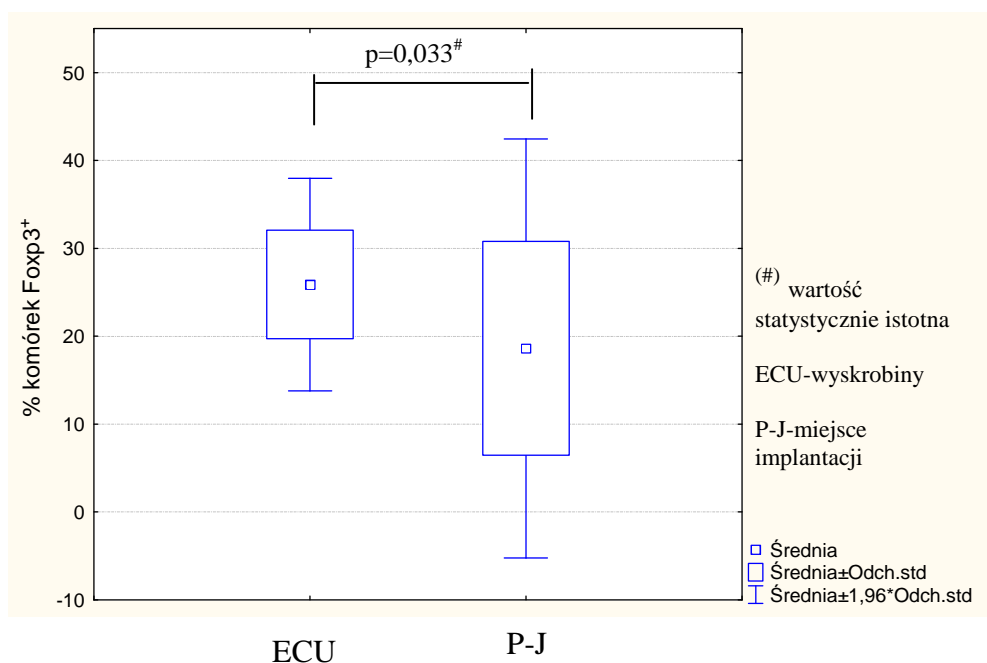
Rycina 9. Średni odsetek komórek Foxp3⁺ w materiale tkankowym z miejsca implantacji zarodka w niepękniętej ciąży jajowodowej (NP-J) i w doczesnej uzyskanej poprzez wyłęczekowanie jamy macicy (ECU)

Przy zachowanej ciągłości ściany jajowodu nie stwierdzono różnic w średnim odsetku limfocytów T CD4⁺ w obu lokalizacjach. Zarówno w grupie ECU, jak i w grupie NP-J naciek komórek CD4⁺CD25⁺ również nie wykazywał istotnych statystycznie różnic (Tabela 4).

Tabela 4. Analiza średniego odsetka komórek CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ w doczesnej (ECU) i miejscu implantacji zarodka w jajowodzie w niepękniętej ciąży pozamacicznej (NP-J) (±SD, odchylenie standardowe).

	Niepęknięta ciąża pozamaciczna (NP)		P
	ECU	NP-J	
Średni odsetek liczby komórek CD4 ⁺ (±SD)	24,2 ± 19,54	28,29 ± 27,23	NS
Średni odsetek liczby komórek CD4 ⁺ CD25 ⁺ (±SD)	2,3 ± 3,09	1,98 ± 1,71	NS

W ciąży pozamacicznej pękniętej wykazano większy odsetek limfocytów Treg w obrębie doczesnej (ECU) w porównaniu do miejsca implantacji jaja płodowego w jajowodzie (P-J) ($25,88 \pm 6,17$ vs. $18,62 \pm 12,16$; $p=0,033$) (Rycina 10).



Rycina 10. Średni odsetek komórek Foxp3⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P-J) i w doczesnej (ECU).

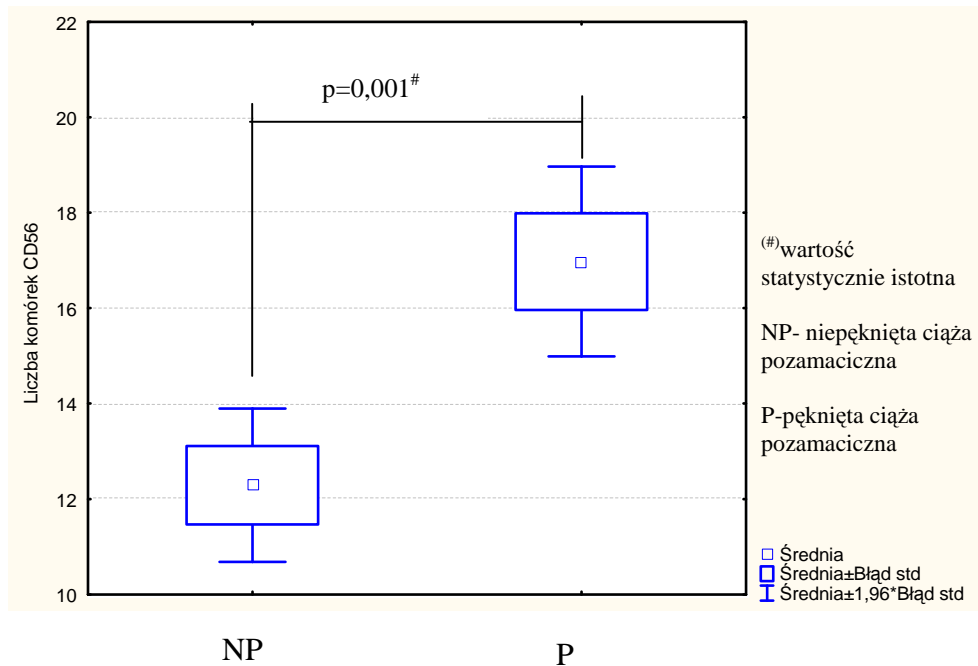
W grupie kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną nie stwierdzono istotnych różnic w miejscu implantacji zarodka i wyskrobinach z jamy macicy pod względem średniego odsetka limfocytów T CD4⁺ i komórek T CD4⁺CD25⁺ (Tabela 5).

Tabela 5. Analiza średniego odsetka komórek CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ w wyskrobinach i miejscu implantacji zarodka w jajowodzie w pękniętej ciąży pozamacicznej (\pm SD, odchylenie standardowe).

	Pęknięta ciąża pozamaciczna (P)		p
	ECU	P-J	
Średni odsetek liczby komórek CD4 ⁺ (\pm SD)	$26,1 \pm 26,23$	$23,53 \pm 17,75$	NS
Średni odsetek liczby komórek CD4 ⁺ CD25 ⁺ (\pm SD)	$1,0 \pm 0,47$	$1,2 \pm 0,7$	NS

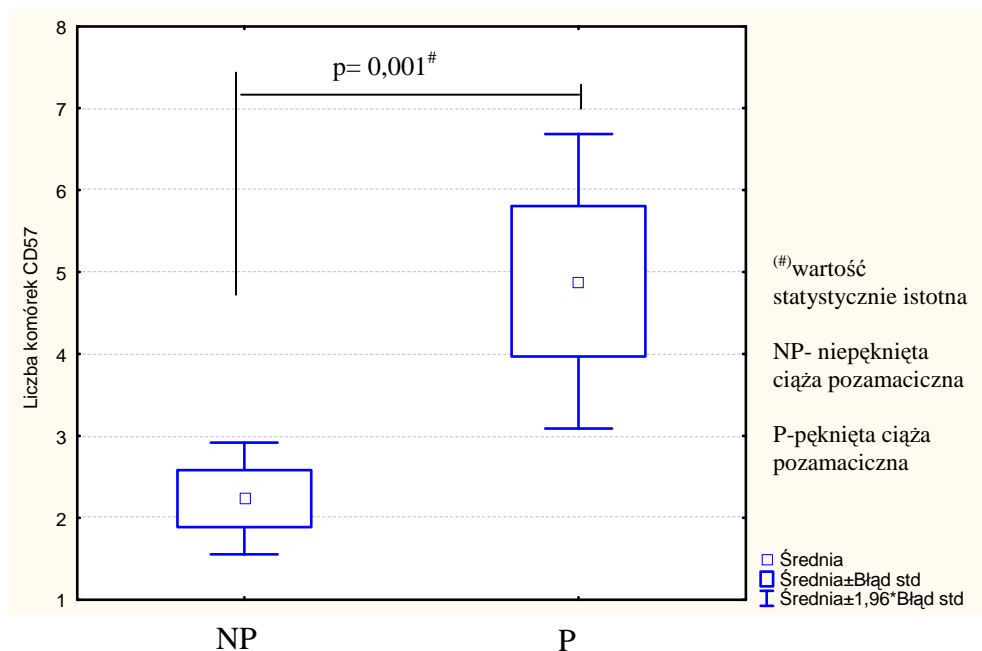
Ocena populacji komórek cytotoksycznych

Analiza liczby komórek cytotoksycznych w miejscu implantacji zarodka w ciąży pozamacicznej wykazała, że w grupie pacjentek z pękniętą ciążą pozamaciczną (**P**) średnia liczba komórek CD56⁺ była wyższa w porównaniu do grupy pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną (**NP**) (16,97±4,96 vs. 12,29±3,66; p=0,001) (Rycina 11).



Rycina 11. Średnia liczba komórek CD56⁺ w miejscu implantacji jaja płodowego w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej

Podobny trend zaobserwowano dla populacji komórek CD57⁺. Średni naciek komórek CD57⁺ był większy w obrębie miejsca implantacji jaja płodowego w jajowodzie o naruszonej ciągłości ściany (P) w porównaniu do niepękniętego (NP) jajowodu (4,88±4,49 vs. 2,23±1,55; p=0,015) (Rycina 12).



Rycina 12. Średnia liczba komórek CD57+ w miejscu implantacji jaja płodowego w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej.

Niezależnie od tego czy ściana jajowodu była pęknięta czy nie, w obu grupach pacjentek średni odsetek limfocytów T CD8⁺ nie wykazywał istotnych różnic. Zarówno pacjentki z grupy ciąży niepękniętej jak i z grupy ciąży pękniętej charakteryzowały się podobnym średnim naciekiem komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ w obrębie jajowodu (Tabela 6).

Tabela 6. Analiza średniego odsetka komórek CD8⁺, CD3⁺CD8⁺CD57⁺ w miejscu implantacji w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej (±SD)

	Grupy pacjentek		p
	NP	P	
Średni odsetek liczby komórek CD8 ⁺ (±SD)	40,79 ± 15,04	39,8 ± 9,7	NS
Średni odsetek liczby komórek CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ (±SD)	4,99 ± 1,33	6,02 ± 3,87	NS

Porównanie komórek cytotoksycznych w wyskrobinach z jamy macicy pacjentek z ciążą pozamaciczną.

Średnia liczba komórek CD56⁺ w obrębie doczesnej była porównywalna w grupie pacjentek z niepękniętą i pękniętą ciążą jajowodową. Jedynie niewielką różnicę w nacieku komórek CD57⁺ wykazano między porównywanymi grupami. W doczesnej pobranej od pacjentek z ciążą pozamaciczną niepękniętą stwierdzono wyższy naciek komórek CD57⁺ w porównaniu do grupy kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną. Jednak różnica nie była istotna statystycznie.

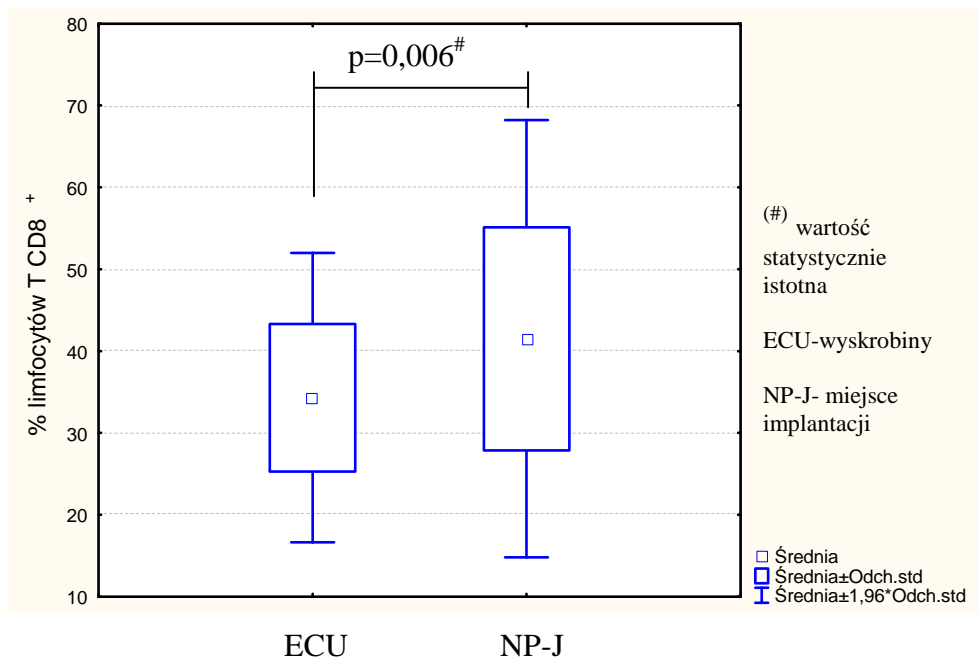
Grupy pacjentek z ciążą pozamaciczną niepękniętą i pękniętą wykazywały podobny średni odsetek w subpopulacji limfocytów T CD8⁺. Nie wykazano również różnic w nacieku komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ między opisywanymi grupami (Tabela 7).

Tabela 7. Analiza średniej liczby komórek CD57⁺, CD56⁺, CD3⁺CD8⁺CD57⁺, CD8⁺ w wyskrobinach w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamaciczej (±SD).

	Wyskrobiny z jamy macicy w grupach pacjentek		p
	NP	P	
Średni odsetek liczby komórek CD56 ⁺ (±SD)	14,5 ± 6,93	11,83 ± 3,28	NS
Średni odsetek liczby komórek CD57 ⁺ (±SD)	4,22 ± 5,36	2,5 ± 1,4	NS
Średni odsetek liczby komórek CD8 ⁺ (±SD)	34,29 ± 9,01	34,0 ± 2,46	NS
Średni odsetek liczby komórek CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ (±SD)	5,02 ± 2,47	4,99 ± 2,08	NS

Porównując **sparowany materiał tkankowy** pobrany z miejsca implantacji zarodka w jajowodzie oraz w doczesnej osobno w **grupie pacjentek z niepękniętą i pękniętą ciążą pozamaciczną**, jajowodową wykazano, że w ciąży **pozamaciczej niepękniętej** większa jest średnia liczba komórek CD57⁺ w obrębie doczesnej w porównaniu do miejsca implantacji jaja

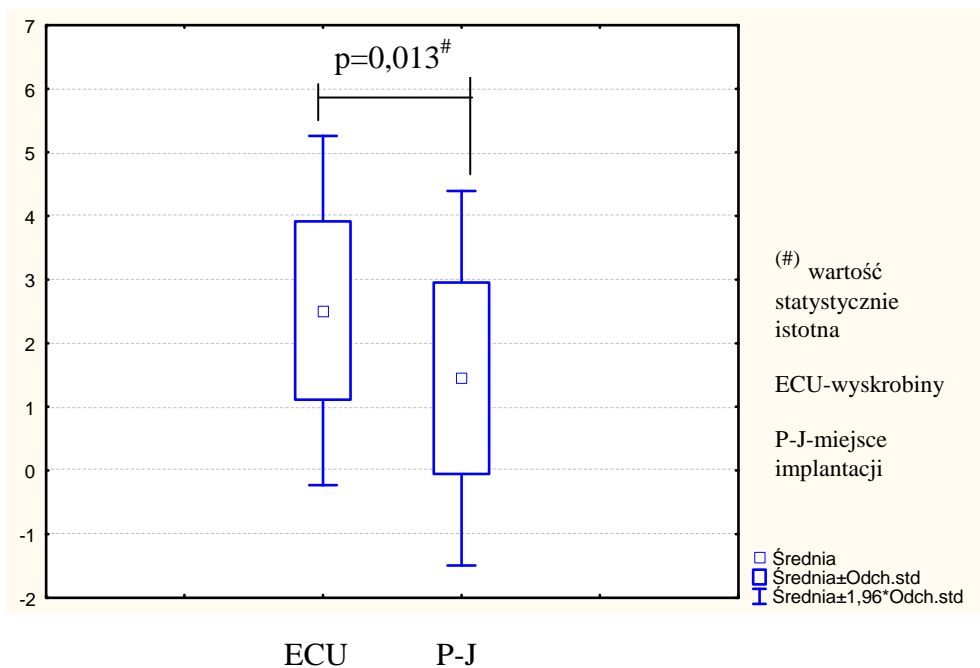
plodowego w jajowodzie. Jakkolwiek różnica ta nie była istotna statystycznie ($4,22 \pm 5,36$ vs. $2,71 \pm 1,69$; $p=NS$). Zarówno doczesna, jak i miejsce implantacji zarodka w ścianie niepękniętego jajowodu wykazywały podobną średnią liczbę komórek $CD56^+$ ($14,5 \pm 6,93$ vs. $12,59 \pm 4,07$; $p=NS$). W obrębie populacji limfocytów **T $CD8^+$** stwierdzono **większy średni naciek w miejscu implantacji w niepękniętym jajowodzie w porównaniu do doczesnej** ($41,51 \pm 13,63$ vs. $34,29 \pm 9,01$; $p=0,006$) (Rycina 13).



Rycina 13. Średni odsetek limfocytów T $CD8^+$ w niepękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (NP-J) i w doczesnej z wyskrobin z jamy macicy (ECU)

Natomiast odsetek komórek $CD3^+CD8^+CD57^+$ zarówno w doczesnej, jak i w niepękniętej ciąży jajowodowej nie wykazywał istotnych różnic ($5,02 \pm 2,47$ vs. $4,95 \pm 1,42$; $p=NS$).

Porównując próbki sparowane pobrane z miejsca implantacji zarodka w jajowodzie oraz doczesnej w grupie kobiet z pękniętą (**P**) ciążą pozamaciczną wykazano **istotne różnice** w średniej liczbie komórek **$CD57^+$** , których naciek był **większy w doczesnej z wyskrobin z jamy macicy w porównaniu do ściany jajowodu** ($2,5 \pm 1,4$ vs. $1,45 \pm 1,5$; $p=0,013$) (Rycina 14).



Rycina 14. Średnia liczby komórek CD57⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P-J) i w doczesnej z wyskrobiny z jamy macicy (ECU)

Średnia liczba komórek CD56⁺ była większa w obrębie pękniętego jajowodu w porównaniu do doczesnej, jednak różnica nie była statystycznie istotna między badanymi grupami. Mimo że naciek komórek T CD8⁺ był nieznacznie większy w lokalizacji ciąży jajowodowej w porównaniu do doczesnej z wyskrobiny z jamy macicy, to różnica między obu grupami nie była statystycznie istotna. Także różnice w średnim odsetku komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ w obu lokalizacjach nie były istotne statystycznie (Tabela 8).

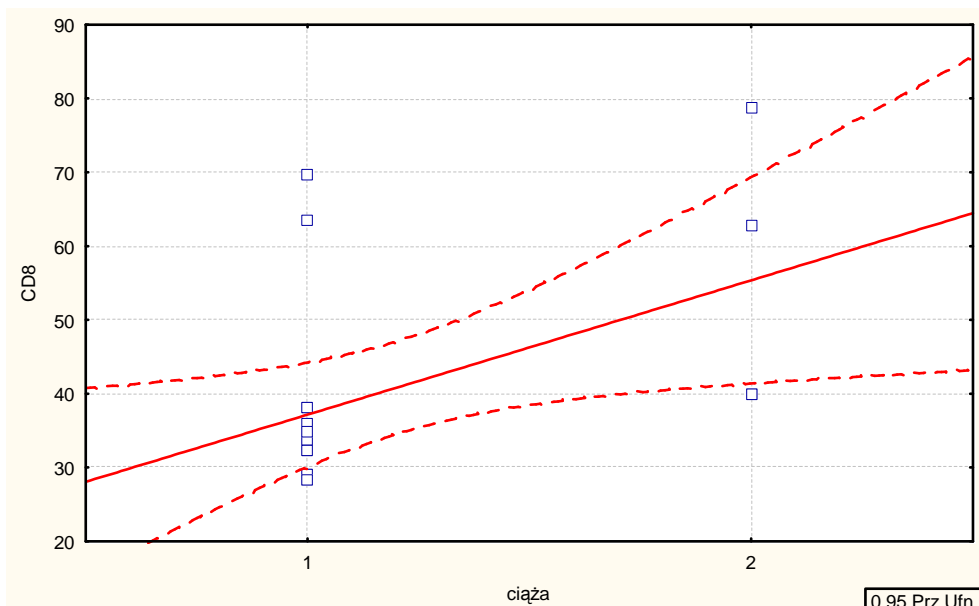
Tabela 8. Analiza średniej liczby komórek CD56⁺, CD8⁺, CD3⁺CD8⁺CD57⁺ w wyskrobinach z jamy macicy (ECU) i miejscu implantacji zarodka w jajowodzie w pękniętej ciąży pozamaciczej (P-J) (\pm SD).

	Pęknięta ciąża pozamaciczna (P)		p
	ECU	P-J	
Średni odsetek liczby komórek CD56 ⁺ (\pm SD)	11,8 \pm 3,28	15,71 \pm 5,87	NS
Średni odsetek liczby komórek CD8 ⁺ (\pm SD)	34,0 \pm 2,46	40,3 \pm 14,6	NS
Średni odsetek liczby komórek CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ (\pm SD)	4,99 \pm 2,08	2,85 \pm 0,44	NS

Analiza komórek regulatorowych i cytotoksycznych w aspekcie danych klinicznych

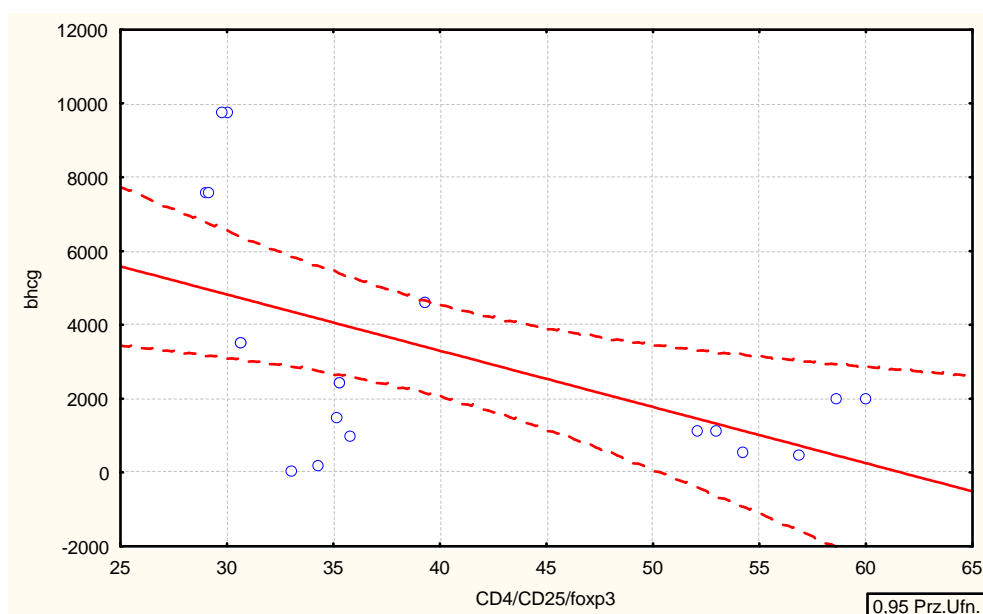
Z uwagi na stwierdzone różnice w danych klinicznych, zwłaszcza w liczbie ciąż, porodów, czasie trwania ciąży, poziomie β -hCG między grupą ciężarnych z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną, postanowiono sprawdzić, czy są one niezależnymi czynnikami wpływającymi na poziom badanych limfocytów.

Nie stwierdzono, aby wiek, liczba ciąż i porodów były niezależnymi czynnikami wpływającym na liczebność limfocytów T CD4⁺, komórek CD4⁺CD25⁺, Foxp3⁺, CD56⁺, CD57⁺, CD3⁺CD8⁺CD57⁺. Jedynie dla limfocytów T CD8⁺ wykazano, że liczba ciąż jest niezależnym czynnikiem wpływającym na ich liczebność w ciąży pozamaciczej. Rozpatrzono w związku z tym jej wpływ osobno dla grupy pacjentek z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną. W ciąży niepękniętej stwierdzono związek między liczbą ciąż a liczbą komórek CD8⁺ (Rycina 15). W ciąży pękniętej takiej korelacji nie zaobserwowano.



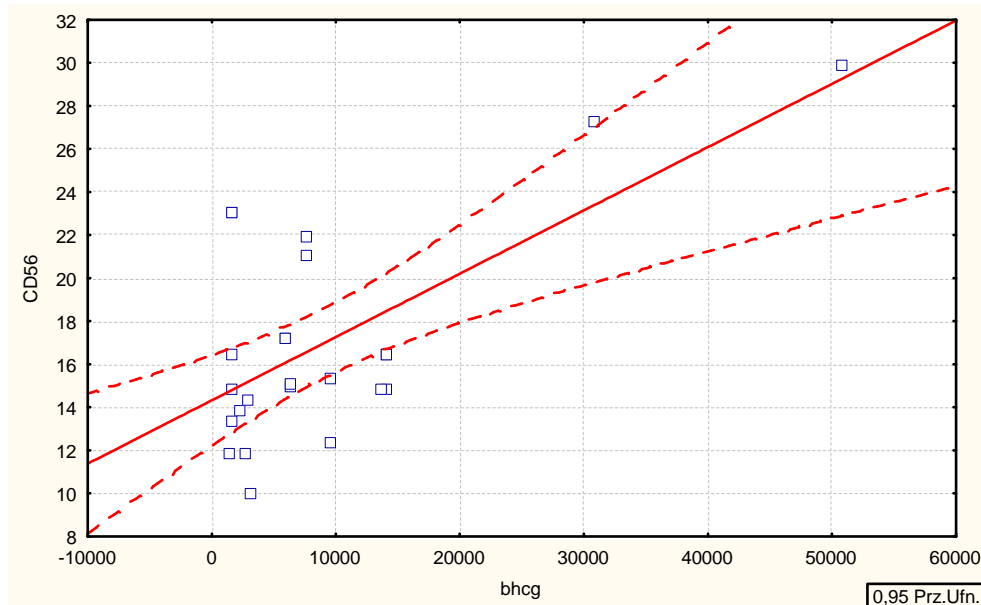
Rycina 15. Dodatnia korelacja liczby ciąży z odsetkiem limfocytów CD8⁺ w niepękniętej ciąży pozamacicznej (współczynnik korelacji [r] wynosi 0,496; p=0,0259; --- 95% przedział ufności).

Dodatkowo zauważono, że stężenie β -hCG jest niezależnym czynnikiem wpływającym istotnie na liczebność komórek Treg i komórek CD56⁺ w grupie pacjentek z ciążą pozamaciczną. Podobnie jak poprzednio rozpatrzono wpływ stężenia β -hCG osobno dla grupy pacjentek z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną. Potwierdzono istotnie silną, ujemną korelację między komórkami Treg a stężeniem β -hCG w grupie pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną (NP) ($r = -0,546$; $p = 0,01$) (Rycina 16).



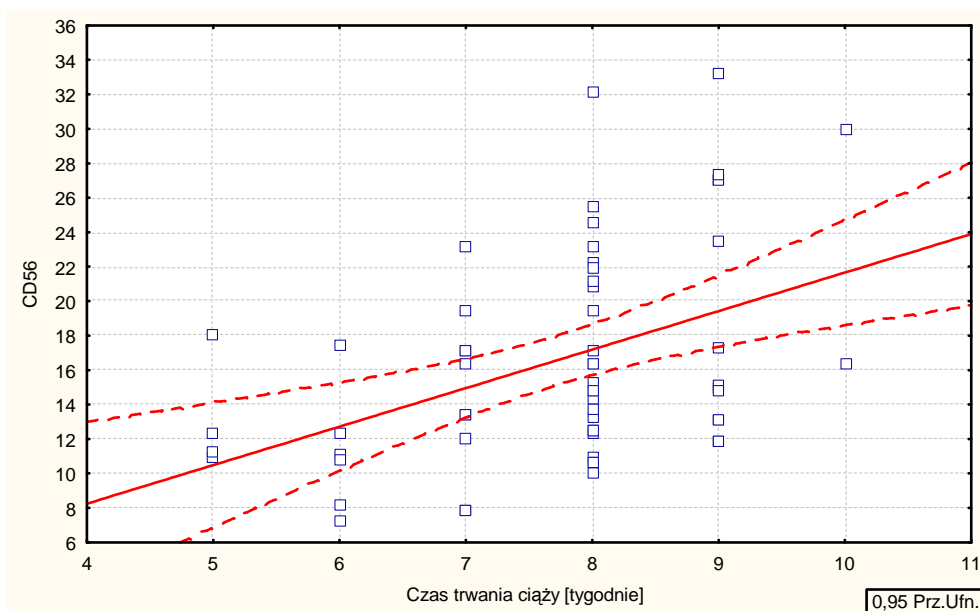
Rycina 16. Ujemna korelacja poziomu β -hCG z odsetkiem limfocytów CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ w ciąży pozamacicznej niepękniętej (współczynnik korelacji [r] wynosi -0546; p<0,001; --- 95% przedział ufności).

U kobiet z pękniętym jajowodem nie wykazano związku między liczebnością komórek Treg a poziomem β -hCG. Odwrotną zależność zaobserwowano dla populacji komórek CD56⁺. Stwierdzono, że stężenie β -hCG jest niezależnym czynnikiem mającym wpływ na liczebność komórek cytotoksycznych CD56⁺ jedynie po pęknięciu ściany jajowodu (Rycina 17).



Rycina 17. Dodatnia korelacja poziomu β -hCG z liczbą komórek CD56⁺ w pękniętej ciąży pozamacicznej (współczynnik korelacji [r] wynosi 0,658; $p < 0,001$; --- 95% przedział ufności).

W dalszej analizie wykazano, że czas trwania ciąży był niezależnym czynnikiem wpływającym jedynie na liczebność komórek CD56⁺ ($p < 0,001$) (Rycina 18). Jakkolwiek rozpatrując osobno grupę ciąży pozamacicznej pękniętej i niepękniętej takiego związku nie potwierdzono.

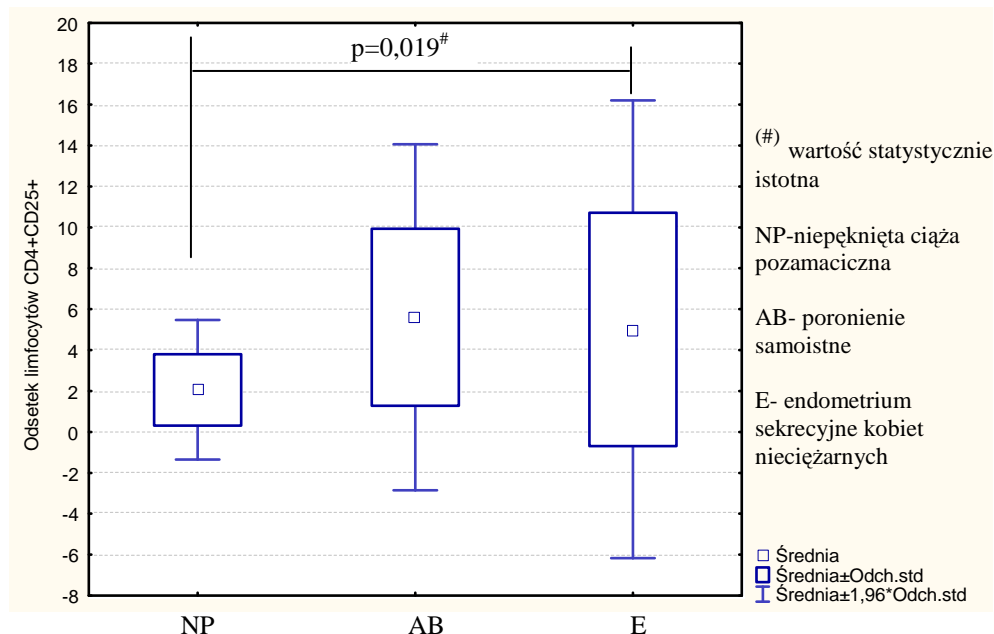


Rycina 18 Dodatnia korelacja czasu trwania ciąży z liczbą komórek CD56⁺ (współczynnik korelacji [r] wynosi 0.430; p<0,001; --- 95% przedział ufności).

Porównanie komórek T regulatorowych (Treg) i cytotoksycznych w miejscu implantacji jaja płodowego u kobiet z ciążą pozamaciczną, poronieniem samoistnym i nieciężarnych z endometrium sekrecyjnym.

Z uwagi na stwierdzone różnice w liczebności komórek Treg i cytotoksycznych w miejscu implantacji zarodka w jajowodzie pomiędzy grupami pacjentek z pękniętą i niepękniętą ciążą pozamaciczną, dokonano porównania tych parametrów w grupach kobiet z poronieniem samoistnym (AB), nieciężarnych z endometrium sekrecyjnym (E), osobno z grupą kobiet z pękniętą (P) ciążą pozamaciczną i niepękniętą ciążą pozamaciczną (NP).

Grupy pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną, nieciężarne z endometrium sekrecyjnym i z poronieniem samoistnym nie różniły się w sposób istotny pod względem mediany odsetka limfocytów T CD4⁺ oraz średniej odsetka limfocytów T regulatorowych Foxp3⁺ (Tabela 9). Największy średni odsetek komórek CD4⁺CD25⁺ stwierdzono w grupie poronienia spontanicznego i był on istotnie wyższy w porównaniu z grupą kobiet z niepękniętą ciążą pozamaciczną (Rycina 19). Endometrium sekrecyjne kobiet nieciężarnych nie różniło się liczebnością komórek CD4⁺CD25⁺ między porównywanymi wyżej grupami (Tabela 9).



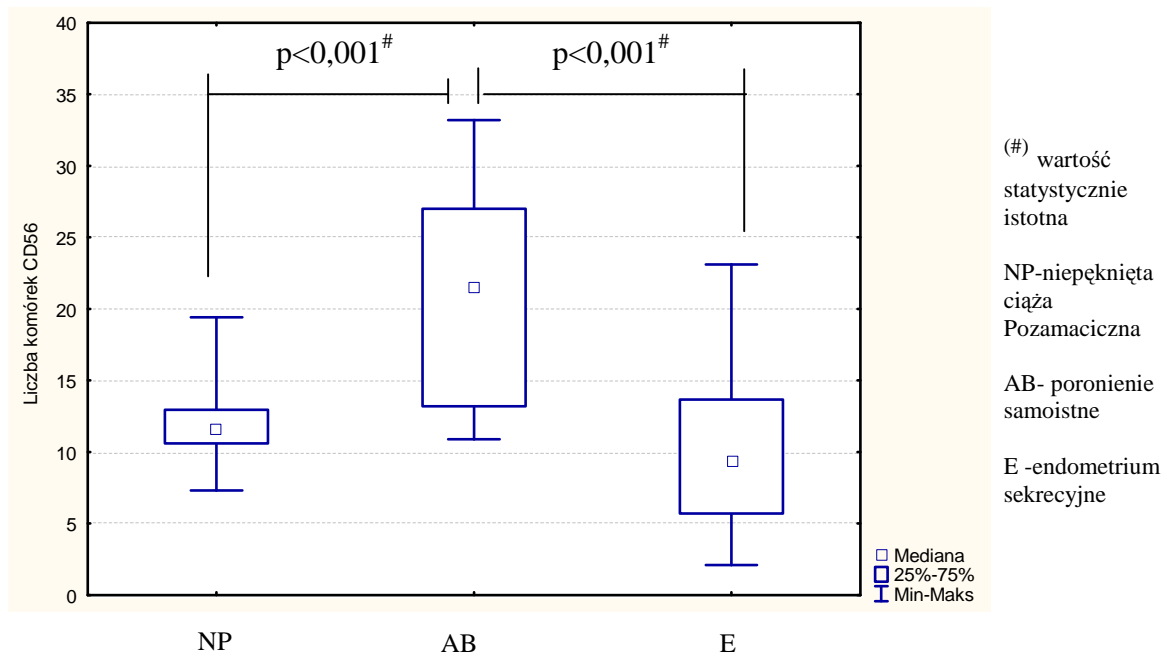
Rycina 19. Średnia odsetka komórek CD4+CD25+ w miejscu implantacji zarodka w niepękniętej ciąży jajowodowej (NP), w doczesnej w poronieniu samoistnym (AB) i endometrium sekrecyjnym kobiet nieciążarnych (E)

Tabela 9. Ocena liczebności badanych komórek w grupach pacjentek z niepękniętą ciążą jajowodową (NP) w miejscu implantacji, w wyskrobinach z jamy macicy w poronieniu samoistnym (AB) oraz w endometrium sekrecyjnym (E).

	Grupy pacjentek			Wartość p
	NP	AB	E	
Średni odsetek komórek Foxp3⁺ (±SD [#])	40,07±11,0	42,4±22,0	45,0±9,0	NS
Średnia odsetka komórek CD4⁺CD25⁺ (±SD [#])	2,0±2,7	4,25±6,3	2,6±7,4	0,024*
Mediana odsetka komórek CD4⁺ (±IQR ^{##})	16,1±53,7	45,9±15,6	40,0±32,6	NS
Mediana liczby komórek CD56⁺ (±IQR ^{##})	11,6±2,3	21,5±13,8	9,3±7,9	0,001*
Mediana liczby komórek CD57⁺ (±IQR ^{##})	2,23±1,55	3,0±2,6	2,69±2,1	NS
Mediana odsetka komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ (±IQR ^{##})	4,55±1,4	8,0±5,3	4,0±2,2	0,001*
Średni odsetek komórek CD8⁺ (±SD [#])	40,8±15,0	34,9±8,6	36,3±8,8	NS

wartość statystycznie istotna; [#] odchylenie standardowe; ^{##} rozstęp międzykwartylowy

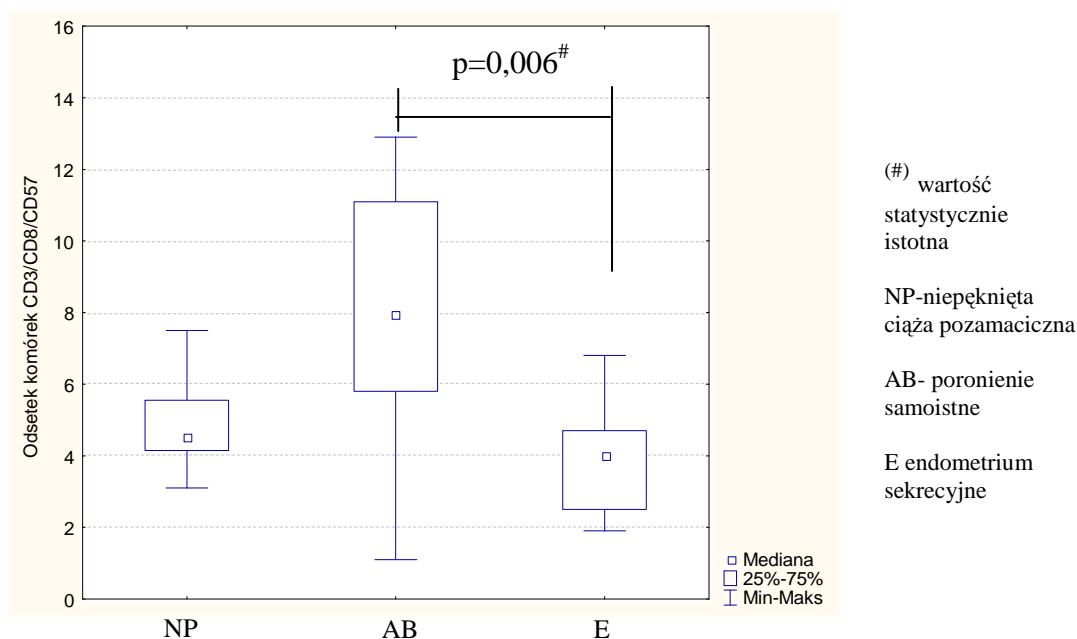
W dalszej kolejności badane grupy porównano pod względem populacji komórek cytotoksycznych. Grupa kobiet z poronieniem samoistnym (AB) charakteryzowała się największą medianą liczby komórek CD56⁺, która malała odpowiednio w grupie kobiet z niepękniętą ciążą pozamaciczną (NP) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E). Liczebność populacji komórek CD56⁺ u pacjentek z poronieniem samoistnym istotnie statystycznie różniła się w porównaniu do pacjentek nieciążarnych, u których wykonano biopsję endometrium i pacjentek z niepękniętą ciążą pozamaciczną. Nie wykazano różnic w nacieku komórkowym CD56⁺ między grupą NP i E (Rycina 20).



Rycina 20. Mediana liczby komórek CD56⁺ w niepękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (NP) , poronieniu samoistnym (AB) i endometrium sekrecyjnym (E)

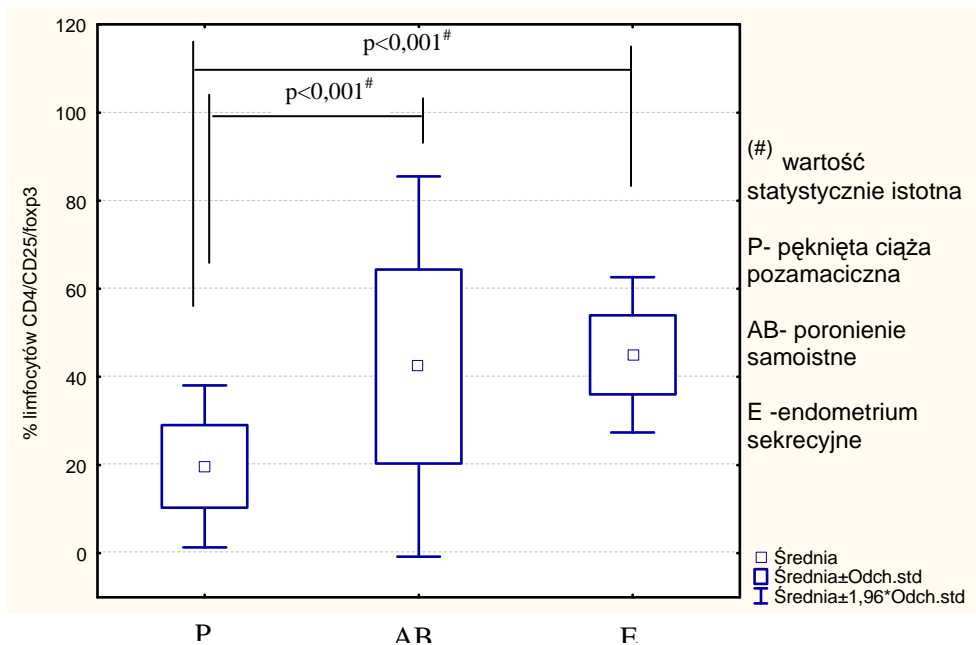
Średnia liczebność populacji komórek CD57⁺ we wszystkich trzech grupach nie różniła się istotnie. Podobnie nie wykazano różnic między powyższymi grupami dla populacji limfocytów T CD8⁺.

Najwyższa mediana liczebności komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ charakteryzowała grupę kobiet z poronieniem samoistnym (AB) i była nieznacznie wyższa w porównaniu do grupy kobiet z niepękniętą ciążą pozamaciczną (NP). W stosunku do grupy kobiet nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E), grupa AB wykazywała również istotne różnice pod względem nacieku komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ (Rycina 21).



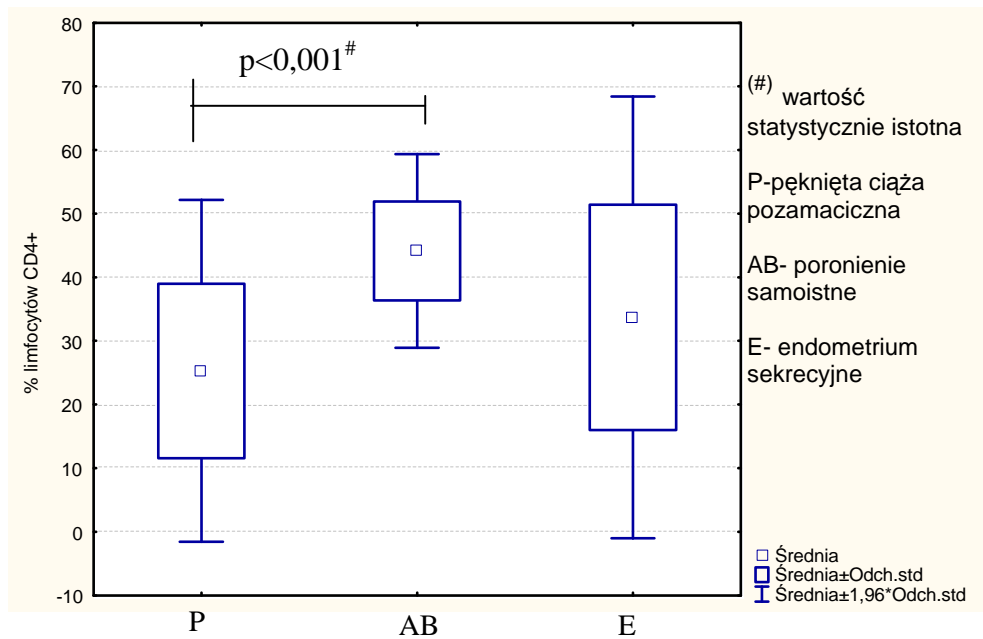
Rycina 21. Mediana liczby komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ w miejscu implantacji zarodka w niepękniętej ciąży jajowodowej (NP), poronieniu samoistnym (AB) i u nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E)

Pod względem nacieku limfocytów regulatorowych (Treg) wykazano różnice pomiędzy grupami, tj. grupą kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną (P), poronieniem samoistnym (AB) i grupą nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E). Największy średni odsetek komórek Treg charakteryzował grupę pacjentek nieciążarnych, u których wykonano biopsję endometrium, a najniższy grupę pacjentek z pękniętą ciążą pozamaciczną. Naciek limfocytów Treg u pacjentek z ciążą jajowodową pękniętą był również istotnie niższy w porównaniu do grupy pacjentek z poronieniem samoistnym (Rycina 22).



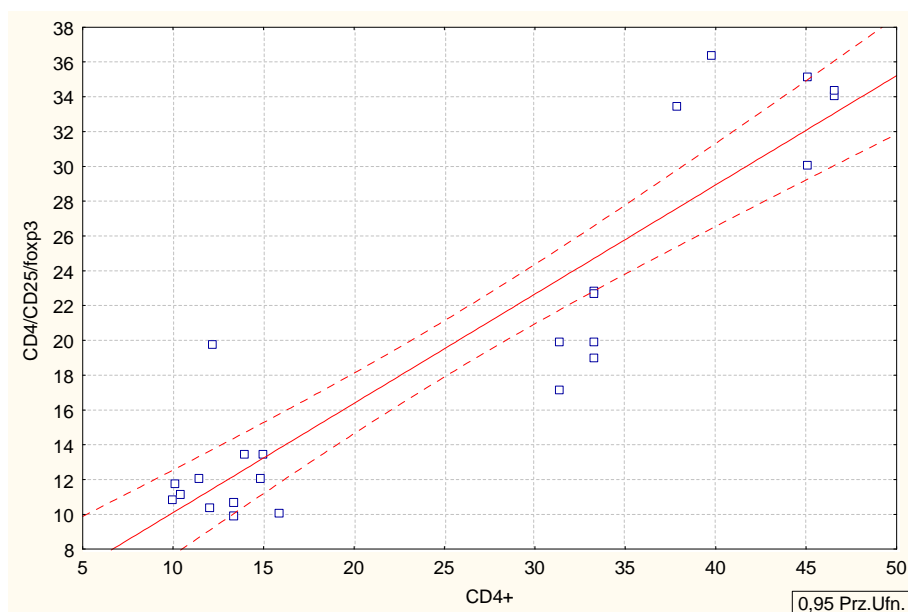
Rycina 22. Średni odsetek limfocytów Treg w grupie z pękniętą ciążą pozamaciczną w miejscu implantacji jaja płodowego (P), poronieniu samoistnym (AB) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E).

Średnia liczebności populacji T CD4⁺ również wykazywała różnice między grupą z pękniętą ciążą pozamaciczną (P) a poronieniem samoistnym (AB). Druga z wyżej wymienionych grup charakteryzowała się większym naciekiem komórkowym w porównaniu do grupy z pękniętym jajowodem. Grupa kobiet nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym nie różniła się w sposób istotny pod względem populacji T CD4⁺ w stosunku do pozostałych grup (Rycina 23).



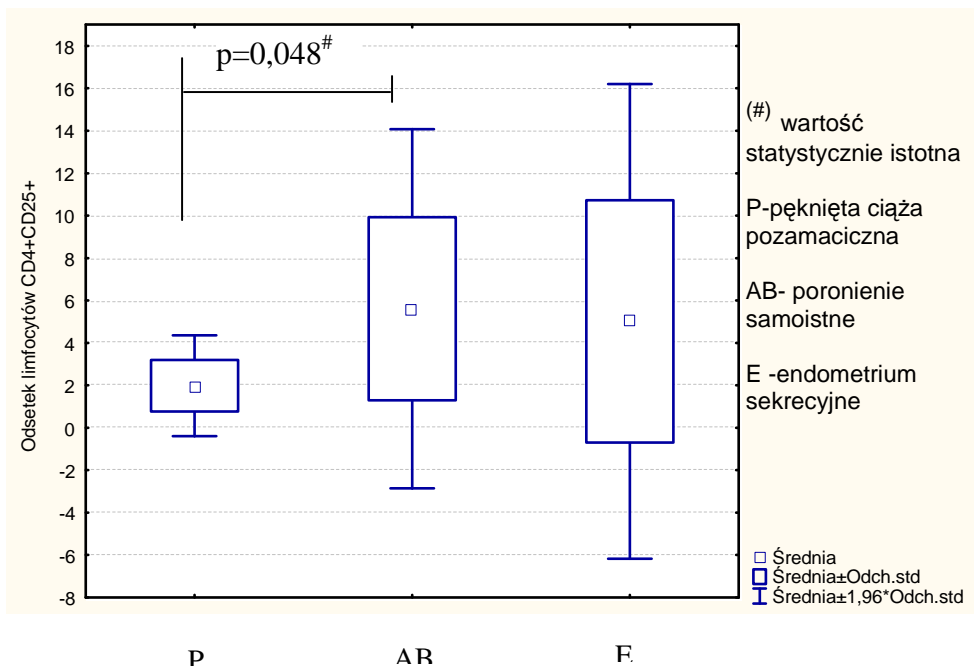
Rycina 23. Średnia odsetka limfocytów T CD4⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P), poronieniu samoistnym (AB) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E)

Z uwagi na stwierdzone różnice w nacieku komórek T CD4⁺ między badanymi grupami zbadano ich potencjalny wpływ na liczebność komórek Treg. Jedynie dla grupy pacjentek z pękniętym jajowodem wykazano średnio istotnie dodatnią korelację między komórkami Foxp3⁺ a CD4⁺ ($r=0,846$; $p<0,001$) (Rycina 24).



Rycina 24. Dodatnia korelacja komórek CD4⁺ z limfocytami Treg w pękniętej ciąży pozamacicznej (współczynnik korelacji [r] wynosi 0.430; $p<0,001$; --- 95% przedział ufności).

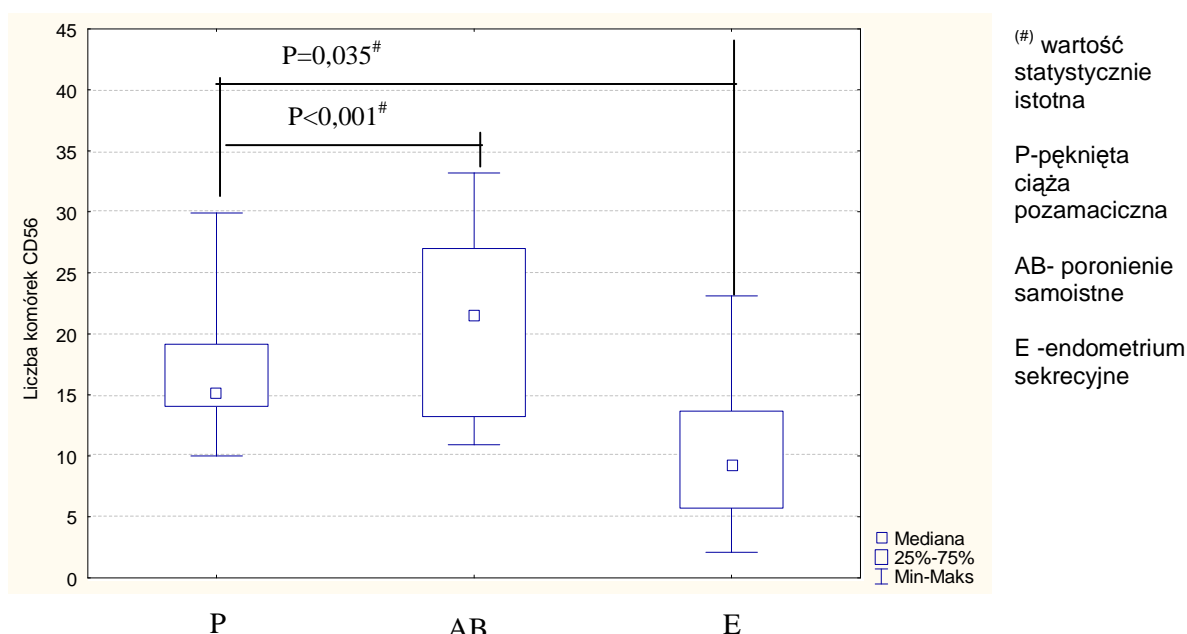
W badanych grupach kobiet ciężarnych z pękniętym jajowodem (P) i poronieniem samoistnym (AB) wykazano różnicę w zakresie komórek CD4⁺CD25⁺. Średnia komórek CD4⁺CD25⁺ była największa u pacjentek z poronieniem samoistnym (Rycina 25). Grupa pacjentek nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym nie różniła się pod względem nacieku komórek CD4⁺CD25⁺ od grupy z pękniętą ciążą pozamaciczną (P), jak również od grupy z poronieniem samoistnym (AB) (Tabela 10).



Rycina 25. Średnia odsetka limfocytów T CD4⁺CD25⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P), poronieniu samoistnym (AB) i endometrium sekrecyjnym (E)

W następnej kolejności badane grupy z poronieniem samoistnym (AB) i nieciążarne z endometrium sekrecyjnym (E) porównano z grupą kobiet ciężarnych z pękniętym jajowodem (P) pod względem populacji komórek cytotoksycznych. Grupa pacjentek z poronieniem samoistnym charakteryzowała się największą medianą liczby komórek CD56⁺ (Tabela 10), która malała odpowiednio w grupie pacjentek nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym i pacjentek z pękniętą ciążą jajowodową. Liczebność populacji komórek CD56⁺ w doczesnej z poronienia samoistnego (AB) wykazywała istotne różnice w porównaniu do ich

liczebności w miejscu implantacji zarodka w pękniętym jajowodzie (P) oraz do endometrium sekrecyjnego(E) (Rycina 26)



Rycina 26 Mediana liczby komórek CD56+ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P) , poronieniu samoistnym (AB) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E)

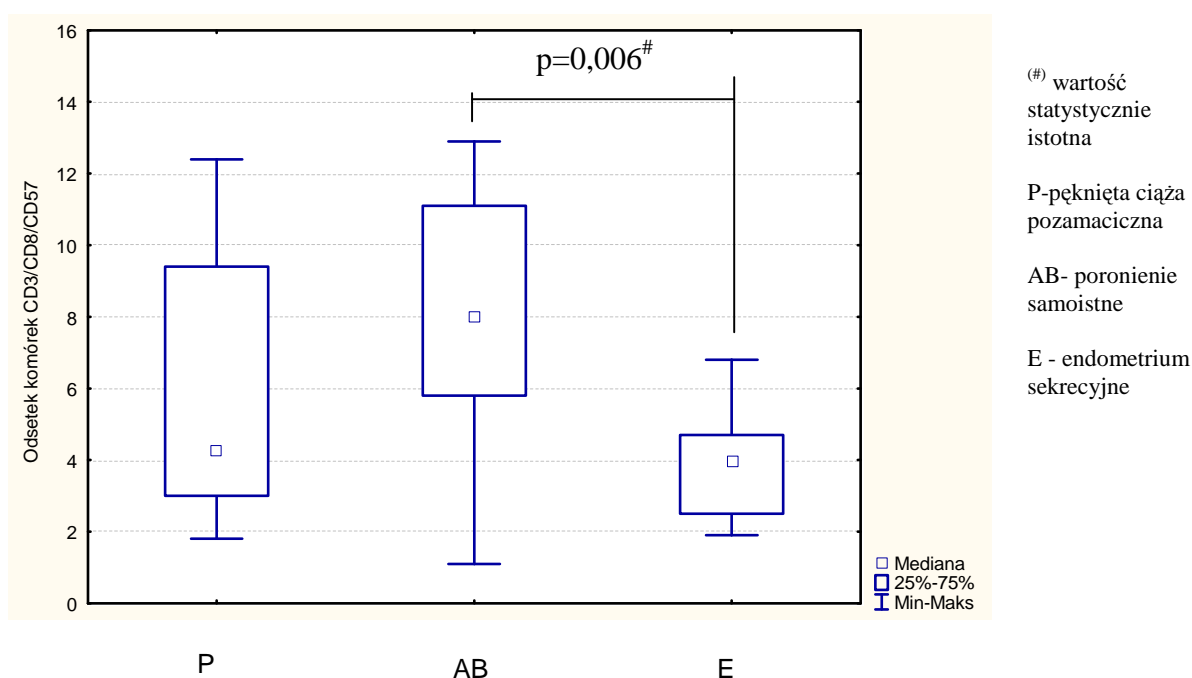
Tabela 10. Ocena liczebności badanych komórek w grupach pacjentek z pękniętą ciążą jajowodową w miejscu implantacji (P), w doczesnej w poronieniu samoistnym (AB) oraz u nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E).

	Grupy pacjentek			Wartość p
	P	AB	E	
Średni odsetek komórek Foxp3 ⁺ (±SD [#])	19,6±9,3	42,3±22,0	45,0±9,0	0,001*
Średnia odsetka komórek CD4 ⁺ CD25 ⁺ (±SD [#])	1,6±1,6	4,2±6,3	2,6±7,4	0,048*
Średnia odsetka komórek CD4 ⁺ (±SD [#])	23,5±22,8	45,9±15,6	40,0±32,6	0,001*
Mediana liczby komórek CD56 ⁺ (±IQR ^{##})	16,9±4,9	20,9±6,9	10,0±5,8	0,001*
Mediana liczby komórek CD57 ⁺ (±IQR ^{##})	4,8±4,5	3,0±2,6	2,7±2,1	NS
Mediana odsetka komórek CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ (±IQR ^{##})	4,2±6,4	8,0±5,3	4,0±2,2	0,009*
Średni odsetek komórek CD8 ⁺ (±SD [#])	39,8±9,7	34,9±8,6	36,3±8,8	NS

* wartość statystycznie istotna; # odchylenie standardowe; ## rozstęp międzykwartyłowy

Liczebność populacji komórek CD57⁺ i T CD8⁺ w analizowanych grupach, nie wykazywała istotnych różnic (Tabela 10).

Mediana odsetka komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ była największa w doczesnej w poronieniu samoistnym (AB) i malała odpowiednio w grupie kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną (P) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym(E). Istotne różnice stwierdzono między grupą pacjentek z poronieniem samoistnym (AB) i pacjentek nieciążarnych (E). Miejsce implantacji zarodka w pękniętej ciąży pozamacicznej (P) nie różniło się medianą liczebności komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ od doczesnej w poronieniu samoistnym (AB) i endometrium sekrecyjnym (E) (Rycina 27).



Rycina 27. Mediana odsetka komórek CD3⁺CD8⁺CD57⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P) , doczesnej z poronienia samoistnego (AB) i endometrium sekrecyjnym (E).

5. DYSKUSJA

W przeprowadzonym badaniu rozpatrywano osobno grupy pacjentek z niepękniętą i pękniętą ciążą jajowodową z uwagi na stwierdzone różnice w danych klinicznych, m.in. dotyczące długości trwania ciąży, co może wskazywać na to, że pacjentki z dłuższym okresem od daty ostatniej miesiączki należą do grupy o wyższym ryzyku perforacji jajowodu w miejscu zlokalizowanej ciąży pozamacicznej. Te obserwacje są zgodne z naszymi poprzednimi doniesieniami [113,137] oraz wynikami innych autorów [26,47,48]. Stwierdzono również, że do perforacji ściany jajowodu dochodzi częściej przy średnicy zmiany przekraczającej 35mm. Zaobserwowana prawidłowość zależności perforacji od wielkości zmiany i czasu trwania ciąży może wynikać z faktu, że ectopowo rozwijająca się ciąża powiększa się w miarę czasu jej trwania, a jej rozwój jest ograniczony przez mniej podatne na rozciągnięcie tkanki ściany jajowodu. Jednak w świetle obecnych doniesień etiologia perforacji ściany jajowodu wydaje się być jednak bardziej złożona. Rozwojowi ciąży pozamacicznej i związanych z tym komplikacji, podobnie jak w trakcie porodu lub poronienia, towarzyszą zmiany w układzie odpornościowym ciężarnej, związane ze wzmożoną aktywnością układu immunologicznego. W obecnym i w poprzednich badaniach [137] liczba komórek regulatorowych i cytotoksycznych układu immunologicznego nie korelowała z wielkością zmiany, co wymaga dalszych badań biorąc pod uwagę wyniki retrospektywnej analizy [156], w której wykazano, że częstość perforacji jajowodu rośnie z wielkością ciąży. Rozbieżności w wynikach mogą wskazywać na bardziej złożony mechanizm aktywacji komórek układu immunologicznego podczas destrukcji ściany jajowodu, niż tylko napływ komórek NK i spadek liczby komórek Treg do jajowodu. Mechanizmy molekularne, które warunkują interakcję komórek układu immunologicznego, komórek trofoblastu i komórek endometrium funkcjonują sprawnie podczas rozwoju ciąży

wewnątrzmacicznej. Pozwala to w większości przypadków uniknąć klinicznych konsekwencji masywnych molekularnych zmian towarzyszących poronieniu lub porodowi. Natomiast w błonie śluzowej jajowodu podczas jego perforacji obserwuje się zaburzenie funkcjonowania tych mechanizmów.

W pracy została wykazana istotna różnica w liczbie ciąż i porodów między pacjentkami, u których doszło do perforacji jajowodu, a tymi, u których ściana jajowodu była niezmienną. Wyniki mogą sugerować, że przebyte już ciążę i związane z nimi zmiany molekularne, które warunkowały powstanie tolerancji immunologicznej we wcześniejszych ciążach, powodują spowolnienie reakcji rekrutowanych do jajowodu komórek cytotoksycznych. Może to być powodem opóźnienia wystąpienia objawów klinicznych, będących następstwem zgromadzenia większej liczby komórek cytotoksycznych w ścianie jajowodu. Ostatecznie reakcja napływających komórek cytotoksycznych doprowadza do perforacji ściany jajowodu, co zostało częściowo potwierdzone istnieniem dodatniej korelacji między liczbą ciąż a naciekiem komórek CD8⁺.

W dotychczasowych badaniach wykazano, że wiele mechanizmów jest zaangażowanych w rozwój immunologicznej tolerancji matki w stosunku do allogenicznego płodu w czasie ciąży, a jej utrzymanie jest przynajmniej częściowo możliwe dzięki komórkom regulatorowym Treg, których główną funkcją jest zapobieganie odpowiedzi autoimmunologicznej oraz tolerancji allogenicznego przeszczepu [79,157]. Wiele charakterystycznych właściwości komórek Treg sprawia, że stanowią one główną składową w wytworzeniu i utrzymaniu stanu tolerancji w stosunku do alloantygenów płodu, niezbędnych dla prawidłowego rozwoju ciąży. Wśród swoistych cech można wymienić zdolność tzw. „połączonej supresji” (linked suppression), w której tolerancja w odniesieniu do pokrewnych antygenów tej samej tkanki rozwija się w mechanizmie antygenowo niezależnym, oraz „tolerancję infekcyjną” (infectious tolerance), gdzie przy stałej stymulacji

antygenowej komórki Treg zdolne są do konwersji naiwnych komórek CD4⁺ w komórki regulatorowe [158]. W odniesieniu do ciąży zaobserwowano, że liczba komórek Treg wzrasta wcześniej po zapłodnieniu, osiąga maksymalne wartości w drugim trymestrze, zmniejszając się do porodu [93]. Limfocyty Treg hamują odpowiedź proliferacyjną autologicznych komórek T CD4⁺CD25⁻ w stosunku do allogenicznych komórek DC, przez co umożliwiają rozwój zarodka [93,152]. Funkcje supresorowe komórek Treg wywierane są zarówno przez kontakt bezpośredni (cell-cell contact) z komórką efektorową [159], jak i pośrednio przez sekrecję cytokin o funkcjach hamujących jak IL-10 lub TGF-β [160-162]. Ekspresja antygeny powierzchniowego CD25 nie jest swoista dla komórek regulatorowych Treg. Komórki efektorowe również wykazują ekspresję CD25 [163]. Dodatkowe markery aktywacji jak HLA-DR, CD69 oraz CTLA-4 i Foxp3⁺ umożliwiają różnicowanie pomiędzy komórkami efektorowymi a regulatorowymi. Ostatni z wymienionych -czynnik transkrypcyjny Foxp3⁺ w badaniach na modelach mysich charakteryzował wyłącznie komórki CD4⁺Treg i był odpowiedzialny za ich różnicowanie i funkcje regulatorowe [88,89].

W przeprowadzonym badaniu wykazano obecność komórek Foxp3⁺ zarówno w miejscu implantacji jaja płodowego w jajowodzie, jak i w doczesnowo zmienionej błonie śluzowej macicy. Co więcej w ciąży pozamacicznej, podobnie jak w ciąży prawidłowej, ich liczebność ulega zmianie zależnie od czasu trwania ciąży. Istotnym zatem pozostaje pytanie czy regulacja komórek Treg w ciąży pozamacicznej jest zależna od tych samych czynników, co w ciąży eutopowej. Mimo przeprowadzonych dotąd badań dotyczących komórek Treg w ciąży, mechanizmy odpowiedzialne za ich rozwój, ekspansję i migrację nie zostały do końca wyjaśnione. Wydaje się możliwym, że zarówno rekrutacja obwodowych komórek Treg, jak i miejscowa proliferacja komórek regulatorowych mogą przyczyniać się do zwiększenia ich populacji w obrębie granicy styku maczyno-płodowego. We wczesnej ciąży miejsce o odległej lokalizacji w stosunku do macicy może być źródłem

wyrzutu obwodowych komórek Treg u myszy [90] i u człowieka [93]. Aluvihare i wsp. [90] sugerowali, że wzrost liczebności komórek Treg jest allo-antygenowo nieswoisty, ponieważ według ich obserwacji ekspansja komórek Treg miała miejsce zarówno u syngenicznych, jak i allogenicznych mysich krzyżówek. Dlatego zaproponowano **możliwość udziału hormonów** w kontroli populacji komórek regulatorowych. Zaobserwowano, że estrogeny nie tylko wpływają na ekspansję komórek Foxp3⁺, lecz również pobudzają konwersję komórek T CD4⁺CD25⁻ do CD4⁺CD25⁺[165]. Co więcej, estrogeny zwiększają ekspresję genu Foxp3 zarówno w warunkach in vitro, jak i in vivo, a terapia estrogenowa zwiększa liczbę i moduluje funkcje komórek CD4⁺CD25⁺ [166,167]. W przeciwieństwie do tego Zhao i wsp. wykazali, że ani estrogeny ani progesteron osobno lub łącznie nie wpłynęły na liczebność komórek Treg u myszy po usunięciu jajników. Zaobserwowali również wyższy odsetek komórek Treg w allogenicznie, w porównaniu do syngenicznie, skrzyżowanych myszy, sugerując udział antygenów ojcowskich w ekspansji komórek Treg [100]. Teoria ta została potwierdzona w ostatnich doniesieniach Robertson i wsp., którzy dowiedli, że składniki nasienia pobudzają ekspansję komórek Treg [168]. Mechanizm ten odgrywa dużą rolę dla semiallogenicznego płodu, umożliwiając ochronę przed atakiem immunokompetentnych komórek matki. Moment generacji komórek Treg w ciąży nie został dokładnie określony. U myszy ekspansja populacji komórek Treg została wykryta w węzłach chłonnych drenujących obszar narządu rodno już w drugim dniu po zapłodnieniu [169]. Co więcej dowiedziono, że komórki CD4⁺CD25⁺ preferencyjnie migrują z krwi obwodowej w obręb doczesnej w trakcie ciąży [170]. Wśród czynników odpowiedzialnych za aktywną migrację komórek Treg mogą być chemokiny oraz czynniki hormonalne. Zaobserwowano, że komórki Treg wykazują ekspresję L-selektyny, powierzchniowego antygeny limfocytarnego (CLA-cutaneous lymphocyte antigen) i receptory chemokinowe CCR4 i CCR8 [171-173]. Podobnie ekspresja

L-selektyny na obwodowych komórkach NKCD56, obecnych również w miejscu implantacji ciąży pozamacicznej, ulega zwiększeniu w fazie pre-owulacyjnej i spełnia ważne funkcje w ich migracji do macicy w ciąży prawidłowej [174]. Ten sam mechanizm, podobnie dla komórek CD56⁺, może być zatem odpowiedzialny za migrację komórek Treg w obręb miejsca implantacji zarodka. Kolejnym czynnikiem mogącym odpowiadać za migrację komórek Treg do miejsca implantacji jest gonadotropina kosmówkowa CG. Posiada ona funkcje immunoregulacyjne, m.in. przez hamowanie stymulowanej mitogenem odpowiedzi limfocytów T [175] i B [176] oraz przez indukcję komórek supresorowych [177]. Schumacher i wsp. potwierdzili obecność receptorów LH/CG na powierzchni komórek Treg, przez które HCG wywiera swoje funkcje chemotaktyczne. Co więcej wykazali, że komórki trofoblastu przez wytwarzanie HCG efektywniej przyciągają komórki Treg w przeciwieństwie do nieprodukujących HCG keratynocytów [141]. W badaniu Schumacher i wsp. doczesna w ciąży prawidłowej zawierała więcej komórek regulatorowych, co korelowało z wysokimi wartościami HCG, w przeciwieństwie do poronienia spontanicznego czy doczesnej w ciąży pozamacicznej [141]. **W obecnym badaniu również wykazano korelację, jakkolwiek ujemną, między komórkami Treg a poziomem HCG w ciąży pozamacicznej.** Rozbieżności w wynikach badań Schumacher i wsp. [141] a obecnym mogą być, przynajmniej częściowo, tłumaczone faktem, iż w obecnej pracy wpływ HCG oceniano w odniesieniu do miejsca implantacji jaja płodowego w jajowodzie, a nie doczesnowo zmienionej błonie śluzowej macicy, gdzie w ciąży pozamacicznej brak jest wytwarzających HCG struktur trofoblastu. Dodatkowo w badaniu Schumacher i wsp. wiek ciążowy w poronieniu spontanicznym i ciąży pozamacicznej był cztery tygodnie niższy w porównaniu do materiału tkankowego ocenianego w powyższej pracy. Gonadotropina kosmówkowa promuje różnicowanie komórek trofoblastu [178] i ich inwazję przez zwiększenie ekspresji czynnika LIF (Leukemia inhibitory factor) [179] oraz ma bezpośredni wpływ na proces

przemiany doczesnej błony śluzowej macicy [180,181]. Jakkolwiek w ciąży pozamacicznej mikrośrodowisko komórkowe w otoczeniu trofoblastu pozakosmkowego różni się od tego w jamie macicy z powodu braku obecności doczesnej, która odgrywa rolę w hamowaniu jego inwazji poza granicę doczesnej podstawnej. Podczas inwazji trofoblastu w obręb ściany jajowodu obserwuje się spadek apoptozy komórek trofoblastu w porównaniu do inwazyjnego trofoblastu w jamie macicy. Z kolei zwiększona inwazyjność trofoblastu jest identyfikowana jako główny czynnik wpływający na proces perforacji ściany jajowodu [122]. Przy założeniu, że w ścianie jajowodu implantuje się prawidłowy zarodek, różnica w inwazyjności trofoblastu pozakosmkowego może wynikać z wpływu lub jego braku otaczającego środowiska - doczesnej. Liczba i skład komórkowy w błonie śluzowej jajowodu w trakcie implantacji różni się od tego w obrębie doczesnej [61,125]. W tej ostatniej przeważającą populację stanowią komórki dNK, podczas gdy w ścianie jajowodu zaobserwowano głównie komórki CD3⁺ i makrofagi Vasiliadou i wsp. nie wykazali obecności doczesnowych dNK w obrębie ściany jajowodu, a jedynie klasyczne NK [125].

W przeciwieństwie do tego Wicherek i wsp. stwierdzili obecność komórek CD56⁺ w miejscu implantacji zarodka, których liczba była jednak zależna od etapu rozwoju ciąży pozamacicznej i zwiększała się z w kolejnych etapach pęknięcia ściany jajowodu. [137].

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że stężenie gonadotropiny kosmówkowej ma wpływ na liczbę komórek CD56⁺, ale dopiero po pęknięciu ściany jajowodu, kiedy ich naciek był istotnie wyższy w porównaniu do grupy z niepękniętą ciążą jajowodową. Co więcej, zaobserwowano, że **wraz ze wzrostem ciąży pozamacicznej i zagrażającym pęknięciem ściany jajowodu zmienia się skład komórkowy w miejscu implantacji jaja płodowego, tj. ubywa komórek regulatorowych kosztem rosnącej liczby komórek cytotoksycznych-CD56⁺, CD57⁺ i CD8⁺**. Ta obserwacja jest zgodna z wcześniejszymi badaniami [113,137],

w których również stwierdzono, że pękaniu ściany jajowodu towarzyszy zwiększenie napływu komórek CD3⁺ i CD56⁺ wraz ze wzrostem immunoreaktywności antygenu CD69. Proll i wsp. zauważyli zwiększoną liczbę komórek CD8⁺ w ciąży pozamaciczej w porównaniu do ciąży prawidłowej [182]. Z drugiej strony Kemp i wsp. stwierdzili, że naciek komórek CD8⁺ jest 8 razy większy w jajowodowej ciąży obumarłej (TA-tubal abortion) w porównaniu do żywej ciąży jajowodowej (VTP- viable tubal pregnancy) [183], co może świadczyć o ich możliwym wpływie na przebieg ciąży jajowodowej przez indukcję apoptozy. Duży odsetek obumarłych ciąż jajowodowych z ogólnej liczby ciąż pozamaciczych jest szacowany na około 2/3 przypadków i może być również przyczyną stwierdzonego wzrostu liczby CD8⁺ w tym badaniu [183]. W obecnym badaniu nie różnicowano grup pacjentek w zależności od obecności akcji serca płodu z uwagi na fakt, że wiele pacjentek z ciążą pozamaciczną bez ASP jest obecnie kwalifikowanych do leczenia zachowawczego metotreksatem.

Obserwowane w obecnej pracy zmiany w nacieku komórek cytotoksycznych i regulatorowych dowodzą o ich czynnościowym związku, jednak zależność między komórkami cytotoksycznymi a regulatorowymi jest złożona i niemożliwym jest sprowadzenie jej do jednej, wzajemnej interakcji. Częściowo można wyjaśnić ją m.in.

w oparciu o badania dotyczące immunoregulacji w nowotworach, w których wykazano, że limfocyty Treg bezpośrednio hamują zależne od receptora NKG2D funkcje cytotoksyczne komórek NK zarówno w warunkach in vitro [184, 185], jak i in vivo [186]. Co więcej, komórki Treg hamują również aktywność komórek NK przez TGF- β , lecz nie zmniejszają produkowanego przez nie IFN- γ . Ostatnia z wymienionych cytokin- IFN- γ - niezbędna jest z kolei do prawidłowego działania supresorowego komórek Treg przez zwiększenie ekspresji enzymuIDO (indoleamino-2,3-dioxygenase). ŹródłemIDO są głównie komórki DC, makrofagi, komórki trofoblastu kosmkowego i pozakosmkowego (EVT; extravillous

trophoblast) [187-189]. Dzięki zwiększonej zawartości enzymuIDO na granicy maczyno-płodowej mikrośrodowisko pozbawione zostaje tryptofanu, co zapobiega nadmiernej aktywacji komórek T i NK [187,190-192].

W ostatnich badaniach Garin i wsp. po przeprowadzeniu analizy transkryptomowej i proteomowej aktywowanych komórek Treg zauważyli, że galektyna-1 (galectin-1) ulegała w nich selektywnej „up-regulacji” [192]. Galektyna-1 jest 14kDa molekułą powierzchniową wiążącą fragmenty węglowodanowe w CD45, CD43, CD2, CD3, a blokada jej wiązania w obrębie komórek Treg zmniejsza ich właściwości supresorowe zarówno u myszy, jak i u człowieka [193]. Interesujący jest jednak fakt, że komórki dNK produkują duże ilości galektyny-1, która regulowana jest za pośrednictwem hormonów płciowych [194]. Stąd galektyna-1 na powierzchni komórek Treg CD4⁺CD25⁺ i doczesnowych dNK może być jednym z czynników świadczących o wzajemnej kooperacji tych komórek w zjawisku immunoregulacji na granicy maczyno-płodowej.

W innych badaniach wykazano, że zwiększona liczba i aktywność komórek Treg jest odpowiedzialna za zmniejszoną aktywność komórek NK w wielu stanach patologicznych [185,186]. Z drugiej strony dowiedziono, na przykładzie modelu infekcji patogenami wewnątrzkomórkowymi, że komórki NK mogą pełnić funkcje modulujące w odniesieniu do komórek Treg, ponieważ aktywowane komórki NK zdolne są do hamowania ich ekspansji na drodze bezpośredniej lizy przez aktywujące receptory NKG2D i NKp46 [195].

W przeprowadzonym badaniu porównano materiał pochodzący z endometrium i miejsca implantacji jaja płodowego ciąży pozamacicznej pochodzących od tych samych pacjentek. Zaobserwowano, że **pęknięciu ściany jajowodu towarzyszy zwiększenie nacieku komórek cytotoksycznych, CD56⁺, CD8⁺ przy równoczesnym zmniejszeniu ich liczby w błonie śluzowej jamy macicy**, co jest zgodne z wynikami poprzednich badań [113,137] i może sugerować, że koncentracja odpowiedzi immunologicznej w jajowodzie związana jest

z pęknięciem jego ściany. **Jakkolwiek zjawisku temu nie towarzyszył kompensacyjny wzrost liczby komórek regulatorowych Foxp3+ w obrębie miejsca implantacji w jajowodzie, który był istotnie niższy od tego obserwowanego w jamie macicy.** Spadek liczby komórek hamujących Foxp3⁺, prawdopodobnie jako efekt zaburzenia mechanizmów kompensacyjnych w jajowodzie (które zachowane są w obrębie doczesnej), może w rezultacie być czynnikiem kluczowym prowadzącym do perforacji jego ściany. Nie można jednak wykluczyć faktu, że obserwowany w badaniu spadek nacieku komórek regulatorowych nie jest przyczyną, lecz raczej następstwem destrukcji ściany jajowodu lub wynikiem zahamowania wzrostu ciąży pozamaciczej.

Podobne jak w przypadku komórek Treg zmiany zaobserwowano dla innych czynników regulatorowych m.in. białka RCAS1, MT i rozpuszczalnej izoformy antygenu HLA-G. We wszystkich przypadkach rozwijającej się ciąży pozamaciczej towarzyszył przejściowy wzrost immunoreaktywności RCAS1 i MT w jajowodzie oraz stężenia rozpuszczalnej izoformy antygenu HLA-G we krwi obwodowej, po którym, wraz z uszkodzeniem ściany jajowodu, dochodziło do spadku ich wartości [137]. W dotychczasowych badaniach wykazano, że sHLA-G przyczynia się do utrzymania stanu tolerancji m.in. przez

a) hamowanie litycznej aktywności komórek NK i wytwarzania przez nie IFN- γ ,
b) bezpośrednie hamowanie odpowiedzi limfocytów T w stosunku do alloantygenów,
c) wzrost stężenia IL-10, d) ekspansję komórek CD4⁺CD25⁺Treg [196]. Dlatego spadek stężenia tej molekuly w czasie pęknięcia ściany jajowodu może być związany z obserwowanymi w tym badaniu zmianami nacieku komórek immunokompetentnych w miejscu implantacji ciąży pozamaciczej- tj. wzrostem aktywności komórek cytotoksycznych i spadkiem nacieku komórek regulatorowych.

Można zatem wnioskować, na podstawie obecnej analizy i poprzednich badań przeprowadzonych w Klinice Ginekologii i Onkologii UJCM, że oprócz inwazji trofoblastu

za pęknięcie ściany jajowodu mogą być odpowiedzialne zarówno zwiększony napływ cytotoksycznych komórek układu immunologicznego matki, jak i osłabienie immunomodulujących właściwości błony śluzowej jajowodu [113,137,197].

Infiltracja komórek układu immunologicznego w obrębie endometrium, będących pod kontrolą komórek regulatorowych jak Foxp3⁺ i komórek doczesnej [73,137,155], rozpoczyna się już w późnej fazie proliferacyjnej i trwa do wczesnej fazy sekrecyjnej [198], gdy komórka jajowa transportowana jest w obrębie jajowodu. Wicherek i wsp. zaobserwowali, że implantacji jaja płodowego w jajowodzie towarzyszy napływ komórek immunokompetentnych w jego obręb [197]. Jednak odsetek komórek CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ w endometrium eutopowym nie wykazuje tak znaczących zmian jak to ma miejsce w doczesnej w ciąży prawidłowej. Naciek komórek Treg w doczesnowo zmienionej błonie śluzowej w ciąży jajowodowej był niższy w porównaniu do obserwowanego w doczesnej poronienia spontanicznego [109]. Odsetek komórek Treg w doczesnej w poronieniu spontanicznym był z kolei niższy od obserwowanego w doczesnej w ciąży prawidłowej [152] i porównywalny do nacieku w endometrium wczesnej fazy sekrecyjnej [109]. W obecnym badaniu, z uwagi na stwierdzoną koncentrację odpowiedzi immunologicznej w miejscu implantacji jaja płodowego w jajowodzie, porównano populacje badanych komórek z tej lokalizacji z tymi w endometrium i poronieniu spontanicznym. Wykazano, że **poronieniu samoistnemu towarzyszy największa liczebność komórek cytotoksycznych w porównaniu do pozostałych grup. Natomiast pod względem komórek regulatorowych największy naciek obecny był w obrębie endometrium. W porównaniu do endometrium sekrecyjnego liczba komórek Treg była niższa w doczesnej w poronieniu spontanicznym, z najniższymi wartościami w obrębie miejsca implantacji jaja płodowego w pękniętej ciąży pozamacicznej.**

Liczba komórek Treg, zarówno w doczesnej, jak i we krwi obwodowej, zmniejsza się

w przypadku poronienia [152, 154]. W poronieniach nawykowych również zaobserwowano spadek liczby komórek Treg i upośledzenie ich funkcji [155]. Z drugiej strony zmniejszona liczba subpopulacji komórek Treg w endometrium uważana jest za przyczynę zaburzeń implantacji jaja płodowego [199]. Jasper i wsp. stwierdzili, że poronieniu towarzyszy zmniejszenie komórkowej ekspresji foxp3+ [199]. Zjawisko to obserwowane jest w innych zaburzeniach autoimmunologicznych z uwagi na to, że zmniejszenie ekspresji Foxp3 znosi supresorowe funkcje komórek Treg, które ulegają konwersji do komórek efektorowych [200]. CTLA-4 jest ważnym negatywnym czynnikiem regulacji funkcji komórek T - jego wiązanie indukuje stan anergii, a nie proliferację. [201]. Zwiększona ekspresja CTLA-4 przy zmniejszonej ekspresji CD28 jest dominującym zjawiskiem na granicy maczyno- płodowej w ciąży prawidłowej, podczas gdy w poronieniu proporcja ta ulega odwróceniu. Zwiększenie ekspresji CD28 może być odpowiedzialne za silną odpowiedź allogenową prowadzącą do poronienia. Zauważono bowiem, że limfocyty T w doczesnej w poronieniu charakteryzują się większą produkcją IL-2 i IFN- γ [154]. Jednak potencjalna przyczyna poronienia może mieć związek już z okresem przedimplantacyjnym, kiedy w warunkach prawidłowych dochodzi do ekspansji komórek Treg. U kobiet, u których wystąpiło poronienie, wykazano stałą liczebność komórek Treg zarówno w późnej fazie proliferacyjnej, jak i sekrecyjnej cyklu, co świadczy o tym, że brak u nich prawidłowej ekspansji tych komórek w pierwszej fazie cyklu, obserwowanej u kobiet płodnych, bez niepowodzeń położniczych.

Zaobserwowana najniższa liczebność komórek Treg w ciąży pozamacicznej w miejscu implantacji, mimo obecności prawidłowego zarodka, może świadczyć nie tylko o osłabionym mechanizmie tolerancji immunologicznej w tej lokalizacji, ale również o konieczności jego kontroli przez komórki doczesnej w miejscu styku maczyno-płodowego, które jednak nie są obecne w tej lokalizacji.

6. WNIOSKI

1. W przeprowadzonych badaniach wykazano obecność limfocytów T regulatorowych i komórek cytotoksycznych ($CD56^+$, $CD57^+$, $CD3^+CD8^+CD57^+$, $CD8^+$) we wszystkich analizowanych tkankach, tj. z miejsca implantacji jaja płodowego w jajowodzie niepękniętym jak i pękniętym, z doczesnej ciąży, która uległa samoistnemu poronieniu i w sekrecyjnym endometrium kobiet nieciążarnych.
2. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że rozwój ciąży pozamacicznej związany jest ze zmianą liczebności komórek układu immunologicznego, zarówno komórek supresorowych (Treg), jak i cytotoksycznych ($CD56^+$, $CD57^+$) w miejscu implantacji jaja płodowego w jajowodzie.
3. Wzrostowi nacieku komórek cytotoksycznych towarzyszy spadek populacji limfocytów Treg w tej lokalizacji, czego nie zaobserwowano w obrębie doczesnej eutopowej.
4. Najniższa liczebność komórek Treg w obrębie jajowodu w czasie rozwoju ciąży pozamacicznej, w porównaniu do pozostałych grup, mimo obecności prawidłowego zarodka, może świadczyć nie tylko o osłabionym mechanizmie tolerancji immunologicznej w tej lokalizacji, ale również o konieczności jego kontroli przez komórki doczesnej w miejscu kontaktu maczyno-płodowego, które nie są obecne w obrębie jajowodu.
5. Pęknięcie ściany jajowodu może być związane z naciekiem komórek cytotoksycznych układu immunologicznego i brakiem wzrostu liczby komórek supresorowych kompensujących odpowiedź efektorową.

7. ABSTRACT

Ectopic pregnancy is a difficult diagnostic and therapeutic problem, the prevalence of which is estimated at 18–19/1,000 pregnancies. In 80% of cases it is located in the fallopian tube. The risk of extrauterine pregnancy increases markedly after tubal surgery, previous pelvic infections, infertility treatment. However, the causes of extrauterine implantation have not been definitely established. The management of ectopic pregnancy is problematic and an early diagnosis is the most important factor for the successful therapy and subsequent fertility of the patient. More than 75% of deaths in the first trimester are associated with the ectopic pregnancy. That is why a search of the marker, that would aid in prediction of tubal perforation, is inevitable.

Intrauterine pregnancy is associated with the molecular, decidual changes that are responsible for the establishment of immune tolerance between the mother and the fetus. Induction of a pregnancy-related tolerance in extrauterine localization has not yet been discovered. The studies on ectopic pregnancy were conducted on the small groups of patients with the use of immunohistochemistry in majority of cases.

The topic of immunosuppressive cells at the tubal implantation site has not yet been evaluated. The use of flow cytometry in the identification of this subpopulation may aid in obtaining the information regarding the role of Treg cells in the establishment of immune tolerance in ectopic pregnancy. Due to the lack of decidual changes at the extrauterine implantation site, the trophoblast's invasion is not limited. The unopposed penetration of tubal mucosa by extravillous trophoblast may be responsible for tubal perforation. Similarly to labour, which is accompanied by alterations in the level of maternal immune tolerance toward fetal antigens, development of ectopic pregnancy and subsequent tubal rupture, may be associated with the changes of immunosuppressive as well as cytotoxic cells.

THE SUBJECT OF THE STUDY

The aim of the study was to identify the populations of immunosuppressive Treg lymphocytes $CD4^+CD25^+foxp3^+$ and cytotoxic cells $CD56^+,CD57^+, CD3^+CD8^+CD57^+, CD8^+$ during the development of ectopic pregnancy. The assessment of the cells was done by: a) the identification of Treg lymphocytes at the implantation site in unruptured and ruptured tubal pregnancy, b) identification of Treg cells in eutopic endometrium in unruptured and ruptured ectopic pregnancy, c) identification of the cytotoxic cells at the tubal implantation site and within the decidua, d) comparison of the infiltration of the cells studied in these two localisations. Additionally, the infiltration of the Treg lymphocytes and cytotoxic cells in ectopic pregnancy was compared to that in decidua at the time of spontaneous abortion and in the endometrium during secretory phase of the cycle.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples evaluated in the study were obtained from 80 women who were referred to the Gynecology and Oncology Department of Jagiellonian University, Krakow, Poland. The study group comprised forty four women with ectopic pregnancy. Control group consisted of 36 women (eighteen with spontaneous abortion, 18 patients non-pregnant in secretory phase of the cycle). All women from the study group underwent laparoscopic procedures because of Fallopian tube pregnancy, which was followed by the curettage. During the laparoscopy, an integrity of the fallopian tube and the presence of blood in the abdomen were evaluated. Based on intraoperative findings, the study group was further divided into two subgroups: unruptured (n=24) and ruptured (n=20) ectopic pregnancy. Eighteen women underwent curettage because of spontaneous abortion, while the 18 patients underwent laparoscopic myomectomy following a biopsy of the endometrium (the biopsy was an additional procedure for which the patient's consent was obtained). The presence of regulatory T cells and

cytotoxic cells ($CD56^+$, $CD57^+$, $CD3^+CD8^+CD57^+$, $CD8^+$) in the tissue samples was analysed by the flow cytometry. All calculations were made using Statistica v. 7.0 software and $p < 0.05$ was considered to be statistically significant value.

RESULTS

T regulatory lymphocytes and cytotoxic cells were present in all tissue samples examined. The percentage of Treg cells was significantly lower, while the number of $CD56^+$ and $CD57^+$ cytotoxic cells were significantly higher at the implantation site in ruptured ectopic pregnancy compared to unruptured one. No such differences between these subgroups in the percentages of immune cells were found in the endometrium typified by Arias-Stella reaction. The numbers of Treg lymphocytes and $CD8^+$ cells were significantly higher within the fallopian tube compared to the decidua in unruptured ectopic pregnancy. The opposite was observed in ruptured pregnancy group- where the concentration of Treg cells and $CD57^+$ cells was significantly higher in decidua compared to the tubal implantation site.

Statistically significant differences were found in the number of $CD56^+$ and $CD3^+CD8^+CD57^+$ cells between deciduae of patients suffering spontaneous abortion, implantation site of unruptured ectopic pregnancy and secretory endometrium. The number of these cells were the highest within decidua of spontaneous abortion, and decreased in unruptured fallopian tube and secretory endometrium, respectively.

The percentage of T reg cells was significantly lower at the implantation site in ruptured ectopic pregnancy compared to the tissue samples from the patients with spontaneous abortion and non-pregnant secretory endometrium. The latter two groups did not differ in the concentration of Treg cells. The number of $CD56^+$ cells at the tubal implantation site in ruptured ectopic pregnancy was significantly higher compared to the secretory endometrium and significantly lower compared to the decidua in spontaneous abortion.

β -hCG level was found to be an independent factor that influenced the number of both Treg and CD56⁺ cells in ectopic pregnancy. The positive correlation between the number of pregnancies and the CD8⁺ cell infiltration in unruptured pregnancy was observed.

CONCLUSIONS

In the study the presence of Treg lymphocytes as well as the cytotoxic cells (CD56⁺, CD57⁺, CD3⁺CD8⁺CD57⁺, CD8⁺) was confirmed in all the tissues examined: at the implantation site in ruptured and unruptured ectopic pregnancy, within the decidua of spontaneous abortion cases and in the secretory endometrium. It was found that the development of ectopic pregnancy is associated with the alterations in numbers of the immune cells - suppressive T regulatory cells (Treg), as well as cytotoxic cells (CD56⁺, CD57⁺) at the tubal implantation site. During the course of tubal rupture, the increase of the cytotoxic cell infiltration was accompanied by the decrease in the number of suppressive Treg lymphocytes. No such differences were observed within the eutopic decidua. The lowest infiltration of Treg cells at the tubal implantation site, when compared to other groups studied, may be the result of an insufficiency of the compensatory immune response mechanisms in this localisation. Furthermore it can explain the need of decidual cells' control at the feto-maternal interface which are absent at the tubal mucosa. Perforation of the tubal wall seems to be linked to a concentration of cytotoxic immune cells without an adequate increase of the numbers of suppressive cells compensating for detrimental immune cell response.

8. STRESZCZENIE

Ciąża pozamaciczna występuje ze średnią częstością 18/1000 ciąż i w około 80% przypadków zlokalizowana jest w jajowodzie. Zabiegi chirurgiczne w obrębie jajowodu, przebyte próby zapłodnienia pozaustrojowego czy też stany zapalne narządu rodowego zwiększają ryzyko wystąpienia nieprawidłowego zagnieżdżenia jaja płodowego. Przyczyny implantacji poza jamą macicy w większości pozostają jednak w dalszym ciągu niewyjaśnione. Diagnostyka ciąży pozamacicznej nastęrcza niekiedy wiele trudności, a kluczowym dla powodzenia terapii i dalszej płodności pacjentki jest jej wczesne rozpoznanie. Pęknięcie jajowodu w przebiegu ciąży pozamacicznej i związane z nim krwawienie pozostają jedną z częstych przyczyn zgonu kobiet w pierwszym trymestrze ciąży. Z tego powodu podejmowane są próby poszukiwania markerów mogących świadczyć o wzrastającym ryzyku pęknięcia jajowodu.

Wewnątrzmacicznemu rozwojowi płodu od implantacji do porodu towarzyszy szereg zmian molekularnych w endometrium umożliwiających powstanie zjawiska tolerancji immunologicznej w ciąży. Jest to możliwe dzięki immunomodulującym właściwościom błony śluzowej macicy. Przebieg procesu indukcji swoistej tolerancji immunologicznej w ciąży pozamacicznej zlokalizowanej w błonie śluzowej jajowodu nie został do dzisiaj w pełni wyjaśniony. Badania dotyczące zagadnienia układu immunologicznego w ciąży jajowodowej przeprowadzone zostały jak dotąd na niewielkich grupach pacjentek z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych. W przeprowadzonych do tej pory badaniach nie został poruszony temat komórek T regulatorowych w miejscu implantacji ciąży jajowodowej. Badanie z użyciem przyżyciowych technik cytometrii przepływowej może pomóc w uzyskaniu informacji na temat roli tych komórek w kształtowaniu zjawiska tolerancji immunologicznej w ciąży jajowodowej. W błonie śluzowej jajowodu, z uwagi na brak przemiany doczesnowej, inwazja trofoblastu nie jest hamowana, a dalsza jego penetracja jest

przyczyną pęknięcia ściany jajowodu i w rezultacie zagrażającego życiu krwawienia. Tak jak podczas porodu fizjologicznego, kiedy aktywność układu immunologicznego matki ulega zmianie w kolejnych jego okresach, tak w ciąży pozamaciowej kolejnym fazom pęknięcia ściany jajowodu prawdopodobnie mogą towarzyszyć zmiany liczebności komórek immunosupresorowych i cytotoksycznych układu immunologicznego.

CEL PRACY

Głównym celem pracy jest ocena limfocytów T regulatorowych (Treg) $CD4^+CD25^+foxp3^+$ i komórek cytotoksycznych- $CD56^+$, $CD57^+$, $CD3^+CD8^+CD57^+$, $CD8^+$ w ciąży pozamaciowej. Zostanie ona wykonana poprzez: a) identyfikację komórek Treg, w miejscu implantacji jaja płodowego w ścianie jajowodu w niepękniętej i pękniętej ciąży pozamaciowej, b) identyfikację komórek Treg w obrębie doczesnej w jamie macicy w ciąży pozamaciowej niepękniętej i pękniętej, c) charakterystykę populacji komórek cytotoksycznych w doczesnej eutopowej oraz w miejscu implantacji ciąży pozamaciowej pękniętej i niepękniętej, d) porównanie próbek sparowanych pod kątem limfocytów Treg i komórek cytotoksycznych, pobranych z miejsca implantacji zarodka oraz doczesnej osobno w grupie pacjentek z niepękniętą oraz z pękniętą ciążą jajowodową. Dodatkowo dokonane zostanie porównanie populacji limfocytów Treg i komórek cytotoksycznych w miejscu implantacji ciąży pozamaciowej, doczesnej w poronieniu samoistnym i endometrium sekrecyjnej fazy cyklu.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na grupie 80 kobiet hospitalizowanych w Klinice Ginekologii i Onkologii Katedry Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, w tym 49 pacjentek z ciążą pozamaciową, które stanowiły

grupę badaną oraz 36 kobiet (18 pacjentek z poronieniem samoistnym i 18 nieciążarnych), które stanowiły grupę porównawczą. Pacjentki z grupy badanej zostały zakwalifikowane do zabiegu laparoskopii i wyłyżeczkowania jamy macicy. W trakcie każdego zabiegu oceniano integralność ściany jajowodu i obecność krwi w jamie brzusznej. W zależności od rozpoznania śródoperacyjnego kobiety z grupy badanej zostały podzielone na dwie podgrupy: z niepękniętą (NP, n=24) i pękniętą (P, n=20) ciążą pozamaciczną. U kobiet z poronieniem samoistnym wykonano zabieg wyłyżeczkowania jamy macicy. W grupie 18 kobiet nieciążarnych wykonano zabieg chirurgiczny- miomektomię drogą laparoskopową oraz dodatkową procedurę- biopsję endometrium, na co uzyskano zgodę pacjentki.

W pobranym materiale tkankowym identyfikowano limfocyty T regulatorowe i cytotoksyczne metodą cytometrii przepływowej. Komórki T regulatorowe oceniano w oparciu o ekspresję markerów powierzchniowych CD4 i CD25 oraz markera cytoplazmatycznego Foxp3. Komórki cytotoksyczne identyfikowano po wybarwieniu powierzchniowym z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-CD56 APC, anti-CD57 FITC, anti-CD8 PE, a limfocyty cytotoksyczne z użyciem przeciwciał anti-CD3 PE-Cy5, anti-CD8 PE, anti-CD57 FITC. Wybarwione komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto (BD Biosciences, Immunocytometry Systems, San, Jose, CA, USA) w programie FACS DiVa v. 6.1 pracującym w środowisku Windows XP

Analizy statystycznej dokonano przy pomocy pakietu Statistica 7.0 (firma StatSoft), przyjmując za poziom istotności statystycznej wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

W analizowanym materiale klinicznym potwierdzono obecność limfocytów T regulatorowych i komórek cytotoksycznych metodą cytometrii przepływowej we wszystkich analizowanych tkankach. Wykazano istotnie niższą liczebność komórek regulatorowych Treg

i istotnie wyższą komórek cytotoksycznych CD56⁺ i CD57⁺ w miejscu implantacji jaja płodowego w grupie kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną w porównaniu do grupy z niepękniętą ciążą pozamaciczną. Nie stwierdzono istotnych różnic w nacieku badanych komórek w obrębie doczesnej w niepękniętej i pękniętej ciąży pozamaciczej. Miejsce implantacji zarodka w jajowodzie charakteryzował istotnie wyższy odsetek komórek Treg i CD8⁺ w porównaniu do doczesnej w niepękniętej ciąży pozamaciczej. Odwrotną zależność stwierdzono w grupie kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną, gdzie naciek komórek Treg i wśród cytotoksycznych-komórek CD57⁺ był znamienne statystycznie wyższy w doczesnej w porównaniu do miejsca implantacji w jajowodzie.

Stwierdzono istotne statystycznie różnice w liczbie komórek cytotoksycznych CD56⁺ i CD3⁺CD8⁺CD57⁺ naciekających doczesną w poronieniu spontanicznym, endometrium sekrecyjnym i miejscu implantacji w niepękniętym jajowodzie. Obie populacje komórek najliczniej występowały w doczesnej w poronieniu samoistnym, a ich liczebność malała kolejno w jajowodzie w niepękniętej ciąży pozamaciczej i endometrium sekrecyjnym.

Odsetek limfocytów Treg różnił się istotnie statystycznie między grupą kobiet z pękniętą ciążą pozamaciczną, z poronieniem samoistnym i nieciążarnymi z endometrium sekrecyjnym. Liczebność komórek Treg była najniższa w miejscu implantacji w pękniętej ciąży pozamaciczej w porównaniu do dwóch pozostałych grup. Doczesna w poronieniu samoistnym, jak i endometrium sekrecyjne u kobiet nieciążarnych nie wykazywały istotnych różnic w zakresie limfocytów regulatorowych Treg. Grupa pacjentek z pękniętą ciążą pozamaciczną różniła się istotnie pod względem liczby komórek CD56⁺ zarówno między grupą pacjentek z poronieniem samoistnym jak i nieciążarnych w sekrecyjnej fazie cyklu.

Stwierdzono, że β -hCG jest niezależnym czynnikiem wpływającym na liczebność komórek CD56⁺ i limfocytów Treg w ciąży pozamaciczej. Wykazano dodatnią korelację między liczbą ciąż a naciekiem komórek CD8⁺ w niepękniętej ciąży pozamaciczej.

WNIOSKI

W przeprowadzonych badaniach wykazano obecność limfocytów T regulatorowych i komórek cytotoksycznych ($CD56^+$, $CD57^+$, $CD3^+CD8^+CD57^+$, $CD8^+$) we wszystkich analizowanych tkankach tj. z miejsca implantacji jaja płodowego w jajowodzie niepękniętym, jak i pękniętym, z doczesnej ciąży, która uległa samoistnemu poronieniu i w sekrecyjnym endometrium kobiet nieciążarnych. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że rozwój ciąży pozamaciczej związany jest ze zmianą liczebności komórek układu immunologicznego, zarówno komórek supresorowych (Treg), jak i cytotoksycznych ($CD56^+$, $CD57^+$) w miejscu implantacji jaja płodowego w jajowodzie. Wzrostowi nacieku komórek cytotoksycznych towarzyszy spadek populacji limfocytów Treg w tej lokalizacji, czego nie zaobserwowano w obrębie doczesnej eutopowej. Najniższa liczebność komórek Treg w obrębie jajowodu w czasie rozwoju ciąży pozamaciczej, w porównaniu do pozostałych grup, mimo obecności prawidłowego zarodka, może świadczyć nie tylko o osłabionym mechanizmie tolerancji immunologicznej w tej lokalizacji, ale również o konieczności jego kontroli przez komórki doczesnej w miejscu kontaktu maczyno-płodowego, które nie są obecne w obrębie jajowodu. Pęknięcie ściany jajowodu może być związane z naciekiem komórek cytotoksycznych układu immunologicznego i brakiem wzrostu liczby komórek supresorowych kompensujących odpowiedź efektorową.

PISMIENNICTWO*

1. Tait L. Lecture on Ectopic Pregnancy and pelvic haematocol. Birmingham, English Journal Printing Works, 1988. 193.
2. Editorial. Unanswered questions on ectopic pregnancy. *Br Med J.* 1980;280:1127-8.
3. Coste J, Bouyer J, Ughetto S. Ectopic pregnancy is again on the increase. Recent trends in the incidence of ectopic pregnancies in France (1992-2002). *Hum Reprod.* 2004;19:2014-8.
4. RCOG. Why mothers die 1997-1999: the fifth report of the confidential enquiries into maternal deaths in the UK 1997-1999. London; RCOG Press 2001.
5. Bakken IJ, Skjeldestad FE. Time trends in ectopic pregnancies in a Norwegian county 1970-2004--a population-based study. *Hum Reprod.* 2006;21:3132-6.
6. Storeide O, Veholmen M, Eide M, Bergsjø P, Sandvei R. The incidence of ectopic pregnancy in Hordaland County, Norway 1976-1993. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997;76:345-9.
7. Kamwendo F, Forslin L, Bodin L, Danielsson D. Epidemiology of ectopic pregnancy during a 28 year period and the role of pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Infect.* 2000; 76: 28-32.
8. Anon Healthcare cost and utilization project (HCUP), 1988–2001: a federal-state-industry partnership in health data, (2003), Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville. <http://www.ahrq.gov/HCUPnet/> (accessed Dec 14, 2004)
9. Anon , Ectopic pregnancies: United States, 1990-1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1995; 44: 46-48.
10. Egger M, Low N, Smith GD, Lindblom B, Herrmann B. Screening for chlamydial infections and the risk of ectopic pregnancy in a county in Sweden: ecological analysis. *BMJ* 1998; 316: 1776-86
11. From the Centers for Disease Control and Prevention. Ectopic pregnancy- United States, 1990-1992. *JAMA.* 1995;273:533.
12. Pisarski T, Lesny P, Markwitz W. Ciąża ektopowa w regionie wielkopolskim w latach 1980-1985. Występowanie, wykrywanie i rozpoznawanie ciąży ektopowej. *Gin Pol* 1987; 58:180-183
13. NCHS Advanced report of final mortality statistics, 1992. Hyattsville, Maryland: US Department of Health and Human Services, Public Health Services, CDC 1994. (Monthly vital statistics report; vol 43, no. 6, suppl).
14. Varma R, Mascarenhas L. Evidence-based management of ectopic pregnancy. *Curr Obstet Gynaecol* 2002;12:191-199.

*Zgodnie z rekomendacjami Oddziału Informacji Naukowej Biblioteki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego każda pozycja piśmiennictwa wykorzystanego w artykule otrzymała kolejny numer (podany cyframi arabskimi ujętymi w nawiasy) w miejscu tekstu, w którym Autor po raz pierwszy się na nią powołał. Styl przypisów bibliograficznych odpowiada zasadom stosowanym przez Amerykańską Państwową Bibliotekę Medyczną (NLM) w Index Medicus.

15. Farquhar CM. Ectopic pregnancy. *Lancet*. 2005;366:583-91.
16. Ankum WM, Mol BWJ, Van der Veen F, Nossuyt PMM. Risk factors for ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 1996; 65:1093-1099.
17. Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly JL, Fernandez H, Gerbaud L, Job-Spira N. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. *Am J Epidemiol*. 2003;157:185-94.
18. Fernandez H, Gervase A. Ectopic pregnancies after infertility treatment: modern diagnosis and therapeutic strategy. *Hum Reprod*. 2004;10: 503-513.
19. Latchaw G, Takacs P, Gaitan L, Geren S, Burzawa J. Risk factors associated with the rupture of tubal ectopic pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*. 2005;60:177-80.
20. Peterson HB, Xia Z, Hughes JM, Wilcox LS, Tylor LR, Trussell J. The risk of ectopic pregnancy after tubal sterilization. *N Engl J Med*. 1997;336:762-767.
21. Mol BWJ, Ankum WM, Bossuyt PMM, Van der Veen F. Contraception and the risk of ectopic pregnancy: a meta analysis. *Contraception*. 1995;52: 337-341.
22. Furlong LA. Ectopic pregnancy risk when contraception fails: a review. *J Reprod Med* 2002; 47: 881-85.
23. Mol F, Strandell A, Jurkovic D, Yalcinkaya T, Verhoeve HR, Koks CA, van der Linden PJ, Graziosi GC, Thurkow AL, Hoek A, Hogström L, Klinte I, Nilsson K, van Mello NM, Ankum WM, van der Veen F, Mol BW, Hajenius PJ. European Surgery in Ectopic Pregnancy study group. The ESEP study: salpingostomy versus salpingectomy for tubal ectopic pregnancy; the impact on future fertility: a randomised controlled trial. *European Surgery in Ectopic Pregnancy study group. BMC Womens Health*. 2008;8:11.
24. Rulin MC. Is salpingostomy the surgical treatment of choice for unruptured tubal pregnancy? *Obstet Gynecol*. 1995;86:1010-3.
25. Nama V, Manyonda I. Tubal ectopic pregnancy: diagnosis and management. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;279:443-53.
26. Sindos M, Togia A, Sergeantanis TN, Kabagiannis A, Malamas F, Farfaras A, Sergeantanis IN, Bassiotou V, Antoniou S. Ruptured ectopic pregnancy: risk factors for a life-threatening condition. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;279:621-3.
27. Berg C, Danel I, Atrash H, Zane S, Bartlett L (Editors). *Strategies to reduce pregnancy-related deaths: from identification and review to action*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2001.
28. Goldner TE, Lawson HW, Xia Z, Atrash HK. Surveillance for ectopic pregnancy-United States, 1970-1989. *MMWR CDC Surveill Summ*. 1993 17;42:73-85.
29. Barnhart K, Esposito M, Coutifaris C. An update on the medical treatment of ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2000;27:653-67.

30. Baffoe S, Nkyekyer K. Ectopic pregnancy in Korle Bu Teaching Hospital, Ghana: a three-year review. *Trop Doct.* 1999;29:18-22.
31. Goyaux N, Leke R, Keita N, Thonneau P. Ectopic pregnancy in African developing countries. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:305-12.
32. Kaplan BC, Dart RG, Moskos M, Kuligowska E, Chun B, Adel Hamid M, Northern K. Ectopic pregnancy: prospective study with improved diagnostic accuracy. *Ann Emerg Med.* 1996;28:10-17.
33. Tay JJ, Moore J, Walker JJ. Ectopic pregnancy. *BMJ.* 2000;320:916-919.
34. Robson SJ, O'Shea RT. Undiagnosed ectopic pregnancy: a retrospective analysis of 31 "missed" ectopic pregnancies at a teaching hospital. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1996;36:182-185.
35. Emerson DS, McCord ML. Clinician's approach to ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 1996;39:199-222.
36. Fernandez H, Gervase A. Ectopic pregnancies after infertility treatment: modern diagnosis and therapeutic strategy. *Hum Reprod* 2004; 10: 503-13.
37. Brown DL, Doubilet PM. Transvaginal sonography for diagnosing ectopic pregnancy: positivity criteria and performance characteristics. *J Ultrasound Med.* 1994;13: 259-266.
38. Nyberg DA, Hughes MP, Mack LA, Wang KY. Extrauterine findings of ectopic pregnancy of transvaginal US: importance of echogenic fluid. *Radiology.* 1991;178:823-6.
39. Thorsen MK, Lawson TL, Aiman EJ, Miller DP, McAsey ME, Erickson SJ, Quiroz F, Perret RS. Diagnosis of ectopic pregnancy: endovaginal vs transabdominal sonography. *AJR Am J Roentgenol.* 1990;155:307-10.
40. Barnhart KT, Simhan H, Kamelle SA. Diagnostic accuracy of ultrasound above and below the beta-hCG discriminatory zone. *Obstet Gynecol.* 1999; 94: 583-587.
41. Kadar N, Freedman M, Zacher M. Further observations on the doubling time of human chorionic gonadotropin in early asymptomatic pregnancies. *Fertil Steril.* 1990;54:783-787.
42. Kadar N, Bohrer M, Kemman E, Shelden R. A prospective, randomised study of the chorionic gonadotropin-time relationship in early gestation: clinical implications. *Fertil Steril.* 1993;60: 409-412.
43. Barnhart KT, Sammel MD, Rinaudo PF, Zhou L, Hummel AC, Guo W. Symptomatic patients with an early viable intrauterine pregnancy: HCG curves redefined. *Obstet Gynecol.* 2004;104:50-55.
44. Ankum W, Van der Veen F, Hamerlynck J, Lammes F. Laparoscopy: a dispensable tool in the diagnosis of ectopic pregnancy?. *Hum Reprod.* 1993;8:1301-1306.
45. Kadar N, Bohrer M, Kemmann E. The discriminatory human chorionic gonadotropin zone for endovaginal sonography: a prospective, randomized study. *Fertil Steril.* 1994; 61:1016-1020.

- 46.Saxon D, Falcone T, Mascha EJ, Marino T, Yao M, Tulandi T. A study of ruptured tubal ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1997;90:46-9.
- 47.Falcone T, Mascha EJ, Goldberg JMFalconi LL, Mohla G, Attaran M. A study of risk factors for ruptured tubal ectopic pregnancy. *J Womens Health.* 1998;7:459-63.
- 48.Roussos D, Panidis D, Matalliotakis I, Mavromatidis G, Neonaki M, Mamopoulos M, Koumantakis E. Factors that may predispose to rupture of tubal ectopic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;89:15-7.
- 49.Galstyan K, Kurzel RB. Serum beta-hCG titers do not predict ruptured ectopic pregnancy. *Int J Fertil Womens Med.* 2006;51:14-6
- 50.Job-Spira N, Fernandez H, Bouyer J. Ruptured tubal ectopic pregnancy: risk factors and reproductive outcome: results of a population-based study in France. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:938-44.
- 51.Cacciatore B, Stenman UH, Ylöstalo P. Early screening for ectopic pregnancy in high-risk symptom-free women. *Lancet.* 1994;343:517-8.
- 52.Mol BW, Hajenius PJ, Ankum WM, Bossuyt PM, van der Veen F. Screening for ectopic pregnancy in symptom-free women at increased risk. *Obstet Gynecol.* 1997;89:704-7.
- 53.Berlingieri P, Bogdanskiene G, Grudzinskas JG. Rupture of tubal pregnancy in the Vilnius population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;131:85-8.
- 54.Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *1953 J Immunol.* 2010;184:5-8.
- 55.Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:731-7.
56. Petraglia F, Santuz M, Florio P, Simoncini T, Luisi S, Plaino L, Genazzani AR, Genazzani AD, Volpe A. Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J Reprod Immunol.* 1998;39:221-33.
57. von Rango U. Fetal tolerance in human pregnancy--a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. *Immunol Lett.* 2008;115:21-32.
- 58.Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181:718-24.
- 59.Jaffe R, Jauniaux E, Hustin J. Maternal circulation in the first-trimester human placenta--myth or reality? *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:695-705.
- 60.Lambert N, Nelson JL. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmun Rev.* 2003;2:133-9.

61. von Rango U, Classen-Linke I, Kertschanska S, Kemp B, Beier HM. Effects of trophoblast invasion on the distribution of leukocytes in uterine and tubal implantation sites. *Fertil Steril*. 2001;76:116-24.
62. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006;11:279-95.
63. You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology*. 2008;48:978-90.
64. Henry F, Bretaudeau L, Hequet A, Barbieux I, Lieubeau B, Meflah K, Grégoire M. Role of antigen-presenting cells in long-term antitumor response based on tumor-derived apoptotic body vaccination. *Pathobiology*. 1999;67:306-10.
65. Tabiasco J, Rabot M, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, Parant O, Laskarin G, Juretic K, Bensussan A, Rukavina D, Le Bouteiller P. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties. *Placenta*. 2006;27 Suppl A:S34-9.
66. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:656-63.
67. Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod*. 1998;59:643-54.
68. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993;14:353-6.
69. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*. 1997;18:478-82.
70. Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK-cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2008;77:14-22
71. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online*. 2006;13:680-6.
72. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and human pregnancy-an inflammatory view. *Trends Immunol*. 2006;27:399-404.
73. Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin Immunopathol*. 2007;29:115-22.
74. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003;171:6323-6327.

75. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med.* 2002;196:255-260.
76. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta 1 secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 1996;98:70-77.
77. Smith TR, Kumar V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* 2008;29:337-342.
78. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaber SA. Suppressor T Cells. *J Immunol.* 1972;108:586-590.
79. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-1164.
80. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-352.
81. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002;3:135-142.
82. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000;192:303-310.
83. Liu H, Liu L, Fletcher BS, Visner GA. Sleeping beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *FASEB J.* 2006a;20:2384-2386.
84. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, de St Groth BF, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006b;203:1701-1711.
85. Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med.* 2006;64:4-9.
86. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61.
87. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-336
88. Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med.* 2005a;202:901-906.
89. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005b;22:329-341.
90. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004;5:266-71.

91. Darrasse-Jèze G, Klatzmann D, Charlotte F, Salomon BL, Cohen JL. CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett.* 2006 ;102:106-9.
92. Aluvihare VR, Betz AG. The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. *Immunol Rev.* 2006;212:330-43.
93. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology.* 2004;112:38-43.
94. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, Leber J, Volk HD. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol.* 2006 ;36:82-94.
95. Zenclussen AC. CD4(+)CD25+ T regulatory cells in murine pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2005;65:101-10.
96. Saito S, Nishikawa K, Morii T, Narita N, Enomoto M, Ichijo M. Expression of activation antigens CD69, HLA-DR, interleukin-2 receptor-alpha (IL-2R alpha) and IL-2R beta on T cells of human decidua at an early stage of pregnancy. *Immunology.* 1992;75:710-712.
97. Sasaki Y, Satomi M, Miyazaki J, Sakai M, Saito S. CD4+CD25+ regulatory T cells are increased in the human early pregnancy decidua and have immunosuppressive activity. *Am J Reprod Immunol.* 2003;49:356.
98. Thuere C, Zenclussen ML, Schumacher A, Langwisch S, Schulte-Wrede U, Teles A, Paeschke S, Volk HD, Zenclussen AC. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58:514-523.
99. Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol.* 2004;136:373-378.
100. Zhao JX, Zeng YY, Liu Y. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell pool during pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2007;75:71-81.
101. Saito S, Sasaki Y, Sakai M. CD4+CD25 high regulatory T cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2005;65:111-120.
102. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, de Groot-Swings GM, Kanhai HH, Claas FH, Scherjon SA. Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta.* 2006;27(Suppl A):S47-S53.
103. Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toerner A, Meuer S, Sohn C. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol.* 2008;129:401-12.

104. Mjösberg J, Svensson J, Johansson E, Hellström L, Casas R, Jenmalm MC, Boij R, Matthiesen L, Jönsson JI, Berg G, Ernerudh J. Systemic reduction of functionally suppressive CD4^{dim}CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17β-estradiol. *J Immunol*. 2009;183:759-69.
105. Wicherek L, Klimek M, Dutsch-Wicherek M. The level of maternal immune tolerance and fetal maturity. *Neuro Endocrinol Lett*. 2005;26:561-6.
106. Galazka K, Pitynski K, Skret-Magierlo J, Mach P, Knafel A, Sikora J, Niemiec T, Dobrogowski J, Basta A, Wicherek L. The increase in metallothionein and ectopic decidual immunoreactivity with respect to the progression of labor at term and the lack of analogical changes in placental abruption. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60:204-13.
107. Wicherek L, Basta P, Galazka K, Mak P, Dancewicz L, Kalinka J. RCAS1 decidual immunoreactivity and RCAS1 serum level during cesarean section with respect to the progression of labor. *Am J Reprod Immunol*. 2008;59:152-8.
108. Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-γ, IL-4, IL-10, TGF-β and TNF-α. *J Reprod Immunol*. 2006;71:41-56.
109. Galazka K, Wicherek L, Pitynski K, Kijowski J, Zajac K, Bednarek W, Dutsch-Wicherek M, Rytlewski K, Kalinka J, Basta A, Majka M. Changes in the subpopulation of CD25⁺ CD4⁺ and FOXP3⁺ regulatory T cells in decidua with respect to the progression of labor at term and the lack of analogical changes in the subpopulation of suppressive B7-H4 macrophages--a preliminary report. *Am J Reprod Immunol*. 2009;61:136-46.
110. Steinborn A, Sohn C, Sayehli C, Baudendistel A, Hüwelmeier D, Solbach C, Schmitt E, Kaufmann M. Spontaneous labour at term is associated with fetal monocyte activation. *Clin Exp Immunol*. 1999;117:147-52.
111. Abadía-Molina AC, Ruiz C, Montes MJ, King A, Loke YW, Olivares EG. Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast. *J Reprod Immunol*. 1996;31:109-23.
112. Sindram-Trujillo AP, Scherjon SA, van Hulst-van Miert PP, van Schip JJ, Kanhai HH, Roelen DL, Claas FH. Differential distribution of NK cells in decidua basalis compared with decidua parietalis after uncomplicated human term pregnancy. *Hum Immunol*. 2003;64:921-9.
113. Wicherek L, Galazka K, Popiela TJ, Dutsch-Wicherek M, Czekierdowski A, Pabian W, Banas T, Migdal M, Klimek M. Metallothionein expression and infiltration of cytotoxic lymphocytes in uterine and tubal implantation sites. *J Reprod Immunol*. 2006;70:119-31.
114. White HD, Crassi KM, Givan AL, Stern JE, Gonzalez JL, Memoli VA, Green WR, Wira CR: CD3⁺CD8⁺ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J Immunol* 1997; 158: 3017–3027.
115. Boehme M, Donat H. Identification of lymphocyte subsets in the human fallopian tube. *Am J Reprod Immunol*. 1992;28:81-4.

116. Ito C, M. Ito, A. Itakura, M. Asai, O. Narita, S. Mizutani: A prospective evaluation of the effects of salpingectomy on endometrial lymphocyte clusters in patients with hydrosalpinges. *Fertil Steril.* 2004;82:149-53.
117. Smith JM, Wira CR, Fanger MW, Shen L. Human fallopian tube neutrophils--a distinct phenotype from blood neutrophils. *Am J Reprod Immunol.* 2006;56:218-29.
118. Mselle TF, Meadows SK, Eriksson M, Smith JM, Shen L, Wira CR, Sentman CL. Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clin Immunol.* 2007;124:69-76.
119. Morris H, Emms M, Visser T, Timme A. Lymphoid tissue of the normal fallopian tube--a form of mucosal-associated lymphoid tissue (MALT)? *Int J Gynecol Pathol.* 1986;5(1):11-22.
120. Wollen AL, Sandvei R, Mørk S, Marandon JL, Matre R. In situ characterization of leukocytes in the fallopian tube in women with or without an intrauterine contraceptive device. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1994;73:103-12.
121. Benirschke K and Kaufmann P [2000] *Pathology of the Human Placenta*, 4th edn. Berlin/Heidelberg/New York; Springer.
122. von Rango U, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, Beier HM. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. *Placenta.* 2003;24:929-40.
123. Kemp B, Kertschanska S, Kadyrov M, Rath W, Kaufmann P, Huppertz B. Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem Cell Biol.* 2002;117:401-14.
124. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol.* 1998;110:495-508.
125. Vassiliadou N, Bulmer JN. Characterization of tubal and decidual leukocyte populations in ectopic pregnancy: evidence that endometrial granulated lymphocytes are absent from the tubal implantation site. *Fertil Steril.* 1998;69:760-7.
126. Stewart-Akers AM, Krasnow JS, DeLoia JA. Decidual leukocyte populations in ectopic pregnancies. *Fertil Steril.* 1997;68:1103-7.
127. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol.* 2001;166:6477-82.
128. Soriano D, Hugol D, Quang NT, Darai E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril.* 2003;79:975-80.
129. Roberts M, Luo X, Chegini N: Differential regulation of interleukins IL-13 and IL-15 by ovarian steroids, TNF- beta and TGF- alfa in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 751-760.

130. Steck T, Giess R, Suetterlin MW, Bolland M, Wiest S, Poehls UG, Dietl J: Leukemia inhibitory factor gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 112: 69–73.
131. Yamashita H, Otsuki Y, Matsumoto K, Ueki K, Ueki M: Fas-L, Fas antigen and Bcl-2 expression in human the endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 358–364.
132. Wicherek L, Popiela TJ, Galazka K, Dutsch- Wicherek M, Oplawski M, Basta A, Klimek M: Metallothionein and RCAS1 expression in comparison to immunological cells activity in endometriosis, endometrial adenocarcinoma and the endometrium according to menstrual cycle changes. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 622–630.
133. Ohshima K, Nakashima M, Sonoda K, Kikuchi M, Watanabe T: Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 481–486.
134. Kawano Y, Kaku T, Sonoda K, Hirakawa T, Kobayashi H, Ohishi Y, Nakano H: Expression of RCAS1 in female genital organs. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24: 330–334.
135. Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP: Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol Sci* 2003; 73: 294–300.
136. Seve M, Chimienti F, Favier A: Role of intracellular zinc in programmed cell death. *Pathol Biol* 2002; 50: 212–221.
137. Wicherek L, Galazka K, Lazar A. Analysis of metallothionein, RCAS1 immunoreactivity regarding immune cell concentration in the endometrium and tubal mucosa in ectopic pregnancy during the course of tubal rupture. *Gynecol Obstet Invest.* 2008;65:52-61.
138. McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol.* 1995;154:3771-8.
139. Goffin F, Munaut C, Malassiné A, Evain-Brion D, Frankenne F, Fridman V, Dubois M, Uzan S, Merviel P, Foidart JM. Evidence of a limited contribution of feto-maternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway. *Tissue Antigens.* 2003;62:104-16.
140. Hunt JS, Langat DK, McIntire RH, Morales PJ. The role of HLA-G in human pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4 Suppl 1:S10.
141. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, Alexander T, Taran A, Malfertheiner SF, Costa SD, Zimmermann G, Nitschke C, Volk HD, Alexander H, Gunzer M, Zenclussen AC. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J Immunol.* 2009;182:5488-97.
142. Malatyalioglu E, Ozer S, Kokcu A, [et al]. CA-125 levels in ruptured and unruptured tubal ectopic pregnancies. *J Obstet Gynaecol Res.* 2006 ;32:422-7.

143. Morelli SS, Keegan DA, Krey LC, Katz J, Liu M, Noyes N. Early serum interleukin-8 evaluation may prove useful in localizing abnormally implanted human gestations after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008;90:2068-72.
144. Col-Madendag I, Madendag Y, Kanat-Pektas M, Danisman N. Can sonographic endometrial pattern be an early indicator for tubal ectopic pregnancy and related tubal rupture? *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281:189-94.
145. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update*. 2002;8:463-81.
146. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*. 2003;9:163-74.
147. Quack KC, Vassiliadou N, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA. Leukocyte activation in the decidua of chromosomally normal and abnormal fetuses from women with recurrent abortion. *Hum Reprod*. 2001;16:949-55.
148. Vassiliadou N, Searle RF, Bulmer JN. Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod*. 1999;14:1194-200.
149. Sipak-Szmigiel O, Ronin-Walknowska E, Cybulski C, Plonka T, Lubiński J. Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45 Suppl 1:S137-41
150. Rizzo R, Andersen AS, Lassen MR, Sørensen HC, Bergholt T, Larsen MH, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR, Hviid TV. Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62:320-38.
151. Pfeiffer KA, Rebmann V, Pässler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D, Grosse-Wilde H. Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol*. 2000;61:559-64.
152. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*. 2004;10:347-53.
153. Yang H, Qiu L, Di W, Zhao A, Chen G, Hu K, Lin Q. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril*. 2009;92:301-5.
154. Jin LP, Chen QY, Zhang T, Guo PF, Li DJ. The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clin Immunol*. 2009;133:402-10.
155. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+ and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*. 2007;178:2572-8.

156. Knafel A, Basta P, Skotniczny K, Paweł M, Krzysztof B, Rokita W, Obrzut B, Wicherek Ł. Ectopic pregnancy rupture--can it be prevented? *Ginekol Pol.* 2009;80:734-9.
157. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002;168:1080-6.
158. Graca L, Chen TC, Le Moine A, Cobbold SP, Howie D, Waldmann H. Dominant tolerance: activation thresholds for peripheral generation of regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2005;26:130-5.
159. Miwa N, Hayakawa S, Miyazaki S, Myojo S, Sasaki Y, Sakai M, Takikawa O, Saito S. IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod.* 2005 ;11:865-70.
160. Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol.* 2001 ;166:3789-96.
161. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, Protschka M, Galle PR, Neurath MF, Blessing M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* 2004;173:6526-31.
162. Groux H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation.* 2003;75(9 Suppl):8S-12S.
163. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004;10:801-5
164. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005;22:329-41.
165. Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, Zhao L, An X, Du X, Chen X, Wang S, Xia G, Wang B. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol.* 2008;214:456-64.
166. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandembark AA, Ziegler SF, Offner H. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol.* 2004;173:2227-30.
167. Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology.* 2006;118:58-65.
168. Robertson SA, Guerin LR, Moldenhauer LM, Hayball JD. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *J Reprod Immunol.* 2009;83:109-16.
169. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol.* 2005;166:811-22.

170. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, de Groot-Swings GM, Kleijburg C, Scherjon SA, Claas FH. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol.* 2008;180:5737-45.
171. Venturi GM, Conway RM, Steeber DA, Tedder TF. CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover. *J Immunol.* 2007;178:291-300.
172. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol.* 2006;177:4488-94.
173. Soler D, Chapman TR, Poisson LR, Wang L, Cote-Sierra J, Ryan M, McDonald A, Badola S, Fedyk E, Coyle AJ, Hodge MR, Kolbeck R. CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3+ regulatory and Th2 effector lymphocytes. *J Immunol.* 2006;177:6940-51.
174. van den Heuvel M, Peralta C, Bashar S, Taylor S, Horrocks J, Croy BA. Trafficking of peripheral blood CD56(bright) cells to the decidualizing uterus--new tricks for old dogmas? *J Reprod Immunol.* 2005;67:21-34.
175. Adcock EW 3rd, Teasdale T, August CS, Cox S, Meschia G, Ballaglia TC, Naughton MA. Human chorionic gonadotropin: its possible role in maternal lymphocyte suppression. *Science.* 1973 31;181:845-7.
176. Hammarström L, Fuchs T, Smith CI. The immunodepressive effect of human glucoproteins and their possible role in the nonrejection process during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1979;58:417-22.
177. Fuchs T, Hammarström L, Smith CI, Brundin J. Sex-dependent induction of human suppressor T cells by chorionic gonadotropin. *J Reprod Immunol.* 1982;4:185-90.
178. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology.* 1986 ;118:1567-82.
179. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, Dubois M, Munaut C, Goffin F, Hagelstein MT, Noël A, Hazout A, Foidart JM, Geenen V. Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum Reprod.* 2004;19:2633-43.
180. Tang B, Gurpide E. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;47:115-21.
181. Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol.* 2003;171:2305-13.
182. Pröll J, Bensussan A, Goffin F, Foidart JM, Berrebi A, Le Bouteiller P. Tubal versus uterine placentation: similar HLA-G expressing extravillous cytotrophoblast invasion but different maternal leukocyte recruitment. *Tissue Antigens.* 2000;56:479-91.
183. Kemp B, Rimbach S, Kämmerer U, Rath W, Beier HM, von Rango U. Tubal abortions but not viable tubal pregnancies are characterized by an increased number of CD8+ T cells. *J Reprod Immunol.* 2007;73:180-7.

184. Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Dobyszuk A, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol.* 2004;112:258-67.
185. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9:606-12.
186. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol.* 2006 ;176:1582-7.
187. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 1998 ;281:1191-3.
188. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999;189:1363-72.
189. Kudo Y, Boyd CA, Spyropoulou I, Redman CW, Takikawa O, Katsuki T, Hara T, Ohama K, Sargent IL. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *J Reprod Immunol.* 2004;61:87-98.
190. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* 2002;297:1867-70.
191. Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol.* 2003;81:247-65.
192. Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2007;109:2058-65.
193. Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol.* 1998 ;160:4831-40.
194. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev.* 2005;26:44-62.
195. Roy S, Barnes PF, Garg A, Wu S, Cosman D, Vankayalapati R. NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. *J Immunol.* 2008 ;180:1729-36.
196. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells.* 2008;26:212-22.
197. Wicherek L. The role of the endometrium in the regulation of immune cell activity. *Front Biosci.* 2008;13:1018-35.
198. King A, Burrows T, Loke YW. Human uterine natural killer cells. *Nat Immun.* 1996-1997;15:41-52.
199. Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod.* 2006;12:301-8.

200.Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*. 2007;445:766-70.

201.Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:565-94.

INDEKS SKRÓTÓW

- AB** (*abortus*)- poronienie
- APC** (*Antigen Presenting Cells*)- komórki prezentujące antygen
- β -hCG** (β subunit of human chorionic gonadotropin)- β -podjednostka gonadotropiny kosmówkowej
- CA-125** (*Cancer Antigen 125*) – białko antygenowe będące markerem nowotworowym
- CCR** (*C-C Chemokine Receptor*)- receptor chemokininowy
- CD** (*Cluster of Differentiation*)- antygen różnicowania
- CG** (*Chorionic Gonadotropin*)- gonadotropina kosmówkowa
- CTLA-4** (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*)- Antygen CTLA-4 (CD152), cząsteczka immunoglobulinopodobna, wykazująca 30% homologię w stosunku do CD28.
- DC** (*Dendritic Cells*)- komórki dendrytyczne
- dNK** (*decidual Natural Killers*)- doczesne komórki NK
- E** (*Endometrium*)- błona śluzowa jamy macicy
- EP** (*Ectopic pregnancy*)- ciąża pozamaciczna, synonimy: ciąża jajowodowa, ciąża ektopowa
- EVT** (*Extravillous Trophoblast*)- trofoblast pozakosmkowy
- Fas** – błonowy receptor dla czynników z rodziny TNF; synonimy CD95; APO-1
- FasL** (*Fas Ligand*) – ligand białka Fas
- Foxp3** (*Forkhead Box 3*)- czynnik transkrypcyjny 3
- GITR** (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor related protein*)-białko należące do nadrodziny tumor necrosis factor receptor (TNF-R)
- HELLP** (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets*)- niedokrwistość hemolityczna, podwyższone poziomy enzymów wątrobowych, małopłytkowość
- HLA** (*Human Leukocyte Antigen*)-ludzkie zgodności tkankowej, antygeny leukocytów ludzkich,
- IDO** (*Indoleamino-2,3-dioxygenase*)-indoleamino dioksygenaza
- IFN- γ** -Interferon γ
- IL-2** (*Interleukin-2*) -Interleukina 2
- IQR** (*Interquartile Range*)- rozstęp kwartyłowy
- IUD** (*Intrauterine Device*) – wkładka wewnątrzmaciczna
- KIR2DL4** (*killer-immunoglobulin-like receptors*)- receptory immunoglobulinopodobne o charakterze glikoprotein, których ekspresja odbywa się na komórkach NK i limfocytach T
- LIF** (*Leukemia Inhibitory Factor*)-czynnik hamujący białaczkę
- MALT** (*Mucosa-associated Lymphoid Tissue*) tkanka limfatyczna błon śluzowych przewodu pokarmowego i gruczołów wydzielania wewnętrznego
- MHC** (*Major Histocompatibility Complex*)- główny układ (kompleks) antygenów zgodności tkankowej, antygeny transplantacyjne
- MMP** (*Metaloproteinases*) - metaloproteinazy
- MT** (*Metallothionein*)- metalotioneina
- NK** (*Natural Killer*)- komórki zerowe, komórki naturalnej cytotoksyczności
- NKG2D**- receptor aktywujący komórek NK (activating/triggering receptor)
- PID** (*Pelvic Inflammatory Disease*)- zapalenie narządów miednicy mniejszej
- RCAS1** (*receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*)- Białko błonowe RCAS1/EBAG9 odpowiedzialne za ucieczkę guza spod nadzoru immunologicznego organizmu macierzystego
- SD** (*standard deviation*) -odchylenie standardowe
- s-HLA-G** (*soluble HLA-G*)- rozpuszczalna izoforma antygeny HLA-G
- TGF- β** (*transforming growth factor β*) –czynnik wzrostu guza β
- Th** (*T helper lymphocyte*)- limfocyty pomocnicze
- Th3** (*helper T cells type 3*)- limfocyty pomocnicze typu 3
- TNF α** (*Tumor Necrosis factor α*)- czynnik martwicy nowotworu α
- Tr1** (*Type 1 regulatory T cells*)- limfocyty regulatorowe typu 1
- Treg** (*T regulatory cells*) – limfocyty T regulatorowe
- USG-TV** (*Transvaginal Ultrasound*) - przezpochwowe badanie ultrasonograficzne.
- VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*)- endotelialny czynnik wzrostu

SPIS RYCIN

Rycina 1.	Histogram - rozkład wieku pacjentek z ciążą pozamaciczną.....	31
Rycina 2.	Histogram- rozkład grubości endometrium pacjentek z ciążą pozamaciczną	32
Rycina 3.	Histogram -rozkład średnicy zmiany w przydatkach pacjentek z ciążą pozamaciczną	32
Rycina 4.	Histogram – rozkład względnego stężenia β -HCG w surowicy krwi pacjentek z ciążą pozamaciczną	32
Rycina 5.	Histogram – rozkład wieku pacjentek z poronieniami	34
Rycina 6.	Histogram - rozkład wieku pacjentek nieciążarnych.....	35
Rycina 7.	Analiza cytometryczna limfocytów Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$).....	38
Rycina 8.	Porównanie średniego odsetka komórek $Foxp3^+$ w subpopulacji limfocytów T $CD4^+CD25^+$ w miejscu implantacji jaja płodowego w grupie z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną.....	43
Rycina 9.	Średni odsetek komórek $Foxp3^+$ w materiale tkankowym z miejsca implantacji zarodka w niepękniętej ciąży jajowodowej (NP-J) i w doczesnej uzyskanej poprzez wyłyczkowanie jamy macicy (ECU).....	45
Rycina 10.	Średni odsetek komórek $Foxp3^+$ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P-J) i w doczesnej (ECU).....	46
Rycina 11.	Średnia liczba komórek $CD56^+$ w miejscu implantacji jaja płodowego w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej.....	47
Rycina 12.	Średnia liczba komórek $CD57^+$ w miejscu implantacji jaja płodowego w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej.....	48
Rycina 13.	Średni odsetek limfocytów T $CD8^+$ w niepękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (NP-J) i w doczesnej z wyskrobin z jamy macicy (ECU).....	50
Rycina 14.	Średnia liczby komórek $CD57^+$ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P-J) i w doczesnej z wyskrobin jamy macicy (ECU).....	51
Rycina 15.	Dodatnia korelacja liczby ciąż z odsetkiem limfocytów $CD8^+$ w niepękniętej ciąży pozamacicznej.....	53
Rycina 16.	Ujemna korelacja poziomu β -hCG z odsetkiem limfocytów $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ w ciąży pozamacicznej niepękniętej.....	53
Rycina 17.	Dodatnia korelacja poziomu β -hCG z liczbą komórek $CD56^+$ w pękniętej ciąży pozamacicznej.....	54

Rycina 18.	Dodatnia korelacja czasu trwania ciąży z liczbą komórek CD56 ⁺	55
Rycina 19.	Średnia odsetka komórek CD4 ⁺ CD25 ⁺ w miejscu implantacji zarodka w niepękniętej ciąży jajowodowej (NP), w doczesnej w poronieniu samoistnym (AB) i endometrium sekrecyjnym kobiet nieciążarnych (E).....	56
Rycina 20.	Mediana liczby komórek CD56 ⁺ w niepękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (NP) , poronieniu samoistnym (AB) i nieciążarnych endometrium sekrecyjnym (E).....	57
Rycina 21.	Mediana liczby komórek CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ w miejscu implantacji zarodka w niepękniętej ciąży jajowodowej (NP), poronieniu samoistnym (AB) i u nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E)	58
Rycina 22.	Średni odsetek limfocytów Treg w grupie z pękniętą ciążą pozamaciczną w miejscu implantacji jaja płodowego (P), poronieniu samoistnym (AB) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E).....	59
Rycina 23.	Średnia odsetka limfocytów T CD4 ⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P), poronieniu samoistnym (AB) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E).....	60
Rycina 24.	Dodatnia korelacja komórek CD4 ⁺ z limfocytami Treg w pękniętej ciąży pozamacicznej.....	60
Rycina 25.	Średnia odsetka limfocytów T CD4 ⁺ CD25 ⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P) , poronieniu samoistnym (AB) i endometrium sekrecyjnym (E).....	61
Rycina 26.	Mediana liczby komórek CD56 ⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P) , poronieniu samoistnym (AB) i nieciążarnych z endometrium sekrecyjnym (E).....	62
Rycina 27.	Mediana odsetka komórek CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ w pękniętej ciąży jajowodowej w miejscu implantacji jaja płodowego (P) , doczesnej z poronienia samoistnego (AB) i endometrium sekrecyjnym (E).....	63

SPIS TABEL

Tabela 1.	Porównanie danych klinicznych kobiet z niepękniętą (NP) i pękniętą (P) ciążą pozamaciczną.....	41
Tabela 2.	Porównanie danych klinicznych pacjentek z niepękniętą i pękniętą ciążą pozamaciczną, poronieniem samoistnym i u nieciężarnych z endometrium sekrecyjnym.....	42
Tabela 3.	Analiza średniego odsetka komórek CD4 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ , Foxp3 ⁺ w wyskrobinach w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej.....	44
Tabela 4.	Analiza średniego odsetka komórek CD4 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ w doczesnej (ECU) i miejscu implantacji zarodka w jajowodzie w niepękniętej ciąży pozamacicznej (NP-J).....	45
Tabela 5.	Analiza średniego odsetka komórek CD4 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ w wyskrobinach i miejscu implantacji zarodka w jajowodzie w pękniętej ciąży pozamacicznej.....	46
Tabela 6.	Analiza średniego odsetka komórek CD8 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ w miejscu implantacji w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej.....	48
Tabela 7.	Analiza średniej liczby komórek CD57 ⁺ , CD56 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ , CD8 ⁺ w wyskrobinach w niepękniętej (NP) i pękniętej (P) ciąży pozamacicznej....	49
Tabela 8.	Analiza średniej liczby komórek CD56 ⁺ , CD8 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD57 ⁺ w wyskrobinach z jamy macicy (ECU) i miejscu implantacji zarodka w jajowodzie w pękniętej ciąży pozamacicznej (P-J)	52
Tabela 9.	Ocena liczebności badanych komórek w grupach pacjentek z niepękniętą ciążą jajowodową (NP) w miejscu implantacji, w wyskrobinach z jamy macicy w poronieniu samoistnym (AB) oraz w endometrium sekrecyjnym (E).....	56
Tabela 10.	Ocena liczebności badanych komórek w grupach pacjentek z pękniętą ciążą jajowodową w miejscu implantacji (P), w doczesnej w poronieniu samoistnym (AB) oraz u nieciężarnych z endometrium sekrecyjnym (E)....	62

ANEKS

Informacja dla pacjentki dotycząca udziału w programie badawczym pt.

„Ocena komórek układu immunologicznego w miejscu implantacji ciąży pozamacicznej”

IMIĘ I NAZWISKO PACJENTKI.....

NUMER HISTORII CHOROBY:.....

Udział w programie:

Proponowane Pani uczestnictwo w programie badawczym jest dobrowolne i nie uzależnia się od Pani zgody na udział w badaniu żadnych działań diagnostyczno-terapeutycznych.

Finansowanie programu:

Jest realizowany przez pracowników UJCM w ramach ich pracy naukowo badawczej. Jest badaniem naukowym

Podstawowe informacje na temat programu:

Program badawczy pt „Ocena komórek układu immunologicznego w miejscu implantacji ciąży pozamacicznej” ma na celu identyfikację komórek układu immunologicznego (suresorowych, cytotoksycznych) w jajowodzie podczas implantacji tam jaja płodowego i doczesnej wraz z oceną ich miejscowej aktywności (CD 69) oraz zbadanie w miejscu zagnieżdżenia ekspresji białek (Fas, HLA-G) uczestniczących w regulacji aktywności wyżej wymienionych komórek, które ze względu na budowę chemiczną, mogą w dalszym etapie tego zjawiska znajdować się w surowicy (sFas, sHLA-G).

W tym celu po uzyskaniu zgody pacjentek, dokonana zostanie ocena preparatów tkankowych fragmentów jajowodu i doczesnej (uzyskanych śródoperacyjnie) i surowicy krwi (5ml) pobranych przed zabiegiem od pacjentek operowanych z powodu ciąży pozamacicznej (grupa badana) i mięśniaków macicy (grupa kontrolna). Tak rozpoczęte badania umożliwiłyby poznanie mechanizmów immunologicznych zaangażowanych w rozwój ciąży pozamacicznej i w perspektywie stworzyłyby szansę na znalezienie na obwodzie markera świadczącego o zagrażającym pęknięciu jajowodu co pozwoliłoby na podjęcie skutecznego leczenia w odpowiednim czasie

Zasady przeprowadzenia programu:

Udzielona przez Panią zgoda na udział w programie badawczym jest zgodą na wykorzystanie materiału tkankowego tj. surowicy krwi , doczesnej i fragmentu jajowodu pobranych od Pani podczas zabiegu operacyjnego wykonywanego z powodu ciąży pozamacicznej. W planowanym badaniu należałoby Pani do tzw grupy badanej to znaczy, że wyniki badań uzyskane od Pani byłyby porównywane do danych referencyjnych uzyskanych od pacjentek nieciążarnych operowanych z powodu mięśniaków macicy (grupa kontrolna). Z udziałem w programie nie jest związane pobieranie od Pani dodatkowego materiału tkankowego podczas procesu terapeutycznego.

Informacje dotyczące planowanego u Pani zabiegu operacyjnego zostały w dalszej części tego formularza.

Pytania i wątpliwości

Istnieje możliwość wyjaśnienia wszelkich wątpliwości poprzez zadanie pytań w bezpośredniej rozmowie z lekarzem prowadzącym program badawczy. Jako Uczestnik badania ma Pani możliwość poznania danych personalnych lekarza jego numeru telefonu, celem wyjaśnienia wątpliwości powstałych po zakończeniu rozmowy oraz zmiany decyzji dotyczącej udziału w programie.

Sposób wyrażenia zgody na udział w programie

Wyrażenie przez Panią zgody na udział w programie odbywa się poprzez wypełnienie formularza zgody.

Wypowiedzenie zgody na udział w programie

Istnieje możliwość wypowiedzenia zgody na udział w programie badawczym, niezależnie od etapu zaawansowania programu. Wycofanie się Pani z badania nie jest związane z jakimikolwiek konsekwencjami. Wymaga ona tylko poinformowania o zmianie decyzji lekarza prowadzącego oraz potwierdzeniu na formularzu zgody na udział w programie.

Zapoznałam się z treścią formularza. Bez zastrzeżeń (lub z poniższymi zastrzeżeniami) zgadzam się na mój udział w planowanym programie badawczym

.....
.....
.....

Miejscowość i data.....Podpis Pacjentki.....

INFORMACJA DLA PACJENTKI ORAZ FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA PRZEPROWADZENIE LECZENIA OPERACYJNEGO Z POWODU CIĄŻY POZAMACICZNEJ *

IMIĘ I NAZWISKO PACJENTKI.....

NUMER HISTORII CHOROBY:.....

RODZAJ SCHORZENIA I WSKAZANIA DO OPERACJI

Na podstawie przeprowadzonych dotychczas badań rozpoznano u Pani (istnieje podejrzenie)

.....

Zgodnie z zasadami współczesnej wiedzy medycznej istnieją u Pani wskazania do leczenia operacyjnego drogą laparoskopii / laparotomii

METODY LECZENIA OPERACYJNEGO

Proponowane Pani leczenie operacyjne ciąży pozamacicznej polega na otwarciu jamy brzusznej (chirurgicznym w przypadku laparotomii lub drogą laparoskopową) i wyłuszczeniu ectopicznie zagnieżdżonego jaja płodowego z pozostawieniem jajowodu lub w razie nieodwracalnego uszkodzenia- wycięciem jajowodu (salpingectomy) po stronie jednoimiennej. Zabieg ten przeprowadza się w znieczuleniu ogólnym.

Po szczegółowej analizie Pani przypadku proponujemy u Pani leczenie operacyjne polegające na :

.....

Celem proponowanej operacji jest

.....

.....

.....

Alternatywne metody leczenia ciąży pozamacicznej obejmują:

.....

.....

MOŻLIWOŚĆ WYSTĄPIENIA POWIKŁAŃ:

Żaden lekarz nie jest w stanie zagwarantować pełnego sukcesu zastosowanego leczenia oraz całkowitego braku ryzyka związanego z zabiegiem operacyjnym. Powikłania związane z tą operacją mogą m.in. polegać na:

- śródooperacyjnym uszkodzeniu jelit, moczowodu lub pęcherza moczowego
- wtórnym krwawieniu wymagającym przetoczenia krwi i/lub ponownej operacji
- niedrożności pooperacyjnej jelit
- zapaleniu otrzewnej,
- uszkodzeniu nerwów powikłaniach obszarze powłok brzucha lub ściany miednicy
- powikłaniach zakrzepowo-zatorowych,
- nietrzymaniu moczu,
- zaburzeniach w opróżnianiu pęcherza moczowego,
- zakażeniu rany pooperacyjnej
- bólach brzucha w wyniku powstania zrostów pooperacyjnych

Ciężkie zagrażające życiu lub śmiertelne powikłania proponowanego Pani zabiegu operacyjnego zdarzają się rzadko

ROKOWANIE

Prawdopodobieństwo powodzenia proponowanej operacji jest w Pani przypadku:

.....

Jeśli nie wyrazi Pani zgody na proponowany zabieg rokowanie co do Pani stanu zdrowia jest następujące:

.....

ROZMOWA Z LEKARZEM

Prosimy, aby Pani zapytała nas o wszystko co chciałaby Pani wiedzieć w związku z planowanym leczeniem i projektem badawczym. Chętnie odpowiemy na wszystkie Pani pytania.

ZASTRZEŻENIA PACJENTKI CO DO PROPONOWANEGO LECZENIA OPERACYJNEGO I ZWIĄZANEGO Z NIM UDZIAŁU W BADANIU NAUKOWYM:

.....

.....

.....

OŚWIADCZENIE PACJENTKI:

W pełni zrozumiałam informacje zawarte w tym formularzu oraz przekazane mi podczas rozmowy z lekarzem. Zapewniono mi nieograniczone możliwości zadawania pytań i na wszystkie udzielono mi odpowiedzi i wyjaśnień wyjaśnień sposób satysfakcjonujący.

Po zapoznaniu się z treścią tego formularza i rozmowie wyjaśniającej z Panią.....
spełnione zostały moje wymagania co do informacji na temat :

- rozpoznania
- proponowanych metod leczniczych
- wyników leczenia operacyjnego
- rokowania
- ewentualnych powikłań okołoperacyjnych

Znane mi są możliwe powikłania związane z tym zabiegiem operacyjnym.

**Bez zastrzeżeń (lub z poniższymi zastrzeżeniami) zgadzam się na przeprowadzenie u mnie
Następującego zabiegu operacyjnego**

.....
.....
Oraz jego ewentualne zmiany lub rozszerzenia, które okażą się niezbędne w trakcie przeprowadzenia operacji w razie wystąpienia niebezpieczeństwa utraty życia, ciężkiego uszkodzenia ciała lub ciężkiego rozstroju zdrowia

Data

Podpis lekarza

Podpis pacjentki

*Formularz informacji dla pacjentki i świadomej zgody został opracowany w oparciu o wytyczne Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (PTG)