

mgr Michał Zych

**Wpływ hormonów płciowych na cząsteczki kontrolujące
układ odpornościowy u kobiet dotkniętych problemem
poronień oraz kobiet rodzących bez komplikacji**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

Promotor pomocniczy: dr n. med. Filip Dąbrowski

Zakład Immunologii Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny



**WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY**

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022 r.

**Praca finansowana ze środków statutowych Zakładu Immunologii Klinicznej
oraz finansowania przyznanego w ramach grantu młodego badacza nr
MB/M/32(57)**

**Wyniki badań wstępnych do przeprowadzonej pracy doktorskiej zostały
opublikowane w pracy:** *Zych M, Roszczyk A, Kniotek M, Dąbrowski F, Zagożdżon R.
Differences in Immune Checkpoints Expression (TIM-3 and PD-1) on T Cells in Women with
Recurrent Miscarriages-Preliminary Studies. J Clin Med. 2021;10(18):4182.*

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Panu dr hab. n. med. Radosławowi Zagożdżonowi za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie prowadzenia badań oraz przygotowywania pracy doktorskiej, cierpliwość i wyrozumiałość, oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą.

Chciałem wyrazić głęboką wdzięczność Panu dr n. med. Filipowi Dąbrowskiemu za nieocenioną pomoc w pozyskiwaniu materiału badawczego, mimo napotkanych trudności. Pragnę również podziękować za pomoc w redagowaniu pracy oraz udzielone wskazówki podczas realizacji projektu.

Chciałbym również wyrazić najszersze podziękowania wszystkim pracownikom Zakładu Immunologii Klinicznej za pomoc w pokonywaniu napotkanych trudności podczas realizacji badań, wsparcie podczas całego czasu realizacji studiów doktorskich jak i pracy w Zakładzie. W szczególności mojemu nieocenionemu przyjacielowi Aleksandrowi Roszczykowi, Monice Kniotek oraz Beacie Kalecie.

Chciałabym również podziękować rodzinie oraz przyjaciołom, za nieustanną motywację oraz wsparcie w realizacji marzeń oraz planów.

Michał Zych

Spis treści

Spis treści.....	1
Spis rycin.....	6
Wykaz stosowanych skrótów	11
Streszczenie w języku polskim.....	15
Streszczenie w języku angielskim	18
1. Wstęp.....	21
1.1 Błonowe cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy.....	22
1.1.1 PD1 - Programmed cell death protein	22
1.1.2 TIM-3 - T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3.....	24
1.1.3 LAG-3 - Lymphocyte activation gene-3.....	26
1.1.4 TIGIT- T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	27
1.1.5 VISTA- V-domain Ig suppressor of T cell activation.....	29
1.2 Rozpuszczalne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy oraz ich ligandy.....	30
1.2.1 Rozpuszczalne CTLA-4, CD28, CD80, CD86	30
1.2.2 Rozpuszczalne PD1, PD-L1, PD-L2	33
1.2.3 Rozpuszczalne TIM-3, Gal-9, LAG-3.....	36
1.2.4 Rozpuszczalne CD155, CD112.....	37
1.2.5 Rozpuszczalne HVEM.....	39
1.3 Rola immunologii w ciąży oraz podczas poronień	40
1.4 Wpływ hormonów na układ odpornościowy	42
1.4.1 Wpływ progesteronu na komórki układu odporności	42
1.4.2 Wpływ 17 β -estradiolu na komórki układu odpornościowego.....	45
1.4.3 Wpływ dihydrotestosteronu na komórki układu odporności.....	48
1.5 Definicja poronienia nawykowego.....	52

1.5.1	Przyczyny poronień	52
1.5.2	Zaburzenia immunologiczne	53
1.5.2.1	Przeciwciała przeciwjądrowe	54
1.5.2.2	Przeciwciała przeciwfosfolipidowe	54
1.5.2.3	Przeciwciała przeciwplemnikowe	55
1.5.3	Rozpoznawanie antygenów HLA ojca przez limfocyty matki	56
2.	Cel pracy	57
3.	Materiał i metody	58
3.1	Grupy badane	59
3.1.1	Kobiety ciężarne	59
3.1.2	Kobiety po poronieniu z rozpoznanymi nawracającymi poronieniami	59
3.1.3	Kobiety niebędące w ciąży	59
3.2	Analiza grup na podstawie przeprowadzonych ankiet	59
3.3	Metody	64
3.3.1	Cytometria przepływowa	64
3.3.2	Luminex	65
3.3.3	Izolacja materiału PBMC	66
3.3.4	Wybór stężeń hormonów do hodowli komórkowych	66
3.3.5	Przygotowanie roztworów hormonów do założenia hodowli	69
3.3.6	Zakładanie hodowli	70
3.3.7	Barwienie cytometryczne – PBMC wyizolowane z krwi	71
3.3.8	Barwienie cytometryczne – PBMC z hodowli	72
3.3.9	Schemat bramkowania w cytometrii przepływowej	73
3.3.10	Przygotowanie próbek do analizy z wykorzystaniem urządzenia Luminex	77
3.3.11	Analiza próbek z wykorzystaniem urządzenia Luminex	78

3.3.12	Wykonanie oznaczenia sGal-9 metodą ELISA	78
3.3.13	Statystyka	79
4	Wyniki	80
4.1	Analiza ekspresji cząstek kontrolujących układ odpornościowy pomiędzy badanymi grupami.	80
4.1.1	Podsumowanie badań dotyczących ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w badanych grupach.....	92
4.2	Porównanie stężeń rozpuszczalnych cząstek kontrolujących układ odpornościowy pomiędzy badanymi grupami.....	93
4.2.1	Podsumowanie badań nad rozpuszczalnymi cząsteczkami kontrolującymi układ odpornościowy oraz ich ligandami.....	99
4.3	Analiza wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowlach założonych z komórek jednojądrzastych wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami oraz kobiet ciężarnych.....	100
4.3.1	Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet ciężarnych. (hodowla nie stymulowana OKT-3)	100
4.3.2	Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet ciężarnych. (hodowla stymulowana OKT-3)	109
4.3.3	Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet z poronieniami nawykowymi. (hodowla nie stymulowana OKT-3).....	118
4.3.4	Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet z poronieniami nawykowymi. (hodowla stymulowana OKT-3).....	128

4.3.5	Ocena możliwości wykorzystania hormonów płciowych w terapii wykrytych zaburzeń w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u kobiet z poronieniami nawykowymi.....	137
5	Dyskusja.....	140
5.1	Porównanie otrzymanych wyników ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na powierzchni PBMC pomiędzy badanymi grupami.	140
5.1.1	Ekspresja PD1	141
5.1.2	Ekspresja TIM-3.....	143
5.1.3	Ekspresja LAG-3	147
5.1.4	Ekspresja TIGIT	148
5.1.5	Ekspresja VISTA.....	149
5.2	Porównanie pomiędzy badanymi grupami otrzymanych wyników stężeń rozpuszczalnych cząstek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów w surowicy pobranej od pacjentek.....	151
5.2.1	Rozpuszczalne sCTLA-4, sCD28, sCD80 and sCD86.....	151
5.2.2	Rozpuszczalne sTIM-3, sGal-9.....	152
5.2.3	Rozpuszczalne sPD1, sPD-L1, sPD-L2.....	154
5.2.4	Rozpuszczalne sHVEM	156
5.2.5	Rozpuszczalne sLAG-3, sVISTA.....	157
5.2.6	Rozpuszczalne sCD112, sCD155.....	158
5.3	Omówienie danych dotyczących wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy.	159
5.3.1	Wpływ progesteronu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy. 159	
5.3.2	Wpływ β -estradiolu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy. 167	

5.3.3	Wpływ dihydrotestosteronu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy.....	174
6	Wnioski	180
7	Bibliografia.....	182
	Spis tabel	208
	Zgoda komisji Bioetycznej.....	213

Spis rycin

Rycina 1: Rozkład wieku i BMI między grupami. Kobiety z poronieniami.	60
Rycina 2: Precyzyjne przedstawienie liczby poronień przed przyjęciem do szpitala w grupie kobiet z poronieniami.	61
Rycina 3: Przedstawienie liczby przebytych ciąż w grupie kobiet ciężarnych.	62
Rycina 4: Przedstawienie liczby przebytych ciąż w grupie kobiet niebędących w ciąży.	62
Rycina 5: Częstość występowania objawów prodromalnych (wymioty, nudności, ból piersi) w grupach: kobiet z poronieniami.	63
Rycina 6: Ocena wpływu różnych stężeń progesteronu na ekspresję cząsteczek PD1 oraz TIM-3 na limfocytach CD4 ⁺ oraz CD8 ⁺ . Badania wstępne do przeprowadzenia hodowli komórkowych.	67
Rycina 7: Ocena wpływu różnych stężeń 17β-estradolu na ekspresję cząsteczek PD1 oraz TIM-3 na limfocytach CD4 ⁺ oraz CD8 ⁺ . Badania wstępne do przeprowadzenia hodowli komórkowych.	68
Rycina 8: Ocena wpływu różnych stężeń Dihydrotestosteronu na ekspresję cząsteczek PD1 oraz TIM-3 na limfocytach CD4 ⁺ oraz CD8 ⁺ . Badania wstępne do przeprowadzenia hodowli komórkowych.	68
Rycina 9: Schemat analizy cytometrycznej limfocytów. Kanał PE służył w zależności od próbki do oznaczanie cząsteczek TIM-3 oraz TIGIT, a kanał AmCyan do oznaczania cząsteczek PD1, LAG-3 oraz VISTA.	74
Rycina 10: Schemat analizy cytometrycznej komórek NK oraz NKT. Kanał PE służył w zależności od próbki do oznaczanie cząsteczek TIM-3 oraz TIGIT, a kanał AmCyan do oznaczania cząsteczek PD1, LAG-3 oraz VISTA.	76
Rycina 11: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy PD1 na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej.	81
Rycina 12: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy TIM-3 na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej.	83
Rycina 13: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy LAG-3 na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej.	85

Rycina 14: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy TIGIT na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej.....	87
Rycina 15: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy VISTA na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej.	89
Rycina 16: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujące układ odpornościowy oraz ich ligandów (sCTLA-4, sCD28, sCD86, sCD80) w surowicach.....	93
Rycina 17: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujące układ odpornościowy oraz ich ligandów (sPD1, sPD-L1, sPD-L2,) w surowicach.	94
Rycina 18: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (sVISTA, sHVEM) w surowicach..	95
Rycina 19: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń rozpuszczalnych ligandów (sNectin-2, sCD155) w surowicach.	96
Rycina 20: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujące układ odpornościowy (sTIM-3, sLAG-3) w surowicach.	97
Rycina 21: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężenia cząsteczki sGal-9 w surowicach.	98
Rycina 22: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-D) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.....	101
Rycina 23: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.....	103
Rycina 24: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.	105

Rycina 25: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.	107
Rycina 26: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.	108
Rycina 27: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-C)-wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (D) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.	110
Rycina 28: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.	112
Rycina 29: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.	114
Rycina 30: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.	116

Rycina 31: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.	117
Rycina 32: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-D) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.	119
Rycina 33: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.	121
Rycina 34: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.	123
Rycina 35: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.	125
Rycina 36: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.	127

Rycina 37: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-C) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (D) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.....	129
Rycina 38: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.....	130
Rycina 39: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.....	132
Rycina 40: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.....	134
Rycina 41: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.....	136

Wykaz stosowanych skrótów

- Akt – kinaza białkowa B (ang. protein kinase B)
- APC - komórki prezentujące antygeny (ang. antigen-presenting cells)
- AML – ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia)
- ANA - przeciwciała przeciwjądrowe (ang. antinuclear antibodies)
- APL - przeciwciała przeciwfosfolipidowe (ang. antiphospholipid antibodies)
- AR – receptor androgenowy (ang. androgen receptor)
- ASA – przeciwciała przeciwplemnikowe (ang. antisperm antibodies)
- ATP – adenozyntrifosforan (ang. adenosine triphosphate)
- BAT-3 – transkrypt 3 związany z HLA-B (ang. HLA-B-associated transcript 3)
- BMI – wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
- CEACAM - białek antygeny karcynoembrionalnego (ang. carcinoembryonic antigen)
- Cox2 – cyklooksygenaza indukowana (ang. cyclooxygenase)
- CTLA-4 - antygen-4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. cytotoxic T cell antigen 4)
- DHT – dihydrotestosteron (ang. dihydrotestosterone)
- dNK – doczesnowe komórki naturalni zabójcy (ang. decidual natural killer cells)
- dNKT – doczesnowe limfocyty NKT (ang. decidual natural killer T cells)
- ELISA - test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
- ER – receptor estrogenowy (ang. estrogen receptor)
- FYN – protoonkogenowa kinaza tyrozynowo-białkowa FYN (ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn)
- Foxp3 – czynnik transkrypcyjny Foxp3 (ang. forkhead box P3)
- GATA-3 – czynnik transkrypcyjny GATA-3

GP1R - receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G 1 (ang. G protein-coupled estrogen receptor 1)

HIV - Ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)

HVEM- mediator wejścia wirusa opryszczki (ang. Herpesvirus entry mediator)

IBD- nieswoiste zapalenie jelit (ang. inflammatory bowel disease)

ICP – cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy (ang. Immune checkpoints)

IDO - 2,3-dioksygenaza indoloaminy 1 (ang. Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase)

IFN- γ - interferon gamma (ang. interferon gamma)

IL-2 - interleukina-2

IL-4 - interleukina 4

IL-5 - interleukina 5

IL-10 – interleukina 10

iNOS - Syntaza tlenku azotu (ang. Nitric oxide synthases)

LAG-3 - Gen 3 aktywujący limfocyty (ang. Lymphocyte-activation gene 3)

LPS – lipopolisacharyd (ang. Lipopolysaccharides)

MAPK – kinaza aktywowana mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase)

MHC - Główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)

mRNA - matrycowy RNA (ang. messenger RNA)

NF κ B - czynnik NF κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NK – komórki naturalni zabójcy (ang. Natural killer cells)

NKT – Limfocyty NKT (ang. Natural killer T cells)

PAK4 – kinaza aktywowana przez białko p21 4 (ang. p21 activated kinase 4)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

PD1 - Białko programowanej śmierci 1 (ang. Programmed cell death protein 1)

PD-L1 - Ligand białka programowanej śmierci 1 (ang. Programmed cell death ligand 1)

PD-L2- Ligand białka programowanej śmierci 2 (ang. Programmed cell death ligand 2)

PI3K – kinaza fosfatidyloinozytolu

PR – receptor dla progesteronu (ang. progesterone receptor)

sCD112 – rozpuszczalna forma Nektyny 2 (ang. Soluble Nectin 2)

sCD155 – rozpuszczalny receptor dla poliovirusa (ang. Soluble Poliovirus receptor-related 2)

sCTLA-4 – rozpuszczalny antygen-4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. Soluble cytotoxic T cell antigen 4)

sHVEM- rozpuszczalny mediator wejścia wirusa opryszczki (ang. Soluble Herpesvirus entry mediator)

sLAG-3 - rozpuszczalny Gen 3 aktywujący limfocyty (ang. Soluble Lymphocyte-activation gene 3)

SLE - Toczeń rumieniowaty układowy (ang. systemic lupus erythematosus)

sPD1 – rozpuszczalne białko programowanej śmierci 1 (ang. Soluble programmed cell death protein 1)

sPD-L1 – rozpuszczalny ligand białka programowanej śmierci 1 (ang. Soluble programmed cell death ligand 1)

sPD-L2- rozpuszczalny ligand białka programowanej śmierci 2 (ang. Soluble programmed cell death ligand 2)

sTIM-3- rozpuszczalna Immunoglobulina komórek T i białko 3 zawierające domenę mucyny (ang. Soluble T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)

Th1 – Limfocyty T pomocnicze typu 1 (ang. Helper T cells type 1)

Th2 – Limfocyty T pomocnicze typu 2 (ang. Helper T cells type 2)

Th17 – Limfocyty T pomocnicze typu 17 (ang. Helper T cells type 17)

TIGIT - Immunoreceptor limfocytów T z domeną ITIM (ang. T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)

TIM-3- Immunoglobulina komórek T i białko 3 zawierające domenę mucyny (ang. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)

TNF – czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β)

Treg – Limfocyty T regulatorowe (ang. Regulatory T cells)

VISTA- Supresor aktywacji limfocytów T (ang. V-domain Ig suppressor of T cell activation)

qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. quantitative polymerase chain reaction)

Streszczenie w języku polskim

Wstęp: W otaczającym nas świecie coraz większym wyzwaniem dla społeczeństwa są trudności w posiadaniu potomstwa. Jednym z elementów tego zjawiska są poronienia, które stanowią przyczynę niepowodzenia w co siódmej ciąży. Według definicji, gdy dochodzi do dwóch lub więcej poronień przed 22 tygodniem ciąży w tym samym stosunku partnerskim, wtedy mówimy o poronieniach nawykowych, które dotyczą około 5% par starających się o potomstwo i problem ten staje się coraz bardziej zauważalny wśród społeczeństwa. Coraz częściej jako przyczynę poronień uznaje się nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu immunologicznego. U kobiet z poronieniami nawykowymi w krwi obwodowej oraz tkankach doczesnej zauważono chociażby podwyższoną ilość komórek NK, obniżoną ilość limfocytów T regulatorowych, czy zachwianie równowagi pomiędzy ilością i funkcjonowaniem limfocytów T pomocniczych typu 1 oraz 2. Dane literaturowe wskazują, że dla prawidłowego przebiegu ciąży niezbędna jest równowaga pomiędzy aktywacją, a wyciszeniem reakcji układu odpornościowego. Odpowiedź komórkowa jest regulowana przez serię skomplikowanych mechanizmów zaczynając od eliminowania autoreaktywnych limfocytów w grasicy, po wyciszenie aktywowanych limfocytów w miejscu stanu zapalnego.

Immunologiczne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy, nazywane immunologicznymi punktami kontroli, możemy podzielić na negatywne (kohamujące) lub dodatnie (kostymulujące). Odgrywają one istotną rolę w regulacji i utrzymaniu homeostazy immunologicznej. Są szeroko badane w kontekście przywrócenia reaktywności immunologicznej na komórki nowotworowe, wykorzystania ich potencjału w leczeniu chorób autoimmunologicznych, czy też w zapobieganiu procesom odrzucania przeszczepionych narządów. Receptory kohamujące po związaniu się z ligandami mogą aktywnie dostarczać sygnały prowadzące do wyciszenia aktywacji limfocytów T lub równoważenia sygnałów stymulujących. Ponadto receptory kohamujące w matczyńskich limfocytach T promują stan anergii, który ostatecznie prowadzi do tolerancji immunologicznej względem płodu, która stanowi kluczowy element dla prawidłowego rozwoju ciąży. Cząsteczki kontrolujące mogą odgrywać znaczącą rolę w kontekście poronień. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych (myszach) wykazały, że zablokowanie ekspresji genu dla Tim-3 lub PD1 mogło przyczynić się do poronienia u myszy

wcześniej prawidłowo rodzących. Dotychczasowe badania określają tylko poszczególne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy na pojedynczych subpopulacjach limfocytów.

Na obecną chwilę ilość terapii dla kobiet z poronieniami nawykowymi jest niewielka. Jedną z terapii jest podawanie pacjentkom progesteronu, ale mechanizm jego działania na poprawę kondycji ciąży u tych kobiet nadal pozostaje nieznany, a potwierdzenie skuteczności terapii nadal pozostaje badana. Wiadomo, że hormony płciowe wpływają w układzie odpornościowym zarówno na odpowiedź humoralną, jak i komórkową. Dane literaturowe wskazują, że podawanie hormonów płciowych ma istotny wpływ na funkcjonowanie limfocytów T, czy komórek NK.

W celu lepszego zrozumienia roli i funkcji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy, w poronieniach nawykowych oraz prawidłowej ciąży, w obecnym projekcie dokonano oceny ekspresji poszerzonego zestawu cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy: PD1, TIM-3, LAG-3, VISTA oraz TIGIT. Badania te wykonano na jednocześnie na subpopulacjach limfocytów T pomocniczych, cytotoksycznych oraz regulatorowych, ale również na komórkach NK oraz NKT. Dodatkowo w ramach projektu wykonano oznaczenie rozpuszczalnych form cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów. Uzyskane dane mogą przyczynić się do wyznaczenia parametrów, które mogą być wykorzystane w diagnostyce poronień nawykowych. W projekcie przeprowadzono również badanie wpływu hormonów płciowych takich jak: progesteron, 17β -estradiol oraz dihydrotestosteron na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na limfocytach T oraz komórkach NK oraz NKT. Uzyskane dane być może pozwolą na wskazanie kierunku, który przybliży znalezienie skutecznej terapii dla kobiet z poronieniami nawykowymi lub wyjaśni mechanizm w jakim terapia hormonalna działa u kobiet z poronieniami nawykowymi.

Materiały i metody: W badaniach brały udział trzy grupy kobiet: kobiety z poronieniami nawykowymi, kobiety w ciąży oraz kobiety nie będące w ciąży, u których wcześniej ciążę rozwijały się prawidłowo. Do oceny obecności cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego wykorzystano metodę cytometrii przepływową. Natomiast stężenia rozpuszczalnych form cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów zostały oznaczone przy wykorzystaniu platformy Luminex. Hodowle komórkowe stymulowane hormonami płciowymi zostały założone z komórek jednojądrzastych

wyzolowanych z krwi obwodowej pobranej od uczestników badania. Po 48-godzinnej stymulacji w temperaturze 37°C w cieplarni dokonano oznaczenia obecności cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Wyniki: W wyniku prowadzonych badań wykazano różnicę w ekspresji PD1, LAG-3 oraz VISTA na subpopulacjach limfocytów T dodatkowo wykazaliśmy różnicę w ekspresji TIM-3 na komórkach NK oraz limfocytach T cytotoksycznych pomiędzy kobietami z poronieniami nawykowymi a kobietami ciężarnymi. Również stężenia rozpuszczalnych form cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy takich jak sGal-9, sTIM-3, sLAG-3, sCD80, sCD86, sCD112, sCD155, sVISTA okazały się różne pomiędzy badanymi grupami. Wykazano również, że wśród testowanych hormonów płciowych największy wpływ na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy ma progesteron w stężeniu 500 ng/ml.

Wnioski: Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do ustalenia nowych parametrów (biomarkerów), których ocena może pozwolić na lepszą diagnostykę u kobiet z poronieniami nawykowymi, przez co zwiększyć szansę na prawidłowy rozwój ciąży. Wykazane zmiany po stymulacji hormonami płciowymi wykazują tendencję niwelującą wykryte zaburzenia w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach kobiet z poronieniami nawykowymi względem kobiet z prawidłowo rozwijającą się ciążą. Zebrane dane dotyczące wpływu hormonów płciowych na komórki układu odpornościowego mogą pozwolić na stworzenie terapii dla kobiet z poronieniami nawykowymi oraz wyjaśnić, w jaki sposób hormony płciowe wpływają na komórki układu odpornościowego w trakcie rozwoju ciąży.

Streszczenie w języku angielskim

Title: The influence of sex hormones on immune checkpoint expression in women suffering from miscarriage and women giving birth without complications.

Introduction: In the world around us, difficulties in having children are an increasing challenge for society. One of the elements of this phenomenon are miscarriages, which are the cause of failure in every seventh pregnancy. According to the definition, when there are two or more miscarriages before the 22th week of pregnancy in the same partner relationship, then we are talking about recurrent miscarriages, which affect about 5% of couples trying to conceive, and this problem is becoming more and more noticeable among the public. Increasingly, abnormalities in the functioning of the immune system are recognized as the one of the reasons of miscarriages. In women with recurrent miscarriages, in peripheral blood and decidual tissues, for example, an increased number of NK cells, a decreased number of regulatory T lymphocytes, or an imbalance between the number and functioning of T helper lymphocytes, type 1 and 2, have been noticed. Literature data indicate that a balance between activation and suppression of the immune system is essential for the proper course of pregnancy. The cellular response is regulated by a complex series of mechanisms, ranging from elimination of autoreactive lymphocytes in the thymus to silencing of activated lymphocytes at the site of inflammation. Immunological molecules that control the immune system, called immune checkpoints, can be classified as negative (co-inhibitory) or positive (co-stimulatory). They play an important role in regulating and maintaining immune homeostasis. They are widely studied in the context of restoring immune reactivity to cancer cells, using their potential in the treatment of autoimmune diseases, or in preventing the rejection of transplanted organs. Co-inhibitory receptors, when bound to ligands, can actively provide inhibitory signals to silence T cell activation or to balance stimulating signals. In addition, co-inhibitory receptors on maternal T cells promote an anergic state that ultimately leads to fetal immune tolerance, which is a key element for normal pregnancy development. The controlling molecules can play a significant role in the context of miscarriage. Studies in animal models (mice) have shown that blocking the expression of the gene for Tim-3 or PD1 could have contributed to miscarriage in mice previously giving birth properly. Research to date identifies only individual molecules that control the immune system on individual subpopulations of lymphocytes. At the moment, the amount of therapy for women with recurrent miscarriages is slight. One of the

treatments is to administer progesterone to patients, but the mechanism of its action on improving the condition of pregnancy in these women is still unknown, and confirmation of the effectiveness of the therapy is still under investigation. Sex hormones are known to influence both humoral and cellular responses in the immune system. Literature data indicate that the administration of sex hormones has a significant impact on the functioning of T lymphocytes or NK cells.

To better understand the role and function of immune-controlling molecules in recurrent miscarriages and normal pregnancy, this project assessed the expression of an extended set of immune checkpoints: PD1, TIM-3, LAG-3, VISTA and TIGIT. These studies were performed simultaneously on subpopulations of helper, cytotoxic and regulatory T lymphocytes, as well as NK and NKT cells. Additionally, the project investigated the soluble forms of immune checkpoints and their ligands. The obtained data may contribute to the determination of parameters that can be used in the diagnosis of habitual miscarriages. The project also investigated the effect of sex hormones such as: progesterone, 17 β -estradiol and dihydrotestosterone on the expression of immune checkpoints on T lymphocytes as well as NK and NKT cells. The obtained data may allow to indicate the direction that will bring us closer to finding an effective therapy for women with recurrent miscarriages or explain the mechanism in which hormone therapy works in women with recurrent miscarriages.

Materials and methods: Three groups of women participated in the research: women with recurrent miscarriages, pregnant women and non-pregnant women, whose pregnancies previously developed properly. Flow cytometry was used to assess the presence of immune checkpoints on cells of the immune system. On the other hand, the concentrations of soluble forms of immune checkpoints and their ligands were determined using the Luminex platform. Sex hormone-stimulated cell cultures were established from mononuclear cells isolated from peripheral blood, collected from study participants. After 48 hours of stimulation at 37° C in an incubator, the presence of immune checkpoints was determined by flow cytometry.

Results: As a result of the conducted research, the expression of PD1, LAG-3 and VISTA was shown differently on T lymphocyte subpopulations, we additionally showed a difference in the expression of TIM-3 on NK cells and cytotoxic T lymphocytes between women with recurrent miscarriages and pregnant women. Also, the concentrations of soluble forms of immune checkpoints, such as sGal-9, sTIM-3, sLAG-3, sCD80, sCD86, sCD112, sCD155, sVISTA turned

out to be different between the studied groups. It has also been shown that progesterone at a concentration of 500 ng / ml has the greatest influence on the expression of immune checkpoints among the tested sex hormones.

Conclusions: The conducted research may contribute to the establishment of new parameters (biomarkers), the evaluation of which may allow for better diagnosis in women with recurrent miscarriages, thus increasing the chance for the proper development of pregnancy. The demonstrated changes after stimulation with sex hormones show a tendency to eliminate the detected disturbances in the expression of immune checkpoints on the cells of women with recurrent miscarriages in relation to women with properly developing pregnancy. The collected data on the influence of sex hormones on the cells of the immune system may allow the development of a therapy for women with recurrent miscarriage and explain how sex hormones influence the cells of the immune system during the development of pregnancy.

1. Wstęp

W otaczającym nas świecie coraz większym wyzwaniem dla społeczeństwa są trudności w posiadaniu potomstwa. Jednym elementem tego zjawiska są poronienia, które stanowią przyczynę niepowodzenia w co siódmej ciąży [1]. Według definicji, gdy dochodzi do dwóch lub więcej poronień przed 22 tygodniem ciąży w tym samym związku partnerskim, wtedy mówimy o poronieniach nawykowych, które dotyczą około 5% par starających się o potomstwo i problem ten staje się coraz bardziej zauważalny wśród społeczeństwa [2]. Coraz częściej jako przyczynę poronień uznaje się nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu immunologicznego. U kobiet z poronieniami nawykowymi w krwi obwodowej oraz tkankach doczesnej zauważono chociażby podwyższoną ilość komórek NK, obniżoną ilość limfocytów T regulatorowych, czy zachwianie równowagi pomiędzy ilością i funkcjonowaniem limfocytów T pomocniczych typu 1 oraz 2 [2, 3]. Dane literaturowe wskazują, że dla prawidłowego przebiegu ciąży niezbędna jest równowaga pomiędzy aktywacją a wyciszeniem reakcji układu odpornościowego [4]. Odpowiedź komórkowa jest regulowana przez serię skomplikowanych mechanizmów zaczynając od eliminowania autoreaktywnych limfocytów w grasicy, po wyciszenie aktywowanych limfocytów w miejscu stanu zapalnego [5, 6]. Immunologiczne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy, nazywane immunologicznymi punktami kontroli, możemy podzielić na negatywne (kohamujące) lub dodatnie (kostymulujące) [5]. Odgrywają one istotną rolę w regulacji i utrzymaniu homeostazy immunologicznej. Są szeroko badane w kontekście przywrócenia reaktywności immunologicznej na komórki nowotworowe, wykorzystania ich potencjału w leczeniu chorób autoimmunologicznych, czy też w zapobieganiu procesom odrzucaniu przeszczepionych narządów [5, 6]. (rycina 1) Cząsteczki będące kohamującymi cząsteczkami kontrolującymi są odpowiedzialne za regulowanie funkcji limfocytów takich jak: proliferacja, wydzielanie cytokin, chemokin, granzymów B, czy perforyn [5, 7]. Odgrywają one również kluczową rolę w ograniczaniu aktywacji limfocytów, a więc na przykład zapobiegają rozwojowi chorób autoimmunologicznych [5]. Receptory kohamujące po związaniu się z ligandami mogą aktywnie dostarczać sygnały hamujące do wyciszenia aktywacji limfocytów T lub równoważenia sygnałów stymulujących [6]. Ponadto receptory kohamujące w matczyńskich limfocytach T promują stan anergii, który ostatecznie prowadzi do tolerancji immunologicznej względem płodu, która stanowi kluczowy element dla prawidłowego rozwoju ciąży [7]. Hamujące cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy zapobiegają nadmiernej aktywacji limfocytów T, mogą również pośrednio

wpływać na limfocyty T poprzez promowanie cech supresyjnych na limfocytach T regulatorowych oraz wpływać na funkcjonowanie komórek prezentujących antygen [7]. Częsteczki kontrolujące mogą odgrywać znaczącą rolę w kontekście poronień. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych (myszach) wykazały, że zablokowanie ekspresji genu dla Tim-3 lub PD1 mogło przyczynić się do poronienia u myszy wcześniej prawidłowo rodzących [8]. Dane literaturowe wskazują również, że występują różnice w ekspresji cząsteczek TIM-3 oraz PD1 na limfocytach kobiet dotkniętych problemem poronień nawykowych względem limfocytów kobiet rodzących bez komplikacji [9, 10].

1.1 Błonowe cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy

1.1.1 PD1 - Programmed cell death protein

Białko programowanej śmierci 1 - Programmed cell death protein 1 (PD1). Białko to należy do rodziny B7-CD28. To międzybłonowe białko występuje na powierzchni limfocytów B, limfocytów T pomocniczych, limfocytów T cytotoksycznych, komórek NK oraz komórek NKT. Badania wykazały jego obecność również na monocytach oraz komórkach dendrytycznych [11-13]. PD1 pełni rolę strażnika późnej odpowiedzi immunologicznej. Po przyłączeniu się ligandu do receptora wysyłany jest do jądra komórkowego sygnał hamujący kaskadę immunologiczną, przez co dochodzi do zahamowania procesów odpowiedzi immunologicznej [14].

Znane są dwa ligandy białka programowanej śmierci: ligand białka programowanej śmierci 1 – programmed cell death ligand 1 (PD-L1) oraz ligand białka programowanej śmierci 2 – programmed cell death ligand 2 (PD-L2), obydwa ligandy należą do rodziny białek B7 [13]. Ligand PD-L1 występuje na powierzchni komórek prezentujących antygeny (APC), ale również spotykany jest na powierzchni komórek serca, śledziony, śródbłonna naczyniowego, wątroby, keratynocytów czy na komórkach syncytiotrofoblastu łożyska [12]. Występowanie PD-L1 na części tkanek ma charakter konstytutywny, ale na bardzo wielu tkankach może być indukowana np. cytokinami prozapalnymi, zwłaszcza IFN- γ [12]. Rozpowszechniona ekspresja ligandu PD-L1 na tkankach obwodowych ma za zadanie ochronę komórek przed autoagresją ze strony układu

odpornościowego [14, 15]. Ekspresja ligandu PD-L2 ograniczona jest głównie do komórek układu odpornościowego, a zwłaszcza do monocytów oraz komórek dendrytycznych [13, 15].

Rolą białka PD1 jest ochrona organizmu przed nadmierną odpowiedzią układu odporności na własne antygeny. Początkowo białko to było znane jako marker komórek „wycieńczonych”. Komórki, które prezentują na swojej błonie PD1 w dużej ilości nie są w stanie odpowiedzieć na sygnały aktywacji wysyłane przez inne limfocyty czy komórki prezentujące antygeny [13, 16]. Połączenie się receptora PD1 z ligandem reguluje przebieg procesów zapalnych poprzez zahamowanie nadmiernej aktywacji limfocytów oraz wytworzenie tolerancji na czynniki, antygeny powodujące stan zapalny [17]. Aktywacja receptora PD1 powoduje zahamowanie aktywności kinazy 3-fosfatydilinozytolu (PI3K), która powoduje zmniejszenie aktywności kinazy białkowej B (Akt). Zahamowanie tego szlaku powoduje zmniejszenie wytwarzania cytokin prozapalnych IL-2 czy IFN- γ przez komórki układu odpornościowego [12, 18]. Nadekspresja PD1 powoduje dysfunkcję limfocytów T, obniża ich zdolności efektorowe i powoduje wyczerpanie powiązane z upośledzonym wydzielaniem IFN- γ [11, 12, 17]. Aktywacja białka PD1 zaburza funkcje efektorowe limfocytów T poprzez zahamowanie czynników transkrypcyjnych, takich jak GATA-3, Tbet, Eomes [12]. Zauważono, że limfocyty cytotoksyczne, u których dochodzi do nadekspresji PD1 nie są zdolne do proliferacji oraz odpowiedniej produkcji cytokin podczas infekcji wirusowych [12]. Połączenie PD1 z PD-L1 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₀/G₁, ale nie prowadzi do śmierci komórki [19]. Latchman i współnicy w swoich badaniach wykazali, że połączenie receptora PD1 z PD-L2 powoduje natychmiastową inhibicję proliferacji oraz produkcji cytokin zależnej od aktywacji receptora limfocyty T (TCR) przez limfocyty T pomocnicze [13, 19]. Ponadto PD1 pełni ważną rolę w dojrzewaniu naiwnych limfocytów T w kierunku limfocytów T regulatorowych [20]. Po aktywacji PD1 reguluje funkcje limfocytów T oraz B poprzez zmniejszenie ich reaktywności na obce antygeny [11]. Połączenie PD1 z ligandami skutkuje zahamowaniem aktywacji limfocytów T, może indukować obwodową tolerancję i wzmocnić mechanizm ucieczki immunologicznej guza [21]. Szlak PD1 / PD-L1 odgrywa istotną rolę w regulacji immunosupresji poprzez zmniejszoną proliferację limfocytów T, indukowaną anergię i wyczerpanie limfocytów T, zmniejszoną produkcję cytokin i zwiększoną funkcję limfocytów T regulatorowych [22]. Co ważne, Nagamatsu i wsp. potwierdzili na komórkach pozyskanych od kobiet w ciąży, że resztkowe komórki zrębowe eksprymują na swojej błonie zarówno ligandy PD-L1, jak i PD-L2 [11, 23]. W publikacjach wykazano, że wzorec ekspresji

PD-L1 znajduje się po zewnętrznej stronie warstwy syncytiotrofoblastów, ale nie po stronie wewnętrznej, jak również nie w cytotrofoblastach [24]. W odniesieniu do powyższych danych można założyć, że szlak PD1 / PD-L1 może być aktywowany w okolicy rozwijającego się płodu i może indukować mechanizmy tolerancji immunologicznej matki na antygeny płodu.

1.1.2 TIM-3 - T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

Immunoglobulina komórek T i białko 3 zawierające domenę mucyny – (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 -TIM-3). Częsteczka ta jest związana z regulacją odpowiedzi immunologicznej w procesach autoimmunizacyjnych oraz przeciwko komórkom nowotworowym. Ekspresję TIM-3 obserwuje się na wielu typach komórek odpornościowych, takich jak pomocnicze limfocyty T, cytotoksyczne limfocyty T, komórki NK, komórki tuczne, limfocyty T regulatorowe, komórki szpiku [25]. Obecnie dane sugerują, że funkcjonowanie TIM-3 związane jest z aktywnością transkrypty 3 związanego z HLA-B (BAT3) i protoonkogenowej kinazy tyrozynowo-białkowej FYN. Jeżeli częsteczka TIM-3 nie jest związana z ligandami, funkcja hamująca TIM-3 jest zatrzymana. Jest to związane z przyłączeniem się częsteczki BAT3 z cytoplazmatycznym ogonem TIM-3. BAT3 stanowi blokadę niepozwalającą na przekazanie sygnału hamującego do komórki [25]. Połączenie TIM-3 z jego ligandami prowadzi do fosforylacji Tyr256 i Tyr263 przez kinazę tyrozynową ITK, co prowadzi do uwolnienia związanego z HLA-B transkrypty 3 [25, 26]. Uwolnienie BAT3 prowadzi do przekazania sygnału hamującego do komórki [25]. Potencjalnie kinaza tyrozynowa FYN może wiązać się z tymi samymi miejscami co BAT3. FYN może indukować anergię komórek T poprzez aktywację fosfoproteiny związanej z mikrodomenami wzbogaconymi w glikosfingolipidy 1 (PAG). Ta aktywacja prowadzi do rekrutacji kinazy tyrozynowej CSK, która następnie fosforyluje LCK na reszcie hamującej, powodując supresję sygnalizacji receptora limfocytów T (TCR) [25, 27].

Pierwszym znanym ligandem przypisywanym TIM-3 była galektyna 9 (Gal-9). Gal-9 jest lektyną typu C, która może ulegać ekspresji lub wydzielaniu przez wiele komórek prezentujących antygeny. Ligandy wiążą się z domeną V immunoglobuliny TIM-3 i prowadzą do indukowania uwalniania BAT3 z wewnątrzkomórkowego ogona. Reakcje te wywołują wewnątrzkomórkowy napływ wapnia, co może powodować zahamowanie aktywności limfocytów T lub śmierć komórki [28]. Gal-9 jest znana jako marker endometrium dla środkowej i późnej fazy wydzielniczej i implantacyjnej. Ekspresja tego białka szybko rośnie w środkowej i późnej fazie wydzielniczej oraz

w fazie proliferacyjnej tworząc okno do implantacji zarodka [29, 30]. Ekspresja Gal-9 w fazie proliferacyjnej i wczesno-proliferacyjnej jest bardzo niska [28, 30]. Istnieje kilka innych ligandów dla TIM-3, ale nie wywierają one tak istotnego wpływu jak Gal-9. Fosfatydyloseryna (PtdSer) wiąże się ze wszystkimi członkami rodziny TIM. W porównaniu z innymi cząsteczkami należącymi do tej grupy PtdSer wiąże się z TIM-3 z 5-ciokrotnie niższym powinowactwem. P. PtdSer wiąże się z domeną V immunoglobuliny, ale po przeciwnej stronie niż Gal-9 [31]. Wiązanie PtdSer-TIM-3 prowadzi do pochłonięcia i fagocytozy materiału apoptotycznego przez limfocyty T, ale może też mieć kluczowe znaczenie dla prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne [32]. Komórki, które uległy apoptozie eksponują na swojej błonie zewnętrznej PtdSer które oddziałuje z APC i indukuje fagocytozę martwych komórek. Proces ten pomaga w utrzymaniu tolerancji na autoantygen [29, 31].

Innym ligandem TIM-3 jest HMGB1. Cząsteczka ta została po raz pierwszy zidentyfikowana w komórkach dendrytycznych ekspresyjnym TIM-3. Miejsce wiązania i mechanizm działania nadal pozostają nieznane [33]. Glikoproteina CEACAM1 jest najnowszym odkrytym ligandem dla TIM-3 [34]. Jej funkcję jako ligandu dla TIM-3 stwierdzono podczas analizy regulacji odpowiedzi przeciwwirusowej. Wiązanie CEACAM1 może wyzwać uwalnianie BAT3 z TIM-3, umożliwiając w ten sposób hamowanie sygnalizacji TCR za pośrednictwem TIM-3 [34]. CEACAM1 ulega ekspresji na komórkach dendrytycznych, monocytach, makrofagach i limfocytach T cytotoksycznych [33, 35]. Rola CEACAM1 jako ligandu dla TIM-3 nadal pozostaje badana, a najnowsze doniesienia wskazują na brak interakcji pomiędzy CEACAM1 a TIM-3 [36].

Wiadomo, że TIM-3 negatywnie reguluje odpowiedź immunologiczną przeciwko infekcjom wirusowym i odgrywa ważną rolę w regulacji chorób autoimmunologicznych [37]. TIM-3 jest niezbędny do zapobiegania rozwijaniu procesów autoimmunizacyjnych. Niską ekspresję powierzchniową TIM-3 na limfocytach T potwierdza się w badaniach u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, stwardnieniem rozsianym czy reumatoidalnym zapaleniem stawów [38-40]. Komórki T regulatorowe FOXP3⁺ dodatkowo pod względem TIM-3 są wzbogacone w mechanizmy efektorowe, takie jak wydzielanie IL-10, granzymu A lub perforyn, przez co sprawowane przez nie funkcje hamujące układ odpornościowy są silniejsze [37, 41]. Komórki NK stanowią największą pulę komórek odpornościowych biorących udział w pierwszych

etapach trwania ciąży. Komórki NK TIM-3⁺ w pierwszym trymestrze ciąży wykazują bardziej immunosupresyjny fenotyp, co odgrywa ważną rolę w relacjach immunologicznych matki i płodu [7, 25].

1.1.3 LAG-3 - Lymphocyte activation gene-3

Gen 3 aktywujący limfocyty - Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) jest transbłonowym białkiem typu I, strukturalnie podobnym do receptora CD4 [42]. Obecnie LAG-3 obok PD1 i CTLA-4 jest głównym pretendentem do terapii przeciwnowotworowych zarówno w monoterapiach jak też terapiach wielocelowych [42]. Struktura LAG-3 ma cztery domeny Ig-podobne D1-D4. Ogon cytoplazmatyczny LAG-3 ma trzy regiony, z których pierwszy zawiera miejsce fosforylacji seryny, drugi region zawiera unikalny motyw KIEELE, a trzeci region zawiera powtórzenia kwasu glutaminowego i proliny (EP) [43]. Mechanizm działania dla LAG-3 nadal nie jest w pełni poznany. Co więcej region zewnątrzkomórkowy LAG-3 ma około 20% homologii aminokwasów z CD4, ale nie posiada miejsca palmitoilacji, takiego jak CD4 i brakuje cysteiny wymaganej do połączenia ze specyficzną dla limfocytów białkową kinazą tyrozynową (Lck) [44-46]. Badania *in-vitro* wskazują, że IL-2, IL-7 i IL-12 zwiększają ekspresję LAG-3 na aktywowanych limfocytach T [47, 48].

Jak dotąd ligandy LAG-3 nie zostały w pełni poznane. Niektóre badania wykazały, że galektyna-3 lub lektyna z sinusoidalnych komórek śródbłónka wątroby (LSECtin) mogą oddziaływać z LAG-3 [42, 49]. Inne badania proponują MHC klasy II jako ligand dla LAG-3. Istniała teoria, że LAG-3 współzawodniczy z CD4 o wiązanie z MHC klasy II i w ten sposób powoduje hamowanie limfocytów. Dalsze badania pokazują, że LAG-3 hamują aktywację limfocytów T w innym mechanizmie niż konkurencyjne łączenie MHC II z CD4 [50-53]. Ostatnio transaktywator MHCII (CIITA) został zidentyfikowany, jako krytyczny regulator liganda LAG-3. CIITA indukuje ekspresję nie tylko MHCII, ale także cząsteczek pomocniczych MHCII, w tym CD74 i H2-DM. Cząsteczki pomocnicze MHCII przyczyniają się do tworzenia na powierzchni komórki kompleksu peptyd-MHCII (pMHCII) wykazującego stabilną konformację strukturalną w konwencjonalnym szlaku prezentacji antygeny [54]. LAG-3 rozróżnia konformację pMHCII i selektywnie wiąże się ze stabilnym pMHCII. W związku z tym LAG-3 preferencyjnie hamuje

aktywację limfocytów T pomocniczych, które rozpoznają stabilne pMHCII [52]. Wykazano również, że LAG-3 nie konkuruje z CD4 o wiązanie pMHCII [42, 52]. Wang i wsp. zidentyfikowali białko podobne do fibrynogenu 1 (FGL1), członka rodziny fibrynogenu, jako potencjalny ligand dla LAG-3 [55]. FGL1 jest generalnie wytwarzany przez hepatocyty w stanie fizjologicznym, ale może być również wytwarzany przez komórki nowotworowe [42, 46].

Funkcja hamowania LAG-3 jest skorelowana z poziomem ekspresji tej cząsteczki na powierzchni komórek immunokompetentnych. Ekspresję LAG-3 zauważono na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych i regulatorowych oraz komórkach NK [56]. Stymulacja antygenami prowadzi do intensywnej ekspresji białka na powierzchni limfocytów. Podczas przewlekłego zakażenia wirusami lub bakteriami LAG-3 ulega silnej i trwałej ekspresji. Stan ten powoduje wyczerpanie limfocytów i zaburzenie ich funkcji [57, 58]. LAG-3 uczestniczy w hamowaniu efektorowych limfocytów T i promowaniu supresji, w której pośredniczą limfocyty T regulatorowe [46]. Blokada lub eliminacja Lag-3 w modelu mysim sprzyjała rozwojowi cukrzycy typu 1 lub zahamowaniu swoistej tolerancji antygenowej [50, 59, 60]. LAG-3 odgrywa rolę ważnego regulatora odporności w chorobach autoimmunizacyjnych, przewlekłych infekcjach wirusowych, pasożytniczych czy nowotworach [46].

1.1.4 TIGIT- T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

Po raz pierwszy został opisany przez algorytm bioinformatyczny, jako nowy członek rodziny CD28 i został nazwany Vsig9. Z czasem nazwa była zmieniana na Vstm3, a ostatecznie na TIGIT - immunoreceptor limfocytów T z domeną ITIM [46, 61]. Te receptory nadrodziny Ig są ekspresjonowane na aktywowanych limfocytach T, komórkach NK, limfocytach T pamięci, limfocytach T regulatorowych, gdzie pełnią funkcję receptorów kohamujących [61-64]. Obecnie znane są dwa ligandy dla TIGIT: CD155 (PVR) i CD112 (PVRL2, nektyna-2). Ligandy te są obecne na komórkach prezentujących antygeny, limfocytach T i na typach komórek nie hematopoetycznych, w tym na komórkach nowotworowych [46, 63]. CD155 wiąże się z większym powinowactwem do TIGIT niż CD112 [46]. TIGIT, CD226 i CD96 wiążą się z tymi samymi ligandami. CD226 asocjuje z integryną LFA-1 i dostarcza pozytywny sygnał, podczas gdy TIGIT i CD96 po związaniu z CD155 zawierają motywy ITIM w swoich cytoplazmatycznych ogonach i

mogą dostarczać sygnały hamujące. TIGIT zawiera dodatkowo motyw podobny do ITT [65, 66]. TIGIT nie tylko konkuruje z CD226 o ligandy, ale w niektórych przypadkach może wiązać się z CD266 i stąd jego sygnał kostymulujący [67]. Strukturalnie TIGIT jest podobny do rodziny nekryn PVR. Ta kohamująca cząsteczka składa się z zewnątrzkomórkowego regionu transbłonowego domeny IgV typu 1 i cytoplazmatycznego ogona zawierającego ITIM i motyw tyrozynopodobny ogona immunoglobuliny (ITT) [62, 63, 68]. Wydaje się, że za hamującą funkcję TIGIT odpowiada fosforylacja reszty tyrozyny w motywie ITIM (Y231) lub motywie podobnym do ITT (Y225) [69, 70]. Gdy CD155 wiąże się z TIGIT, indukuje fosforylację przez Fyn i Lck oraz rekrutację SHIP1 (zawierającej domenę SH2 inozytolo-5-fosfatazy 1) przez cytozolowy adapter Grb2 (białko związane z receptorem czynnika wzrostu 2). Rekrutacja SHIP1 do ogona TIGIT blokuje przekazywanie sygnału przez PI3K (3-kinazę fosfoinozytydu) i MAPK, co prowadzi do zahamowania funkcji komórek NK [46, 69, 71]. Po fosforylacji motyw TIGIT podobny do ITT wiąże się z β -arestyną 2 i uwalnia SHIP1 w celu ograniczenia sygnalizacji NF- κ B [46]. Szlaki te powodują zmniejszenie cytotoksyczności oraz wydzielania cytokin przez komórki NK [69-71]. Aktywacja TIGIT w limfocytach T wpływa na szlaki, w których regulowane są komponenty TCR, takie jak TCR α , CD3 ϵ , dodatkowo wpływa na kaskadę sygnalizacyjną TCR, taką jak PLC γ [46, 61]. Aktywacje te blokują produktywną aktywację i proliferację komórek T [61]. Aktywacja TIGIT jest związana z indukcją cząsteczek przeciw apoptotycznych, takich jak Bcl-xL, co powoduje zwiększoną ekspresję receptorów dla IL-2, IL-7, IL-15 działanie to sprzyja przeżywalności komórek T i sprawia, że limfocyty T nie zostaną usunięte z obwodu [46]. Limfocyty które na swoich błonach posiadają TIGIT bezpośrednio hamują aktywację i ekspansję limfocytów T, pośrednio poprzez wiązanie CD155 na komórkach dendrytycznych powodują wydzielanie IL-10 przez te komórki [46]. TIGIT promuje supresję, w której pośredniczą limfocyty T regulatorowe, poprzez indukcję wydzielania IL-10 i Fgl2, które silnie i wybiórczo hamują autopatogenne odpowiedzi limfocytów Th1 / Th17 [46].

1.1.5 VISTA- V-domain Ig suppressor of T cell activation

Supresor aktywacji limfocytów T (VISTA), zawierający domenę V Ig, znany również jako PD1H lub B7-H5, jest transbłonowym białkiem typu I składającym się z pojedynczej N-końcowej domeny V immunoglobuliny (Ig). VISTA zbudowana jest z około 279 aminokwasów. Domena zewnątrzkomórkowa składa się z 162 aminokwasów, domena transbłonowa z 21 aminokwasów i cytoplazmatyczny ogon z 96 aminokwasów [72, 73]. Domena cytoplazmatyczna jest pozbawiona immuno-receptorowych motywów sygnalizacyjnych opartych na tyrozynie, ale posiada potencjalne miejsca fosforylacji białka C i kinazy kazeinowej 2 [72-74]. Analiza genetyczna VISTA wykazała podobieństwa z PD1, CD28, CTLA-4 z największym podobieństwem do PD1, natomiast analiza domeny IgV wykazała najwyższą homologię z PD-L1 [75]. Dane dotyczące struktury VISTA sugerują, że cząsteczki te mogą działać zarówno jako ligand, jak i receptor w regulacji odpowiedzi immunologicznej [72]. VISTA ma domenę IgV, co czyni tę cząsteczkę podobną do członków rodziny B7, takich jak B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-DC (PDL-2), B7-H3 (CD276). Te podobieństwa wskazują, że VISTA może działać jako ligand. Z drugiej strony CTLA-4, PD1 i CD28 posiadające domenę IgV działają również jako receptor [73, 76]. VISTA jest wykrywana na powierzchni makrofagów, komórek dendrytycznych, neutrofilii, ale także na limfocytach pomocniczych T (naiwnych i pamięci), limfocytach T regulatorowych, komórkach NK i limfocytach T cytotoksycznych [72, 75]. Zaobserwowano, że w stanie zapalnym ekspresja VISTA jest obniżona [73]. Badania przeprowadzone z białkiem fuzyjnym VISTA-Ig w obecności przeciwciał anti-CD3 wykazały, że limfocyty pomocnicze i cytotoksyczne słabiej proliferują i wytwarzają zmniejszone ilości IFN- γ i IL-2. Doświadczenia te pozwalają przypuszczać, że VISTA może być negatywnym regulatorem punktu kontrolnego i działać jako ligand dla niektórych z nich [77]. VISTA działa nie tylko jako ligand ekspresyjny na komórkach prezentujących antygen, ale także działa jako receptor na limfocytach T. Do tej pory większość badań opisywała hamujący wpływ VISTA na układ odpornościowy i zdolność leczenia niedoborem VISTA lub leczenia z wykorzystaniem przeciwciał anti-VISTA do zwiększenia odpowiedzi immunologicznej [73, 78]. Do chwili obecnej znane są dwa możliwe ligandy VISTA: VSIG3 i ligand-1 selektyny P (PSGL-1). Interakcje między VISTA i VSIG3 prowadzą do zahamowania odpowiedzi limfocytów T [79]. Do związania PSGL-1 z VISTA konieczne jest kwaśne pH [80]. Działanie VSIG3 z VISTA nadal nie zostało dokładnie zbadane.

1.2 Rozpuszczalne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy oraz ich ligandy

1.2.1 Rozpuszczalne CTLA-4, CD28, CD80, CD86

Obecnie wiele uwagi w badaniach nad rakiem skupia się na cząsteczkach punktów kontrolnych, takich jak PD1/PD-L1 i CTLA-4, które regulują aktywację efektorowych komórek T, co jest zjawiskiem bardzo potrzebnym do utrzymania homeostazy układu odpornościowego i zminimalizowania niekorzystnych reakcji układu odpornościowego. Dodatkowo, cząsteczki te mogą być wykorzystane przez komórki nowotworowe do unikania odpowiedzi układu odpornościowego mających na celu ich zniszczenie, ale również potrafią używać sICP, czy mICP w celu zakamuflowania się przed komórkami układu odpornościowego [81]. Ostatnie badania prowadzone w zakresie immunoterapii wykazały, że za pomocą cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy można manipulować reakcjami układu odpornościowego. Pozwala to, chociażby, przeprogramować odpowiedź immunologiczną na aktywację odpowiedzi u komórek usypionych (w przypadku raka) lub spowodować jej stłumienie (w chorobach autoimmunologicznych) [82]. Skonstruowane przeciwciała anti-CTLA-4 (np. ipilimumab) i białka fuzyjne CTLA-4-Ig (np. abatacept) są już stosowane jako perspektywne terapie odpowiednio w raku lub autoimmunizacji [82]. Co więcej, cząsteczki ICP mają również rozpuszczalne izoformy, które mogą być śledzone w próbkach krwi pobranych od pacjentów i mogą służyć jako potencjalne biomarkery. Obecnie coraz częściej sprawdzana jest korelacja stężeń np. sCTLA-4 ze stanem chorobowym w różnych chorobach zapalnych i nowotworowych [83-85]. Wśród cząsteczek hamujących komórki T, które uczestniczą w molekularnej regulacji odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem komórek T, oś cząsteczek CTLA-4/CD28:B7 jest zdecydowanie najlepiej poznana. Co ciekawe, hamujący CTLA-4 i stymulujący CD28 mają te same ligandy na błonach komórek prezentujących antygen B7-1(CD80) i B7-2 (CD86) w celu regulacji odpowiedzi immunologicznej przez limfocyty T [82]. Istnieje prawie 10-krotnie wyższe powinowactwo wiązania B7-1 do CTLA-4 niż CD28 do CTLA-4 [86]. Można to częściowo wyjaśnić dwuwartościowym charakterem homodimerów CTLA-4, w przeciwieństwie do jednowartościowych homodimerów CD28 [87]. Oprócz ich fizjologicznej hamującej roli w regulowaniu amplitudy i czasu trwania odpowiedzi komórek T, szlaki hamujące komórki T są również wykorzystywane przez komórki nowotworowe do unikania odpowiedzi immunologicznej, która w przeciwnym razie byłaby w stanie rozpoznać i usunąć te nieprawidłowo

przekształcone złośliwe komórki [82]. Kilka badań wykazało istnienie rozpuszczalnych izoform CTLA-4, CD28 oraz B7-1 i B7-2 [82].

Alternatywny splicing mRNA jest przyczyną występowania dwóch form CTLA-4. Po pierwsze, zidentyfikowana w amplifikacji PCR sekwencji kodującej CTLA-4 z niestymulowanych limfocytów T, forma rozpuszczalna po alternatywnym splicingu (sCTLA-4) nie posiada domeny transbłonowej i jest wydzielana z komórki [88, 89]. sCTLA-4, podobnie jak jego odpowiednik o pełnej długości, zachowuje zdolność wiązania się z ligandami B7 na komórkach prezentujących antygeny. Badania *in vitro* na ludzkich limfocytach T wykazały, że sCTLA-4 jest silnym inhibitorem aktywacji limfocytów T, w tym proliferacji specyficznej dla antygeny i wydzielania prozapalnych cytokin, takich jak IFN- γ i IL-17 [90]. Stwierdzono również, że Treg są zdolne do wydzielania sCTLA-4, co dodatkowo przyczynia się do supresyjnego działania regulatorowych limfocytów T poprzez indukowanie sekrecji immunosupresyjnych cytokin TGF- β i IL-10 [90].

sCTLA-4 uczestniczy w regulacji immunologicznej na zewnątrz komórki, co może wpływać na rozwój i rokowanie wielu chorób, w tym autoimmunizacji i raka. Stwierdzono, że poziomy sCTLA-4 są podwyższone w surowicach pacjentów z różnymi chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak autoimmunologiczne zapalenie tarczycy i toczeń, miastenia, twardzina układowa [91-94]. Podobnie, wyższe poziomy sCTLA-4 również sugerowano jako czynnik ryzyka cukrzycy typu 1 [95]. Podwyższone poziomy sCTLA-4 w surowicach korelowały również z chorobami zapalnymi, takimi jak celiakia, czy z uszkodzeniem błony śluzowej jelita. Również u pacjentów z astmą alergiczną stężenie rozpuszczalnych izoform kilku cząsteczek punktów kontrolnych układu odpornościowego, w tym sCTLA-4, było podwyższone [96]. Wpływ sCTLA-4 w tych chorobach autoimmunologicznych lub zapalnych można wykazać jako zdolność do zakłócania interakcji B7: mCTLA-4 z ligandami B7, co prowadzi do zakłócenia hamowania zaktywowanych komórek T, a tym samym do zwiększenia autoimmunizacji. Niemniej jednak, sCTLA-4 może również hamować aktywację komórek T poprzez blokowanie interakcji CD28:B7, w którym to przypadku sCTLA-4 może odgrywać ważną rolę w regulacji immunologicznej w chorobach nowotworowych [82, 97].

Wiele badań wykazało korelacje poziomu sCTLA-4 w surowicy z progresją lub diagnozą raka. Badania wykazały, że funkcjonalne blokowanie sCTLA-4 miało działanie ochronne w czerniaku u myszy [90]. Badanie surowic pacjentów z rakiem piersi również ujawniło istotnie

podwyższone poziomy sCTLA-4 w porównaniu ze zdrowymi osobnikami dobranymi pod względem wieku i płci [85]. W związku z tym wyższe poziomy sCTLA-4 u pacjentów z niektórymi rodzajami raka mogą być wykorzystywane jako marker złego rokowania i mogą pomóc w procesie podejmowania decyzji w odniesieniu do intensywności leczenia i schematu leczenia. W przeciwieństwie do tego, gdy analizowano poziomy sCTLA-4 w surowicy u pacjentów z nieresekcyjnym rakiem przerzutowym lub zaawansowanym rakiem płuca lub przełyku, którzy otrzymali co najmniej jedną konwencjonalną terapię pierwszego rzutu, w tym radioterapię lub chemioterapię, stwierdzono, że sCTLA-4 może być stosowany jako ważny wyznacznik prognostyczny. W rzeczywistości wysoka ekspresja sCTLA-4 istotnie wiązała się z dłuższym całkowitym przeżyciem lub przeżyciem bez progresji choroby [98]. Podobną obserwację nadekspresji sCTLA-4 w surowicy lub wysięku opłucnowym zaobserwowano u pacjentów z międzybłoniakiem opłucnej, co wskazywało na korzystne działanie prognostyczne rozpuszczalnej izoformy CTLA-4 [99].

Podobnie jak CTLA-4, znana jest rozpuszczalna izoforma CD28, receptora aktywującego komórki T przez ligandy z rodziny B7. Podwyższone poziomy sCD28 w surowicy stwierdzono w chorobach autoimmunologicznych, takich jak toczeń, zespół Sjögrena czy twardzina układowa i mogą być związane z nasileniem choroby [100]. U chorych na raka piersi stwierdzono podwyższony poziom krążącej sCD28 oraz sCTLA-4, co może być wykorzystane jako biomarker w tej chorobie [82, 101].

Publikowane dane wskazują, że ekspresja ligandów B7 na komórkach nowotworowych zwiększa ich immunogenność, a brak tych cząsteczek na komórkach nowotworowych pomaga w procesie unikania odporności przez nowotwór [102]. Jednak w wielu nowotworach hematologicznych komórki nowotworowe wykazują wysoki poziom tych cząsteczek, zwłaszcza CD86 lub CD80, co wiąże się ze złym rokowaniem [103, 104]. Jednocześnie zaobserwowano podwyższone stężenia sCD80 i sCD86 u pacjentów z nowotworami hematologicznymi [105, 106]. Odkryto, że sCD86 jest również istotnym markerem prognostycznym u pacjentów ze szpiczakiem. Podobne podwyższone poziomy sCD86 stwierdzono u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML), które korelowały również z niższymi wskaźnikami przeżycia [107].

1.2.2 Rozpuszczalne PD1, PD-L1, PD-L2

PD-L1 podlega również alternatywnemu splicingowi w celu wytworzenia rozpuszczalnych izoform tej cząsteczki. sPD-L1 zostało pierwotnie zidentyfikowane w supernatantach hodowli linii komórek nowotworowych, a później stwierdzono, że jest obecne w surowicach pacjentów z rakiem nerki [108]. Zaobserwowano, że stężenie sPD-L1 jest wyższe u pacjentów ze szpiczakiem i chłoniakiem z komórek B i może być stosowane jako marker prognostyczny lub predykcyjny u tych pacjentów [109]. Co ciekawe, stwierdzono, że poziomy krążącego sPD-L1 wzrosły w wyniku leczenia przeciwciałami hamującymi punkty kontrolne, a dynamika tego wzrostu była bezpośrednio związana z wynikami klinicznymi. Pacjenci, u których stwierdzono opóźniony wzrost poziomu sPD-L1 wykazali najbardziej obiecujące wyniki po leczeniu immunoterapeutycznym. Co ważne, ten wzrost sPD-L1 korelował również ze wzrostem poziomu krążących cytokin, co wskazuje na odpowiedź przeciwnowotworową, szczególnie u pacjentów, którzy otrzymali immunoterapię anti-CTLA-4, a nie blokadę anti-PD1. Pokazuje to, że te dwie strategie terapeutyczne działały na różnych poziomach w organizmie [82].

Podobnie jak w przypadku PD-L1, zidentyfikowano rozpuszczalną izoformę PD1 pochodzącą z delecji eksonu-3 genu PD1 [110]. Białko to nie posiada części transbłonowej, zachowując domenę zewnątrzkomórkową i okazało się, że jest zdolne do blokowania interakcji PD1:PD-L1 [82]. Taka blokada prowadzi do przywrócenia aktywności komórek T, co może prowadzić do wzmocnienia przeciwnowotworowych odpowiedzi immunologicznych. Chociaż sPD-1 występuje u osób zdrowych, jego stężenie wzrasta u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi [111]. Co ciekawe, kilka badań wykazało korelację między poziomem sPD1 w surowicy pacjentów a progresją raka. Poziomy sPD1 korelują z utrzymującym się wysokim mianem wirusa zapalenia wątroby typu B i zwiększonym ryzykiem raka wątrobowokomórkowego [112].

Oprócz rzekomej wartości prognostycznej sPD1, jej wartość terapeutyczna w rozwoju nowotworu lub progresji nowotworu została obszernie udokumentowana. Zwiększenie wydzielania sPD1 lub dostarczenie go do mysich modeli raka powodowało regresję guza i przedłużone przeżycie u myszy z guzem, poprzez blokadę szlaku PD1:PD-L1. Szlak ten jest wykorzystywany przez komórki nowotworowe do unikania odporności, a jego zablokowanie prowadziło do przywrócenia odpowiedzi przeciwnowotworowej przez komórki układu

odpornościowego [113, 114]. Mechanizm działania sPD1 bywa różnorodny. Może wiązać się ze związanym z błoną PD-L1 na komórce nowotworowej, zapobiegając w ten sposób jego interakcji ze związanym z błoną PD1 na limfocytach T naciekających nowotwór. Takie działanie zniweluje indukowaną przez nowotwór inhibicję limfocytów T i może przywrócić odporność przeciwnowotworową. Dodatkowo wiadomo, że oprócz PD1, PD-L1 może również oddziaływać z CD86 lub CD80, co również skutkuje hamowaniem funkcji limfocytów T [115]. Co ciekawe, interfejs interakcji B7-1: PD-L1 pokrywa się z interfejsem PD1: PD-L1. Dlatego rozpuszczalna cząsteczka PD1, która może wiązać się z PD-L1 związanym z błoną, może również skutecznie blokować interakcję B7-1:PD-L1, dodając w ten sposób kolejną warstwę strategii przeprogramowania dla limfocytów T naciekających nowotwór [82].

Ustalono, że sPD1 i sPD-L1 mają różne mechanizmy regulacyjne. Przeprowadzone badania wykazały, że sPD1 ma silny wpływ na hamowanie odpowiedzi immunologicznych komórek prezentujących antygeny i komórek T poprzez interakcję z PD-L1 związanym z błoną [116, 117]. Zmienione stężenia sPD1 notowano u pacjentów z małopłytkowością immunologiczną, twardziną układową i zespołem ostrej niewydolności oddechowej [117]. Z drugiej strony, sPD-L1 wiąże się z PD1 związanym z błoną na limfocytach T i wytwarza sygnał hamujący, tym samym hamując aktywację i proliferację limfocytów T [117]. Podwyższony poziom sPD-L1 wiąże się ze złym rokowaniem u pacjentów z zaawansowanym rakiem płuc. Rozpuszczalna forma PD-L1 jest oznaczalna w surowicy ludzkiej, zarówno u pacjentów z chorobą nowotworową, jak i pacjentów z innymi chorobami nienowotworowymi [118]. Pochodzenie sPD1 i sPD-L1 nie zostały jeszcze określone w ciąży [117]. Wydaje się, że rozpuszczalna forma cząsteczek jest albo wytwarzana przez proteolityczne rozszczepienie formy związanej z błoną przez ADAM17 i ADAM10 albo przez translację alternatywnego splicingu mRNA, jak w przypadku rozpuszczalnego CD86 [117, 119]. Ponieważ komórki trofoblastu wytwarzają PD1 i PD-L1, zwiększone rozcięcie proteolityczne może być mechanizmem zmniejszonej ekspresji PD1 i PD-L1 obserwowanej w trofoblastach łożyskowych w stanie przedzrucawkowym, a odcięte od błony komórkowej PD1 i PD-L1 mogą być uwalniane do krwi matki [117, 120]. Zatem trofoblasty łożyskowe mogą być źródłem sPD1 i sPD-L1 podczas ciąży [117].

Badania wykazują, że sPD1 hamuje aktywację komórek dendrytycznych i zwiększa produkcję IL-10 niezależnie od 2,3-dioksygenazy indoloaminy 1 (IDO) [12, 121]. Rozpuszczalne

formy sPD-L1 mogą być jednocześnie częścią szlaku sygnałowego PD1/PD-L1 i mogą być odpowiedzialne za hamowanie przekazywania sygnału poprzez blokowanie dostępu do receptora PD1 [122]. Okuyama i wsp. wykazali podwyższony poziom rozpuszczalnego PD-L1 u kobiet od III trymestru ciąży w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży, dodatkowo zbadali rozpuszczalną formę PD1 i stwierdzili, że stężenie sPD1 było niższe u kobiet w ciąży w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży [123]. Dane przedstawione przez Okuyamę sugerują, że podwyższony poziom sPD-L1 w surowicy kobiet ciężarnych może odgrywać rolę w tłumieniu matczynej reakcji immunologicznej przeciwko płodowi [123]. Źródłem krążącej PD-L1 może być łożyskowy trofoblast lub powierzchnia PD-L1-dodatnich limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych [117, 124]. Gu i wsp. ustalili, że poziomy krążącego sPD-L1 były podwyższone u kobiet w ciąży w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży. Niniejsze badania przeprowadzili u kobiet w ciąży z prawidłowym ciśnieniem i kobiet w rozpoznanym stanie przedrzucawkowym [117]. Badania te pokazują, że w stanie przedrzucawkowym występuje nieprawidłowa sygnalizacja sPD1/sPD-L1. W 2018 roku Enninga i wsp. stwierdzili, że poziomy sPD-L1 były wyższe w surowicy kobiet w ciąży niż u kobiet niebędących w ciąży i po porodzie [124]. W przeciwieństwie do sPD-L1, sPD1 może blokować interakcję między PD-L1 i PD1 na limfocytach T poprzez hamowanie kompetycyjne, co skutkuje zwiększoną aktywnością autoreaktywnych limfocytów T i przyczynia się do działania przeciwnowotworowego [122]. Okuyama odkrył, że poziomy sPD-L1 są podwyższone w surowicy kobiet w ciąży, co może przynajmniej częściowo hamować funkcjonowanie układu odpornościowego u kobiet w ciąży [123].

1.2.3 Rozpuszczalne TIM-3, Gal-9, LAG-3

Rozpuszczalna forma TIM-3 nie zawiera domen mucyny i domen przezłonowych. Ten wariant sTim-3 u myszy jest generowany przez naprzemienne składanie, u człowieka jest wynikiem cięcia zależnego od metaloproteinazy, co ułatwia jego wydalanie z powierzchni komórki [25, 125, 126]. Podwyższony poziom rozpuszczalnej formy TIM-3 stwierdza się w surowicy pacjentów z zakażeniem HIV, chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi lub kostniakomięsakiem [125, 127, 128]. Udokumentowano, że połączenie Gal-9 z TIM-3 może indukować negatywny sygnał kostymulujący do komórek Th1, a tym samym indukować apoptozę komórek Th1 [129]. sTIM-3, tj. region podobny do IgV jest rozpuszczalnym produktem kodowanym przez gen *Tim-3*. Jego poziom ekspresji w normalnej ludzkiej surowicy jest stosunkowo niski, natomiast wzrasta podczas stanów zapalnych [130]. Gal-9 jest kolejnym ligandem ICP odgrywającym rolę w rozwoju stanu zapalnego czy nowotworów, cząsteczka ta może odgrywać istotną rolę w rozwoju ciąży.

Wiele badań nad Gal-9 koncentrowało się na jej interakcji z receptorem TIM-3, który skutecznie hamuje odpowiedź immunologiczną limfocytów pomocniczych typu 1 [28, 124]. Podczas ciąży Gal-9 jest wydzielana przez komórki trofoblastu i może wpływać na obwodowe komórki NK TIM-3⁺, przekształcając je w komórki o fenotypie doczesnowych komórek NK (dNK) charakteryzujących się wydzielaniem dużych ilości interleukiny 4 (IL-4) oraz małych czynnika martwicy nowotworu (TNF- α). Dodatkowo komórki te mają zmniejszone zdolności cytotoksyczne [124, 131, 132]. Zhu i wsp. odkryli, że Gal-9 wiąże się z TIM-3 na limfocytach T pomocniczych typu 1 i inicjuje apoptozę w celu osłabienia odpowiedzi immunologicznej [28]. Wykazano że Gal-9 ze względu na swoje funkcje immunomodulacyjne może posiadać potencjał terapeutyczny w wielu schorzeniach [133]. Podwyższony poziom błonowej lub rozpuszczalnej formy Gal-9 stwierdzono w chorobach autoimmunologicznych, infekcjach wirusowych, malarii, chorobach ginekologicznych, chorobie wieńcowej, zapaleniu skórno-mięśniowym, zakażeniu wirusem HIV i nowotworach [203]. Białko to może być potencjalnie wykorzystane jako nieinwazyjny biomarker do wykrywania i przewidywania ciężkości różnych stanów chorobowych [133].

LAG-3 występuje w postaci rozpuszczalnej. Na mysim modelu Li i wsp. udowodnili, że metaloproteinazy domena dezintegryny i metalopeptydazy (ADAM) 10 i ADAM17 rozszczepiają

LAG-3 i uwalniają pozakomórkowy region LAG-3, dodatkowo rozpuszczalny LAG-3 zawierający D1–D3 może być wytwarzany przez alternatywny splicing [134, 135]. Na chwilę obecną niewiele badań było skupionych na poszukiwaniu możliwości wykorzystania tego rozpuszczalnego ICP w diagnostyce czy leczeniu. Dane literaturowe wskazują na wykorzystanie cząsteczek podobnych do LAG-3 połączonych z fragmentami przeciwciał jako potencjalne leki w chorobach nowotworowych lub autoimmunologicznych.

1.2.4 Rozpuszczalne CD155, CD112

CD155 jest pierwszym opisanym ligandem TIGIT, początkowo zidentyfikowanym jako receptor wejścia dla wirusa polio. Ustalono, że CD155 może również występować w rozpuszczalnej izoformie w wyniku alternatywnego splicingu [136, 137]. Co ciekawe, u ludzi CD155 ulega ekspresji nie tylko jako białko związane z błoną kodowane przez CD155 α i CD155 δ , ale także jako rozpuszczalne formy pozbawione regionu przez błonowego i kodowane przez alternatywne izoformy splicingowe CD155 β i CD155 γ [138]. Chociaż rozpuszczalny CD155 (sCD155) przyczynia się do neutralizacji zakaźności wirusa polio in vitro, szlaki działania są nadal nieznanne [138]. Jest również znany jako cząsteczka adhezyjna, zwana białkiem podobnym do nektyny-5, należąca do nadrodziny immunoglobulin z trzema pozakomórkowymi domenami podobnymi do immunoglobuliny [139]. CD155 ulega ekspresji zarówno na komórkach hematopoetycznych, jak i niehematopoetycznych. Co ważne, jest to również białko indukowane stresem, którego produkcja jest zwiększona w transformowanych komórkach [140, 141].

CD155 odgrywa kluczową rolę w migracji komórek, proliferacji poprzez interakcję z innymi cząsteczkami adhezyjnymi, takimi jak integryny i białko macierzy zewnątrzkomórkowej witronektyna [142-144]. Ostatnie badania wykazały, że poziomy rozpuszczalnego CD155 są znacznie podwyższone w surowicy pacjentów z chorobami przewodu pokarmowego, nowotworami piersi i innymi nowotworami ginekologicznymi. W przypadku nowotworów piersi stwierdzono, że poziom sCD155 wzrasta wraz z zaawansowaniem choroby i, co ciekawe, po chirurgicznym usunięciu guza zaczynał spadać, co wskazuje, że sam guz jest źródłem sCD155 [145]. Chociaż stwierdzono nadekspresję drugiego liganda TIGIT, nektyny 2, znanej jako CD112, w wielu nowotworach, w tym białaczce limfoblastycznej i raku płaskonabłonkowym, jedno z

badania dokumentuje również obecność rozpuszczalnej nektyny-2 w surowicach pacjentów z nowotworami [146, 147]. Stwierdzono, że wyjściowe poziomy nektyny-2 w surowicy są podwyższone u pacjentów z rakiem jelita grubego, zwłaszcza u pacjentów bez przerzutów [148]. Iguchi-Manaka i wsp. w swoim badaniu stwierdzili, że poziomy sCD155 w surowicy były wyższe u pacjentów z różnymi rodzajami raka niż u osób zdrowych, a pacjenci z zaawansowanym stadium raka mieli wyższy poziom sCD155 niż ci z nowotworami we wczesnym stadium. Ponadto poziomy sCD155 w surowicy były dodatnio skorelowane z wielkością guza [145, 149]. Wszystkie te dane pokazują, że rozpuszczalne izoformy ligandów TIGIT mogą być wykorzystywane jako markery prognostyczne lub diagnostyczne. Możliwe, że można je również skorelować z nowymi strategiami immunoterapeutycznymi w nowotworach [82].

1.2.5 Rozpuszczalne HVEM

Herpesvirus entry Mediator (HVEM)- mediator wejścia wirusa opryszczki jest członkiem rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNF) stosowanych jako receptor komórkowy przez glikoproteinę D wirionu (gD) wirusa opryszczki pospolitej (HSV). Zarówno ludzka jak i mysia forma HVEM mogą pośredniczyć w wejściu do komórki HSV-1 i HSV-2, ale nie mają aktywności wejścia dla PRV i BHV-1 [150]. HVEM może pełnić funkcję, jako „przełącznik molekularny”, ponieważ jest w stanie aktywować szlaki sygnałowe kostymulujące lub kohamujące [151]. Jako receptor może wiązać limfotoksyny, konkurować z glikoproteiną D wirusa opryszczki pospolitej o HVEM, czy funkcjonować jako receptor dla cząsteczki ekspresyjowanej przez limfocyty T (LIGHT). Połączenie LIGHT z HVEM dostarcza sygnał kostymulujący. Podczas, gdy jako ligand HVEM przekazuje sygnał hamujący do komórek wyrażających atenuator limfocytów B i T (BTLA) lub cząsteczkę CD160 [152]. HVEM i jego ligandy mogą przynieść nowe światło w celu ukierunkowania nowych cząsteczek kostymulujących/kohamujących w immunoterapii nowotworów [153]. Ostatnie postępy poczyniono w zakresie wiedzy na temat HVEM i jego ligandów w białaczce i czerniaku. Podwyższona ekspresja HVEM jest często obserwowana podczas ludzkiej przewlekłej białaczki limfocytowej, chłoniaka z komórek płaszczka, ostrej białaczki limfoblastycznej, szpiczaka i białaczki z komórek plazmatycznych, co otwiera możliwość wykorzystania HVEM jako markera prognostycznego do identyfikacji pacjentów wysokiego ryzyka i wykorzystaniu tej cząsteczki w immunoterapii [153, 154]. Ponadto wykazano w badaniach *in vitro*, że HVEM na ludzkich komórkach czerniaka hamuje wytwarzanie cytokin i proliferację limfocytów T CD8⁺ swoistych dla antygeny nowotworowego poprzez BTLA [155]. Znacznie mniej wiadomo na temat roli rozpuszczalnego HVEM w immunologii nowotworów [156]. Najnowsze badania wykazały, że poziomy HVEM rozpuszczalne w surowicy odzwierciedlają nasilenie choroby w chłoniaku skóry z limfocytów T [156]. Obecnie sHVEM aspiruje do bycia markerem stosowanym w chorobach immunologicznych i nowotworowych oraz jako predyktor progresji leczenia [157].

1.3 Rola immunologii w ciąży oraz podczas poronień

Od lat siedemdziesiątych badacze używali teorii przesunięcia Th1 / Th2 do wyjaśnienia, jak działa maczyna układ odpornościowy. Teorie te zakładają, że odpowiedzi immunologiczne typu Th2 są bardziej dominujące niż odpowiedzi typu Th1, chroniąc w ten sposób rozwój płodu. Na początku XXI wieku teoria Th1 / Th2 została rozszerzona na paradygmat Th1 / Th2 / Th17 i komórki regulatorowe, co dokładniej wyjaśniło, jak działa regulacja immunologiczna podczas ciąży. W tych wyjaśnieniach możemy podzielić komórki na poszczególne kategorie [21]. Do komórek Th1 zaliczamy komórki pomocnicze T, które wytwarzają IL-2, IL-10, IFN- γ i TNF- α / β i są bardziej zaangażowane w odporność komórkową. Jako komórki Th2 rozpoznajemy komórki wytwarzające IL-4, IL-5, IL-13, które biorą udział w odporności humoralnej. Th17 odgrywają ważną rolę w indukcji procesów zapalnych i wydzielania prozapalnej cytokiny IL-17 [158].

Dutta ustalił, że w I trymestrze ciąży dominuje odporność Th1. Kontrolowany stan zapalny wywołane przez komórki jest niezbędne do procesu implantacji i wczesnego rozwoju zarodka. Odporność Th2 przeważa w drugim trymestrze ciąży i prowadzi do tolerancji alloprzeszczepu płodu i wywołania równowagi między matką a płodem. W trzecim trymestrze odporność Th1 ponownie dominuje i odgrywa znaczącą rolę w indukcji porodu [21, 158]. Aby ciąża przebiegła prawidłowo, konieczne jest uzyskanie tolerancji immunologicznej przez układ odpornościowy matki na płód semiallogenny. Z drugiej strony układ odpornościowy matki musi nadal być w stanie chronić organizm przed patogenami. W celu uzyskania tej szczególnej sytuacji mogą być zaangażowane immunologiczne punkty kontrolne [7]. Dane prezentowane w publikacjach pokazują, że szlak TIM-3 / Gal-9 jest odpowiedzialny za regulację tolerancji immunologicznej i odpowiedzi na antygeny płodu. W zdrowej ciąży ekspresja TIM-3 na komórkach Th1 może być ważnym elementem redukcji prozapalnej odpowiedzi zależnej od Th1 [129]. Zarówno model zwierzęcy, jak i ludzki pokazują, że wiązanie TIM-3 z Gal-9 prowadzi do apoptozy komórek Th1 i Th17 oraz indukuje immunotolerancję, co przyczynia się do modulowania równowagi cytokin Th1 / Th2 [28, 159]. W czasie ciąży podwyższenie ekspresji TIM-3 przez leukocyty obwodowe obserwowano głównie na monocytach i komórkach NK [160]. Dalsze badania wykazały, że limfocyty T TIM-3⁺CD8⁺ wykazują zwiększoną cytotoksyczność w trzecim trymestrze ciąży, a komórki NK TIM-3⁺ mają wysoką zdolność do wydzielania cytokin typu Th2 i zmniejszoną cytotoksyczność wobec trofoblastu [129]. Odkrycia te są zgodne z badaniami, które wykazują

zwiększający się poziom sGal-9 w czasie ciąży [124]. TGF- β może indukować komórki NK do tworzenia szczątkowego fenotypu podobnego do NK i dodatkowo zwiększać ekspresję TIM-3 w obwodowych komórkach NK, co może mieć znaczenie dla rozwoju ciąży [131]. Ekspresja TIM-3 na komórkach NK rośnie we wczesnej ciąży i hamuje cytotoksyczność komórek NK w stosunku do trofoblastu w szlaku zależnym od Gal-9 [7]. Prowadzone badania pokazują, że PD1 i jego ligandy odgrywają kluczową rolę w ewolucji i utrzymaniu obwodowej tolerancji immunologicznej. Podczas prawidłowej ciąży ilościowa ekspansja alloreaktywnych limfocytów T równoległe z obniżoną funkcją limfocytów T regulatorowych poprzez blokowanie powierzchniowego PD-L1 skutkowało zmniejszeniem przeżycia płodu [161]. To udowodniło, że PD-L1 sprzyja przeżywalności płodu poprzez utrzymanie prawidłowej funkcji limfocytów T regulatorowych. PD-L1 ekspresjonowane przez syncytiotrofoblasty kosmków i cytotrofoblasty mogą indukować wyczerpanie limfocytów PD1 dodatnich [161]. Wykazano, że resztkowy limfocyt pomocniczy i cytotoksyczny T zwiększają ekspresję PD1 w czasie ciąży [162]. W czasie ciąży komórki łożyska ekspresjonują na swoich błonach PD-L1 i PD-L2, a także resztkowe komórki zrębowe wyrażają ligandy PD1. Produkcja cytokin Th1 prowadzi do intensywnej ekspresji tych ligandów [163, 164]. Szczególnie w pierwszym tryestrze syncytiotrofoblasty kosmków i cytotrofoblasty ekstrawilne wyrażają PD-L1, PD-L2 jest bardziej ograniczone do cytotrofoblastu kosmków [163, 164]. Podczas implantacji oraz do połowy ciąży dochodzi do masowej rekrutacji komórek NK, które stanowią około 70% populacji komórek odpornościowych [29]. Fenotyp i funkcja komórek dNK koncentrują się na zapewnieniu wsparcia i ochrony płodu [165]. Powyższe obserwacje wskazują, że cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy stanowią istotny element zapewniający prawidłowy rozwój ciąży.

1.4 Wpływ hormonów na układ odpornościowy

1.4.1 Wpływ progesteronu na komórki układu odporności

Progesteron jest syntetyzowany poprzez konwersję cholesterolu jako substratu w szeregu reakcji enzymatycznych. Procesy te są regulowane przez specyficzną dla tkanek i komórek ekspresję enzymów steroidogennych. Po owulacji komórki pęcherzykowe jajnika wspomagające dojrzewanie oocytu przechodzą tzw. proces luteinizacji, tworząc ciało żółte. Podczas luteinizacji ekspresja genów i białek, które pośredniczą w syntezie progesteronu, jest wyraźnie podwyższona [166]. Łożysko wydziela enzymy zaangażowane w produkcję progesteronu i rozpoczyna syntezę steroidogenną w 7–9 tygodniu ciąży, po początkowej syntezie progesteronu w jajniku [167]. Poziom progesteronu stale rośnie, aż do osiągnięcia plateau w ostatnich tygodniach ciąży [166]. Progesteron bierze udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Tak naprawdę przygotowanie do ciąży rozpoczyna się w trakcie cyklu miesięczkowego, kiedy β -estradiol i progesteron optymalizują środowisko macicy i śluzówkę pochwy do poczęcia i implantacji [86]. Jednakże ten optymalny czas na zajście w ciążę jest również najbardziej wrażliwym okresem dla przyszłych matek, ponieważ działanie przeciwzapalne progesteronu wpływa na swoistą i nieswoistą odpowiedź układu odporności obniżając jego zdolność do obrony [168]. Miejscowy, wzrost aktywności progesteronu w fazie lutealnej kieruje również decidualizacją endometrium, co jest niezbędne, aby umożliwić skuteczny rozwój trofoblastu i zagnieżdżenie zarodka [168]. Progesteron stymuluje układ rozrodczy do wydzielania glikodeliny-A, która ma szereg właściwości immunomodulujących zwiększających matczyną tolerancję na rozwijający się płód. Glikodelina-A zmniejsza cytotoksyczność komórek NK, stymuluje limfocyty Th1 do apoptozy i indukuje tolerancyjne komórki dendrytyczne, dodatkowo zwiększając produkcję cytokin Th2 [169]. Wpływ progesteronu na czynniki transkrypcyjne w komórce możliwy jest po przez aktywację receptorów dla progesteronu (PR). Gen Nr3c3 koduje dwie izoformy receptora dla progesteronu PRA i PRB [166, 170]. Te dwa receptory mają zróżnicowaną aktywność transkrypcyjną i znajdują się głównie w gruczole sutkowym oraz w jajniku i macicy [170]. Po zaktywowaniu receptora dla progesteronu wysyłany jest sygnał do jądra komórkowego, gdzie wpływa on na określone regiony DNA, działając jako czynnik transkrypcyjny moduluje ekspresję genów [170]. Ekspresja PR na powierzchni limfocytów jest wciąż badana. Badania prowadzone z zastosowaniem techniki RT-qPCR nie dowiodły występowania PRA oraz PRB na powierzchni

subpopulacji limfocytów [166, 171]. Badania prowadzone na limfocytach kobiet ciężarnych wykazały, że po stymulacji mitogenami lub poprzez stymulację alloantygenową można doprowadzić do pojawienia się na błonie komórkowej limfocytów receptorów dla progesteronu [172]. Prowadzone badania potwierdzają wpływ progesteronu na komórki odpornościowe. Jest on prawdopodobnie wywierany poprzez działanie niegenomowe [166]. Progesteron wiąże się z błonowymi receptorami progesteronowymi sprzężonymi z białkiem G (błonowe receptory progesteronowe: mPR) oraz z tak zwanymi składnikami błon receptora progesteronowego (PGRMC) [166, 168]. mPRalpha / PAQR7 i mPRbeta / PAQR8 oraz PGRMC1 i 2 są obecne w limfocytach T, a mPRalpha ulega ekspresji w poszczególnych subpopulacjach krążących limfocytów T regulatorowych [171, 173]. Wiązanie progesteronu z mPR prowadzi do aktywacji MAPK, co może prowadzić do fosforylacji czynników transkrypcyjnych. Sugerowano, że kinazy szlaku MAPK odgrywają rolę w aktywacji limfocytów T [174]. Wykazano, że kobiety w ciąży ujawniają mPR i PGRMC w limfocytach T podczas ciąży. Progesteronowa modulacja transdukcji sygnału receptora komórek T (TCR) i funkcji limfocytów T jest przekazywana przez PR związane z błoną w ludzkich limfocytach T [171, 175, 176]. Dalsze szlaki po zaangażowaniu TCR obejmują fosforylację MAPK i produkcję trifosforanu inozytolu (IP3), z których ten ostatni promuje uwalnianie Ca^{2+} zmagazynowanego w retikulum endoplazmatycznym [177]. Wiązanie progesteronu na limfocytach T z PGRMC1 i klasycznymi mPR skutkuje zwiększoną mobilizacją wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i zmniejszoną fosforylacją kinazy Zap70 w celu zmieniania aktywacji limfocytów T i odpowiedzi immunologicznej zależnej od TCR [168]. Oba szlaki modulują fosforylację czynników transkrypcyjnych, w tym NF- κ B, białka aktywatora 1 (AP-1) i czynnika jądrowego aktywowanych limfocytów T (NFAT), które są związane z prozapalną ekspresją genów oraz aktywacją i proliferacją limfocytów T [177]. Ze względu na wysokie stężenie tego hormonu w czasie ciąży wydaje się prawdopodobne, że progesteron wyzwała sygnały immunoregulacyjne [166]. Progesteron promuje profil tolerancyjny w nieswoistych komórkach odpornościowych, takich jak makrofagi i komórki dendrytyczne, co jest niezbędne do pomyślnej przebudowy tkanki macicy i utrzymania ciąży [166, 178]. Opublikowane artykuły wykazały, że progesteron może pośredniczyć w swoistej odpowiedzi immunologicznej. W modelach in vivo i in vitro udowodniono, że progesteron wspomaga ekspansję i hamującą funkcję limfocytów T regulatorowych podczas ciąży, skierowanie w kierunku wydzielania cytokin przeciwzapalnych i tłumienie cytotoksyczności limfocytów T cytotoksycznych [171, 179, 180]. Jak dotąd

zgromadzone dowody *in vitro* podkreślają znaczenie szlaków niegenomowych w odpowiedzi limfocytów T oraz ich funkcjonowaniu [171, 175]. Oprócz bezpośredniej interakcji hormon-receptor steroidowy progesteron może pośrednio wpływać na odpowiedzi immunologiczne. Ekspresja PR w macicy i łożysku sprzyja lokalnej ekspresji cząsteczek immunomodulujących, takich jak czynnik blokujący indukowany progesteronem (PIBF), galektyna-1 (Gal-1) [180-182]. PIBF jest wytwarzany przez PR-dodatnie limfocyty ciążowe oraz kilka tkanek związanych z ciążą i nowotworami złośliwymi [172]. W czasie ciąży stężenie PIBF w moczu i surowicy stale rośnie aż do 37 tygodnia ciąży, po czym następuje gwałtowny spadek poprzedzając fazę porodu. W ciążach patologicznych stężenie PIBF w moczu nie wzrasta [183]. PIBF może zwiększać produkcję cytokin Th2 i obniżać cytotoksyczność komórek NK, podczas gdy Gal-1 indukuje fenotyp tolerogenny w komórkach dendrytycznych, co skutkuje ekspansją limfocytów T regulatorowych [179, 181]. Progesteron hamuje wydzielanie specyficznych dla antygeny cytokin zapalnych przez limfocyty T pomocnicze i cytotoksyczne np. IFN- γ , czy granzymu B [184]. Egzogenny progesteron zmniejsza prozapalne i cytotoksyczne odpowiedzi limfocytów T poprzez efektywną modulację interakcji w których pośredniczą komórki odpornościowe i regulację wrażliwości zróżnicowanych komórek pamięci na stymulację antygenem [172, 184]. Progesteron wpływa na różnicowanie limfocytów T krwi obwodowej do subpopulacji Th1, Th0 lub Th2, promując subpopulację Th2 [185]. Jak wykazano w badaniach, progesteron wywołuje zwiększoną produkcję IL-5 i IL-4 przez limfocyty T, również w hodowli *in vitro* na linii Th1, powodując wytwarzanie przez te komórki IL-4, umożliwiając dominację odpowiedzi Th2 w czasie trwania ciąży [185]. Zwiększone stężenia zewnątrzkomórkowego progesteronu *in vivo* i *in vitro* mogą powodować zahamowanie produkcji IFN- γ w ludzkich limfocytach T cytotoksycznych w czasie ciąży, co zostało przypisane hipermetylacji promotora genu IFN- γ na podstawie wyników uzyskanych od ciężarnych myszy wykonanych przez Yao [186]. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem mysiego modelu ciąży ujawniają, że Gal-9 jest biologicznie aktywnym białkiem występującym w cytoplazmie i środowisku zewnątrzkomórkowym, które ma również wyjątkową specyficzność wiązania glikanów [168]. Gal-9 może promować indukcję Treg i apoptozę komórek Th1, wiążąc się z TIM-3⁺ wyrażany na powierzchni ostatecznie zróżnicowanych komórek Th1, ale nie Th2, a jego wiązanie osłabia odpowiedź typu Th1 i Th17 [28, 187]. Wykazano, że szlak Gal-9 / Tim-3 jest wrażliwy na modulację progesteronem podanym do komórek w łożysku myszy. Wykazano, że progesteron zmienia ekspresję Gal-9 i Tim-3 przez subpopulacje limfocytów T oraz komórki NK,

wraz z ekspresją CD107a przez komórki dNK Tim-3⁺ i komórki dNKT Tim-3⁺ [159]. Arruvito i wsp. wykazali, że komórki NK krwi obwodowej wyrażają klasyczny nPR, a ekspresja ta jest ograniczona do dojrzałych fenotypów KIR⁺. Aktywność progesteronu w tych komórkach jest związana ze zwiększoną podatnością zarówno na hamowanie wydzielania IFN- γ indukowanego przez IL-12, jak i na zależną od kaspazy apoptozę [188]. Co więcej, progesteron negatywnie reguluje produkcję przeciwciał o wysokim powinowactwie, a zjawisko to może chronić płód przed zniszczeniem [168]. Stąd progesteron wydaje się być atrakcyjną terapią farmakologiczną, np. mogącą przywrócić matczyną tolerancję immunologiczną i często jest podawany u kobiet zagrożonych powikłaniami ciąży [166].

1.4.2 Wpływ 17 β -estradiolu na komórki układu odpornościowego

Ustalono, że estrogeny są ważnymi mediatorami w wielu procesach fizjologicznych i stanach patologicznych [189]. Istnieje wiele dowodów na to, że 17 β -estradiol (E2) bezpośrednio moduluje rozwój i funkcję komórek odpornościowych [190]. Znane są dwa wewnątrzkomórkowe receptory estrogenowe (ER), ER α i ER β oraz jeden zewnątrzkomórkowy receptor estrogenowym sprzężonym z białkiem G 1 (GPER1), które są odpowiedzialne za wpływ E2 na komórki odpornościowe [191]. Jeśli chodzi o ER, opisano dwie izoformy dla ER α pierwszą o pełnej długości 66 kDa izoformę (ER α 66) oraz drugą krótszą izoformę 46 kDa (ER α 46) nie zawierającą regionu N-końcowego [192]. Dodatkowo jedną izoformę receptora ER β o długości 55 kDa [191]. W rzeczywistości efekty indukowane przez estrogeny obejmują równoczesną aktywację dwóch szlaków sygnałowych MAPK i szlaku ERK przez ER α i szlaku p38 przez ER β [191, 192]. Pierdominici i wsp. w swoich badaniach wykorzystali cytometrię przepływową i technikę western blot, aby określić rozmieszczenie ER w świeżo wyizolowanych komórkach układu odpornościowego z krwi ludzkiej. Ocenili wewnątrzkomórkową i powierzchniową ekspresję ER α i ER β . Dane wykazały wewnątrzkomórkową ekspresję zarówno ER α , jak i ER β w obwodowych limfocytach pomocniczych i cytotoksycznych limfocytach T, limfocytach B i obwodowych komórkach NK. Stwierdzili, że izoforma ER α 46 wydaje się być najbardziej reprezentowaną formą receptora dla estrogenu w limfocytach [192]. Pierdominici i wsp. zaobserwowali również, że niewnikająca do wnętrza komórki forma E2 indukowała szybką fosforylację kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK) powodującą znaczną proliferację limfocytów T i

produkcję IFN- γ przez komórki NK, sugerując w ten sposób ekspresję funkcjonalnego mER α [192]. Estrogen może wpływać na komórki również w niegenomowych szlak regulacji genów. Mechanizmy niegenomowe są alternatywnymi ścieżkami aktywowania kaskad sygnałowych przez estrogeny. Oprócz klasycznych wewnątrzkomórkowych ER estrogen może wiązać się z GPER1, co prowadzi to aktywacji kaskad sygnałowych w komórkach układu odporności [193]. Estrogen zewnątrzkomórkowo wiąże się z GPER1, pierwotnie zidentyfikowanym jako receptor 30 sprzężony z białkiem G (GPR30) [191, 194]. Użycie GPER1 wywołuje szybkie działanie receptorów kinaz tyrozynowych i ograniczenie działania szlaków sygnałowych [195]. Aktywacja szlaku sygnałowego GPER wywołuje odpowiedź czynników transkrypcyjnych. Na początku aktywowane są czynniki odpowiedzi surowicy (SRF), rodzina Ets, białko wiążące element represora cyklicznego AMP (CREB), a następnie drugi poziom obejmujący Fos, Jun, białko odpowiedzi wczesnego wzrostu (EGR) 1, cykliczny czynnik transkrypcyjny zależny od AMP (ATF), czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF), CCAAT / białko wiążące wzmacniacz delta (C / EBPg) i związane z receptorem jądrowym (NR) 4A2 [196]. Powszechnie wiadomo, że estrogen hamuje limfopoezę limfocytów T i B oraz aktywuje funkcję limfocytów B [193]. Dai i wsp. wykazali w mysich splenocytach C57Bl / 6, że estrogen zwiększa aktywność sygnalizacyjną NF κ B powodując zwiększone wytwarzanie IL-1, IL-10 i IFN- γ [197]. W badaniach na ludziach przeprowadzonych przez Moultona i wsp. udowodnili, że 17 β -estradiol hamował produkcję IL-2 w limfocytach T zdrowych kobiet i zwiększał ekspresję czynnika transkrypcyjnego Sp1 oraz represora transkrypcji modulatora elementu odpowiedzi cAMP (CREM) [198]. Ustalili, że estrogen ma specyficzny, zależny od stężenia i podtypu receptora, wpływ na odpowiedzi immunologiczne [198]. Na przykład wykazano, że estrogen zwiększa różnicowanie limfocytów pomocniczych T typu 1, wydzielanie przez komórki IFN- γ i rozwijane procesów zapalnych, w których pośredniczy IFN- γ , w tym wytwarzanie mediatorów zapalnych indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS), NO i (cyklooksygenazy) Cox2 [193]. Maret i wsp. stwierdzili, że podanie estrogeny myszom Bagg Albino z wyciętymi jajnikami (BALB)/c, a następnie immunizacja egzogennymi antygenami, zwiększyło klonalną ekspansję specyficzną dla antygeny komórek T pomocniczych i wybiórczo zwiększyło ilość komórek Th1 i produkcję IFN- γ [199]. Z kolei inne badania przeprowadzone przez Lelu wykazały przeciwny wpływ estrogeny i ER na cytokiny Th1 i Th17. W eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (EAE) mysiego modelu stwardnienia rozsianego z chorobą autoimmunologiczną OUN estrogen

pośredniczy w działaniu neuroprotekcijnym i hamował odpowiedzi Th1, Th17 [200]. Limfocyty T regulatorowe są niezwykle ważne w zapobieganiu rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych i zaobserwowano, że po podaniu myszom estrogenu, na limfocytach, zwiększyła się ekspresja cząsteczek CD25⁺ i FoxP3 [201]. Estrogen zwiększa liczbę i funkcję limfocytów T regulatorowych oraz indukuje ekspresję FoxP3 zarówno in vitro, jak i in vivo [202]. Podawanie estrogenu zwiększyło wewnątrzkomórkową ekspresję PD1 w komórkach T CD4⁺ FoxP3⁺, a ekspresja PD1 była zmniejszona u myszy pozbawionych ER [203]. PD1 jest negatywnym regulatorem odpowiedzi immunologicznej, a jego ekspresja wzrasta na aktywowanych limfocytach T. Dodatkowo, uważa się go za marker dysfunkcyjnych limfocytów T, jest ważny dla tolerancji immunologicznej i jest atrakcyjnym celem leczenia chorób autoimmunologicznych oraz nowotworów [203]. Wykazano więc, że estrogen wpływa nie tylko na rozwój, ale także na różne funkcje limfocytów T, w szczególności limfocytów T pomocniczych - w tym aktywację, różnicowanie produkcji cytokin i funkcje regulacyjne, wpływając na fizjologię i choroby autoimmunologiczne [204].

1.4.3 Wpływ dihydrotestosteronu na komórki układu odporności

Testosteron jest głównym hormonem płciowym i steroidem anabolicznym u mężczyzn. Ponadto testosteron u obu płci wpływa na zdrowie i dobre samopoczucie oraz odgrywa kluczową rolę w profilaktyce osteoporozy. Niedostateczny poziom testosteronu u mężczyzn może prowadzić do nieprawidłowości, w tym osłabienia i utraty masy kostnej. Testosteron jest steroidem z grupy androstanu zawierającym grupy ketonowe i hydroksylowe odpowiednio w pozycjach trzeciej i siedemnastej. Jest biosyntetyzowany w kilku etapach z cholesterolu i jest przekształcany w wątrobie do nieaktywnych metabolitów [205]. Wywiera swoje działanie poprzez wiązanie się z receptorem androgenowym i jego aktywację. U ludzi oraz większości innych kręgowców testosteron jest wydzielany głównie przez jądra przedstawicieli płci męskiej, a w mniejszym stopniu również w niewielkich ilościach przez korę nadnerczy, jajniki i łożysko występujące u przedstawicieli płci żeńskiej [206]. Średnio u dorosłych mężczyzn poziom testosteronu jest około siedem do ośmiu razy wyższy niż u dorosłych kobiet. Ponieważ metabolizm testosteronu u mężczyzn jest bardziej dynamiczny, dzienna produkcja jest około 20 razy większa u mężczyzn. Kobiety są również bardziej wrażliwe na działanie testosteronu i jego pochodnych [205, 206]. Wiadomo, że testosteron i jego metabolit, 5 α -dihydrotestosteron (DHT), pośredniczą w swoim działaniu poprzez wiązanie się z wewnątrzkomórkowym receptorem androgenowym (AR) [207]. Interakcja androgenu z jego receptorem moduluje transkrypcję genów docelowych - mechanizm ten jest znany jako szlak genomowy. Ustalono, że testosteron i DHT mogą wpływać na komórki również w szybkim szlaku niegenomowym. Podczas gdy efekty genomowe wymagają godzin lub dni, aby wywołać swoje działanie, szybkie efekty niegenomowego szlaku steroidowego są aktywowane w ciągu sekund lub minut [207]. Testosteron zwiększa podatność na wiele chorób zakaźnych, ponieważ powoduje hamujący wpływ na odpowiedzi immunologiczne. Na przykład w eksperymentalnych modelach zakażenia malarią lub pierwotniakiem *Leishmania donovani* wcześniejsze leczenie testosteronem skutkowało zwiększonym wskaźnikiem zakażeń. Testosteron znacznie wpływa na reakcje obronne układu odporności, a nieklasyczne drogi aktywacji testosteronem wywierają działanie na limfocyty T i makrofagi [207]. Przeprowadzone badania wykazały, że wykluczenie androgenów wzmacnia odpowiedź immunologiczną i zwiększa skuteczność szczepienia na mysim modelu raka prostaty [208]. W badaniu dotyczącym podatności niemowląt na infekcje stwierdzono, że mężczyźni są znacznie bardziej podatni na infekcje niż

kobiety. Cecha ta jest przypisywana wczesnemu wzrostowi stężenia androgenów, którego doświadczają niemowlęta płci męskiej po urodzeniu [209]. Wykazano, że testosteron ma ogólne działanie supresyjne na układ odpornościowy, w szczególności na autoantygeny i antygeny pochodzące od wirusów [206]. Zastosowanie terapii zastępczej testosteronem w leczeniu pacjentów z zespołem Klinefeltera powoduje obniżenie stężenia przeciwciał i cytokin w surowicy oraz zmniejszenie poziomu limfocytów T i B. Dodatkowo badania przeprowadzone na modelach ptaków potwierdzają immunosupresyjną rolę testosteronu zarówno w adaptacyjnej, jak i wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [206]. Jest oczywiste, że immunosupresyjna rola testosteronu nie ogranicza się do pewnych gatunków, ale można ją postrzegać jako zjawisko szeroko rozpowszechnione u zwierząt, w tym ludzi. Dane wskazują, że hormony płciowe odgrywają znaczącą rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej zarówno na reakcję indukowaną (immunizacja), jak i spontaniczną (autoimmunologiczną) [206]. Badania wskazują, że androgeny mogą odgrywać rolę immunosupresyjną w prawidłowej odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom i po szczepieniu, jednak komórkowe i molekularne mechanizmy efektorowe testosteronu w układzie odpornościowym nie są dobrze poznane [210]. Wielokrotnie potwierdzono, że pozbycie się androgenów u samców wiąże się z powiększeniem grasicy [211, 212]. Ablacja androgenu poprzez kastrację samców, a także defekt sygnalizacji androgenów powoduje odwrócenie i ponowną ekspansję inwolutowanej grasicy, czemu towarzyszy zwiększona komórkowość z powodu większej proliferacji i mniejszej liczby apoptotycznych tymocytów [213]. Co więcej, ablacja androgenów w połączeniu z przeszczepem hematopoetycznych komórek macierzystych skutkuje zwiększoną regeneracją limfoidalną i komórkowością, ujawniając szkodliwą rolę androgenów w odbudowie odporności [214]. Odwrócenie atrofii grasicy po kastracji jest niezależne od wieku i można je ponownie odwrócić podając testosteron lub DHT, co prowadzi do zahamowania odmładzania grasicy, zmniejszenia proliferacji i zwiększonej apoptozy limfocytów T grasicy [211]. Olsen i Kovacs potwierdzili te wyniki u ludzi, wykazując, że przywrócenie testosteronu u mężczyzn z niedoborem androgenów spowodowało zmniejszenie produkcji limfocytów T w grasicy [215]. Dodatkowo kastracja starszych samców myszy spowodowała powrót wydzieliny grasicy do poziomów porównywalnych z tymi u młodszych myszy [134]. Podsumowując, androgeny wpływają hamująco na rozwój grasicy i regulują funkcjonowanie i powstawanie tymocytów. Badania wykastrowanych samców myszy wykazały znaczny wzrost liczby niedawnych emigrantów grasicy, w szczególności naiwnych limfocytów T

CD4⁺ i CD8⁺ CD44⁺, uzupełniających pulę obwodowych limfocytów T [212, 215]. Badania te pokazują, że androgeny hamują liczbę, a być może repertuar, niedawnych emigrantów grasicy wkraczających na peryferia. Wreszcie proliferacja splenocytów w odpowiedzi na stymulację TCR wzrosła po kastracji samców myszy niezależnie od wieku, co sugeruje, że androgeny mogą wpływać na wielkość odpowiedzi limfocytów T po immunizacji [212, 213].

Wiadomo, że komórki Th1 mogą wywoływać negatywne skutki, w tym nieswoiste zapalenie jelit (IBD), odrzucenie przeszczepu oraz choroby autoimmunologiczne, takie jak cukrzyca typu 1 i reumatoidalne zapalenie stawów [216, 217]. Niższa częstość występowania tych chorób u mężczyzn może prowadzić do spekulacji na temat wpływu androgenów na różnicowanie komórek Th1. Z drugiej strony, częstsze występowanie raka u mężczyzn może być związane z hamowaniem cytokin prozapalnych Th1, a w konsekwencji osłabieniem odpowiedzi przeciwnowotworowej [206, 218]. Leczenie androgenami *in vitro* skutkowało zahamowaniem różnicowania limfocytów Th1, mniejszą produkcją IFN- γ i zmniejszoną indukcją fenotypu Th1 zależną od IL-12 [219]. Podobnie wykazano, że ablacja androgenów po przeszczepie szpiku kostnego (BMT) łagodzi objawy EAE i zmniejsza demielinizację i naciekanie limfocytów w OUN [165, 220]. Badania związane z działaniem testosteronu ujawniło, że stymulacja testosteronem skutkuje zwiększeniem aktywności fosfatazy Ptpn1 w szlaku zależnym od receptora androgenowego [219]. Wiadomo, że Ptpn1 inaktywuje Jak2 i kinazy Tyk2 odpowiedzialne za indukowaną przez IL-12 fosforylację STAT 4 potrzebną do indukcji różnicowania Th1 [220]. Inne badania pokazują, że regulacja immunologiczna przez androgeny, takie jak testosteron, wpływa na układ odpornościowy, wzmacniając odpowiedź Th1 i aktywację komórek CD8, jednocześnie zmniejszając odpowiedź komórek NK i zwiększając produkcję przeciwwzapalnej IL-10 [221]. Potwierdzają to badania pokazujące, że obecność testosteronu *in vitro* prowadzi do wyższej produkcji Th1 przez komórki krwi obwodowej przy wyższym stosunku Th1: Th2 u mężczyzn [222, 223]. Wpływ testosteronu i jego pochodnych na limfocyty T pomocnicze typu 1 jest słabo rozpoznany. Istnieją pewne dowody na to, że testosteron może bezpośrednio indukować produkcję IL-10 przez komórki Th2 w modelu EAE zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Splenocyty od samic myszy SJL traktowanych DHT wydzielają znacznie większe ilości IL-10 *in vitro*, a dodanie DHT do hodowli komórek T CD4⁺ prowadzi do większej produkcji IL-10. Następnie wykazano, że samice myszy SJL mają mniejszą częstość występowania EAE po leczeniu DHT [224, 225]. Jednak kastracja samców myszy sprawia, że są one zdolne do usunięcia infekcji robakami pasożytniczymi i wykazano, że są one

zależne od zmniejszenia ekspresji IL-18. Z drugiej strony samice myszy poddanych owariektomii nadal były w stanie wytworzyć odpowiedź Th2 i zwalczyć infekcję pasożytniczą. Wyniki te wskazują, że testosteron działa hamująco na eliminację pasożytów poprzez hamowanie odporności napędzanej przez limfocyty Th2, głównie poprzez podwyższenie poziomu IL-18 [223, 226]. Wydaje się więc, że testosteron działa hamująco na komórki układu odpornościowego, jednak nadal niezbędne jest dokładniejsze zbadanie i ustalenie mechanizmów działania tego związku na układ odpornościowy.

1.5 Definicja poronienia nawykowego.

Poronienie nawykowe (nawracające) definiuje się jako wystąpienie 2 lub więcej następujących po sobie poronień przed ukończeniem 22 tygodnia ciąży w tym samym układzie partnerskim lub jako kolejną stratę ciąży przed osiągnięciem 500g wagi przez płód [2, 227]. Częstość występowania tego problemu ocenia się od 1-2% do 2-5% par w wieku rozrodczym, jest to około 3 ciążarnych na 1000. Poronienia nawykowe stanowią także 5% wszystkich poronień samoistnych i przyczynę utraty 0,4-0,8% wszystkich ciąż [227]. Wystąpienie poronienia znacząco podnosi prawdopodobieństwo wystąpienia kolejnego. Po dwóch przebytych poronieniach ryzyko trzeciego wynosi 17-35%, a każdego następnego 25-46% [2].

1.5.1 Przyczyny poronień

Do przyczyn wystąpienia poronień nawykowych zaliczamy:

1. **Zaburzenia fizjologiczne** – w tym zaburzenia anatomiczne macicy (wrodzone lub nabyte) takiej jak zrosty wewnątrzmaciczne, polipy endometrialne, mięśniaki macicy, niewydolność cieśniowo-szyjkowa [2].
2. **Zaburzenia hormonalne** - szacuje się, że stanowią około 3-5% poronień nawykowych. Do zaburzeń hormonalnych zalicza się zaburzenia takie jak: hiperprolaktynemia, hiperandrogenizm, zespół policystycznych jajników (PCOS). Takie zaburzenia hormonalne mogą przyczynić się do zaburzenia funkcji ciała żółtego. Zaburzenia te uniemożliwiają prawidłowe zagnieżdżenie się zarodka, a w efekcie brak możliwości rozwoju ciąży. Defekt jajnikowy prowadzi do zmniejszonej produkcji progesteronu i lipoprotein niskiej gęstości (LDL), co zaburza fazę lutealną. Zaliczane są tu również cukrzyca typu I oraz zaburzenia tarczycowe [2].
3. **Zaburzenia genetyczne płodu** - są przyczyną około 5% poronień nawykowych. Około 50% stanowią trisomie, 15-25% monosomie X, 15% triploidie a 5-8% tetraploidie [2].
4. **Zaburzenia krzepliwości krwi** – trombofilie wrodzone oraz nabyte, takie jak: mutacja czynnika V Leiden, mutacja genu dla protrombiny, mutacja genu MTHFR. Jako przyczyny poronień zaliczamy również niedobory białka S, białka C oraz antytrombiny [2].
5. **Czynniki mikrobiologiczne** – zakażenia bakteryjne (np. Chlamydia trachomatis), wirusowe (wirus opryszczki - HSV, wirus cytomegalii - CMV, wirus Coxsackie) oraz

pierwotniakami (*Toxoplasma gondii*). Również przewlekłe bakteryjne zakażenia pochwy lub kanału szyjki macicy mogą doprowadzić do poronienia [227].

- 6. Czynniki immunologiczne** – stanowią około 15-20% rozpoznanych przyczyn poronień; występowanie przeciwciał antyfosfolipinowych (APA), antykardiolipinowych (ACA), przeciwplemnikowych (ASA); toczeń rumieniowaty (LE), zaburzenia układu odpornościowego w odpowiedzi na antygen trofoblastu [2].
- 7. Czynniki środowiskowe** - nikotynizm, alkoholizm. Najnowsze badania pozwalają przypuszczać, że jako przyczyny występowania poronień nawykowych można zaliczyć stres i depresje oraz choroby układu pokarmowego: celiakia, otyłość - występowanie receptorów dla leptyny na powierzchni zewnętrznych kosmków trofoblastu [2].

1.5.2 Zaburzenia immunologiczne

Zaburzenia immunologiczne są poważnym i udokumentowanym czynnikiem powodującym poronienia nawykowe. Stanowią one 15-20% wszystkich poronień nawykowych. Z punktu widzenia immunologicznego płód jest dla organizmu matki "pół-allogenicznym przeszczepem" (semi-allogenic transplant). Na powierzchni trofoblastu dochodzi do ekspresji antygenów zgodności tkankowej (Human Leukocyte Antigens- HLA) zarówno od matki, jak i od ojca. Rozpoznanie obcych cząsteczek HLA przez limfocyty matki prowadzi do rozwinięcia się reakcji zapalnej, która w konsekwencji może prowadzić do wystąpienia poronienia, a także do zaburzeń autoimmunologicznych o podłożu humoralnym [3].

Zaburzenia autoimmunologiczne, których przyczyną jest obecność autoprzeciwciał mogą być powodowane przez:

- 1) przeciwciała przeciwjądrowe (antinuclear antibodies - ANA)
- 2) przeciwciała przeciwfosfolipidowe (antiphospholipid antibodies - APL)
- 3) przeciwciała przeciwplemnikowe (antisperm antibodies - ASA)

1.5.2.1 Przeciwciała przeciwjądrowe

Przeciwciała przeciwjądrowe są przyczyną około 22% poronień nawykowych związanych z zaburzeniami immunologicznymi. Przeciwciała te skierowane są przeciwko dwuniciowemu DNA, polinukleotydów, polimerazie RNA czy histonom. U osób z chorobami autoimmunologicznymi powodują zapalenie stawów oraz różnych narządów wewnętrznych, zaś u kobiet zdrowych mogą prowadzić do stanów zapalnych w czasie implantacji zarodka lub w samym łożysku. Często wykrywane są razem z przeciwciałami antyfosfolipidowymi [228].

1.5.2.2 Przeciwciała przeciwfosfolipidowe

Uważa się, że przeciwciała przeciwfosfolipidowe (APL), skierowane przeciwko fosfolipidom błon komórkowych, powodują poronienia ze względu na zwiększone ryzyko powstawania zakrzepów, które zaburzają ukrwienie zarodka oraz łożyska. Przeciwciała antyfosfolipidowe mogą pojawić się w organizmie matki w wyniku uszkodzenia tkanek czy wielokrotnych poronień. Przeciwciała APA wykształcają się zarówno w klasie IgM, jak i IgG. Pojawienie się stanu zapalnego prowadzi do aktywacji kaskady krzepnięcia. Przeciwciała antyfosfolipidowe hamują aktywne białko C, antytrombinę III oraz czynnik tkankowy, pojawiają się zmiany o charakterze zakrzepowo-zatorowym. Podobne zmiany wykrywa się u pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym (SLE), lecz nie zawsze prowadzą one do poronień. Zespół antyfosfolipidowy rozwija się u około 22% pacjentek z poronieniami nawykowymi, każde następne poronienie zwiększa ryzyko wystąpienia tego zespołu o około 15%. Do ważnych dla rozwoju zarodka fosfolipidów zaliczmy serynę i etanolaminę, to one pozwalają na zespolenie łożyska z zarodkiem i transport substancji odżywczych do zarodka. Ich niedobór zaburza proces prawidłowego rozwoju łożyska, co może prowadzić do poronienia [228].

1.5.2.3 Przeciwciała przeciwplemnikowe

Przeciwciała te mogą być przyczyną niepłodności zarówno kobiet (8-20%) jak i mężczyzn (10-20%). U mężczyzn mogą pojawić się po przebytym urazie lub infekcji jąder w wyniku zaburzenia bariery krew-jądro. Pojawiają się również u około 1-12% płodnych kobiet. W niektórych przypadkach pojawiają się bez uchwytej przyczyny. Są one wykrywane we krwi, nasieniu oraz ślinie szyjowym. Stanowią one problem z zapłodnieniem, jeżeli są skierowane przeciwko plemnikowym antygenom niezbędnym do zapłodnienia komórki jajowej. Przeciwciała te mogą wiązać główki plemników lub opłaszczają je powodując ich spowolnienie lub niemożność ruchu. Wiadomo, że antygeny plemnikowe wbudowywane są w strukturę zarodka, jak i pełnią ważną funkcję w procesie zagnieżdżenia. Ekspresja antygenów plemnikowych na komórkach zarodka może prowadzić do niezgodności z układem zgodności tkankowej (MHC) matki i prowadzić do poronienia [228].

1.5.3 Rozpoznawanie antygenów HLA ojca przez limfocyty matki.

Konflikt między zarodkiem a organizmem matki pojawia się, gdy układ odpornościowy kobiety rozpozna na zarodku antygeny zgodności tkankowej HLA pochodzące od ojca.

Antygeny zgodności tkankowej (MHC, zwane również HLA) są glikoproteinami. W zależności od miejsca występowania i rolę w prezentacji antygenów możemy podzielić je na trzy grupy:

- MHC klasy I występujące na powierzchni wszystkich komórek jądrzastych,
- MHC klasy II występujące konstytutywnie tylko na profesjonalnych komórkach prezentujących antygen (APC), czyli: komórkach dendrytycznych, limfocytach B oraz makrofagach, zaś po indukcji mogące występować również na innych komórkach.
- MHC klasy III w małej ilości występuje na monocytach

Cząsteczki MHC klasy I możemy podzielić na klasyczne: HLA-A, HLA-B, HLA-C oraz nieklasyczne: HLA-E, HLA-F, HLA-G, MICA oraz MICB [229]. Również cząsteczki MHC klasy II możemy podzielić na klasyczne: HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ oraz nieklasyczne: HLA-DM, HLA-DO [229]. Najważniejszą funkcją cząsteczek MHC klasy I i II jest prezentacja antygenów limfocytom T [229]. W warunkach fizjologicznych trofoblast wykazuje ekspresję nieklasycznych cząsteczek MHC: HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-D oraz HLA-G, co chroni go przed odpowiedzią immunologiczną matki, szczególnie jej komórek NK [3]. W momencie, gdy dojdzie do ekspresji klasycznych cząsteczek MHC (HLA-A, HLA-B, HLA-DR, DQ, DP) na powierzchni trofoblastu dochodzi do rozpoznania antygenów i niszczenia zarodka [3]. Podobna sytuacja ma miejsce, gdy para rodziców ma podobne antygeny zgodności tkankowej - prowadzi to do rozpoznania tych cząstek przez organizm matki jako komórki własne, ale zmienione, i prowadzi do zniszczenia trofoblastu [2, 3]. Rola oraz funkcja MHC klasy III nadal pozostaje nieznana [230].

2. Cel pracy

Na podstawie opisanych powyżej danych literaturowych oraz przeprowadzonych badań wstępnych, w obecnym projekcie postawiono następujące cele badawcze:

- Ocena różnic w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy takich jak: PD1, TIM-3, LAG-3, TIGIT, VISTA na subpopulacjach limfocytów (pomocniczych, cytotoksycznych regulatorowych) oraz komórkach NK oraz NKT izolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, ciężarnych oraz zdrowo rodzących.
- Ocena wpływu hormonów płciowych (progesteronu, 17β -estradiolu, dihydrotestosteronu) na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy takich jak: PD1, TIM-3, LAG-3, TIGIT, VISTA na subpopulacjach limfocytów (pomocniczych, cytotoksycznych regulatorowych) oraz komórkach NK oraz NKT w hodowlach założonych z limfocytów izolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi oraz ciężarnych.
- Ocena stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (sPD1, sTIM-3, sLAG-3, sCTLA-4, sVISTA) oraz ich ligandów (sPD-L1, sPD-L2, sGal-9, sCD80, sCD86, sCD112 (sNectin-2), sCD28, sHVEM) w surowicach uzyskanych od kobiet z poronieniami nawykowymi, ciężarnych oraz zdrowo rodzących.

3. Materiał i metody

Prowadzone badania zostały zaaprobowane przez Komisję Bioetyczną WUM. Numer opinii komisji bioetycznej: KB/13/2020. Każda z kobiet biorących udział w badaniu wyraziła świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu.

Kobiety biorące udział w badaniu zostały podzielone na 3 grupy: kobiety ciężarne, kobiety po poronieniu z rozpoznanymi nawracającymi poronieniami oraz kobiety niebędące w ciąży. Z wszystkimi kobietami biorącymi udział w badaniu została przeprowadzona ankieta. Na podstawie ankiety uzyskaliśmy informacje związane z: wiekiem, masą ciała, wzrostem, występowaniem objawów prodromalnych ciąży (wymioty, nudności, ból piersi), wykonanymi zabiegami przed i w trakcie ciąży.

Kobiety zostały również zapytane o przyjmowanie witamin lub suplementów diety przed ciążą oraz podczas ciąży, przyjmowanie kwasu foliowego na 6 tygodni przed ciążą, stosowanie antykoncepcji hormonalnej, leczenie in vitro. Dodatkowo uzyskaliśmy informacje na temat chorób przewlekłych, takich jak cukrzyca, endometrioza, insulinooporność, choroba Hashimoto czy zespół policystycznych jajników.

3.1 Grupy badane

3.1.1 Kobiety ciężarne

Grupa składała się z 20 kobiet będących we wczesnej ciąży (do 12 tygodnia). Pacjentkom wykonano badanie ultrasonograficzne i badania krwi w celu ustalenia, czy ciąża rozwija się prawidłowo. U żadnej z kobiet zakwalifikowanych do tej grupy wcześniej nie doszło do poronienia.

3.1.2 Kobiety po poronieniu z rozpoznanymi nawracającymi poronieniami

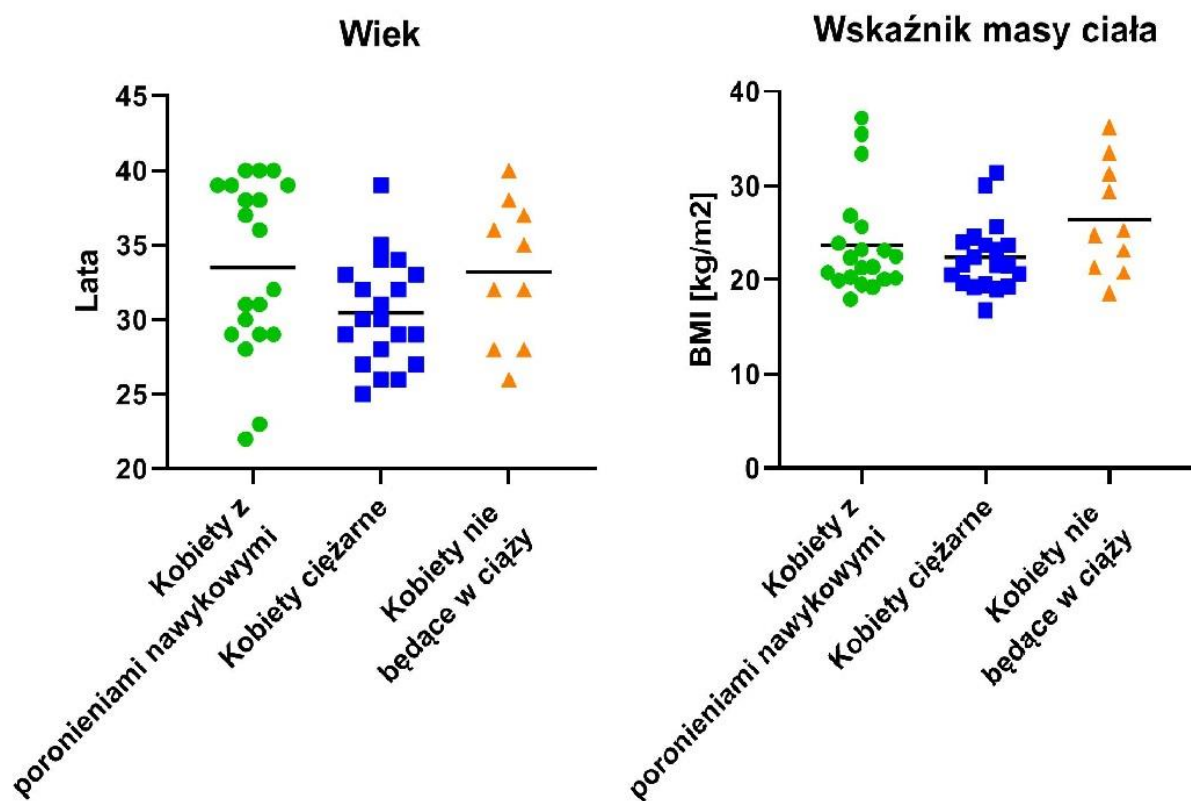
Do grupy włączono 20 pacjentek z rozpoznanymi nawracającymi poronieniami. U wszystkich kobiet w tej grupie wcześniej co najmniej 2 razy dochodziło do utraty ciąży. Do wszystkich poronień dochodziło przed 22 tygodniem ciąży. Materiał został pobrany maksymalnie 72 godziny od momentu ostatniego poronienia. Z badań wyłączono pacjentki z anatomicznymi, genetycznymi, mikrobiologicznymi, immunologicznymi lub hormonalnymi przyczynami poronień.

3.1.3 Kobiety niebędące w ciąży

Grupa składała się z 10 kobiet, które w momencie zakwalifikowania do badania nie były w ciąży, bez zaburzeń w wywiadzie położniczo-ginekologicznym i internistycznym. Wszystkie kobiety z tej grupy odbyły przynajmniej jeden poród bez powikłań, kobiety deklarowały prawidłowy przebieg ciąży i porodu. U żadnej z kobiet w tej grupie nie doszło wcześniej do poronienia.

3.2 Analiza grup na podstawie przeprowadzonych ankiet

Na podstawie przeprowadzonych ankiet nie stwierdziliśmy różnic w wieku i BMI pomiędzy grupami (Tabela 1). W tabeli 2 przedstawiono występowanie chorób przewlekłych: cukrzycy, endometriozy, insulinooporności, choroby Hashimoto, zespołu policystycznych jajników wśród uczestniczek zakwalifikowanych do badań. Grupy zostały dokładnie zbadane pod kątem liczby poronień i ciąż donoszonych przez uczestników badania.



Rycina 1: Rozkład wieku i BMI między grupami. Kobiety z poronieniami n = 20, kobiety w ciąży n = 20, kobiety niebędące w ciąży n = 10.

Tabela 1: Porównanie między grupami: wiek, BMI, średnia liczba ciąż donoszonych, średnia liczba poronień

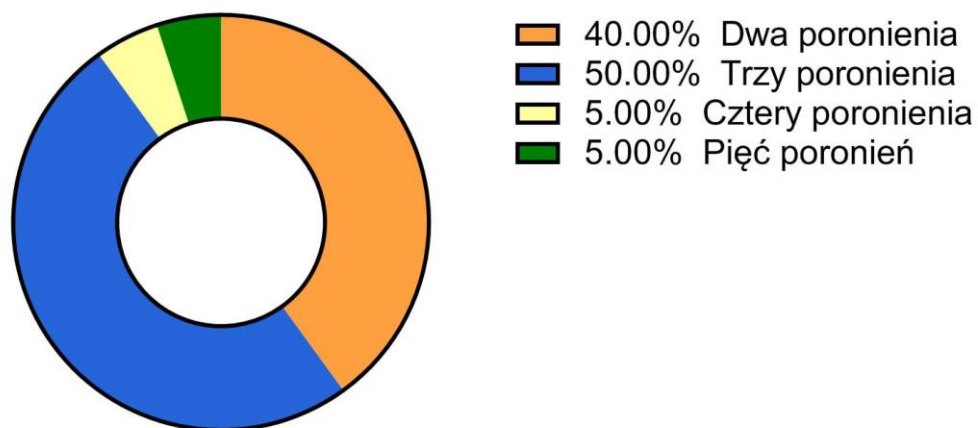
	Kobiety z poronieniami	Kobiety ciężarne	Kobiety niebędące w ciąży
Wiek (lata)	33,5 ± 5,6	30,5 ± 3,5	33,2 ± 4,5
BMI	23,7 ± 5,3	22,4 ± 3,5	26,4 ± 5,6
Średnia liczba ciąż zakończonych żywym porodem	0	0,6	1,6
Średnia liczba poronień	2,75	0	0

Nie wykazałem istotnych różnic w wieku oraz BMI pomiędzy grupami (Tabela 1, Rycina 1). W Tabeli 2 przedstawiłem ilość występujących chorób wśród kobiet z grup badanych. Wśród kobiet ciężarnych najczęściej kobiet chorowało na chorobę Hashimoto, a wśród kobiet z poronieniami nawykowymi na endometriozę oraz chorobę Hashimoto (Tabela 2).

Tabela 2: Występowanie chorób przewlekłych w grupach.

	Kobiety z poronieniami	Kobiety ciężarne	Kobiety niebędące w ciąży
Cukrzyca	1	2	0
Endometrioza	2	0	0
Insulinooporność	1	0	0
Choroba Hashimoto	2	6	1
Zespół policystycznych jajników	0	2	0

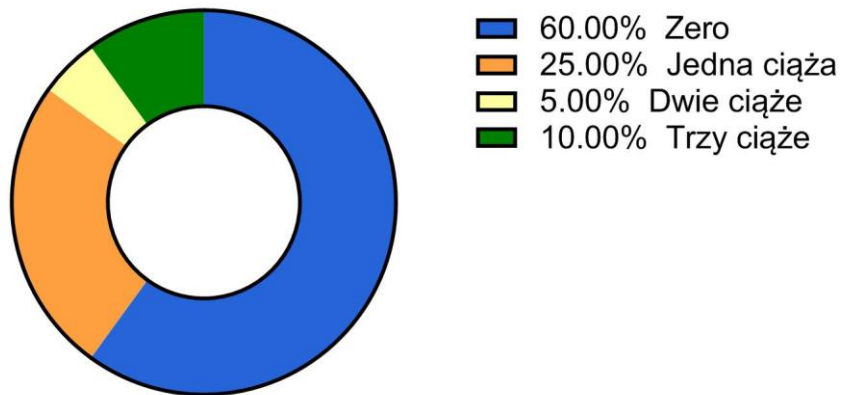
Liczba poronień



Rycina 2: Precyzyjne przedstawienie liczby poronień przed przyjęciem do szpitala w grupie kobiet z poronieniami; n = 20.

W grupie kobiet z poronieniami nawykowymi 40 % kobiet doznało 2 poronień przed zakwalifikowaniem do badania, a 50% kobiet trzech poronień, 5% czterech poronień i kolejne 5 % 5 poronień (Rycina 2).

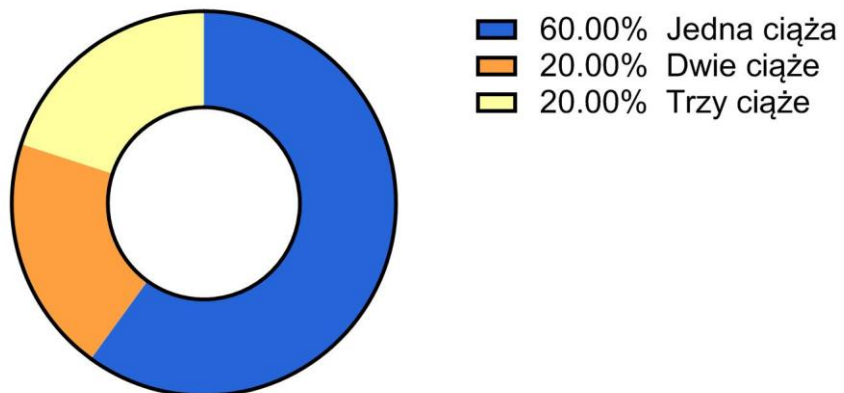
Liczba przebytych ciąż zakończonych porodem



Rycina 3: Przedstawienie liczby przebytych ciąż w grupie kobiet ciężarnych, n = 20.

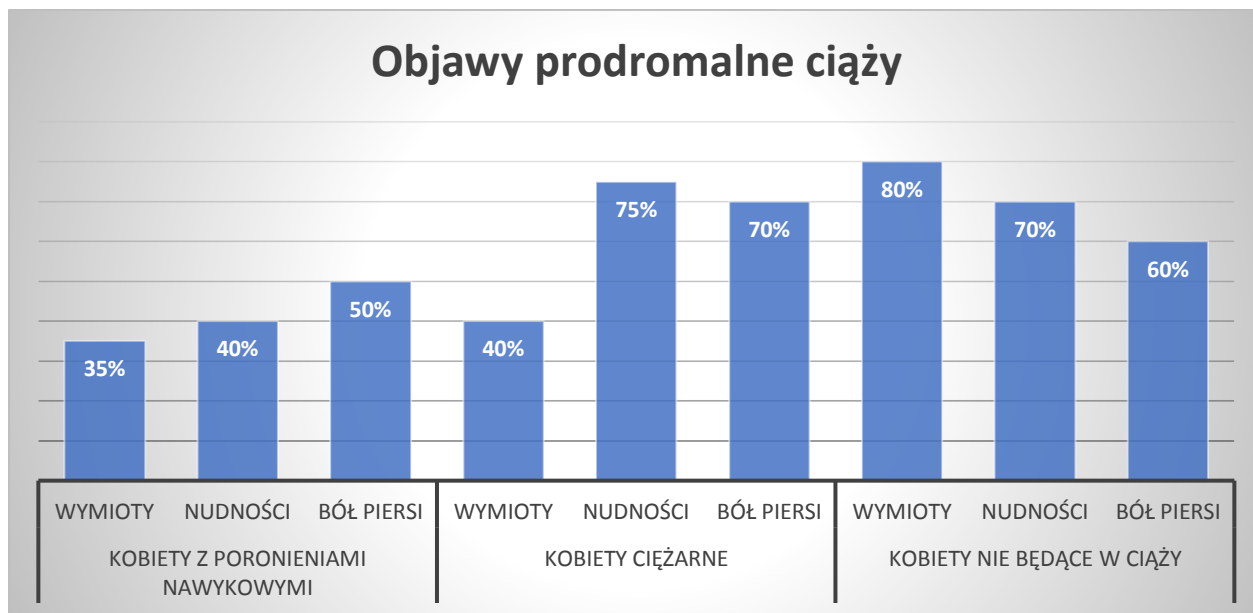
W grupie kobiet ciężarnych 60% kobiet zakwalifikowanych do badania wskazało, że wczesniej nie było w ciąży, a obecna ciążą jest ich pierwszą. 25% kobiet wskazało, że przebyły jedną ciążę, 5%, że dwie, a 10% wskazało, że przebyło trzy ciąże (Rycina 3).

Liczba przebytych ciąż zakończonych porodem



Rycina 4: Przedstawienie liczby przebytych ciąż w grupie kobiet niebędących w ciąży, n = 10.

W grupie kobiet niebędących w ciąży 60% kobiet wskazało, że przebyło jedną ciążę, 20% że dwie, a kolejne 20%, że trzy (Rycina 4).



Rycina 5: Częstość występowania objawów prodromalnych (wymioty, nudności, ból piersi) w grupach: kobiet z poronieniami n = 20, kobiet ciężarnych n = 20, kobiet niebędących w ciąży n = 10.

Kobiety w grupie RSA wskazywały mniejszą częstość objawów prodromalnych w porównaniu do kobiet w ciąży i kobiet niebędących w ciąży (Rycina 5). W naszym badaniu zebraliśmy dane dotyczące przyjmowania leków przed i podczas trwania ciąży (Tabela 3).

Tabela 3: Przyjmowanie suplementów diety i kwasu foliowego przed ciążą i w czasie ciąży Grupa kobiet z poronieniami n = 20, kobiet ciężarnych n = 20, kobiet niebędących w ciąży n = 10.

	Kobiety z poronieniami nawykowymi	Kobiety ciężarne	Kobiety niebędące w ciąży
Przyjmowanie kwasu foliowego przed ciążą	80%	65%	60%
Przyjmowanie leków i suplementów diety przed ciążą	75%	60%	30%
Przyjmowanie leków i suplementów diety podczas trwania ciąży	75%	90%	40%

3.3 Metody

3.3.1 Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest obecnie szeroko stosowaną metodą analizy ekspresji wielu cząstek związanych z pojedynczą komórką. Metoda ta pozwala na wykrywanie cząsteczek zewnątrz oraz wewnątrzkomórkowych, charakteryzowanie i definiowanie różnych typów komórek w heterogenicznych populacjach komórek, ocenę czystości izolowanych subpopulacji oraz analizy wielkości i objętości komórek. Zastosowanie przeciwciał oraz fluorochromów umożliwia jednoczesną wieloparametrową analizę pojedynczych komórek poprzez pomiar intensywności fluorescencji wytwarzanej przez wyznakowane fluorescencyjnie przeciwciała. Cytometria pozwala na analizę białek (receptorów lub ligandów) związanych z błoną komórkową lub wydzielanych przez komórkę, dodatkowo możemy oceniać funkcjonalność poszczególnych komórek poprzez ocenę ich żywotności, proliferacji czy fazy cyklu komórkowego. Procedura barwienia obejmuje wykonanie zawiesiny pojedynczych komórek z hodowli komórek, próbek tkanek lub krwi. Komórki następnie inkubuje się w probówkach lub płytkach z przeciwciałami nieznakowanymi lub znakowanymi fluorochromem i analizuje w cytometrze przepływowym. Zawiesina komórek zaaspirowana do cytometru poprzez dodanie płynu zmniejszającego wiązana pomiędzy komórkami pozwala na hydrodynamiczne ogniskowanie przez małą dyszę. Drobnym strumieniem płynu przenosi komórki przez światło lasera po jednej komórce na raz. Światło rozproszone z komórek lub cząstek jest wykrywane, gdy przechodzą przez wiązkę laserową. Detektor przed wiązką światła mierzy rozproszenie z przodu (FS), a kilka detektorów dokonuje pomiaru bocznego rozpraszania (SS). Detektory fluorescencji mierzą fluorescencję emitowaną przez dodatnio zabarwione komórki lub cząstki. Komórki lub cząstki przechodzą przez wiązkę światła rozpraszającego, które jest wykrywane jako FS i SS. FS koreluje z rozmiarem komórki, a SS jest proporcjonalne do ziarnistości komórek. W ten sposób populacje komórek można często rozróżniać na podstawie samych różnic w ich wielkości i ziarnistości. Oprócz oddzielania komórek na podstawie FS i SS, komórki można również rozdzielać na podstawie tego, czy wyrażają określone białko. W takim przypadku do barwienia białka będącego przedmiotem zainteresowania często stosuje się fluorochromy. Fluorochromy używane do wykrywania białek docelowych emitują światło po wzbudzeniu przez laser o odpowiedniej długości fali wzbudzenia. Te zabarwione fluorescencyjnie komórki lub cząstki można wykryć indywidualnie. Światło

rozproszone w przód i w bok oraz fluorescencja zabarwionych komórek są dzielone na określone długości fal i kierowane przez zestaw filtrów i luster w cytometrze przepływowym. Światło fluorescencyjne jest filtrowane, dzięki czemu każdy czujnik będzie wykrywał fluorescencję tylko przy określonej długości fali. Czujniki te nazywane są fotopowielaczami (PMT). W dichroicznym filtrze długoprzepustowym fotony powyżej określonej długości fali są przesyłane na wprost, podczas gdy fotony poniżej określonej długości fali są odbijane pod kątem 90°. Gdy komórka fluorescencyjna przechodzi przez wiązkę laserową, z upływem czasu wytwarza szczyt lub impuls emisji fotonów. Są one wykrywane przez PMT i przekształcane w impuls napięciowy, zwany zdarzeniem. Całkowita wysokość i powierzchnia impulsu są mierzone przez cytometr przepływowy. Zmierzony obszar impulsu napięcia będzie bezpośrednio skorelowany z intensywnością fluorescencji dla tego zdarzenia, co pozwala na ustalenie, czy na danej komórce występuje wyznakowana przez nas cząsteczka, a jeśli tak, to w jakiej ilości.

3.3.2 Luminex

Testy immunologiczne Luminex Multiplex Bead to testy typu sandwich na fazie stałej, które są przeznaczone do analizy przy użyciu aparatów typu Luminex. Właściwości widmowe 100 różnych regionów kulek można monitorować za pomocą instrumentu Luminex, co daje temu systemowi testowemu możliwość pomiaru do 100 różnych analitów w jednej próbce. Kulki o określonych właściwościach spektralnych sprzężone ze specyficznymi dla analitu przeciwciałami wychwytyjącymi (w tym wzorcami o znanym stężeniu analitu, próbkach kontrolnych i nieznanym) są pipetowane do dołków mikropłytki z filtrem i inkubowane z próbkami. Mikrosfery lub kulki oznaczone kolorami są wewnętrznie zabarwione różnymi proporcjami fluoroforów na czerwono i podczerwieni, które odpowiadają odrębnej sygnaturze widmowej lub regionowi kulki. Podczas tej pierwszej inkubacji anality wiążą się z przeciwciałami wychwytyjącymi na kulkach. Po przemyciu kulek dodaje się biotynylowane przeciwciała wykrywające specyficzne dla analitu i inkubuje z kulkami. Podczas tej drugiej inkubacji biotynylowane przeciwciała wykrywające swoiste dla analitu rozpoznają swoje epitopy i wiążą się z odpowiednimi unieruchomionymi analitami. Po usunięciu nadmiaru biotynylowanych przeciwciał wykrywających dodaje się i inkubuje streptawidynę sprzężoną z białkiem fluorescencyjnym R-fikoerytryną (streptawidyna-RPE). Podczas tej ostatniej inkubacji streptawidyna-RPE wiąże się z biotynylowanymi przeciwciałami

wykrywającymi związanymi z kompleksami immunologicznymi na kulkach, tworząc czterocząłową kanapkę z fazą stałą. Po przemyciu w celu usunięcia niezwiązanej Streptavidiny-RPE, kulki analizuje się za pomocą urządzenia Luminex. Monitorując właściwości spektralne kulek i ilość związanej z nimi fluorescencji R-fikoerytryny (RPE) można określić stężenie jednego lub większej liczby analitów.

3.3.3 Izolacja materiału PBMC

Krew była pobierana do próbek z heparyną. Po pobraniu krew zmieszano w proporcji 1: 2 objętości z roztworem PBS. Rozcieńczoną krew delikatnie nawarstwiono do 15 ml próbek na wcześniej przygotowane 3 ml roztworu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Niemcy). Po nawarstwieniu próbki wirowano przy 800 x g przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Komórki z interfazy zebrano, a następnie przeniesiono do nowych próbek. Zebrane PBMC przemyto roztworem PBS (aqua-med, Polska) i wirowano 600 x g, 10 minut w temperaturze pokojowej. Ten krok został powtórzony dwukrotnie. Następnie komórki zawieszono w medium hodowlanym RPMI ze stabilną glutaminą (Biowest) wzbogaconą 10% inaktywowaną termicznie ludzką surowicą (Sigma Aldrich), roztworem antybiotyko-przeciwgrzybiczym 100 IU, penicyliną, 100µg / ml Streptomycyną, 0,25µg / ml Amfoterycyną (Corning, BD , USA).

Ludzką surowicę przed użyciem inkubowano przez 24h z preparatem dextran-coated charcoal (Sigma Aldrich) w celu absorpcji hormonów płciowych zawartych w preparacie. Po inkubacji surowica została odwirowana w celu pozbycia się preparatu. Oczyszczona surowica została podzielona na odpowiednie objętości i zamrożona w -20°C.

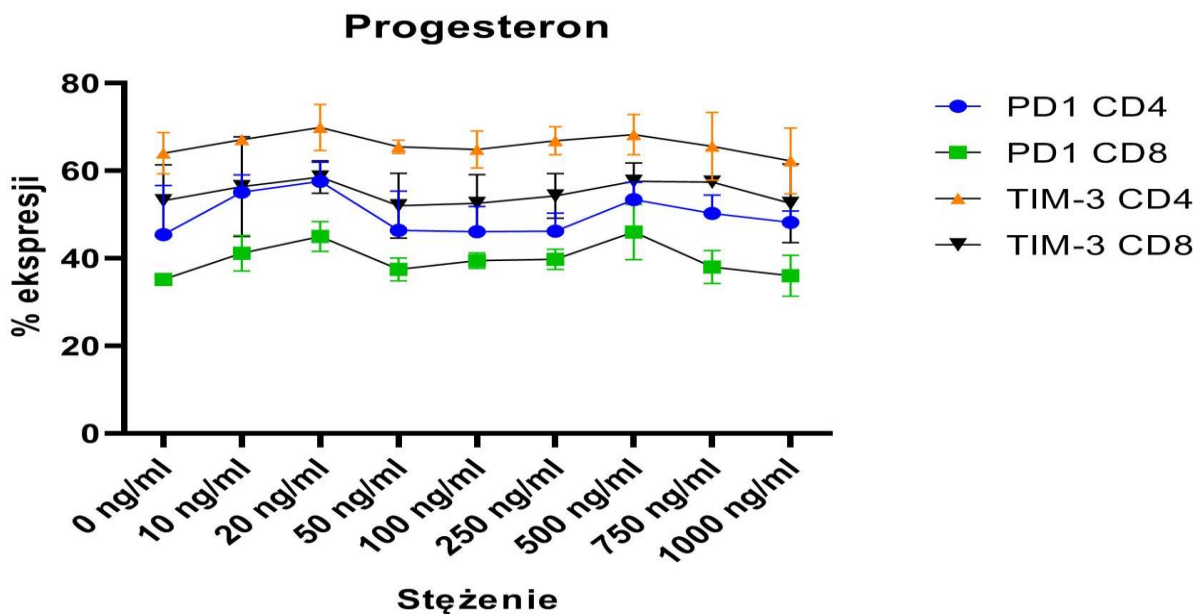
3.3.4 Wybór stężeń hormonów do hodowli komórkowych

Przed rozpoczęciem hodowli dokonano wyboru stężeń hormonów (progesteronu, estradiolu, dihydrotestosteronu) na podstawie oceny wpływu wyżej wymienionych hormonów na ekspresję PD1 oraz TIM-3 na limfocytach T cytotoksycznych (CD3+CD8+) oraz pomocniczych (CD3+CD4+). Badanie przeprowadzono w trzech powtórzeniach na krwi uzyskanej od zdrowych kobiet niebędących w ciąży. Do badania przygotowano szereg rozcieńczeń dla poszczególnych

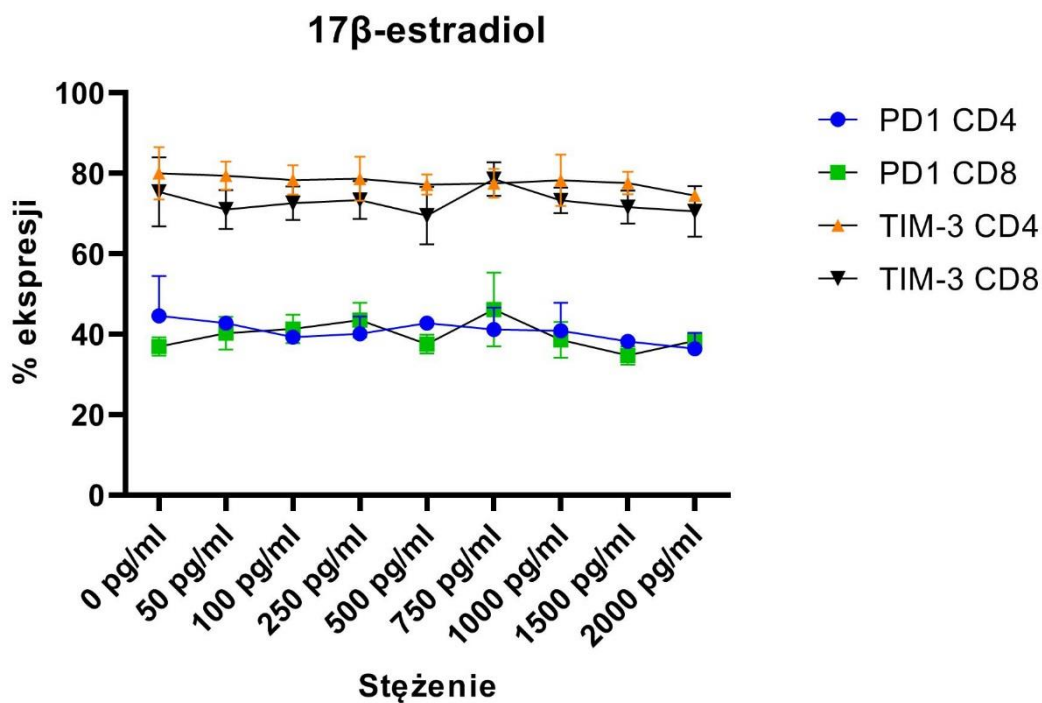
hormonów (Tabela 4), a hodowle przygotowano z uwzględnieniem trzech punktów czasowych 12h, 24h, 48h. Największe zmiany w ekspresji PD1 oraz TIM-3 uzyskano w hodowlach 48h przy stężeniach: Progesteronu 250 ng/ml oraz 500ng/ml, estradiolu 250 pg/ml oraz 750 pg/ml, dihydrotestosteronu 250 pg/ml oraz 500 pg/ml (Ryciny 6-8).

Tabela 4: Stężenia przetestowane podczas wybierania optymalnych stężeń dla doświadczeń.

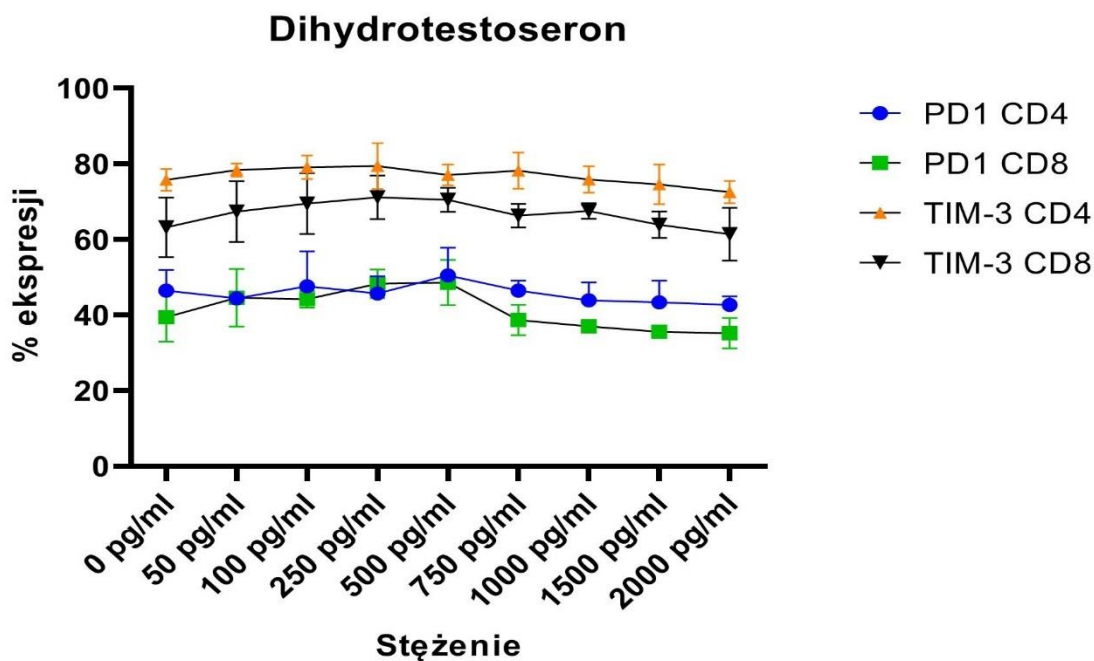
Progesteron	0 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	750 ng/ml	1000 ng/ml
17β-estradiol	0 pg/ml	50 pg/ml	100 pg/ml	250 pg/ml	500 pg/ml	750 pg/ml	1000 pg/ml	1500 pg/ml	2000 pg/ml
Dihydrotestosteron	0 pg/ml	50 pg/ml	100 pg/ml	250 pg/ml	500 pg/ml	750 pg/ml	1000 pg/ml	1500 pg/ml	2000 pg/ml



Rycina 6: Ocena wpływu różnych stężeń progesteronu na ekspresję cząsteczek PD1 oraz TIM-3 na limfocytach CD4⁺ oraz CD8⁺. Badania wstępne do przeprowadzenia hodowli komórkowych.



Rycina 7: Ocena wpływu różnych stężeń 17 β -estradiolu na ekspresję cząsteczek PD1 oraz TIM-3 na limfocytach CD4⁺ oraz CD8⁺. Badania wstępne do przeprowadzenia hodowli komórkowych.



Rycina 8: Ocena wpływu różnych stężeń Dihydrotestosteronu na ekspresję cząsteczek PD1 oraz TIM-3 na limfocytach CD4⁺ oraz CD8⁺. Badania wstępne do przeprowadzenia hodowli komórkowych.

3.3.5 Przygotowanie roztworów hormonów do założenia hodowli

Progesteron

Do zakupionego liofilizatu dodano 1ml 100% etanolu w celu osiągnięcia stężenia początkowego roztworu 1 mg/ml. Następnie roztwór podzielono na porcje po 10 µl i zamrożono w temperaturze -80°C. Przed założeniem hodowli ampulkę rozmrożono i dodano do niej 990 µl medium hodowlanego. Po dodaniu medium ampulkę worteksowano z przerwami, przez minutę. Powstało rozcieńczenie nr 1 (10µg /ml). Następnie z otrzymanego roztworu pobrano 100 µl i przeniesiono do nowej probówki endorfa, gdzie dodano 900 µl medium. Powstały roztwór ponownie wirowano z przerwami w probówce endorfa. Powstało rozcieńczenie nr 2 (1 µg/ml). Do założenia hodowli pobrano odpowiednio 50 µl z roztworu nr 1, aby osiągnąć stężenie w hodowli 500 ng/ml i po 20 µl z rozcieńczenia nr 2, aby osiągnąć stężenie w hodowli 20 ng/ml.

Estradiol

Do zakupionego liofilizatu dodano 1ml 100% etanolu w celu osiągnięcia stężenia początkowego roztworu 1 mg/ml. Następnie roztwór podzielono na porcje po 10 µl i zamrożono w temperaturze -80°C. Przed założeniem hodowli ampulkę rozmrożono i dodawano do niej 990 µl medium hodowlanego. Po dodaniu medium ampulkę worteksowano z przerwami przez minutę. Powstało rozcieńczenie nr 1 (10 µg /ml). Następnie z otrzymanego roztworu pobrano 100 µl i przeniesiono do nowej probówki endorfa, gdzie dodano 900 µl medium hodowlanego. Powstały roztwór ponownie wirowano z przerwami w probówce endorfa. Powstało rozcieńczenie nr 2 (1 µg /ml). Następnie z otrzymanego roztworu pobrano 10 µl i przeniesiono do nowego endorfa, gdzie dodano 990 µl medium hodowlanego. Powstały roztwór ponownie wirowano z przerwami w probówce endorfa. Powstało rozcieńczenie nr 3 (10 ng/ml). Do założenia hodowli pobrano odpowiednio 25 µl lub 75 µl z rozcieńczenia nr 3, aby uzyskać stężenie 250 oraz 750 pg/ml w dołku hodowlanym.

Dihydrotestosteron

Z zakupionego liofilizatu 1g odważono 100 mg substancji, a następnie rozpuszczono w 1 ml 100% etanolu w celu osiągnięcia stężenia początkowego roztworu 100 mg/ml. Następnie roztwór podzielono na porcje po 10 μ l i zamrożono w temperaturze -80°C . Przed założeniem hodowli ampulkę rozmrożono i dodano do niej 990 μ l medium hodowlanego. Po dodaniu medium ampulkę worteksowano z przerwami przez minutę. Powstało rozcieńczenie nr 1 (1 mg/ml). Następnie z otrzymanego roztworu pobrano 100 μ l i przeniesiono do nowej probówki ependorfa, gdzie dodano 900 μ l medium hodowlanego. Powstały roztwór ponownie wirowano z przerwami w probówce ependorfa. Powstało rozcieńczenie nr 2 (100 μg /ml). Następnie z otrzymanego roztworu pobrano 10 μ l i przeniesiono do nowej probówki ependorfa, gdzie dodano 990 μ l medium hodowlanego. Powstały roztwór ponownie wirowano z przerwami w probówce ependorfs. Powstało rozcieńczenie nr 3 (1 μg /ml). Ponownie z otrzymanego roztworu pobrano 10 μ l i przeniesiono do nowej probówki ependorfa, gdzie dodano 990 μ l medium hodowlanego. Powstały roztwór ponownie wirowano z przerwami w probówce ependorfa. Powstało rozcieńczenie nr 4 (10 ng/ml). Do założenia hodowli pobrano odpowiednio 25 μ l lub 50 μ l z rozcieńczenia nr 4 w celu uzyskania stężenia 250 oraz 500 pg/ml w hodowli komórkowej.

3.3.6 Zakładanie hodowli

Hodowlę komórkową przygotowano na 24-studzienkowej płytce. 24 godziny przed użyciem osiem dołków zalano roztworem OKT-3 o stężeniu $0,75\mu\text{g}/\text{ml}$. Bezpośrednio przed założeniem hodowli dołki z OKT-3 przemyto 1ml PBS z Ca^{2+} i Mg^{2+} . Płukanie powtórzono dwukrotnie, a płytka została dokładnie osuszona przed użyciem. Po izolacji komórki zliczono pod mikroskopem świetlnym przy użyciu komory Bürkera. Do każdego dołka przeniesiono po 1 mln komórek. Do odpowiednich dołków dodano progesteron, 17β -estradiol i dihydrotestosteron w odpowiedniej objętości, aby uzyskać oczekiwane stężenie (Tabela 5). Dołki zostały dopełnione przygotowanym medium hodowlanym: RPMI ze stabilną glutaminą (Biowest) wzbogaconą 10% inaktywowaną termicznie ludzką surowicą (Sigma Aldrich), roztworem antybiotykoprzeciwgrzybiczym 100 IU, penicyliną, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycyną, $0,25\mu\text{g}/\text{ml}$ Amfoterycyną (Corning, BD , USA) do objętości 1ml. Płytki inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C w ciemności przez 48 godzin.

Tabela 5: Schemat przygotowania płytki hodowlanej. Każde pole tabeli odpowiada dołkowi na płytce.

Kontrola		OKT-3%	OKT-3
Stężenie progesteronu 20 ng/ml	Stężenie progesteronu 500 ng/ml	OKT-3 oraz progesteron o stężeniu 20 ng/ml	OKT-3 oraz progesteron o stężeniu 500 ng/ml
Stężenie 17 β -estradiolu 250 pg/ml	Stężenie 17 β -estradiolu 750 pg/ml	OKT-3 oraz 17 β -estradiol o stężeniu 250 pg/ml	OKT-3 oraz 17 β -estradiol o stężeniu 750 pg/ml
Stężenie dihydrotestosteronu 250 pg/ml	Stężenie dihydrotestosteronu 500 pg/ml	OKT-3 oraz dihydrotestosteron o stężeniu 250 pg/ml	OKT-3 oraz dihydrotestosteron o stężeniu 500 pg/ml

3.3.7 Barwienie cytometryczne – PBMC wyizolowane z krwi

Po wyizolowaniu oraz przeliczeniu w komorze Bürkera 1mln komórek przeniesiono do 5 ml probówki stosowanej w cytometrii. Komórki przemyto w 1ml PBS z 0,01% azydkiem sodu przez odwirowanie przy prędkości 600 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki zawieszono w 100 μ l PBS z 0,01% azydkiem sodu. Zawieszone komórki zostały poddane pierwszemu etapowi barwienia przeciwciałami przeciwko antygenom powierzchniowym (Tabela 6). Wszystkie przeciwciała zostały zmiareczkowane przed eksperymentem. Komórki barwiono 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po pierwszym barwieniu komórki przemyto 1ml PBS z 0,01% azydkiem sodu i odwirowano przy 600 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po przemyciu komórki ponownie zawieszono w 400 μ l PBS z 0,01% azydkiem i worteksowano. Następnie zabarwione komórki przeniesiono do 4 probówek do cytometrii. Pierwsza probówka nie była barwiona po raz drugi, druga probówka była barwiona przeciwciałami anti-PD1 i anti-TIM-3, trzecia probówka była barwiona przeciwciałami anti-LAG-3, czwarta probówka była barwiona przeciwciałami anti-TIGIT i anti-VISTA (Tabela 7). Komórki barwiono przez 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Na koniec komórki przemyto 1ml PBS z 0,01% azydkiem i odwirowano przy 600 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Na koniec komórki ponownie zawieszono w 150 μ l PBS z 0,01% azydkiem sodu i przygotowano do akwizycji. Komórki zostały z analizowane w urządzeniu FACS Canto II.

3.3.8 Barwienie cytometryczne – PBMC z hodowli

Do hodowli komórkowych zostały użyte PBMC wyizolowane od kobiet w ciąży i po poronieniu. Po inkubacji komórki z każdej studzienki przeniesiono do odpowiednio oznakowanej probówki. Komórki ponownie zawieszono i przemyto w 1ml PBS z 0,01% azydkiem sodu przez odwirowanie przy prędkości 600 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki zawieszono w 100µl PBS z 0,01% azydkiem i poddano pierwszemu etapowi barwienia przeciwciałami przeciwko antygenom powierzchniowym (Tabela 6). Komórki barwiono 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po pierwszym barwieniu komórki przemyto 1ml PBS z 0,01% azydkiem sodu i odwirowano przy prędkości 600 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po przemyciu komórki ponownie zawieszono w 400µl PBS z 0,01% azydkiem i wortexowano. Następnie zabarwione komórki przeniesiono do 4 probówek do cytometrii. Pierwsza probówka nie była barwiona po raz drugi, druga probówka była barwiona przeciwciałami anti-PD1 i anti-TIM-3, trzecia probówka była barwiona przeciwciałami anti-LAG-3, czwarta probówka była barwiona przeciwciałami anti-TIGIT i anti-VISTA (Tabela 7). Komórki barwiono przez 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Na koniec komórki przemyto 1ml PBS z 0,01% azydkiem sodu i odwirowano przy 600 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki ponownie zawieszono w 150µl PBS z 0,01% azydkiem i przygotowano do akwizycji. Komórki zostały z analizowane w urządzeniu FACS Canto II.

Tabela 6: Spis przeciwciał użytych do pierwszego etapu barwienia

Przeciwciało	Fluorochrom	Klon	Dodawana objętość przeciwciała na 1 probówkę	Producent
Anti-CD3	PreCp	SK7	2µl	Becton Dickinson
Anti-CD4	APC-Cy7	SK3	0,5µl	Becton Dickinson
Anti-CD8	APC	SK1	0,5µl	Becton Dickinson
Anti-CD25	FITC	2A3	1µl	Becton Dickinson
Anti-CD127	BV650	HIL-7R-M21	0,5µl	Becton Dickinson
Anti-CD56	PE-Cy7	B159	1µl	Becton Dickinson

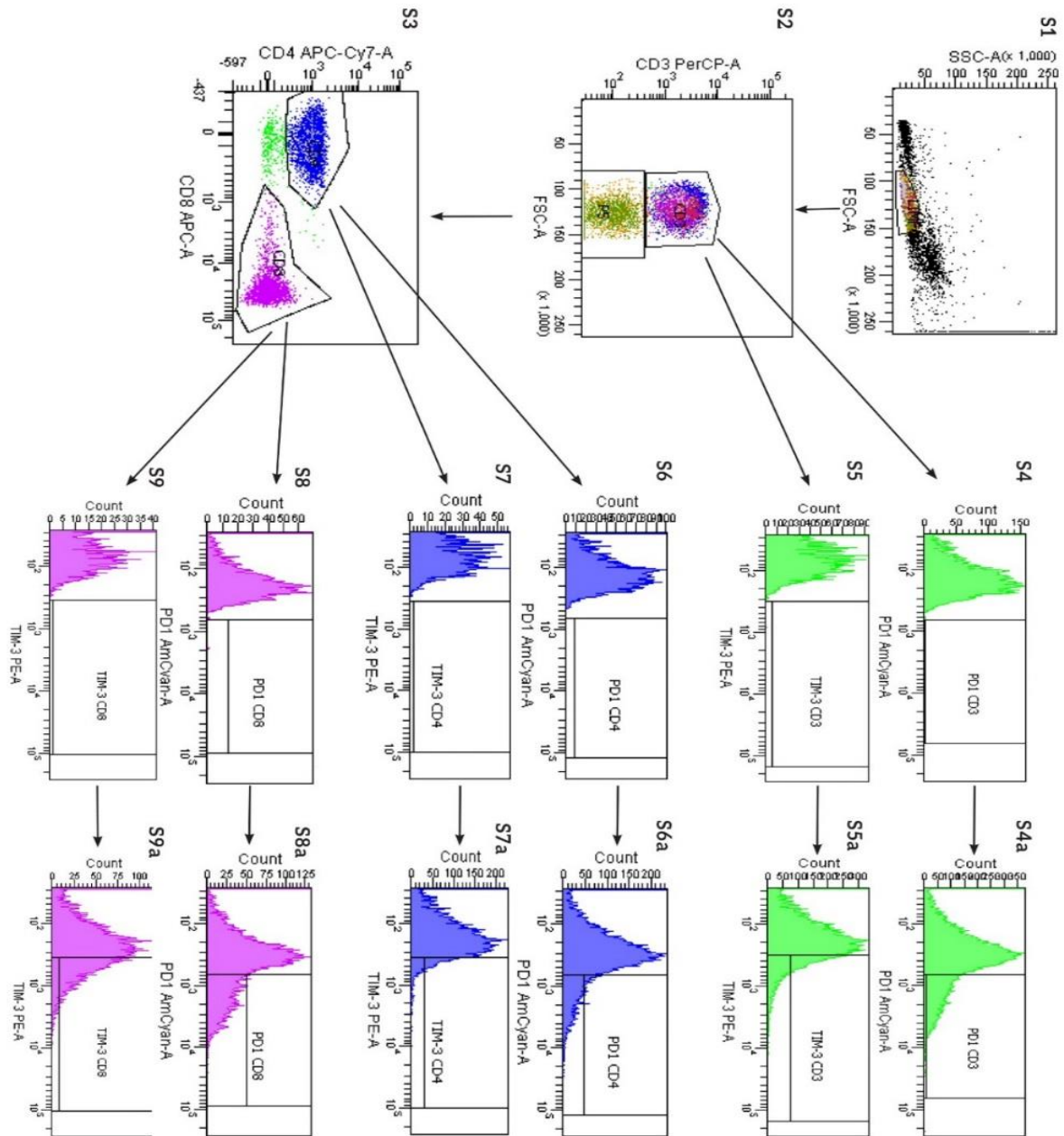
Tabela 7: Spis przeciwciał użytych do drugiego etapu barwienia

Numer próbówki	Przeciwciało	Fluorochrom	Klon	Dodawana objętość przeciwciała na 1 próbówkę	Producent
Pierwsza próbówka	-	-	-	-	-
Druga próbówka	Anti-PD1	BV480	EH12.1	1 μ l	Becton Dickinson
	Anti-TIM-3	PE	7D3	0,5 μ l	Becton Dickinson
Trzecia próbówka	Anti-LAG-3	BV480	T47-530	1 μ l	Becton Dickinson
Czwarta próbówka	Anti -TIGIT	PE	741182	1 μ l	Becton Dickinson
	Anti-VISTA	BV480	MIH65	1 μ l	Becton Dickinson

3.3.9 Schemat bramkowania w cytometrii przepływowej

Analizowane subpopulacje limfocytów T: pomocnicze ($CD3^+CD4^+$), cytotoksyczne ($CD3^+CD8^+$), regulatorowe ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$), komórki NK ($CD3^-CD56^+$), komórki NKT ($CD3^+CD56^+$). W przypadku komórek pobranych z hodowli stymulowanej OKT-3 analiza limfocytów T regulatorowych była nie możliwa ze względu na zwiększenie ekspresji CD25 na wszystkich aktywowanych komórkach.

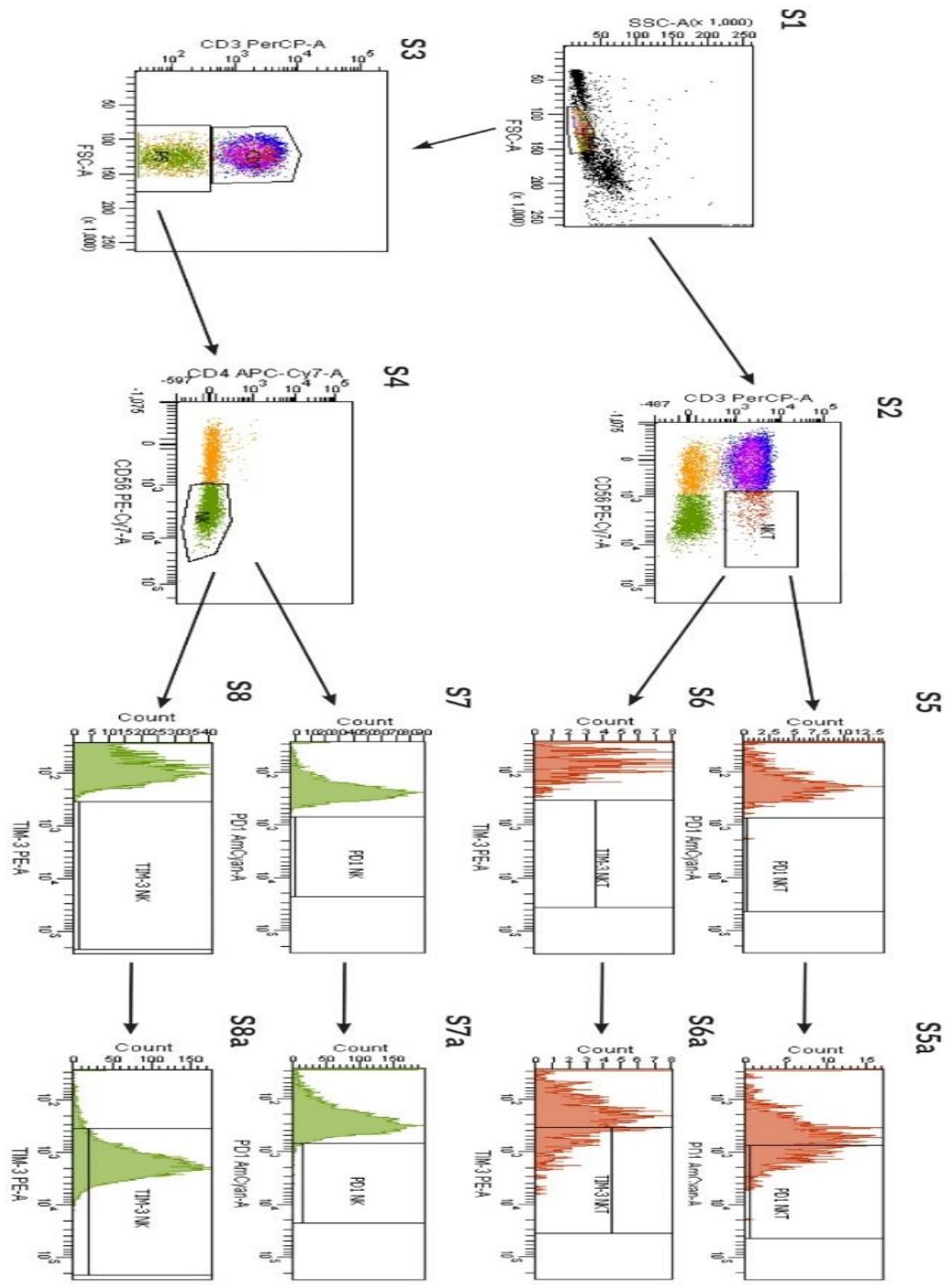
Analizy dokonano z wykorzystaniem metody FMO (Fluorescence minus one). Metoda ta polega na ustaleniu punktu odcięcia poprzez odjęcie z mieszaniny jednego z fluorochromów i poddanie próbki analizie. Przykład analizy przedstawiono na poniższych schematach.



Rycina 9: Schemat analizy cytometrycznej limfocytów. Kanał PE służył w zależności od próbek do oznaczanie cząsteczek TIM-3 oraz TIGIT, a kanał AmCyan do oznaczania cząsteczek PD1, LAG-3 oraz VISTA.

Opis schematu bramkowania (Rycina 9):

Limfocyty zidentyfikowano na wykresie punktowym (Dotplot) FSC / SSC (S1) jako komórki w zakresie $50-100 \times 10^3$ na kanale FSC i poniżej 50×10^3 na kanale SSC. Następnie na Dotplocie (S2) zidentyfikowano limfocyty T jako komórki posiadające antygen CD3 (limfocyty T zidentyfikowano jako zdarzenia z fluorescencją PreCP powyżej 10^3 w skali logarytmicznej). Na Dotplocie (S3) komórki posiadające antygen CD4 (limfocyty pomocnicze T zidentyfikowano jako zdarzenia z fluorescencją APC-Cy7 powyżej 10^2 w skali logarytmicznej) i komórki posiadające antygen CD8 (limfocyty T cytotoksyczne zidentyfikowano jako zdarzenia z fluorescencją APC powyżej 10^3 w skali logarytmicznej). Dotploty (S4-S9) obrazują punkty odcięcia dla oznaczanego antygenu PD1 (kanał AmCyan) i TIM-3 (kanał PE), biorąc pod uwagę każdą badaną populację (całkowita liczba limfocytów T, T pomocniczy i T cytotoksyczny komórek). Punkty odcięcia ustalono na podstawie eksperymentów fluorescencji minus jeden (FMO), wykonywanych każdorazowo przy przeprowadzaniu testu. Dotploty (S4a-S9a) przedstawiają badane populacje z ekspresją PD1 i TIM-3, które zostały zidentyfikowane z fluorescencją wyższą niż fluorescencja minus jeden, a zatem dodatnią. Częstka TIGIT była oznaczana na podstawie identycznego schematu z wykorzystaniem kanału PE, a cząsteczki LAG-3 oraz VISTA z wykorzystaniem kanału AmCyan.



Rycina 10: Schemat analizy cytometrycznej komórek NK oraz NKT. Kanał PE służył w zależności od próbki do oznaczania cząsteczek TIM-3 oraz TIGIT, a kanał AmCyan do oznaczania cząsteczek PD1, LAG-3 oraz VISTA.

Opis schematu bramkowania Rycina 10:

Limfocyty zidentyfikowano na wykresie punktowym (Dotplot) FSC / SSC (S1) jako komórki w zakresie $50-100 \times 10^3$ na kanale FSC i poniżej 50×10^3 na kanale SSC. Na Dotplocie (S2) zidentyfikowano komórki NKT posiadające antygen CD56 (fluorescencja powyżej 10^3 Pe-Cy- 7 kanałów, skala logarytmiczna) i antygen CD3 (fluorescencja powyżej w kanale PerCP powyżej 10^3 w skali logarytmicznej). Na dotplocie (S3) komórki CD3-ujemne (limfocyty inne niż T zidentyfikowano jako zdarzenia z fluorescencją PreCP poniżej 10^3 w skali logarytmicznej). Na Dotplocie (S4) zidentyfikowano komórki NK posiadające antygen CD56 (fluorescencja powyżej 10^3 w kanale Pe-Cy-7, skala logarytmiczna). Dotploty (S5-S8) obrazują punkty odcięcia dla oznaczanego antygenu PD1 (kanał AmCyan) i TIM-3 (kanał PE), biorąc pod uwagę każdą badaną populację NKT oraz NK. Punkty odcięcia ustalono na podstawie oznaczeń fluorescencji minus jeden (FMO), wykonywanych każdorazowo przy przeprowadzaniu testu. Dotploty (S5a-S8a) przedstawiają badane populacje z ekspresją PD1 i TIM-3, które zostały zidentyfikowane z fluorescencją wyższą niż fluorescencja minus jeden, a zatem dodatnią. Częsteczka TIGIT była oznaczana na podstawie identycznego schematu z wykorzystaniem kanału PE, a częsteczki LAG-3 oraz VISTA z wykorzystaniem kanału AmCyan.

3.3.10 Przygotowanie próbek do analizy z wykorzystaniem urządzenia Luminex

Surowicę potrzebną do wykonania oznaczeń w urządzeniu Luminex oraz do zestawu ELISA uzyskano w 5 ml probówkach BD Vacutainer Plus Serum Tube. Po co najmniej 30 minutach od momentu pobrania probówkę odwirowano przy prędkości $800 \times g$ przez 20 minut. Następnie surowicę oddzieloną od krwinek zebrano do mrożeniówek. Uzyskano około 1ml surowicy, która została podzielona na porcje po 200 μ l. Surowice przechowywano w temperaturze -80°C .

3.3.11 Analiza próbek z wykorzystaniem urządzenia Luminox

Rozpuszczalne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy oraz ich ligandy zostały oznaczone w surowicy ludzkiej pobranej od kobiet z grup badanych. Oznaczeń dokonano przy użyciu zastawów Human Immuno-oncology Checkpoint Protein panel 1 oraz 2 MILLIPLEX MAP firmy Merck. Panel 1 pozwolił na oznaczenie rozpuszczalnych form cząsteczek CD28, TIM-3, HVEM, LAG-3, PD1, CTLA-4, CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, natomiast panel 2 pozwolił na oznaczenie VISTA, Nektyny-2 (CD112), CD155. W celu rozbicia koniugatów kulek magnetycznych opłaszczonych poszczególnymi antygenami wykorzystano łąźnię wodną. Następnie poszczególne kulki magnetyczne zostały zmieszane w jeden roztwór zawierający różne antygeny (Mixed beads). Następnie standard oraz kontrole jakości zostały rozcieńczone zgodnie z zaleceniami producenta. Na płytkę 96 dołkową, po wcześniejszym przepłukaniu 200µl/dolek Assay buffer, nałożono 7 rozcieńczeń standardów, próbkę ślepa oraz dwie kontrole jakości. Kolejno do pozostałych dołków dodano po 25µl surowicy pacjentek. Do wszystkich dołków dodano po 25µl zmieszanych kulek z antygenami (Mixed beads). Płytkę inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 4°C na mieszadle. Po 16 godzinnej inkubacji płytkę 3 krotnie wypłukano przy użyciu specjalnego magnetycznego uchwytu. Następnie dodano po 25µl przeciwciał wykrywających (detection antibody) i inkubowano płytkę przez godzinę w temperaturze pokojowej na mieszadle. Po inkubacji dodano po 25µl roztworu Streptavidin-Phycoerythrin i inkubowano płytkę 30 minut w temperaturze pokojowej na mieszadle. Potem płytka została odpłukana przy wykorzystaniu łapy magnetycznej i zalana 100µl płynu Drive fluid umożliwiającego odczyt płytki na aparacie MAGPIX. Odczytu płytki dokonano przy użyciu urządzenia MAGPIX z wykorzystaniem oprogramowania Xmap.

3.3.12 Wykonanie oznaczenia sGal-9 metodą ELISA

Rozpuszczalna Galektyna-9 (sGal-9) została oznaczona w surowicy pobranej od pacjentek. Oznaczeń dokonywano przy użyciu zestawów ELISA firmy Thermofisher. Przed rozpoczęciem oznaczenia należało przygotować standardy stężeń badanego białka zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie na 96 dołkową płytkę opłaszczoną przeciwciałami przeciw sGal-9 nałożono przygotowane standardy po 100 µl do pierwszych 16 dołków zgodnie z rosnącym stężeniem

przygotowanych standardów. Do pozostałych dołków nałożono po 100µl surowicy. Po nałożeniu reagentów płytkę zabezpieczono folią i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 150 minut. Po inkubacji płytkę poddano czterokrotnemu płukaniu, dwadzieścia razy rozcieńczonym z woda destylowaną płynem płuczającym, przy użyciu płuczki Tecan 9600. Następnie dodano po 100µl roztworu biotin conjugate do wszystkich dołków. Tak przygotowaną płytkę inkubowano 60 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji płytkę poddano czterokrotnemu płukaniu, dwadzieścia razy rozcieńczonym z woda destylowaną płynem płuczającym, przy użyciu płuczki Tecan 9600. Do wypłukanej płytki dodano po 100 µl roztworu Streptavidin-HRP. Płytkę następnie inkubowano 45 minut w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając. Po inkubacji płytkę poddano czterokrotnemu płukaniu, dwadzieścia razy rozcieńczonym z woda destylowaną płynem płuczającym, przy użyciu płuczki Tecan 9600. Po inkubacji dodano po 100 µl roztworu TMB i ponownie inkubowano płytkę w temperaturze pokojowej w ciemności przez 30 minut mieszając. Po inkubacji dodano po 50µl roztworu hamującego reakcję. Tak przygotowaną płytkę odczytano przy użyciu programu Chromate, na czytniku Chromate 4300-DRGMedTek przy długości fali 450nm (filtr referencyjny 630nm) w ciągu 15 minut od zakończenia reakcji.

3.3.13 Statystyka

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programów GraphPad Prism 8.4.1 oraz Statistica 13.3. Normalność rozkładu określono testem W Shapiro-Wilka. Analizy danych zależnych dla danych z rozkładem normalnym dokonano przy wykorzystaniu testu T studenta dla danych zależnych, a dla danych z brakiem normalności rozkładu wykorzystano test Wilcoxon. Analizę danych niezależnych z rozkładem normalnym dokonano uwzględniając równość lub różność wariancji przy użyciu testu Fishera. Dla danych z wariancją równą użyto testu T studenta, natomiast dane z różnymi wariancjami testowano przy wykorzystaniu testu Cochran-Coxa. Dane niezależne z brakiem normalności rozkładu testowano przy wykorzystaniu testu U-Manna-Whitneya. Wartości p poniżej 0,05 ($p < 0,05$) uznano za istotne statystycznie i zaznaczono na wykresach jako *.

4 Wyniki

4.1 Analiza ekspresji cząstek kontrolujących układ odpornościowy pomiędzy badanymi grupami.

Celem przeprowadzonego badania było ustalenie czy cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy (ICP), takie jak PD1, TIM-3, VISTA, TIGIT, LAG-3 występują na powierzchni komórek układu odpornościowego w badanych grupach oraz czy występują różnice w ekspresji wyżej wymienianych cząstek na różnych populacjach komórek układu odpornościowego pomiędzy badanymi grupami. Ekspresja ICP była badana na subpopulacjach limfocytów T (pomocnicze [CD3⁺CD4⁺], cytotoksyczne [CD3⁺CD8⁺], regulatorowe [CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻]), a także komórkach NK [CD3⁻CD56⁺] oraz NKT [CD3⁺CD56⁺]. Wyniki zostały zaprezentowane na rycinach 11-15.

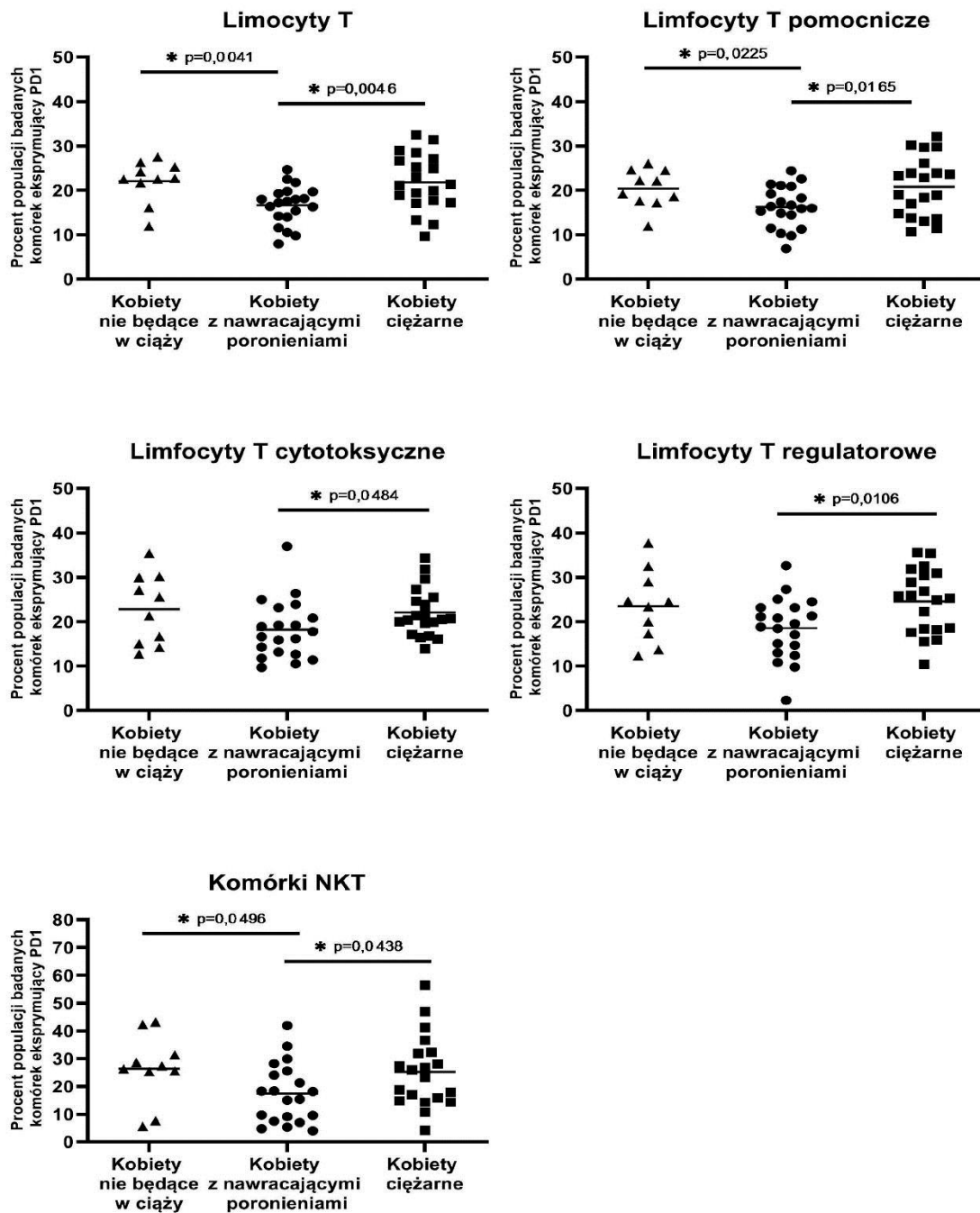
Na rycinie 11 zaprezentowano dane dotyczące ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy PD1 na subpopulacjach limfocytów T (pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych) oraz komórkach NKT. Nie wykazałem ekspresji cząsteczki PD1 na komórkach NK.

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję PD1 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych regulatorowych oraz komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję PD1 na limfocytach T pomocniczych oraz komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi



Rycina 11: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy PD1 na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Na rycinie 12 zaprezentowano dane dotyczące ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy TIM-3 na subpopulacjach limfocytów T (pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych) oraz komórkach NKT.

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet w ciąży zauważyłem:

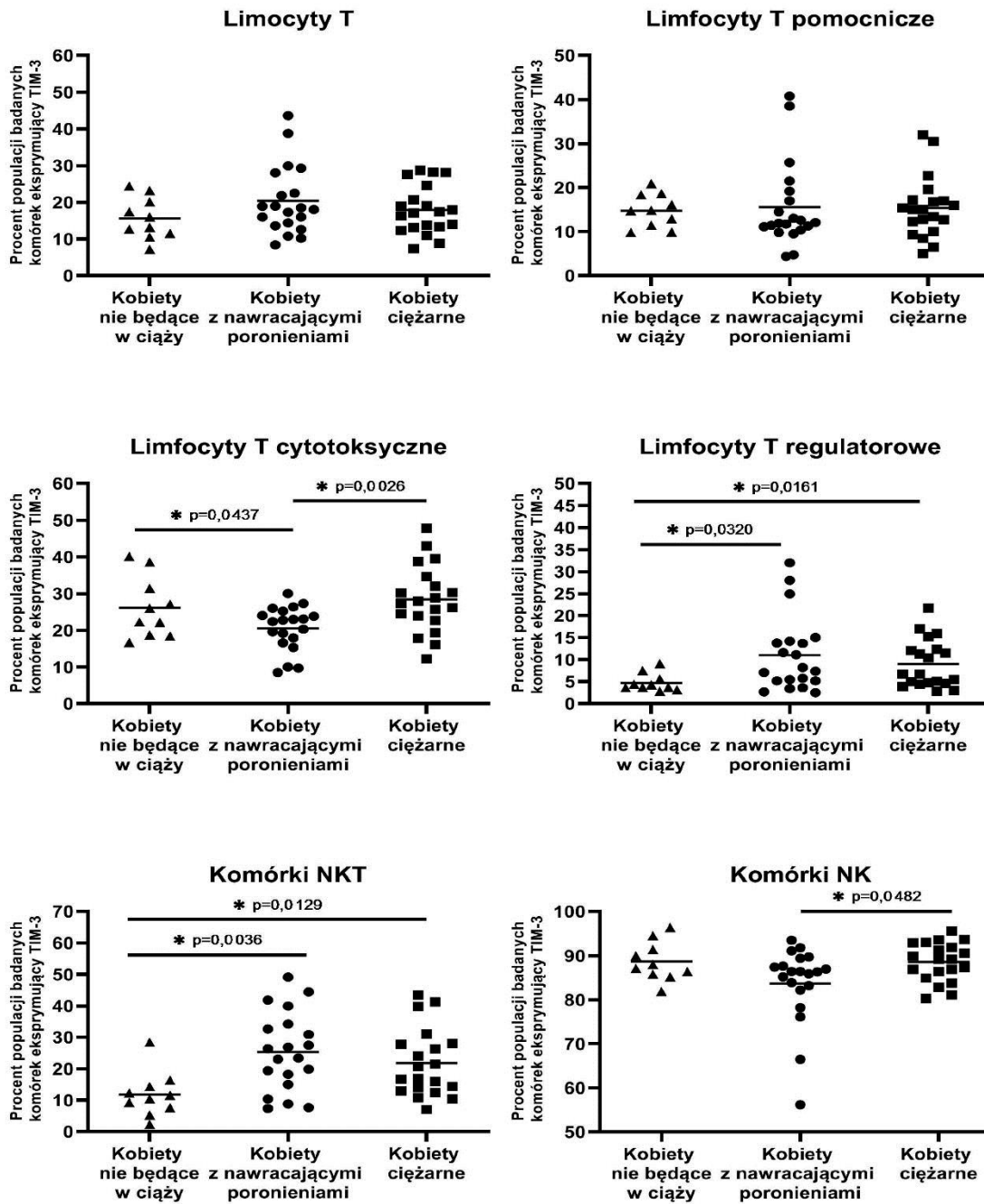
- obniżoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NK w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T cytotoksycznych
- podwyższoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T regulatorowych oraz komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet w ciąży względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- podwyższoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T regulatorowych oraz komórkach NKT w grupie kobiet będących w ciąży



Rycina 12: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy TIM-3 na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Na rycinie 13 zaprezentowano dane dotyczące ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy LAG-3 na subpopulacjach limfocytów T (pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych) oraz komórkach NKT.

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet w ciąży zauważyłem:

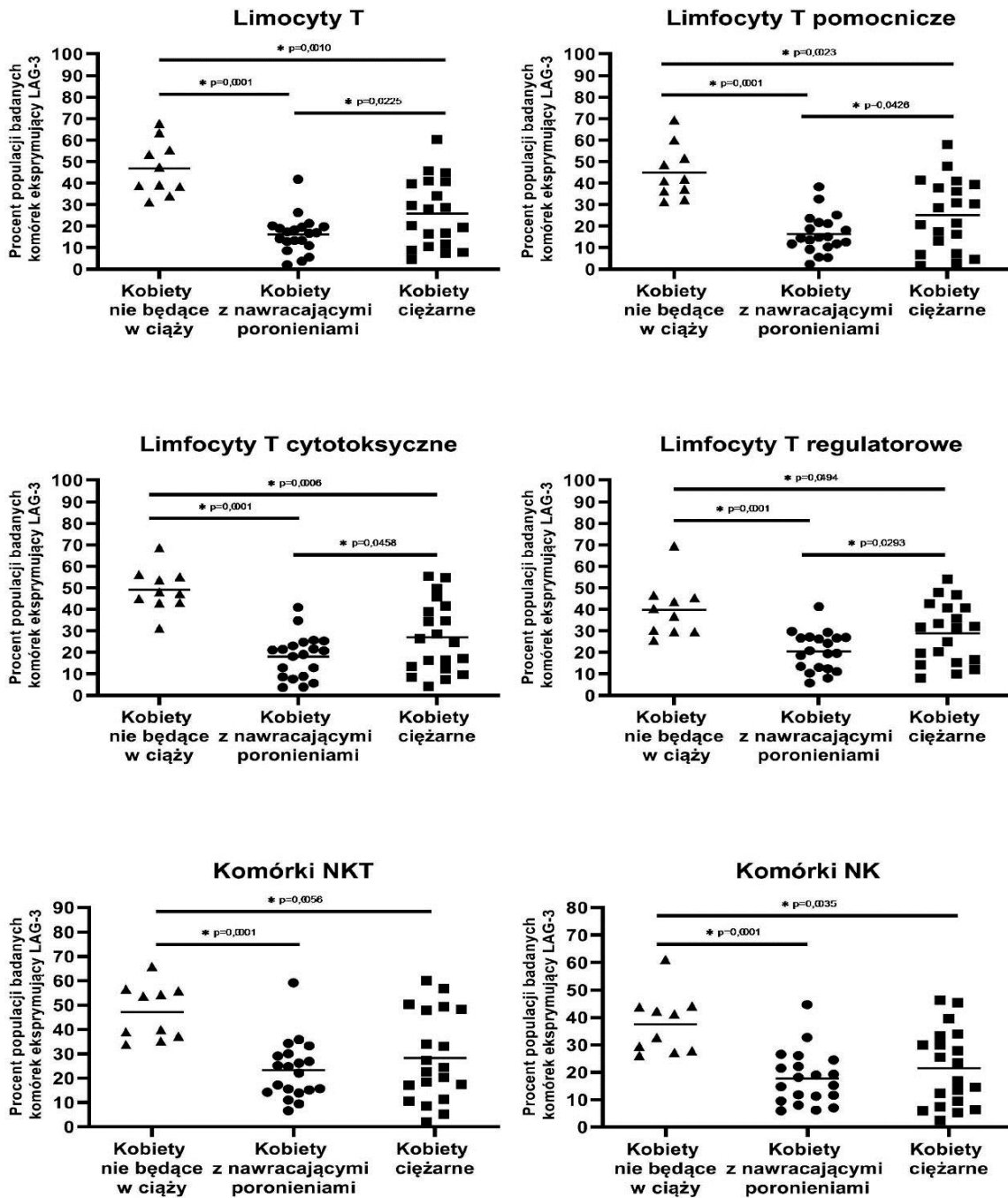
- obniżoną ekspresję LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych oraz komórkach NK oraz NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet w ciąży względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, regulatorowych, cytotoksycznych oraz komórkach NK oraz NKT w grupie kobiet ciężarnych



Rycina 13: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy LAG-3 na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Na rycinie 14 zaprezentowano dane dotyczące ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy TIGIT na subpopulacjach limfocytów T (pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych) oraz komórkach NKT.

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet w ciąży zauważyłem:

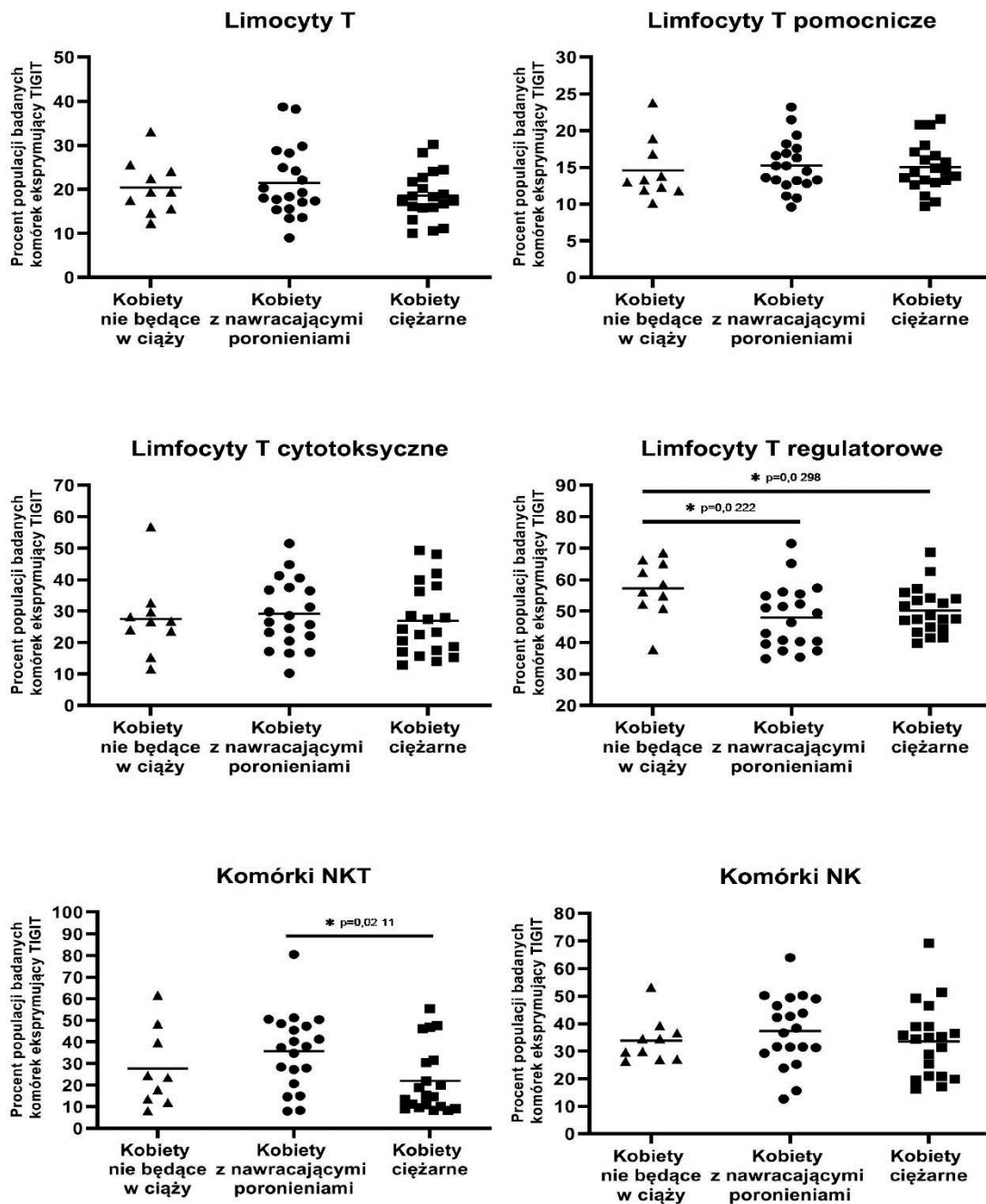
- podwyższoną ekspresję TIGIT na komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- Obniżoną ekspresję TIGIT na limfocytach T regulatorowych w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet w ciąży względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję TIGIT na komórkach T regulatorowych



Rycina 14: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy TIGIT na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

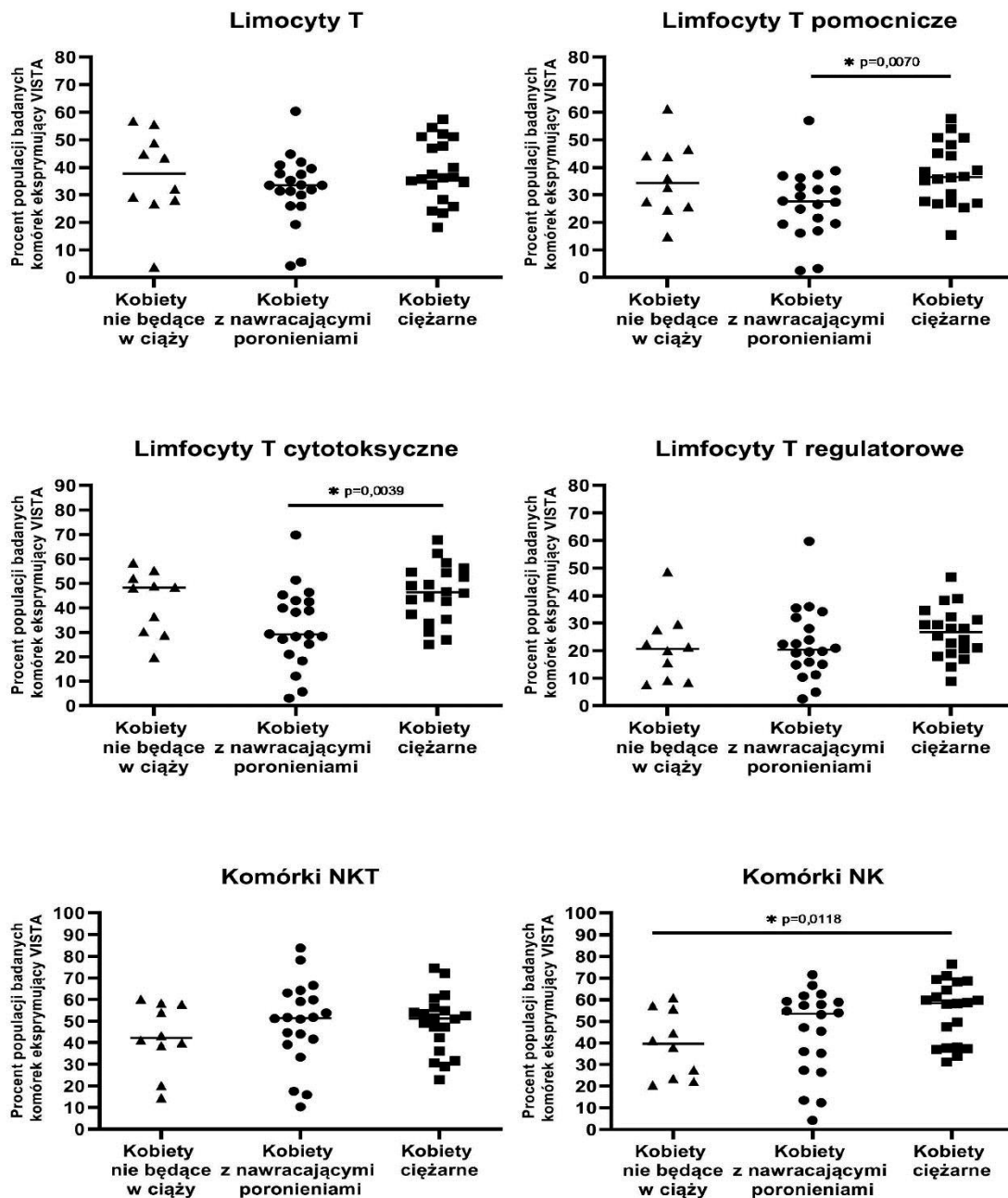
Na rycinie 15 zaprezentowano dane dotyczące ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy VISTA na subpopulacjach limfocytów T (pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych) oraz komórkach NKT

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję w grupie VISTA na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet w ciąży względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- podwyższoną ekspresję VISTA na komórkach NK w grupie kobiet będących w ciąży



Rycina 15: Porównanie pomiędzy grupami ekspresji cząsteczki kontrolującej układ odpornościowy VISTA na komórkach PBMC wyizolowany z świeżej krwi obwodowej. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Podsumowanie zebranych danych.

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję PD1 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych regulatorowych oraz komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi
- obniżoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NK w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi
- obniżoną ekspresję LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi
- podwyższoną ekspresję TIGIT na komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi
- obniżoną ekspresję w grupie VISTA na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet z poronieniami nawykowymi względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- obniżoną ekspresję PD1 na limfocytach T pomocniczych oraz komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi
- obniżoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T cytotoksycznych
- podwyższoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T regulatorowych oraz komórkach NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi
- obniżoną ekspresję LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych oraz komórkach NK oraz NKT w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi
- Obniżoną ekspresję TIGIT na limfocytach T regulatorowych w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi

Porównując dane pomiędzy grupą kobiet w ciąży względem grupy kobiet niebędących w ciąży zauważyłem:

- podwyższoną ekspresję TIM-3 na limfocytach T regulatorowych oraz komórkach NKT w grupie kobiet będących w ciąży
- obniżoną ekspresję LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, regulatorowych, cytotoksycznych oraz komórkach NK oraz NKT w grupie kobiet ciężarnych
- obniżoną ekspresję TIGIT na komórkach T regulatorowych
- podwyższoną ekspresję VISTA na komórkach NK w grupie kobiet będących w ciąży

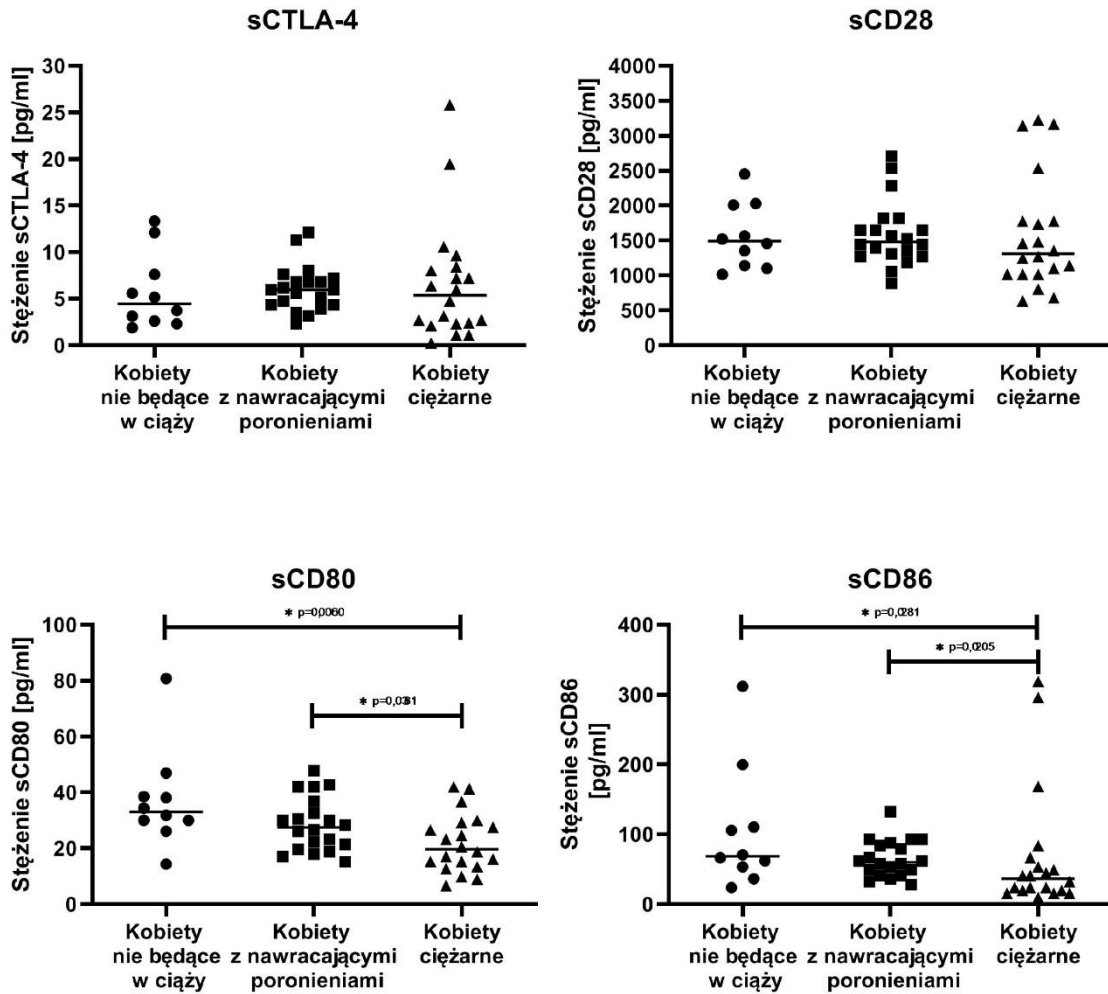
4.1.1 Podsumowanie badań dotyczących ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w badanych grupach.

Przeprowadzone badania wykazały szereg różnic pomiędzy kobietami ciężarnymi, a kobietami z poronieniami nawykowymi. Na podstawie zaprezentowanych danych można przypuszczać, że wykryte zaburzenia mogą przyczyniać się do zaburzeń w funkcjonowaniu układu odpornościowego u kobiet z poronieniami nawykowymi, co w konsekwencji może prowadzić do poronień. (Tabela 8). Wydaje się, że monitorowanie wybranych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u kobiet z poronieniami nawykowymi oraz odpowiednia reakcja farmakologiczna mająca na celu regulowanie wykrytych zaburzeń mogłaby przyczynić się do zmniejszenia ryzyka poronienia.

Tabela 8: Różnice w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u kobiet z poronieniami nawykowymi względem kobiet ciężarnych. ↑ - zwiększona ekspresja, ↓ - obniżona ekspresja, - niezmienna ekspresja.

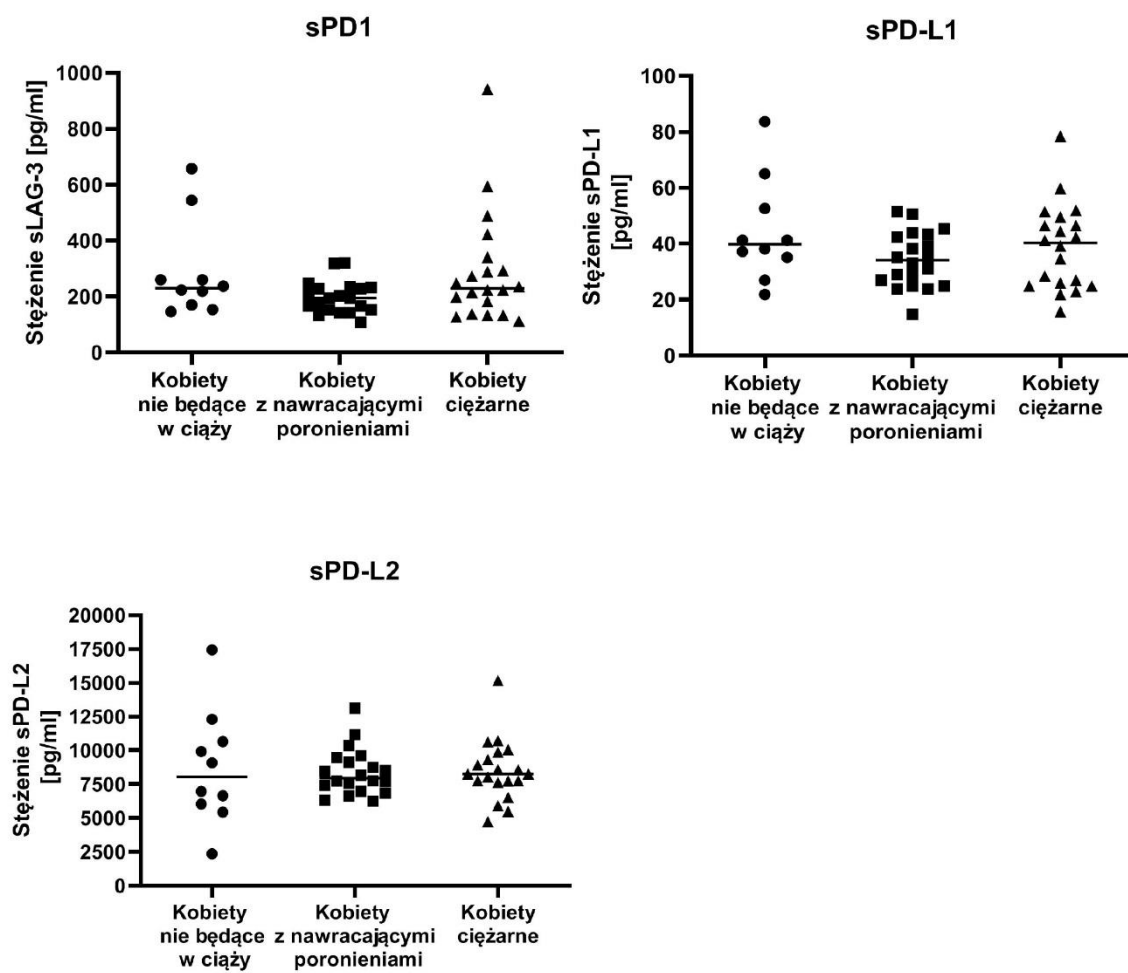
	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	↓	↓	↓	-	↓
Limfocyty T pomocnicze	↓	-	↓	-	↓
Limfocyty T regulatorowe	↓	-	↓	-	-
Komórki NK	-	↓	-	↑	-
Komórki NKT	↓	-	-	-	-

4.2 Porównanie stężeń rozpuszczalnych cząstek kontrolujących układ odpornościowy pomiędzy badanymi grupami.



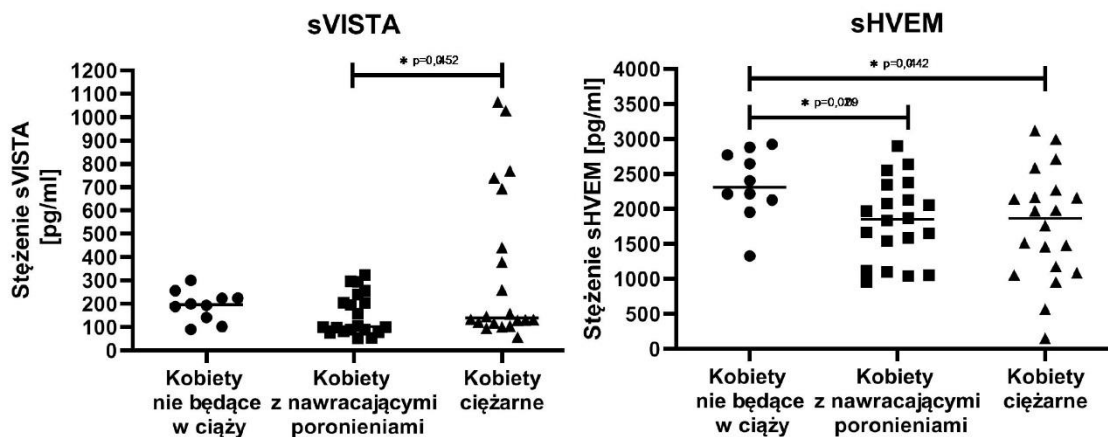
Rycina 16: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujące układ odpornościowy oraz ich ligandów (sCTLA-4, sCD28, sCD86, sCD80) w surowicach. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Przeprowadzone badania nie wykazały różnic w stężeniach wydzielniczych cząsteczek sCTLA-4 oraz sCD28 pomiędzy badanymi grupami. Wykazaliśmy, że ekspresja rozpuszczalnych ligandów u kobiet w ciąży była istotnie niższa względem kobiet niebędących w ciąży, natomiast ekspresja sCD80 oraz sCD86 u kobiet z nawracającymi poronieniami była wyższa względem kobiet ciężarnych (Rycina 16).



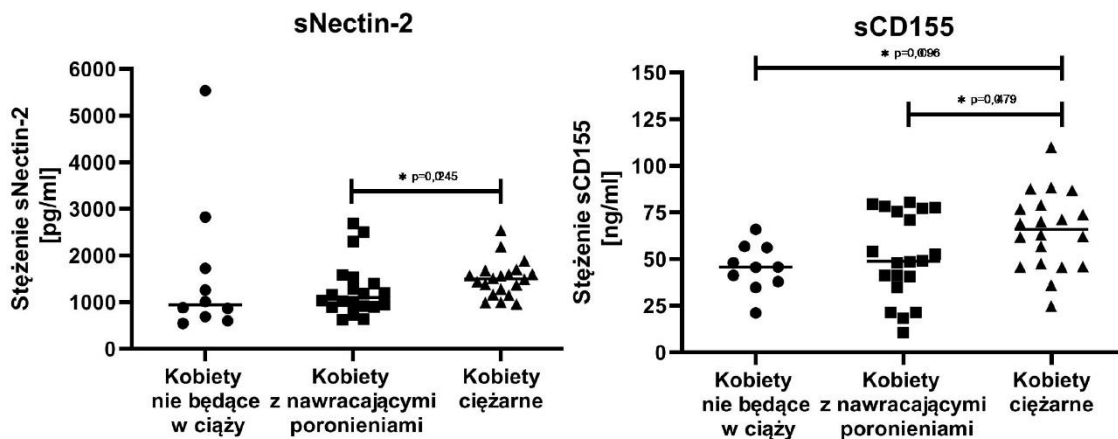
Rycina 17: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujące układ odpornościowy oraz ich ligandów (sPD1, sPD-L1, sPD-L2,) w surowicach. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Nie wykazaliśmy różnic pomiędzy grupami w stężeniach rozpuszczalnej cząsteczki sPD1 oraz jej ligandów sPD-L1 oraz sPD-L2 (Rycina 17).



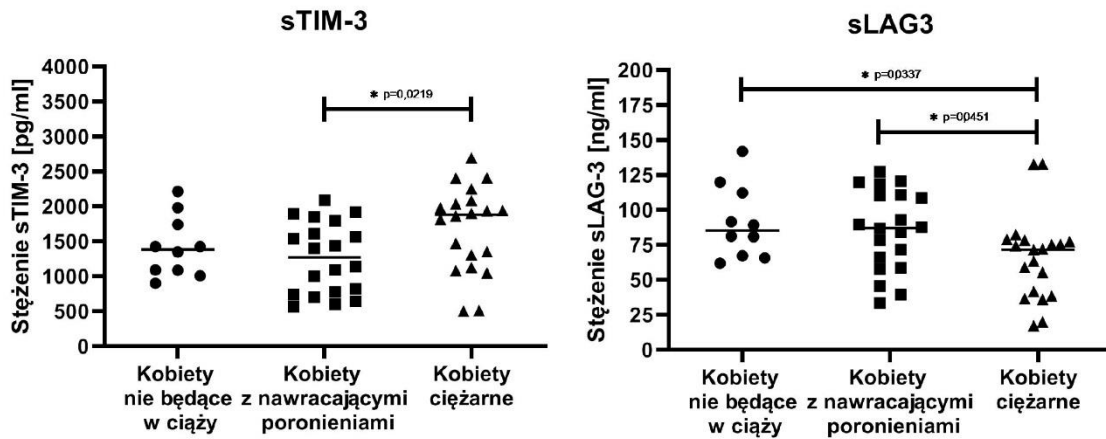
Rycina 18: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (sVISTA, sHVEM) w surowicach. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Badania wykazały, że u kobiet z nawracającymi poronieniami stężenie wydzielniczej cząsteczki sVISTA było obniżone względem kobiet ciężarnych. Stężenie rozpuszczalnej cząsteczki sHVEM było istotnie obniżone zarówno w grupie kobiet ciężarnych oraz kobiet z poronieniami nawykowymi względem kobiet niebędących w ciąży. (Rycina 18)



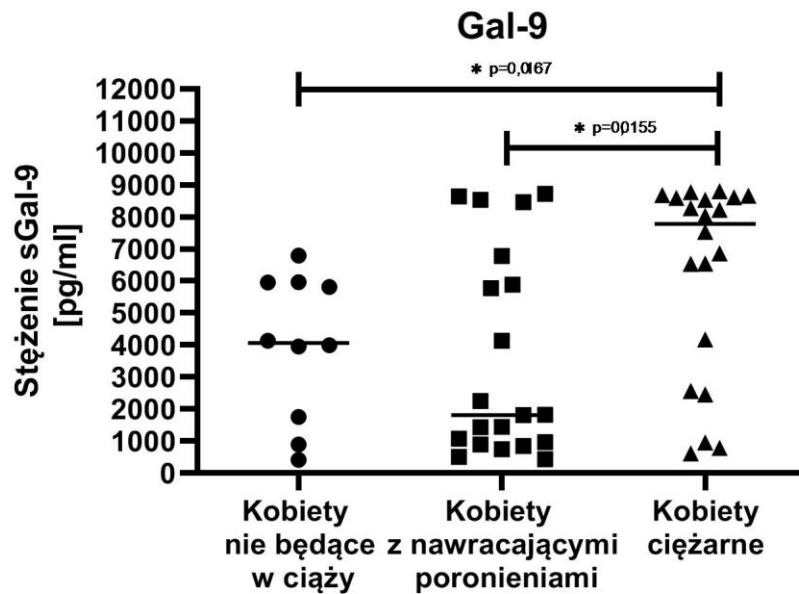
Rycina 19: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń rozpuszczalnych ligandów (sNectin-2, sCD155) w surowicach. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10

Stężenie rozpuszczalnych ligandów dla cząsteczki TIGIT: sNectin-2 (CD112) oraz sCD155 było obniżone u kobiet z nawracającymi poronieniami względem kobiet ciężarnych. Dodatkowo wykazaliśmy, że stężenie sCD155 było istotnie wyższe u kobiet w ciąży względem kobiet niebędących w ciąży. (Rycina 19)



Rycina 20: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężeń wydzielniczych cząsteczek kontrolujące układ odpornościowy (sTIM-3, sLAG-3) w surowicach. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Stężenie rozpuszczalnej cząsteczki sTIM-3 było istotnie wyższe u kobiet w ciąży względem kobiet z poronieniami nawykowymi, a stężenie sLAG-3 było podwyższone w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi względem kobiet ciężarnych. Dodatkowo wykazaliśmy, że stężenie sLAG-3 było istotnie niższe u kobiet w ciąży względem kobiet niebędących w ciąży. (Rycina 20)



Rycina 21: Porównanie pomiędzy badanymi grupami stężenia cząsteczki sGal-9 w surowicach. Grupa kobiet z poronieniami n=20, Grupa kobiet ciężarnych n=20, grupa kobiet niebędących w ciąży n=10.

Stężenie rozpuszczalnej cząsteczki sGal-9 było istotnie wyższe u kobiet w ciąży względem kobiet z poronieniami nawykowymi. Dodatkowo wykazaliśmy, że stężenie sGal-9 było istotnie wyższe u kobiet w ciąży względem kobiet niebędących w ciąży. (Rycina 21)

4.2.1 Podsumowanie badań nad rozpuszczalnymi cząsteczkami kontrolującymi układ odpornościowy oraz ich ligandami.

Badania związane z rozpuszczalnymi cząsteczkami kontrolującymi układ odpornościowy oraz ich ligandów w formie rozpuszczalnej, ujawniły, że istnieje szereg różnic pomiędzy grupami odnośnie stężeń badanych parametrów.

Należy tutaj wspomnieć, że materiał od pacjentek z grupy kobiet z poronieniami nawykowymi pobierany był w ciągu 72h od poronienia - gdzie najczęściej było to kilka godzin od momentu poronienia. Dlatego też porównanie tych danych być może pozwoli na znalezienie odpowiedzi, dlaczego u kobiety, która jeszcze kilka godzin przed momentem pobrania była w ciąży doszło do poronienia. Analizując bezpośrednio te dane zauważamy, że u kobiet z poronieniami występowało obniżone stężenie sGal-9, obniżone stężenie sTIM-3, obniżone stężenie sCD112, obniżone stężenie sCD155, obniżone stężenie sVISTA, podwyższone stężenie sLAG-3, podwyższone stężenia sCD86 oraz sCD80 względem kobiet ciężarnych (Tabela 9). Wykryte różnice mogą posłużyć jako markery w ocenie ryzyka wystąpienia poronienia, co być może pozwoli na przewidywanie lub wykrywanie procesów patologicznych podczas rozwoju ciąży.

Oznaczanie rozpuszczalnych cząsteczek mogłoby być szybkim oraz małoinwazyjnym sposobem oceny prawidłowości rozwoju ciąży. Wczesne wykrycie niepokojących zmian mogłoby pozwolić na wdrożenie leczenia i być może uchronić pacjentkę przed kolejnym poronieniem. Nadal niezbędne są dalsze badania pozwalające wyjaśnić rolę oraz dokładny wpływ zauważonych zmian na rozwój ciąży oraz ich rolę w patogenezie poronień.

Tabela 9: Zestawienie różnic w stężeniach rozpuszczalnych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów w formie rozpuszczalnej pomiędzy kobietami z poronieniami nawykowymi a kobietami będącymi w ciąży.

	Wyznaczone różnice pomiędzy kobietami ciężarnymi a kobietami z poronieniami nawykowymi
Rozpuszczalne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy	↓ sGal-9, ↓ sTIM-3, ↑sLAG-3, ↑sCD80, ↑sCD86, ↓CD112, ↓CD155, ↓ sVISTA

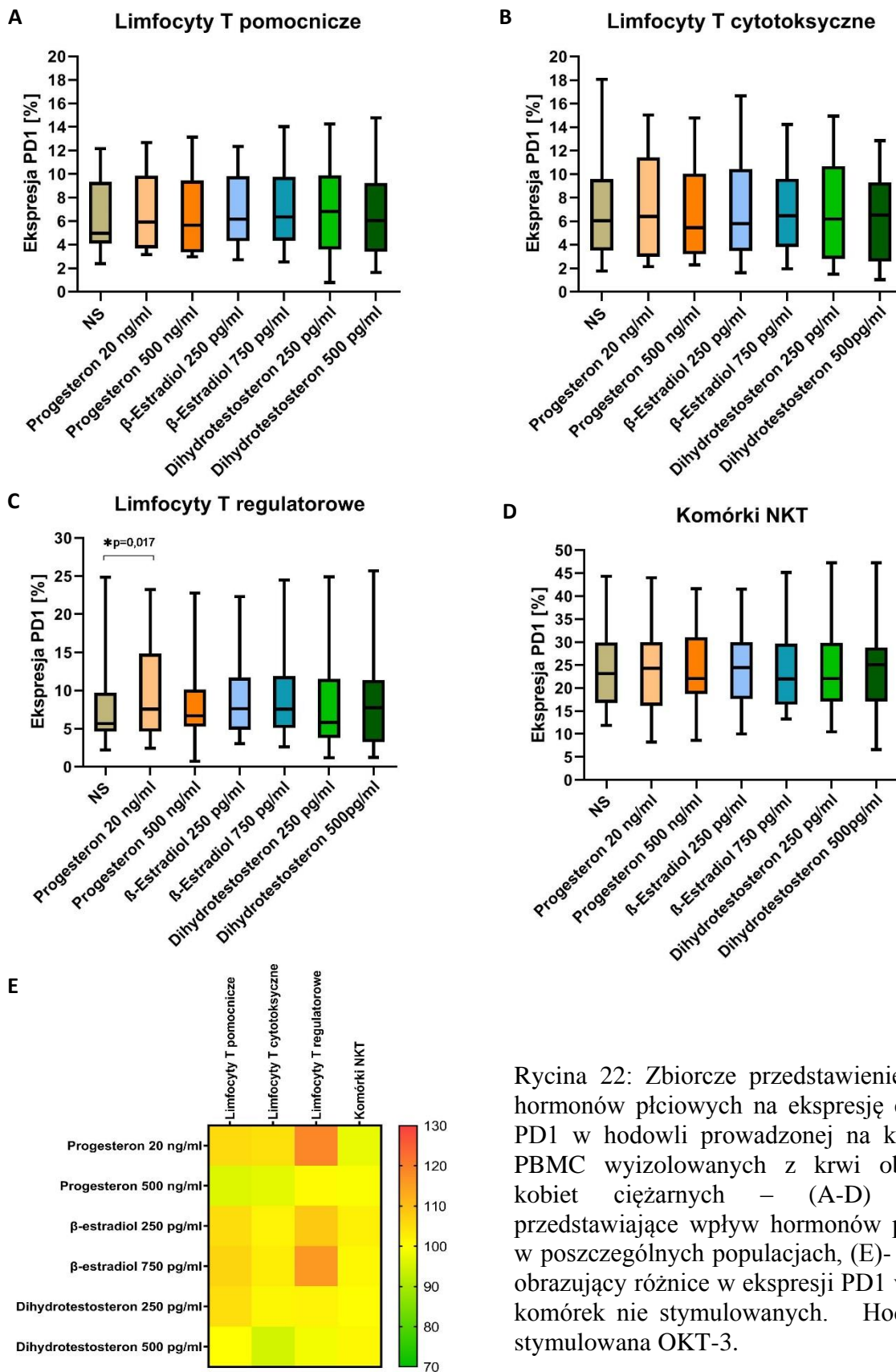
4.3 Analiza wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowlach założonych z komórek jednojądrzastych wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami oraz kobiet ciężarnych.

Analizowano wpływ hormonów płciowych progesteronu, β -estradiolu, dihydrotestosteronu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (PD1, TIM-3, LAG-3, TIGIT, VISTA) na subpopulacje limfocytów T: pomocniczych ($CD3^+CD4^+$), cytotoksycznych ($CD3^+CD8^+$), regulatorowych ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$), komórek NK ($CD3^-CD56^+$), komórek NKT ($CD3^+CD56^+$). W przypadku komórek pobranych z hodowli stymulowanej OKT-3 analiza limfocytów T regulatorowych była nie możliwa ze względów technicznych. Nie wykazałem ekspresji PD1 na komórkach NK.

4.3.1 Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet ciężarnych. (hodowla nie stymulowana OKT-3)

Analiza danych z ryciny 22:

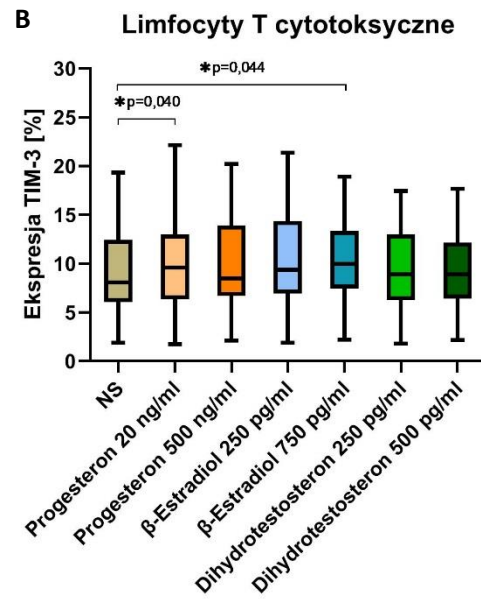
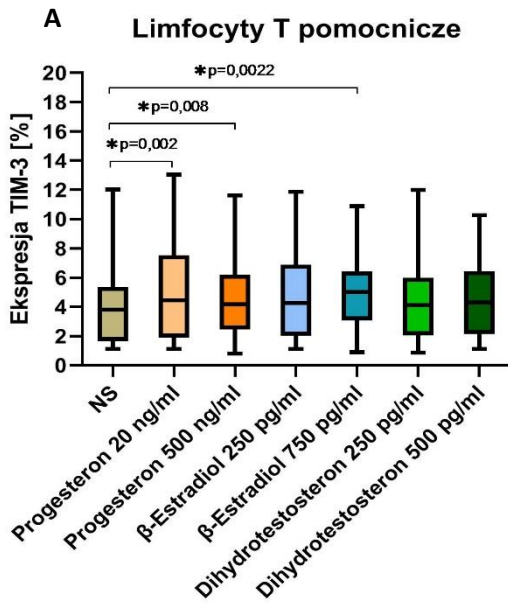
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na limfocytach T regulatorowych.
- Nie wykazano wpływu progesteronu w stężeniu 500 ng/ml, β -estradiolu w stężeniach 250 pg/ml oraz 750 pg/ml oraz dihydrotestosteronu o stężeniach 250 pg/ml oraz 500 pg/ml na ekspresję PD1.

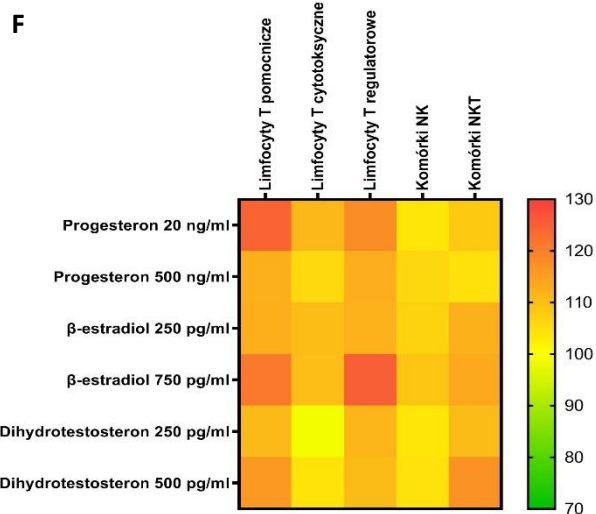
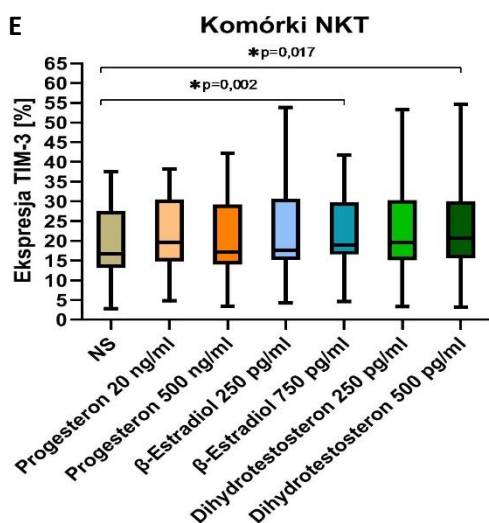
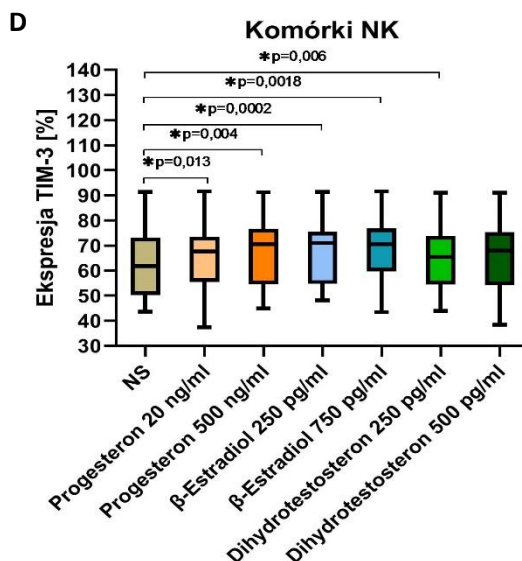
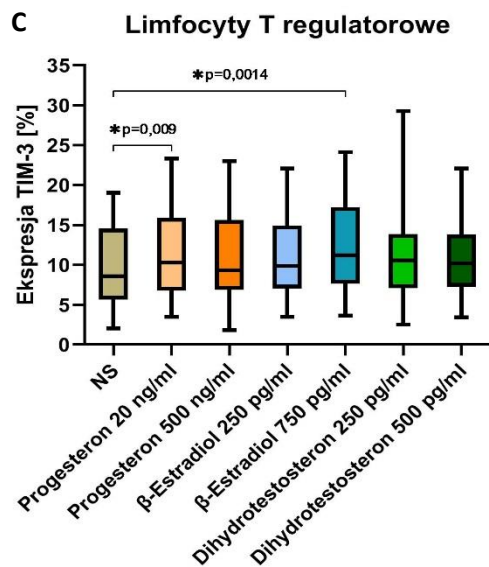


Rycina 22: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-D) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 23:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych oraz komórkach NK i NKT
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NKT.

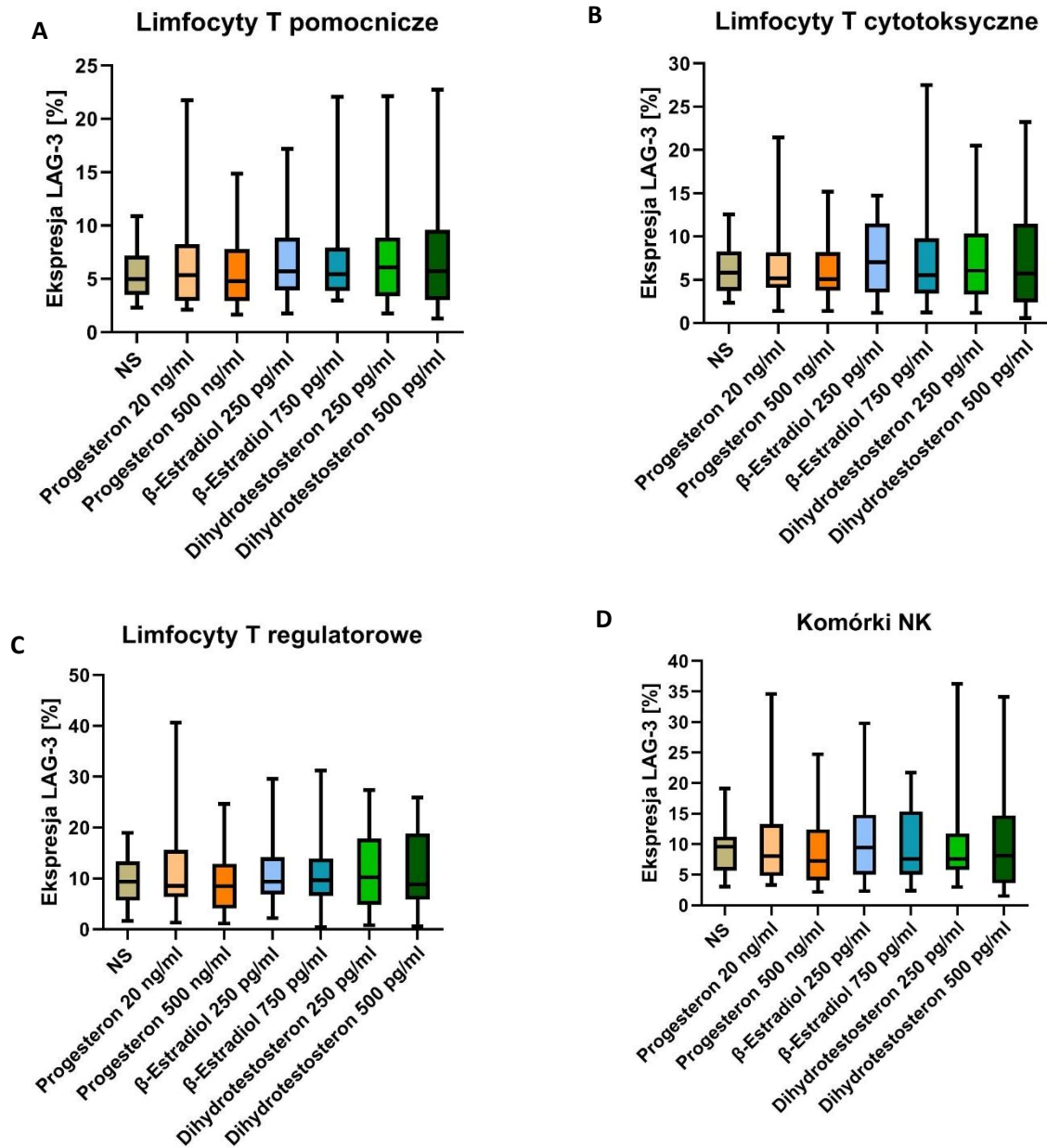


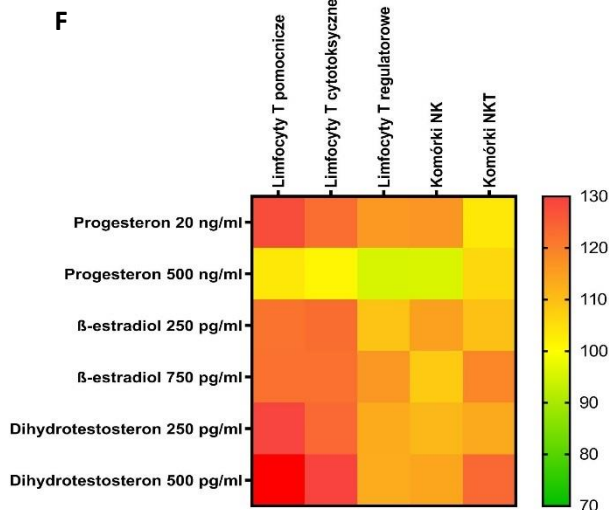
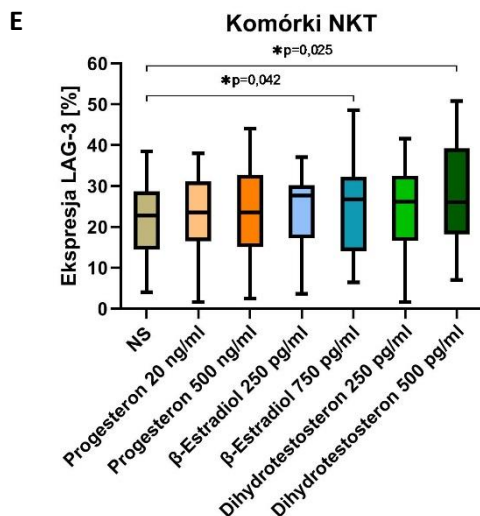


Rycina 23: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)-Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 24:

- Wykazano istotny wpływ β -estradolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na komórkach NKT.
- Nie wykazano wpływu progesteronu w stężeniach 20 oraz 500 ng/ml, β -estradolu w stężeniu 250 pg/ml oraz dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję LAG-3.

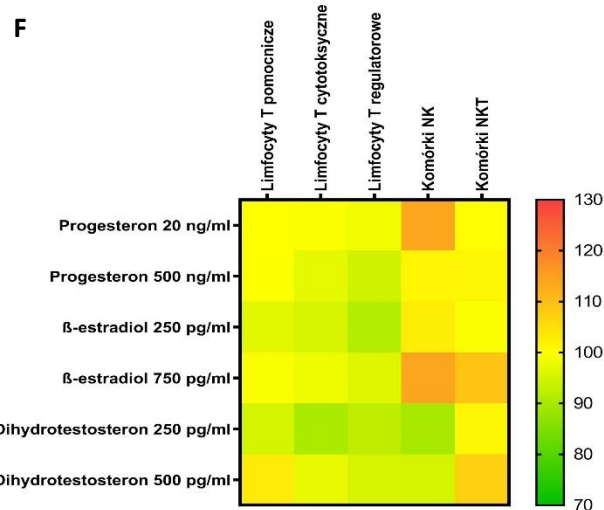
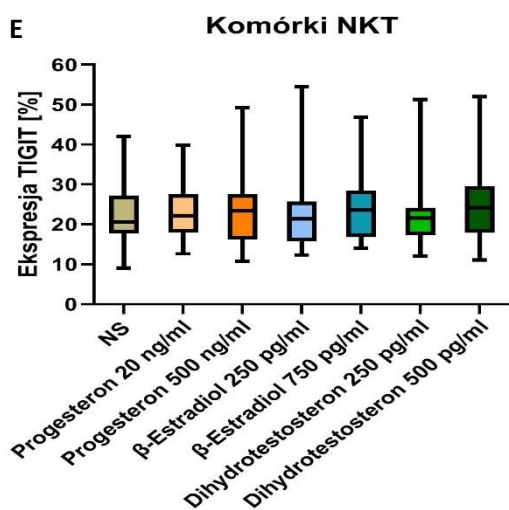
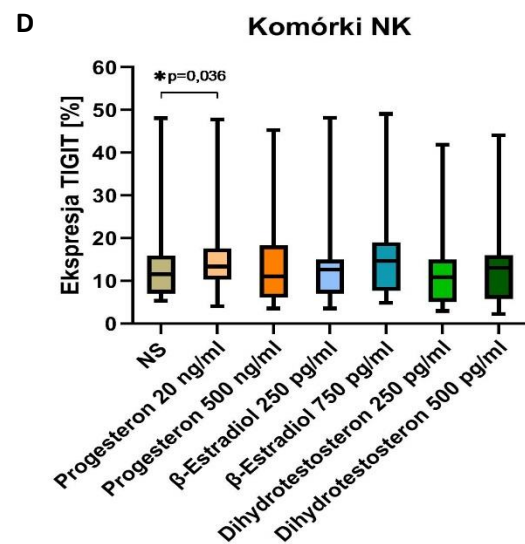
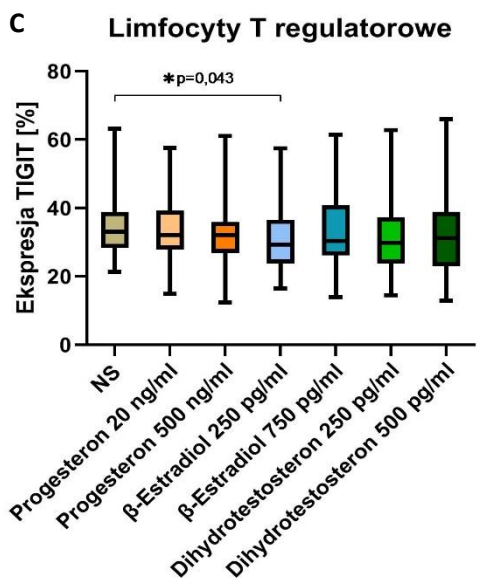
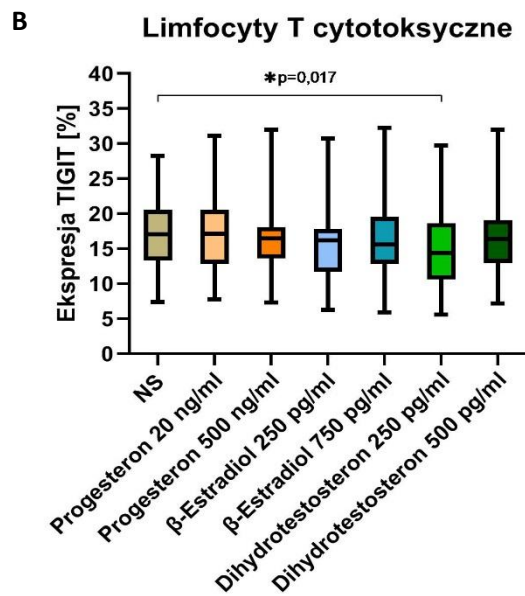
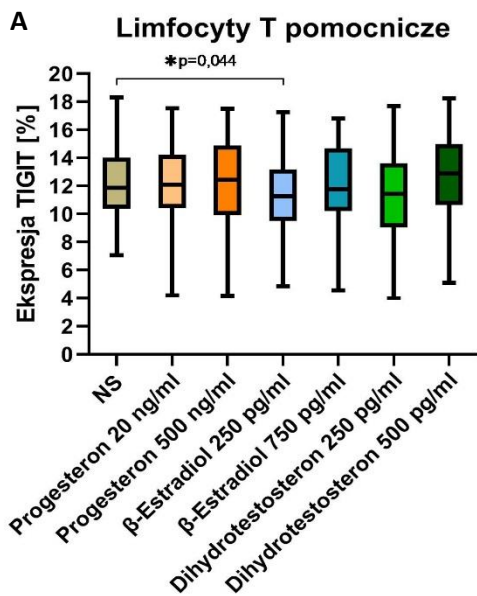




Rycina 24: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)-Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 25:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIGIT na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β-estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T pomocniczych oraz regulatorowych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T cytotoksycznych.
- Nie wykazano wpływu progesteronu w stężeniu 500 ng/ml, β-estradiolu w stężeniu 750 pg/ml oraz dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję TIGIT.

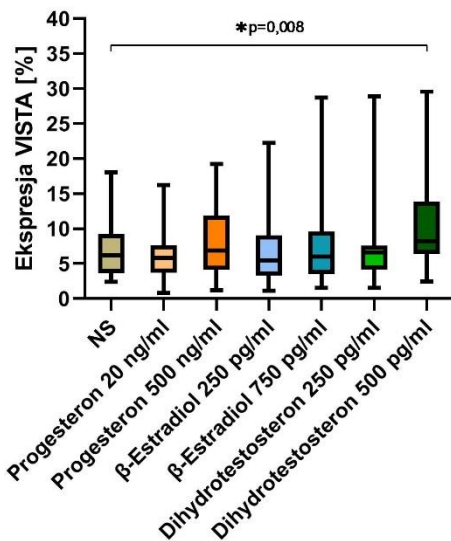


Rycina 25: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.

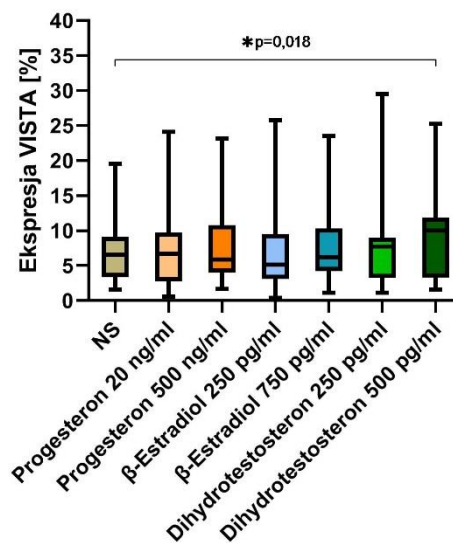
Analiza danych z ryciny 26:

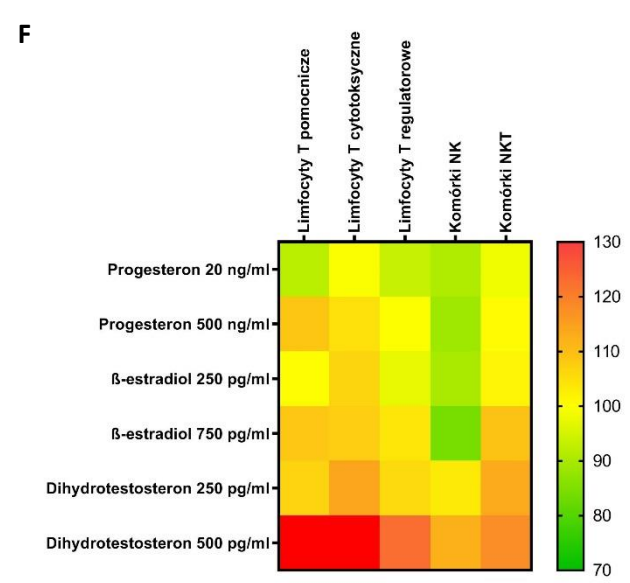
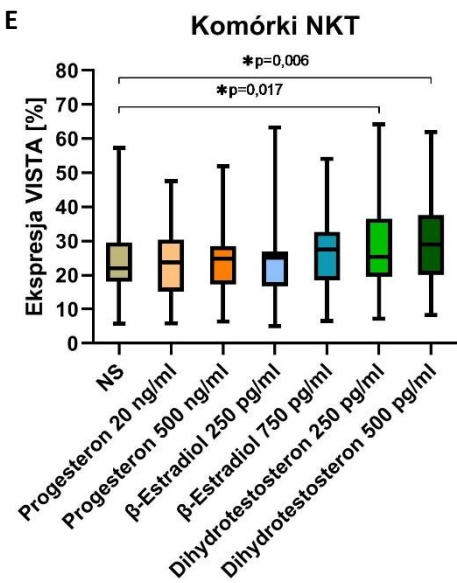
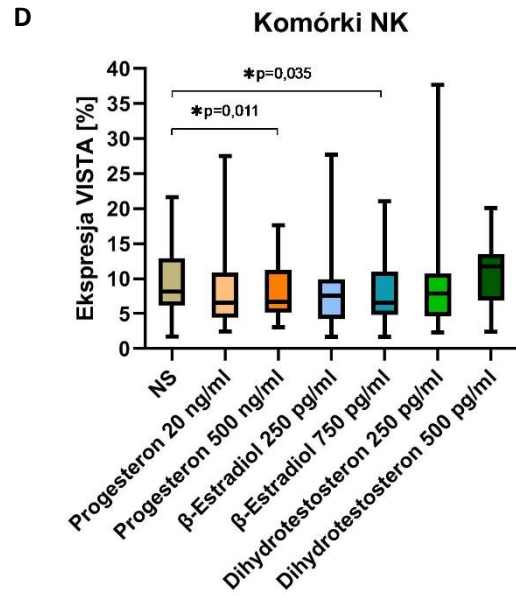
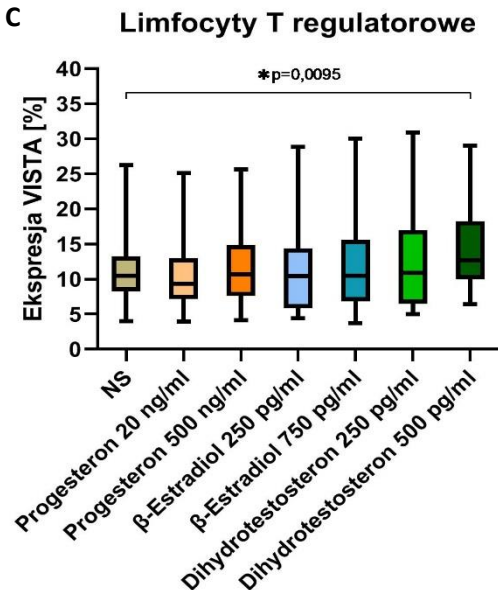
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki VISTA na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki VISTA na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na komórkach NKT.
- Nie wykazano wpływu progesteronu w stężeniu 20 ng/ml, β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na ekspresję VISTA.

A Limfocyty T pomocnicze



B Limfocyty T cytotoksyczne



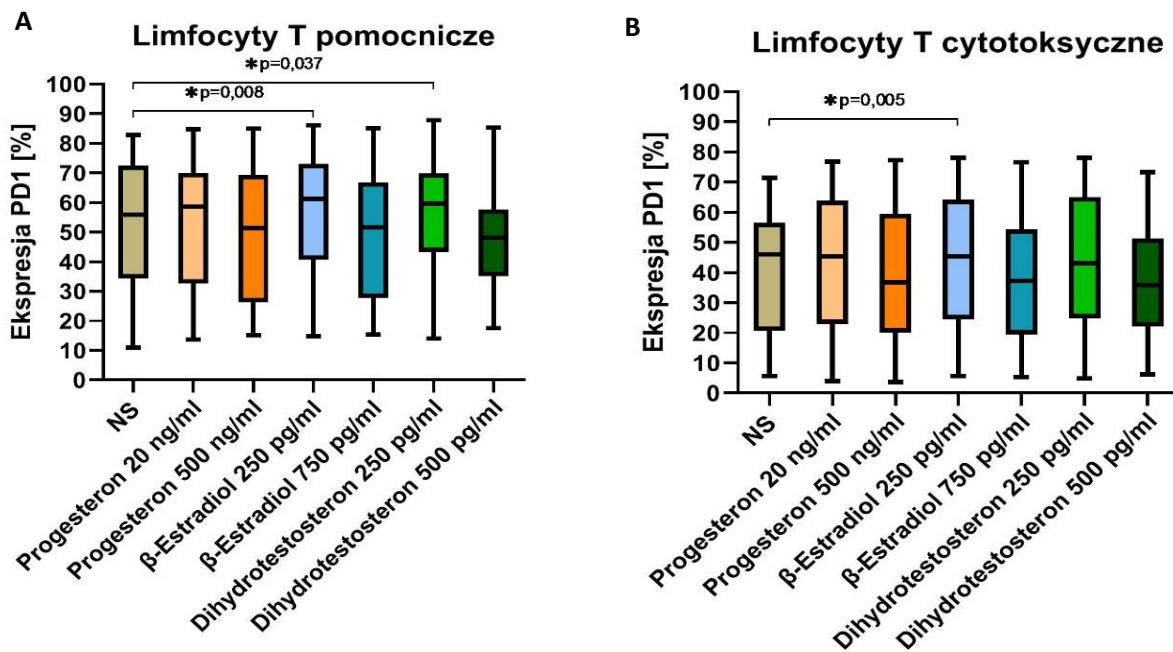


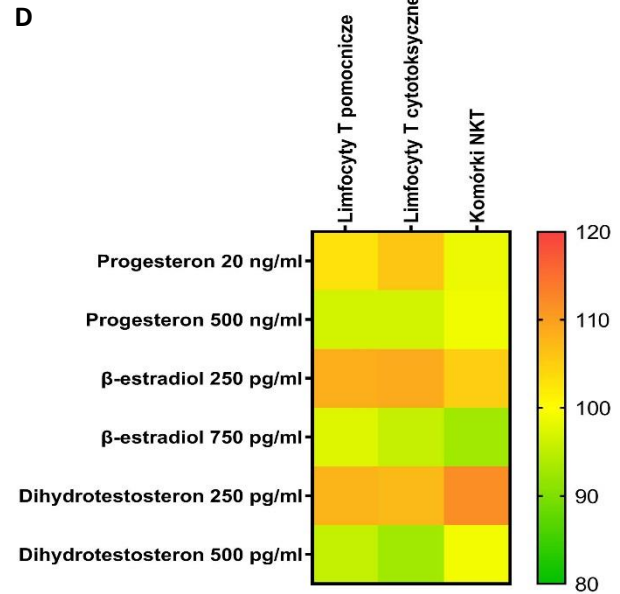
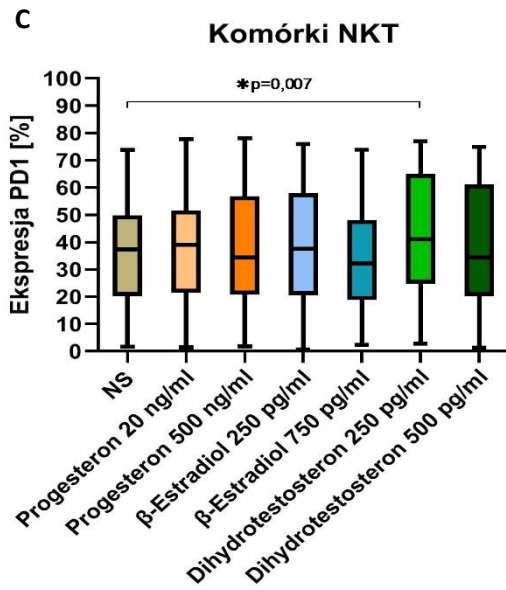
Rycina 26: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych – (A-E) Wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F)- Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla nie stymulowana OKT-3.

4.3.2 Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet ciężarnych. (hodowla stymulowana OKT-3)

Analiza danych z ryciny 27:

- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na limfocytach T pomocniczych oraz komórkach NKT.
- Nie wykazano wpływu progesteronu w stężeniach 20 oraz 500 ng/ml, β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml oraz dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję PD1.

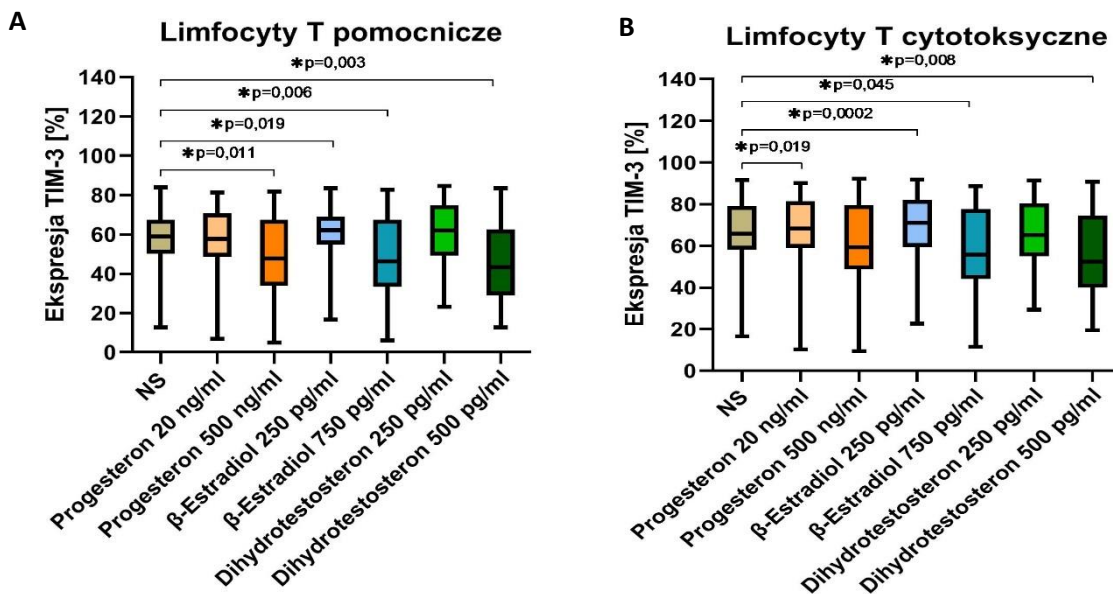


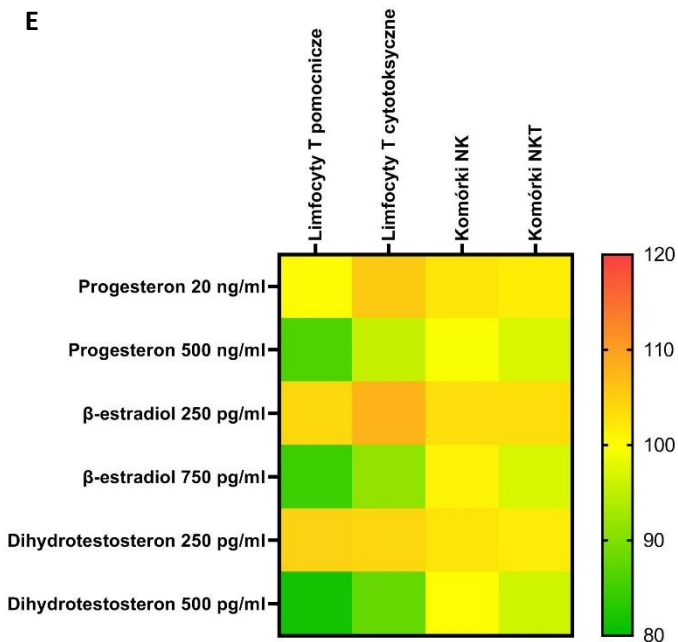
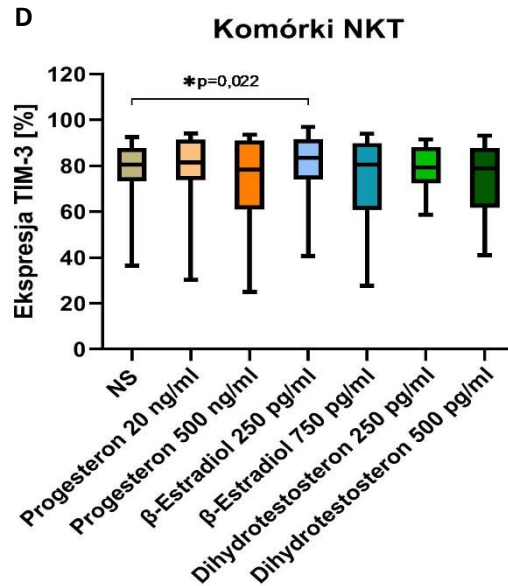
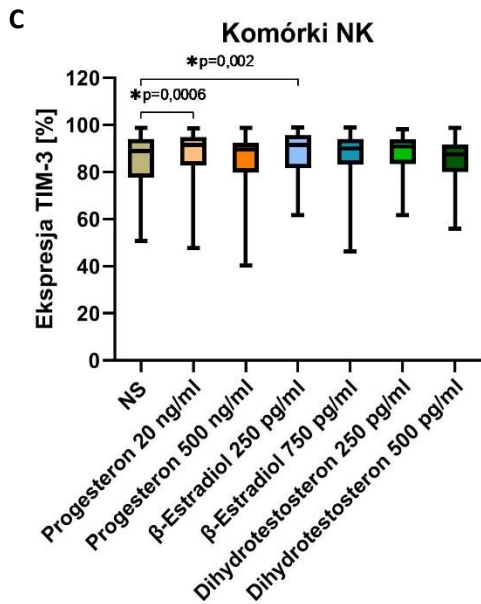


Rycina 27: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-C) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (D) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 28:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, komórkach NK oraz NKT.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Nie wykazano wpływu dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję TIM-3.

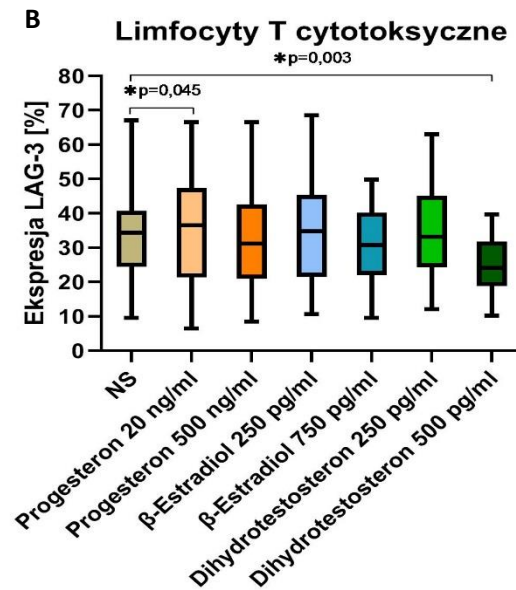
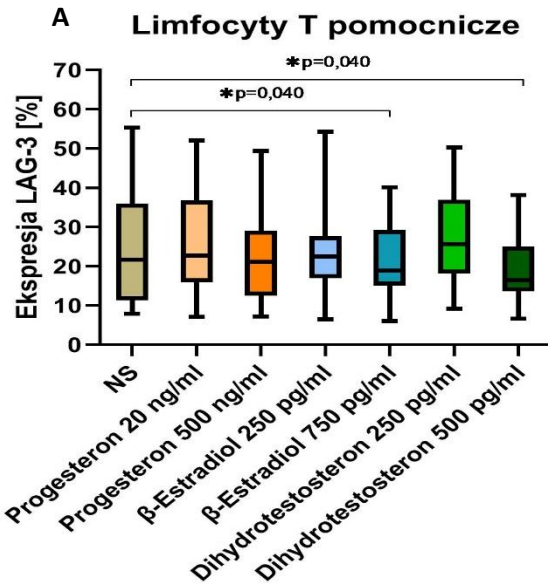


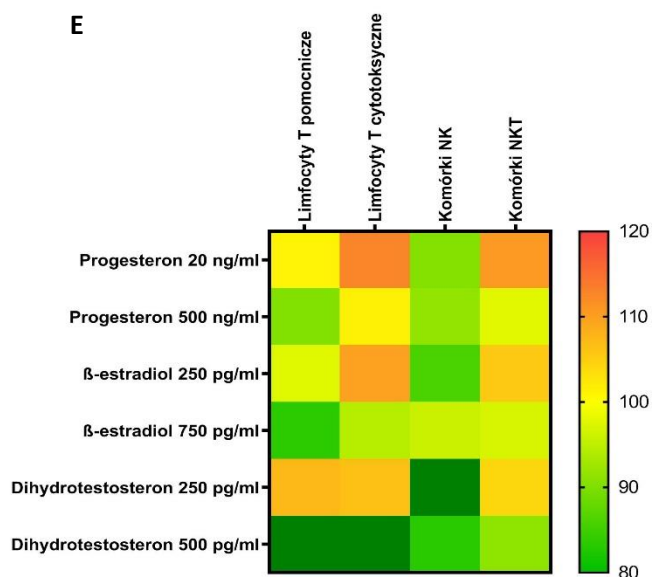
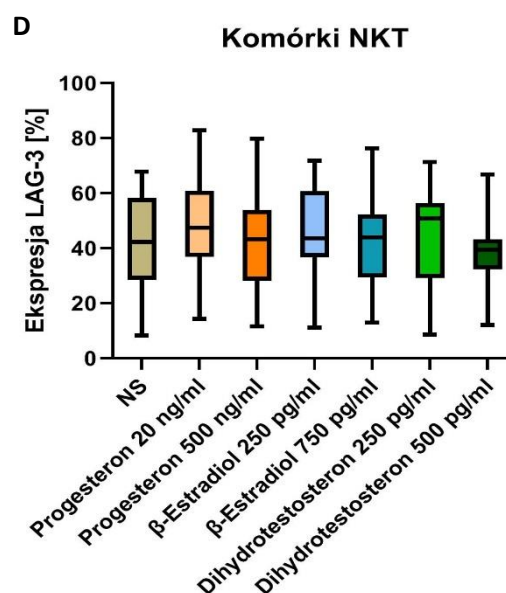
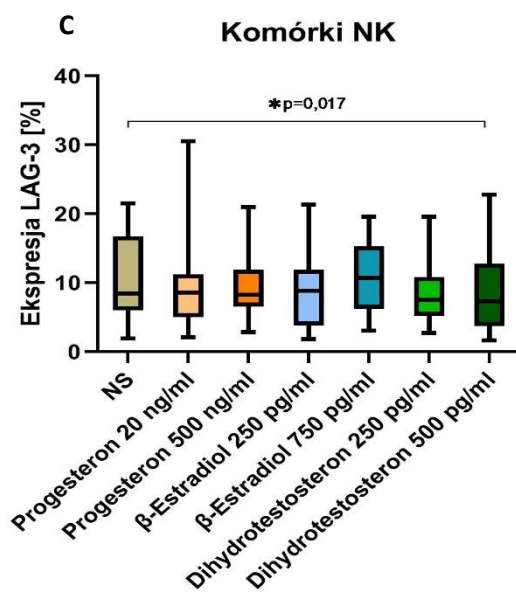


Rycina 28: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 29:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych oraz komórkach NK.
- Nie wykazano wpływu progesteronu o stężeniu 500 ng/ml, β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml oraz dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję LAG-3.

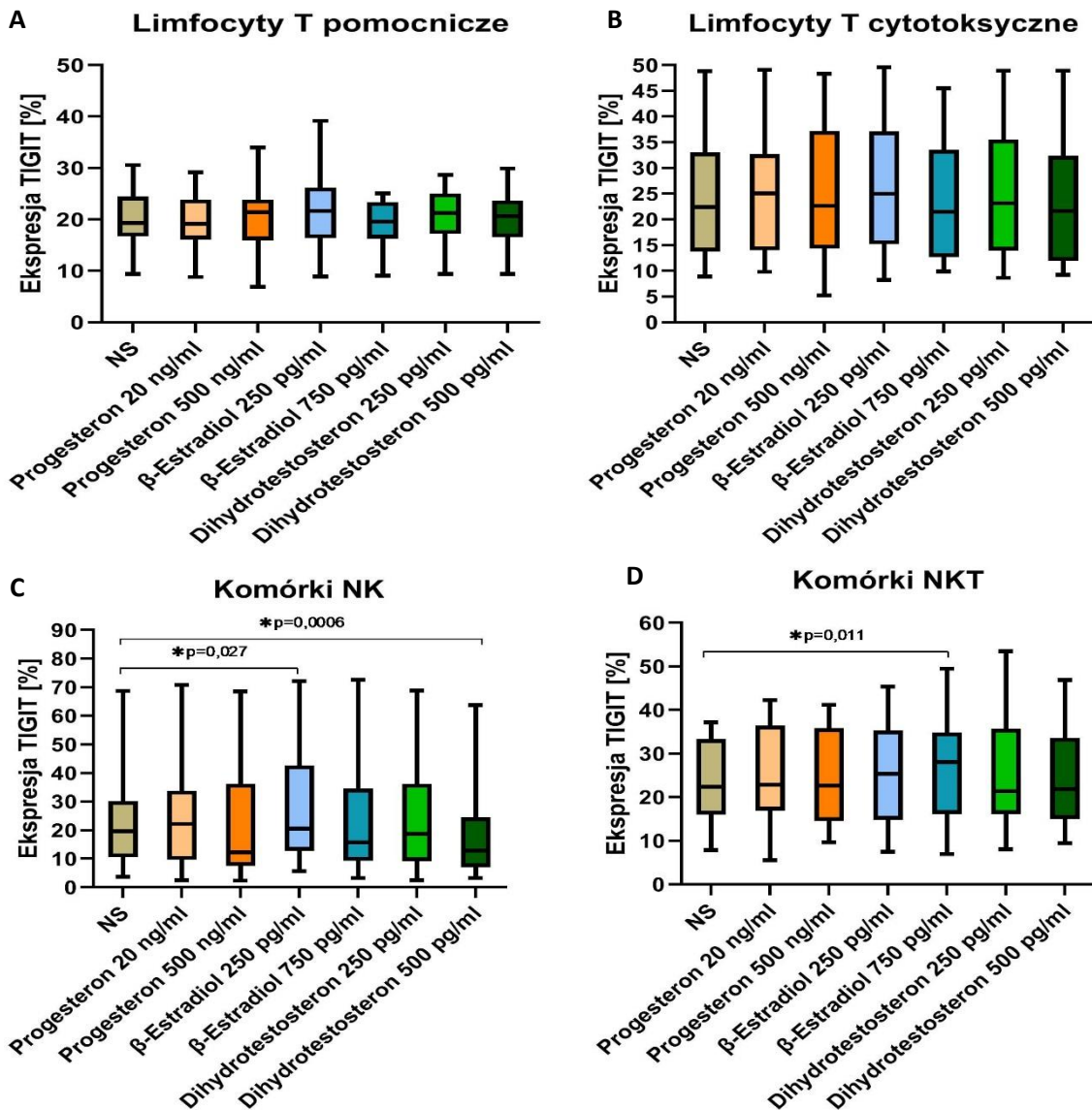


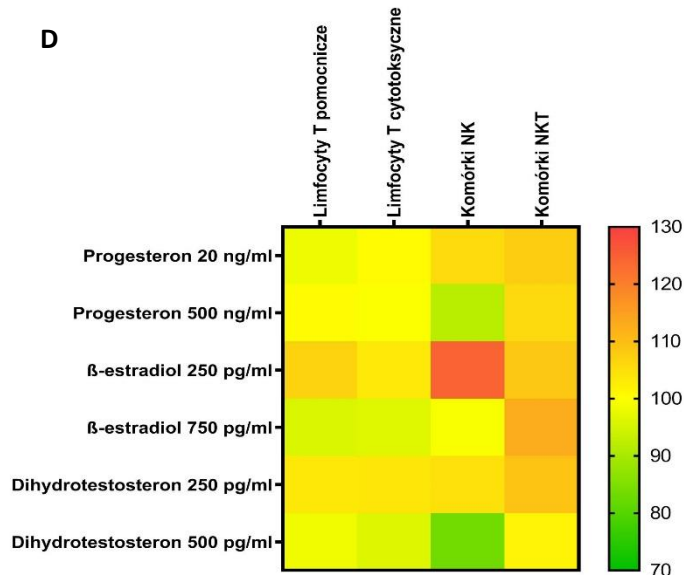


Rycina 29: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 30:

- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIGIT na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIGIT na komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na komórkach NK.
- Nie wykazano wpływu progesteronu o stężeniach 20 ng/ml oraz 500 ng/ml oraz dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję TIGIT.

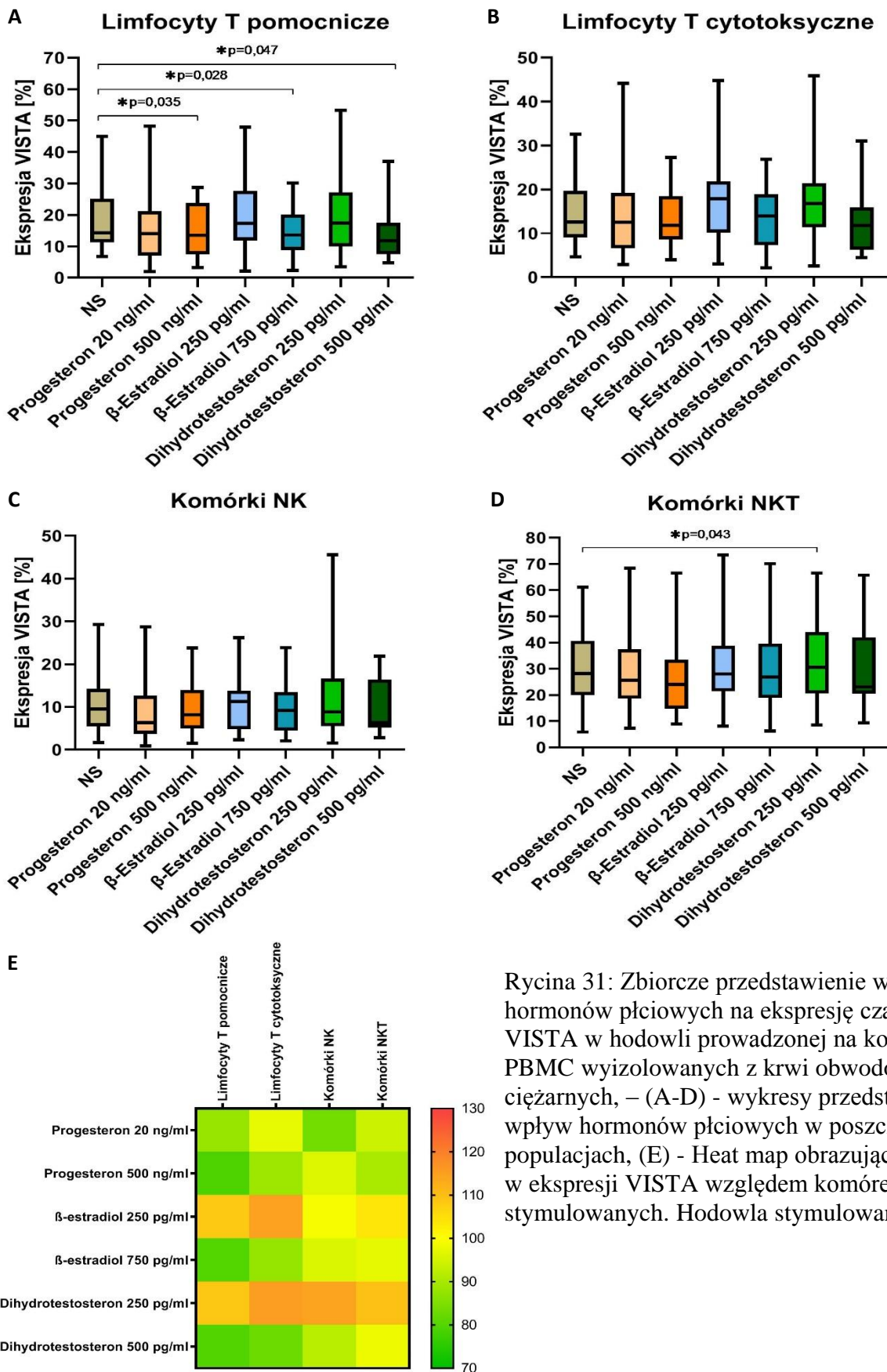




Rycina 30: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z rysunków ryciny 31:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T pomocniczych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T pomocniczych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T pomocniczych.
- Nie wykazano wpływu progesteronu o stężeniu 20 ng/ml, β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na ekspresję VISTA.

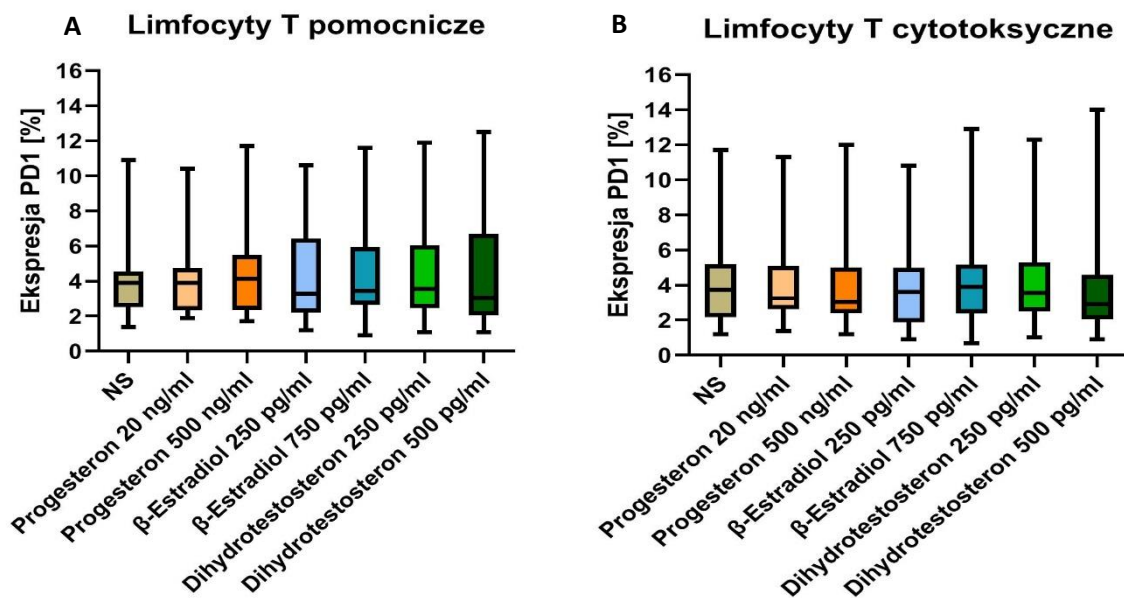


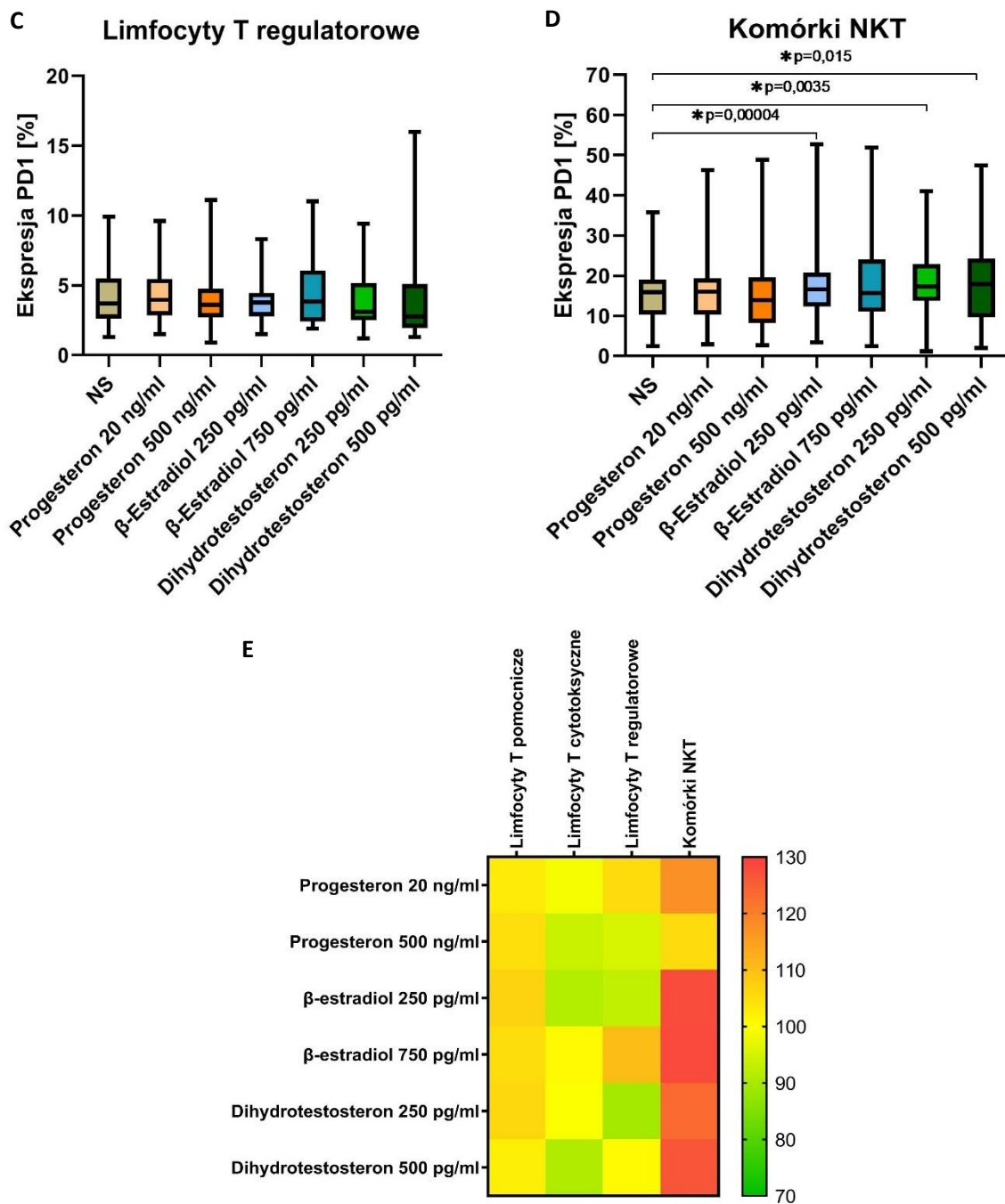
Rycina 31: Zbiorecze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnej populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

4.3.3 Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet z poronieniami nawykowymi. (hodowla nie stymulowana OKT-3)

Analiza danych z ryciny 32:

- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na komórkach NKT.
- Nie wykazano wpływu progesteronu o stężeniach 20 ng/ml, 500 ng/ml, β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na ekspresję PD1.

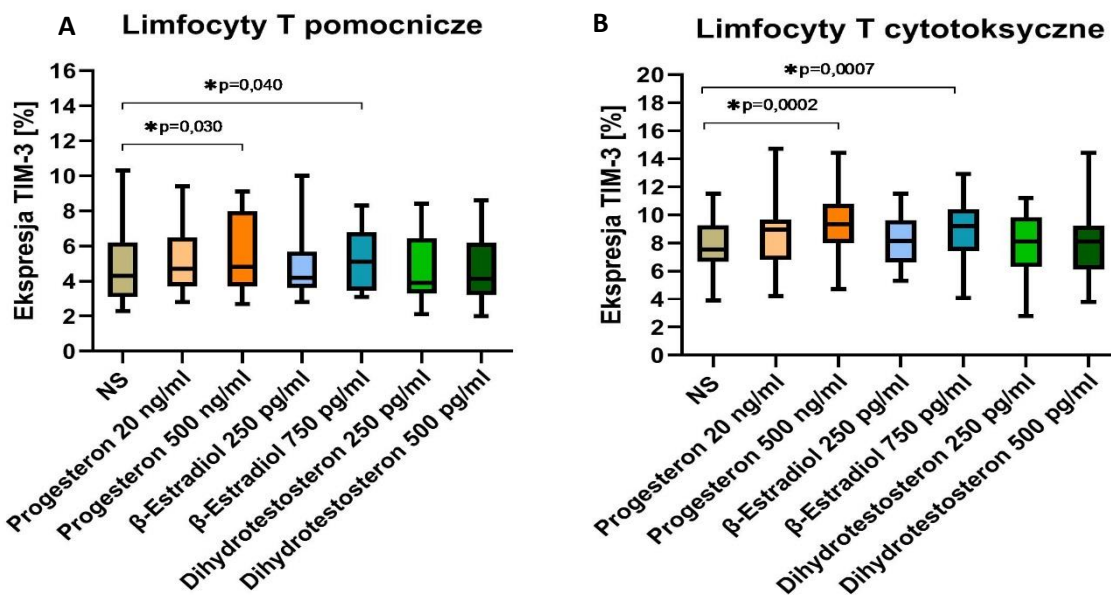


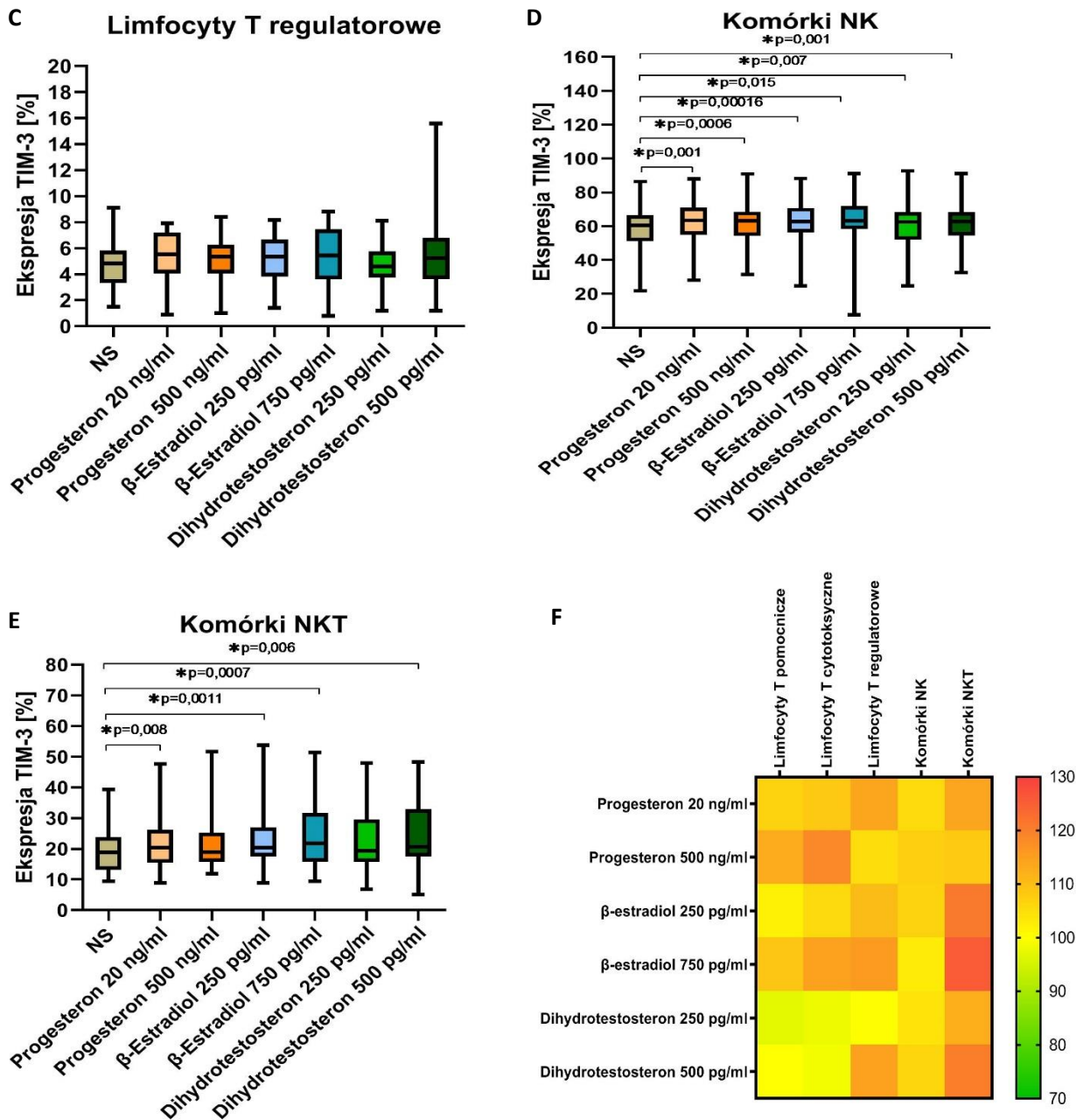


Rycina 32: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.

Analiza danych z ryciny 33:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK oraz NKT
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK oraz NKT
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, komórkach NK oraz NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK oraz NKT.
-

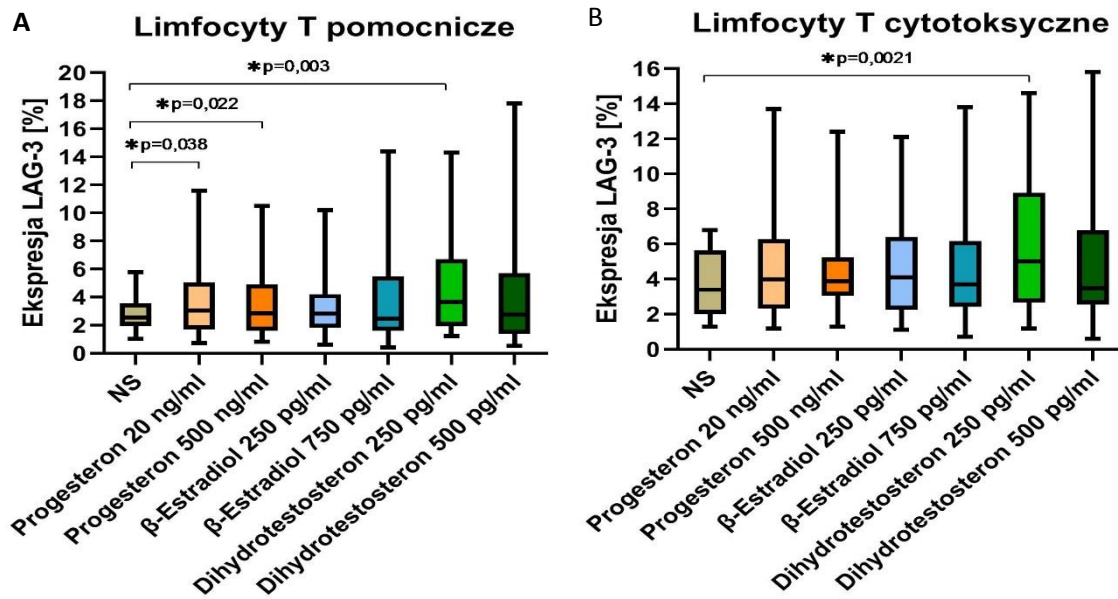


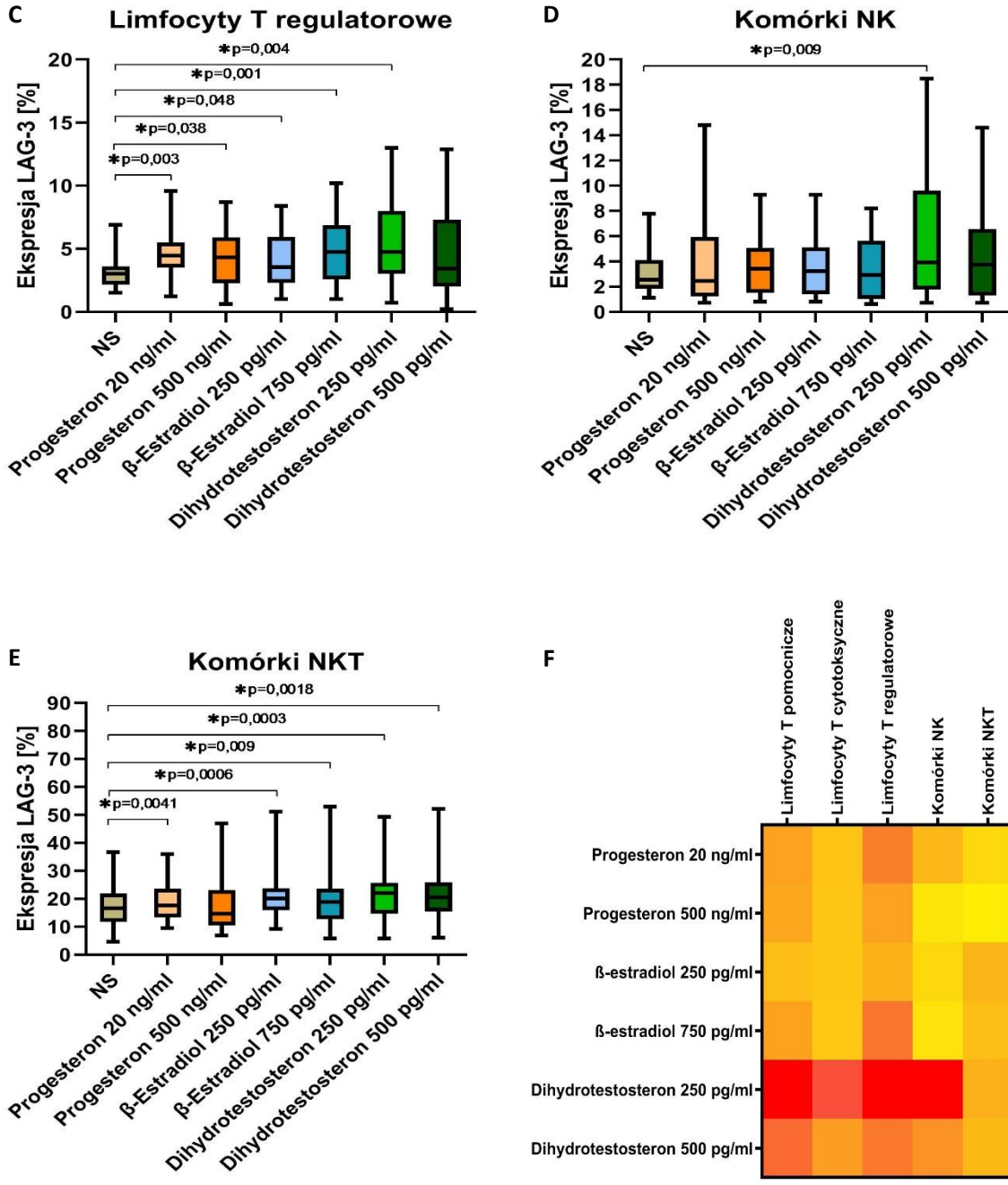


Rycina 33: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.

Analiza danych z ryciny 34:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, regulatorowych oraz komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych oraz regulatorowych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T regulatorowych oraz komórkach NKT
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T regulatorowych oraz komórkach NKT
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych, komórkach NK oraz NKT
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na komórkach NKT.

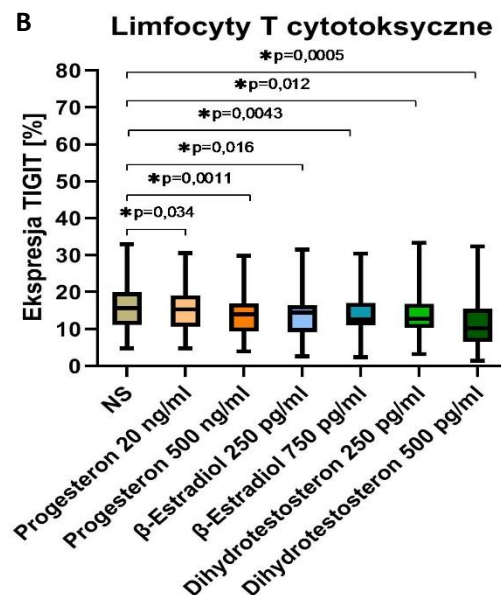
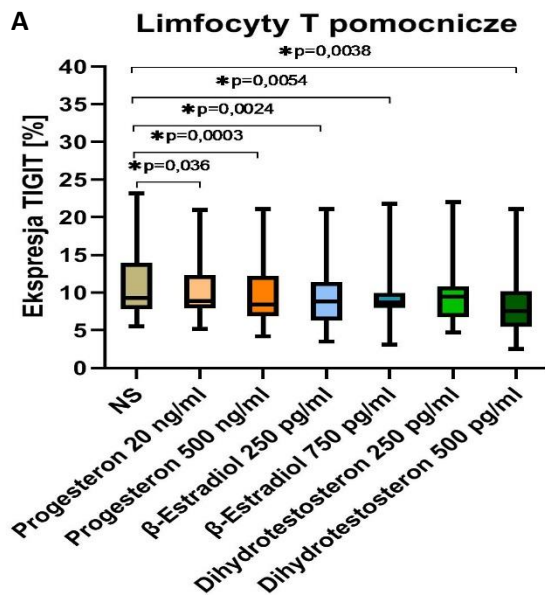


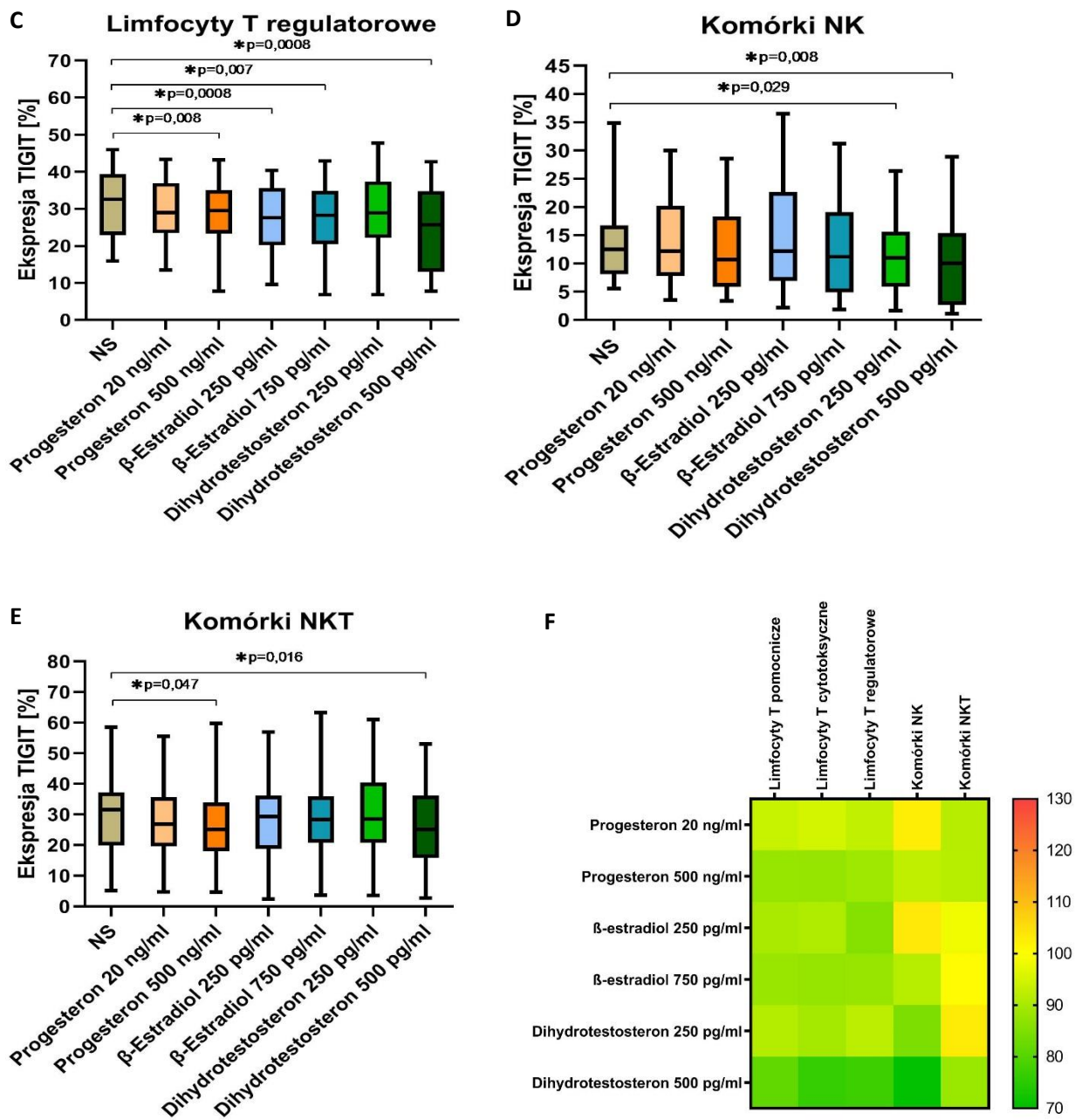


Rycina 34: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.

Analiza danych z ryciny 35:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych oraz komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych oraz regulatorowych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T T pomocniczych, cytotoksycznych oraz regulatorowych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, regulatorowych, komórkach NK oraz NKT.

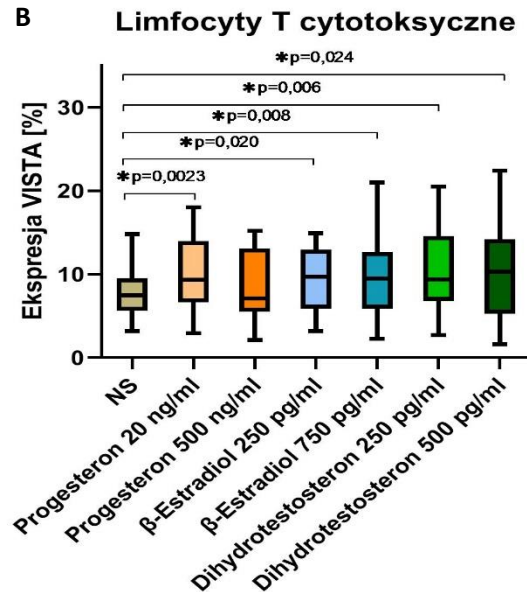
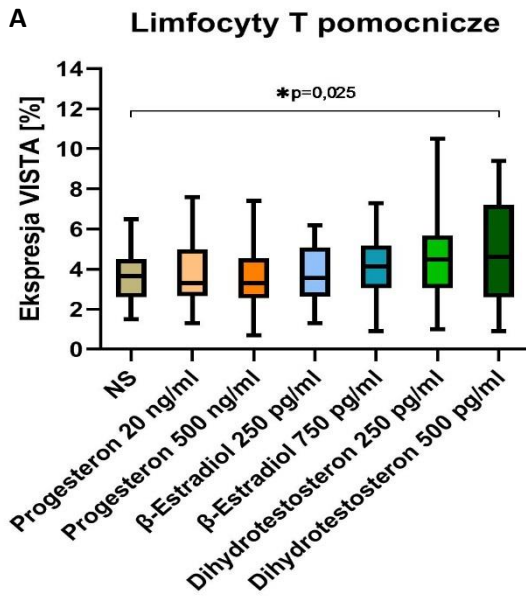


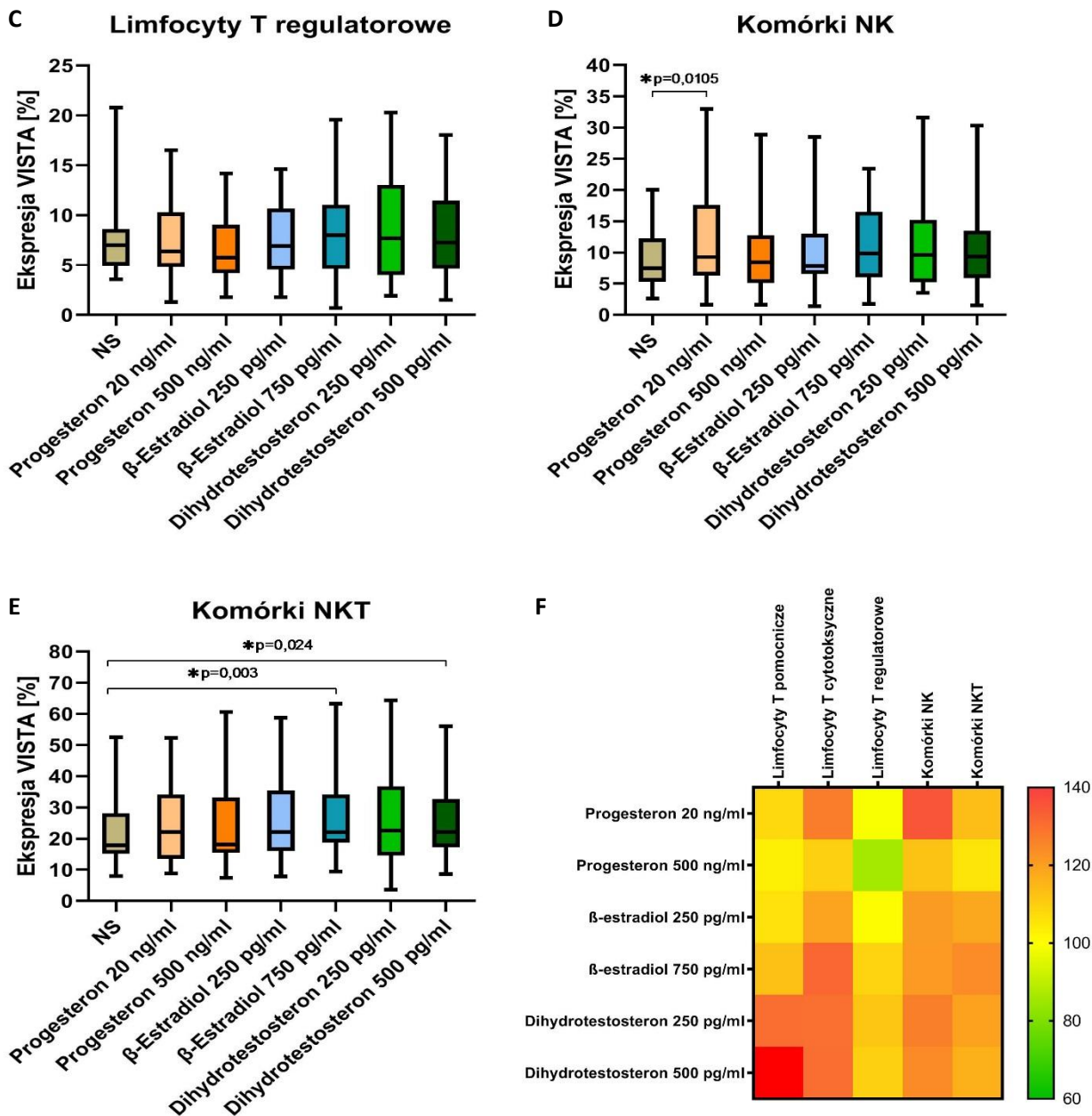


Rycina 35: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.

Analiza danych z ryciny 36:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NKT
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych oraz komórkach NKT
- Nie wykazano wpływu progesteronu o stężeniu 500 ng/ml, na ekspresję VISTA.



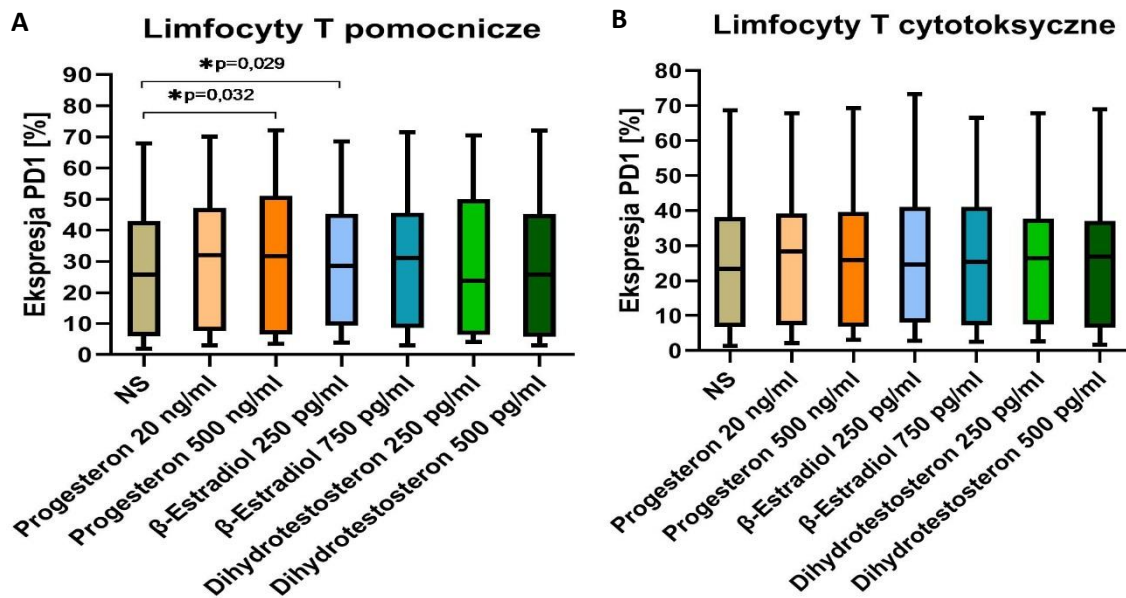


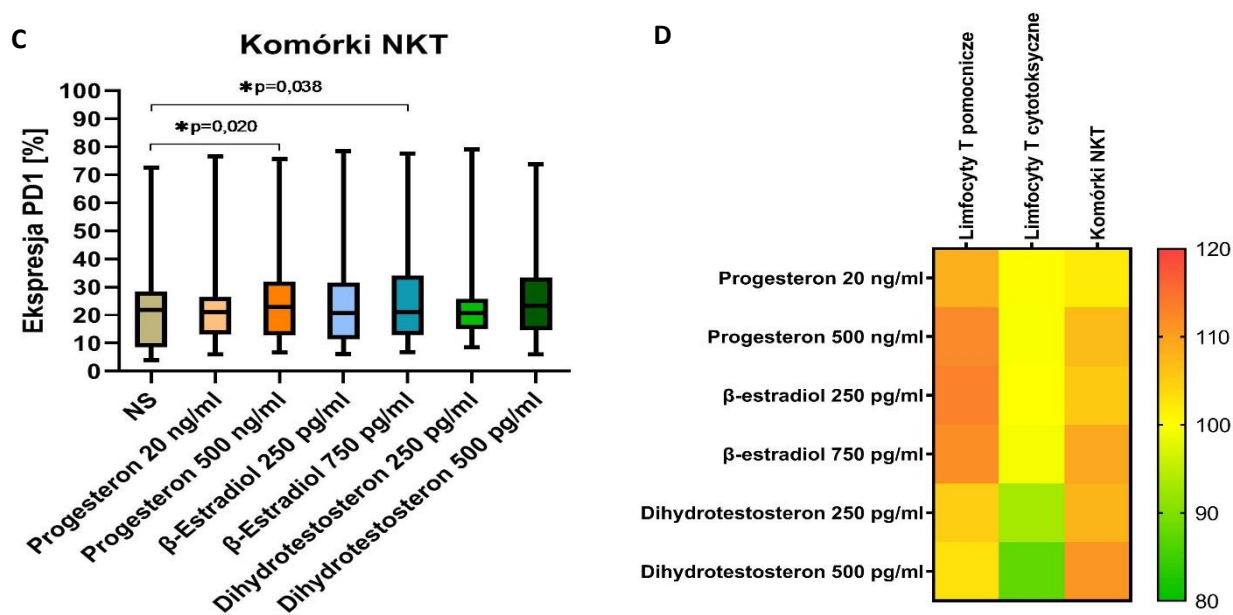
Rycina 36: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-E) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (F) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana nie OKT-3.

4.3.4 Wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w hodowli komórek wyizolowanych od kobiet z poronieniami nawykowymi. (hodowla stymulowana OKT-3)

Analiza danych z ryciny 37:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na limfocytach T pomocniczych oraz komórkach NKT.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na limfocytach T pomocniczych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki PD1 na komórkach NKT.
- Nie wykazano wpływu progesteronu o stężeniu 20 ng/ml, dihydrotestosteronu o stężeniach 250 oraz 500 pg/ml na ekspresję PD1.

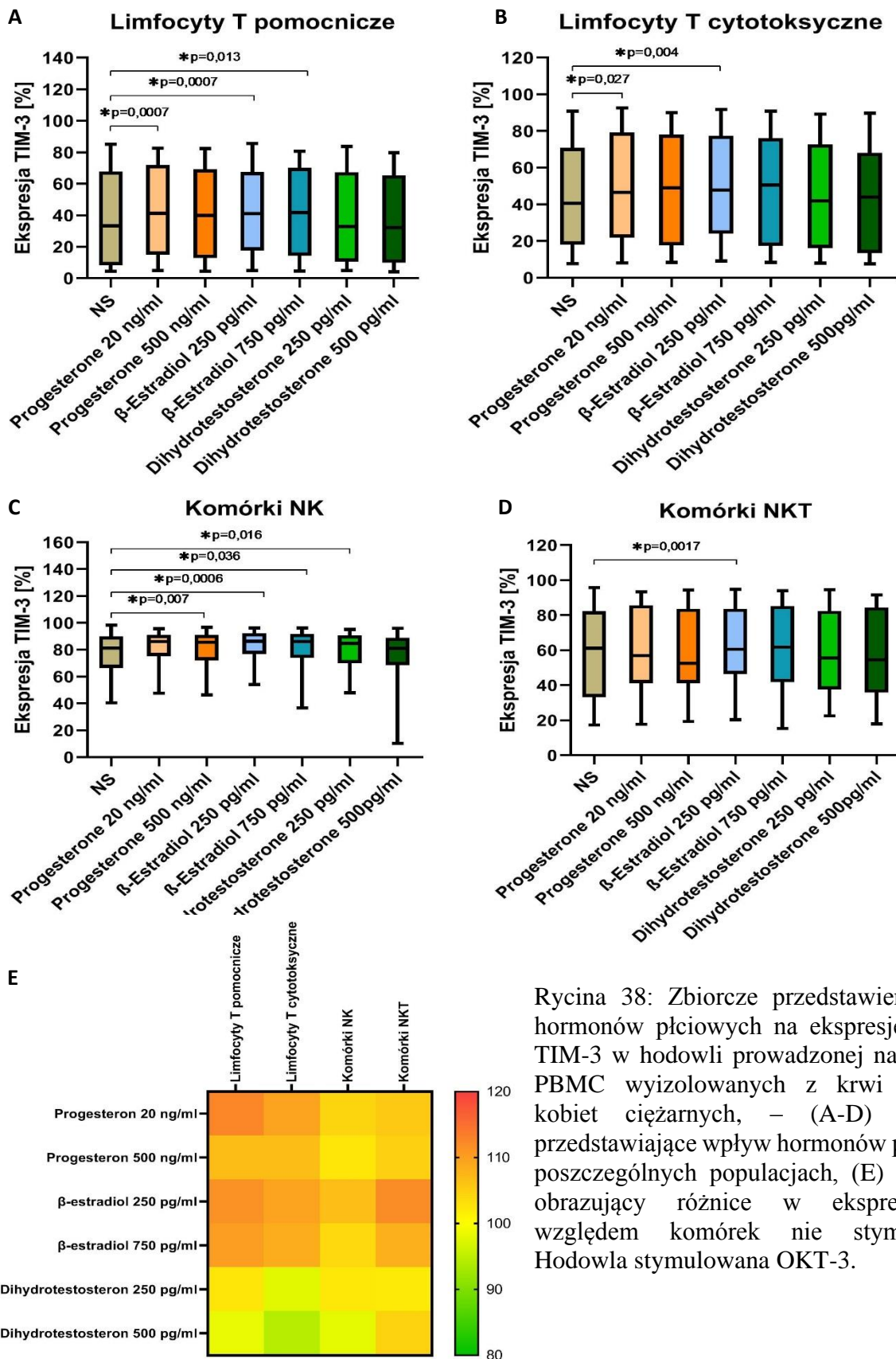




Rycina 37: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki PD1 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet z poronieniami nawykowymi, – (A-C) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (D) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji PD1 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 38:

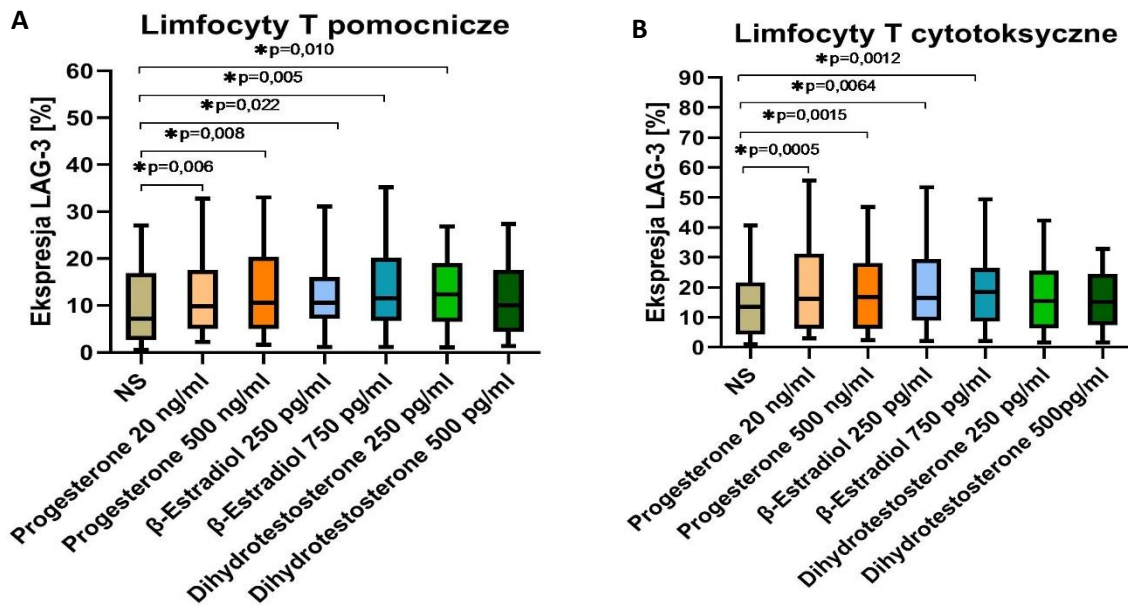
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, komórkach NK oraz NKT.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na limfocytach T pomocniczych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIM-3 na komórkach NK.
- Nie wykazano wpływu dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na ekspresję TIM-3,

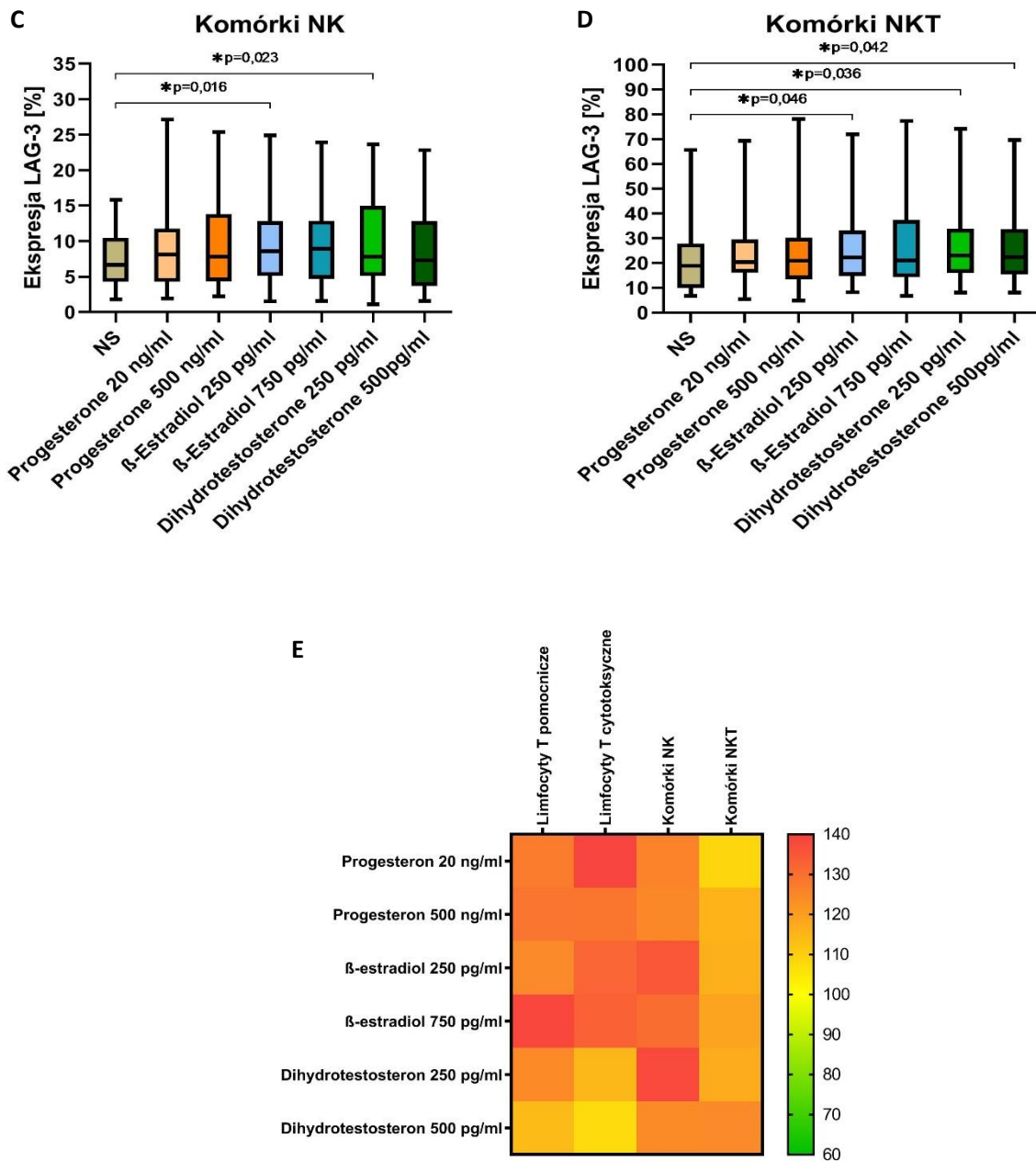


Rycina 38: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIM-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIM-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 39:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych, komórkach NK oraz NKT.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na limfocytach T pomocniczych, komórkach NK oraz NKT.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki LAG-3 na komórkach NKT.

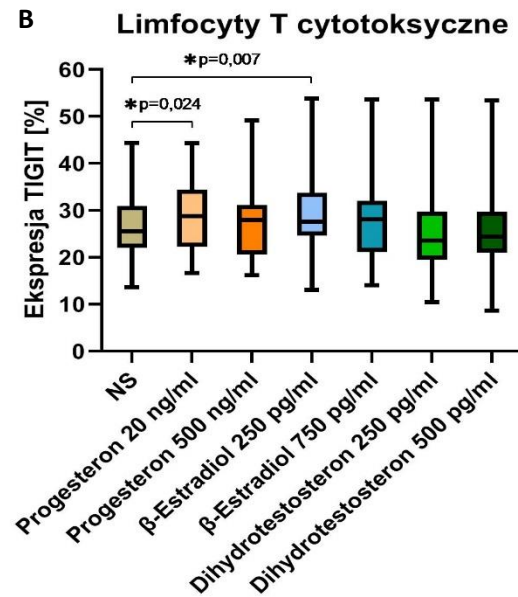
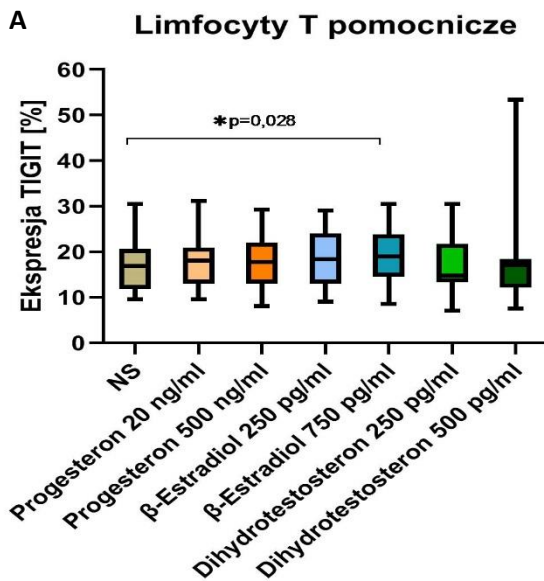


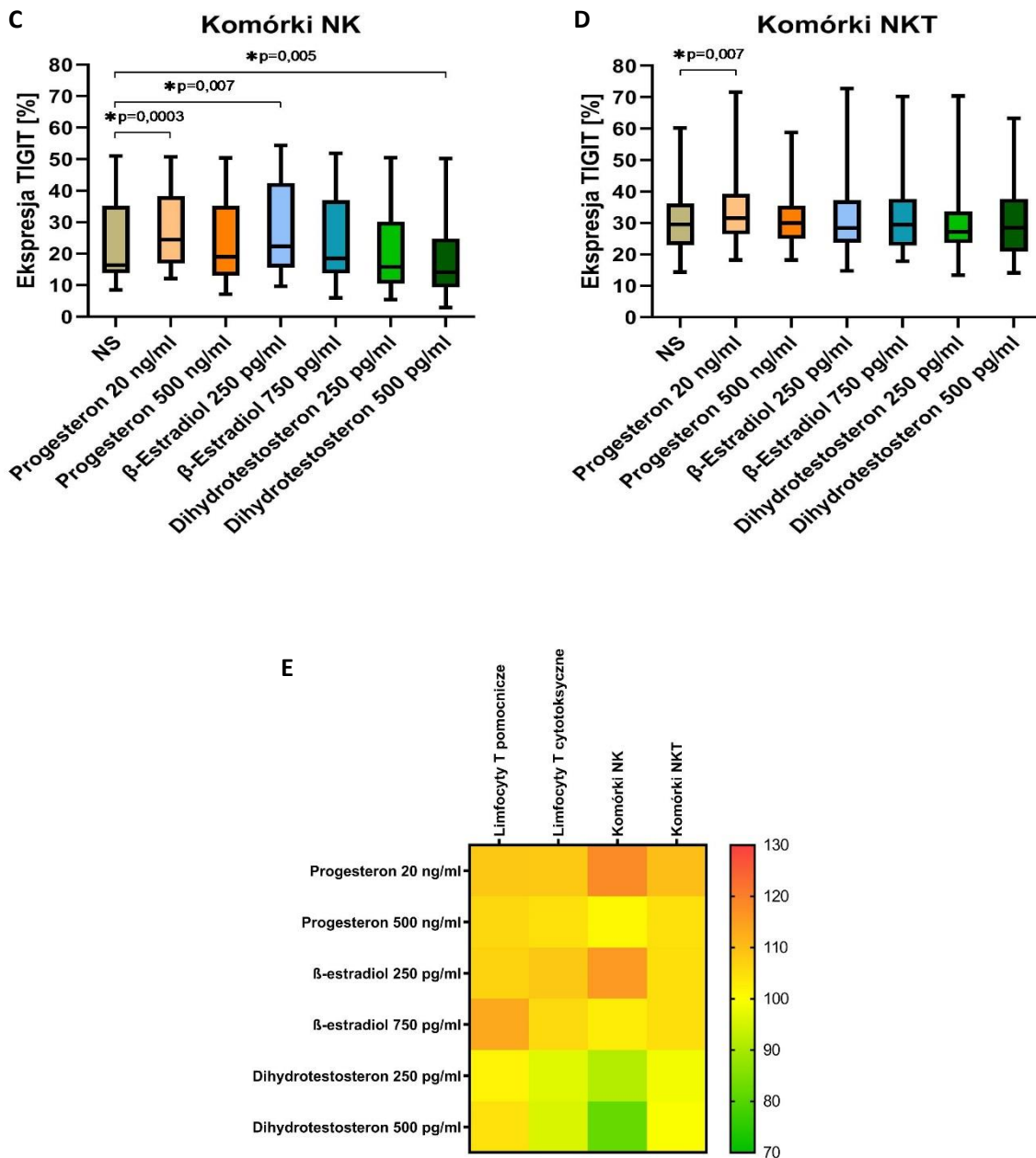


Rycina 39: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki LAG-3 w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) -wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji LAG-3 względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 40:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T cytotoksycznych, komórkach NK oraz NKT.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki TIGIT na limfocytach T pomocniczych.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zmniejszenie ekspresji cząsteczki TIGIT na komórkach NK.
- Nie wykazano wpływu progesteronu o stężeniu 500 ng/ml, dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na ekspresję TIGIT.

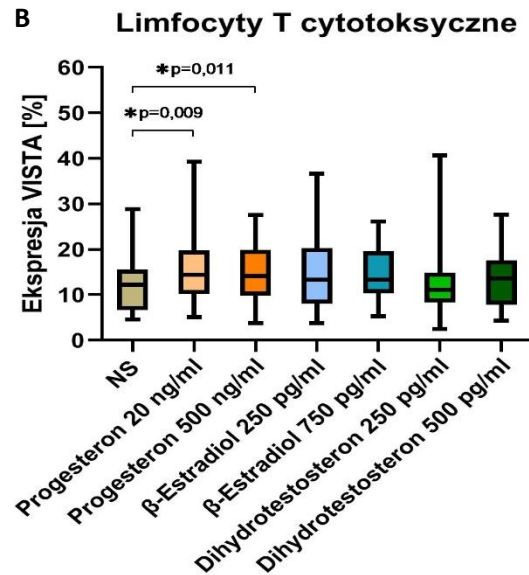
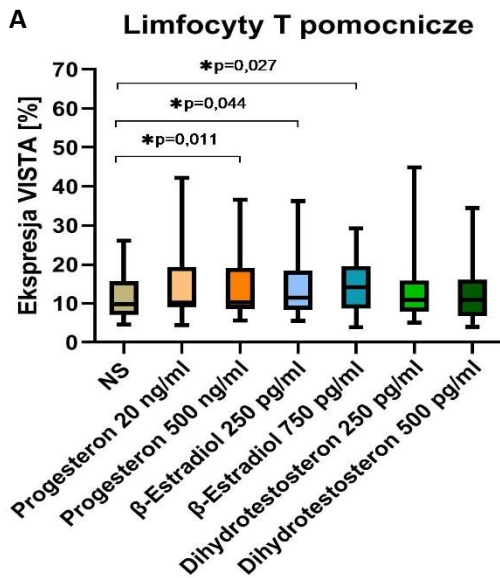


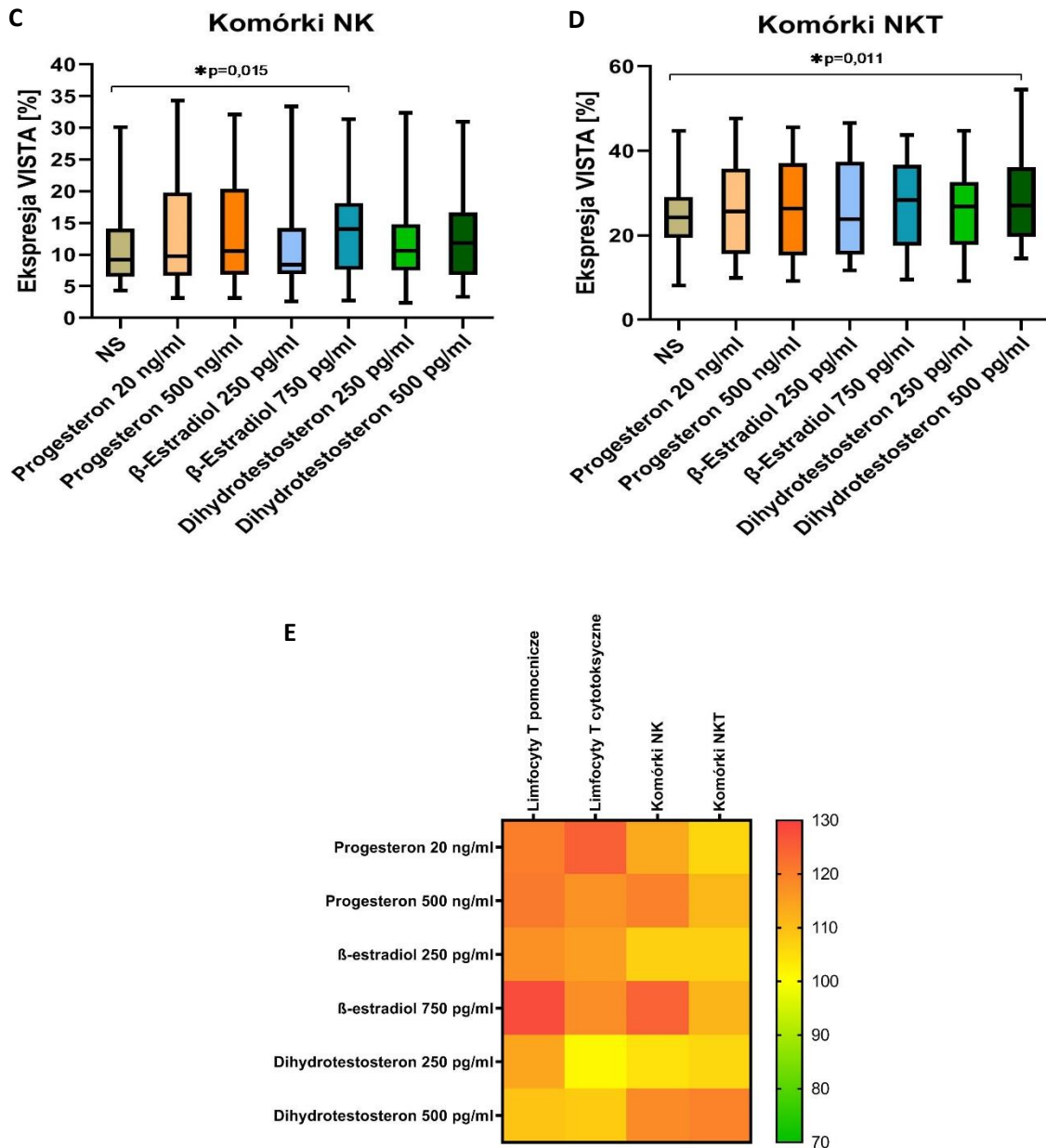


Rycina 40: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki TIGIT w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji TIGIT względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

Analiza danych z ryciny 41:

- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 20 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ progesteronu w stężeniu 500 ng/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T pomocniczych oraz cytotoksycznych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 250 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T pomocniczych.
- Wykazano istotny wpływ β -estradiolu w stężeniu 750 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na limfocytach T pomocniczych oraz komórkach NK.
- Wykazano istotny wpływ dihydrotestosteronu w stężeniu 500 pg/ml na zwiększenie ekspresji cząsteczki VISTA na komórkach NKT.
- Nie wykazano wpływu dihydrotestosteronu w stężeniu 250 pg/ml na ekspresję VISTA.





Rycina 41: Zbiorcze przedstawienie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczki VISTA w hodowli prowadzonej na komórkach PBMC wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych, – (A-D) - wykresy przedstawiające wpływ hormonów płciowych w poszczególnych populacjach, (E) - Heat map obrazujący różnice w ekspresji VISTA względem komórek nie stymulowanych. Hodowla stymulowana OKT-3.

4.3.5 Ocena możliwości wykorzystania hormonów płciowych w terapii wykrytych zaburzeń w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u kobiet z poronieniami nawykowymi.

Przeprowadzone badania wykazały szereg różnic pomiędzy kobietami ciężarnymi, a kobietami z poronieniami nawykowymi po poronieniu. Na chwilę obecną dla kobiet, u których przyczyna poronienia została nierozpoznana nie ma przewidzianego schematu leczniczego. Jako przyczynę poronienia u tych kobiet podaje się błędy w funkcjonowaniu układu odpornościowego, takie jak nadmierna cytotoksyczność komórek NK, czy nadmierne wydzielanie cytokin prozapalnych. Celem pracy było zbadanie wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy. Badania te miały na celu sprawdzenie czy zastosowanie hormonów płciowych jako leku może przyczynić się do istotnych zmian w funkcjonowaniu komórek układu odpornościowego, takich jak limfocyty T oraz komórki NK czy NKT.

Wykazane różnice w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u kobiet z poronieniami nawykowymi: Obniżona ekspresja PD1, TIM-3, LAG-3, VISTA na limfocytach T cytotoksycznych, obniżona ekspresja PD1, LAG-3 oraz VISTA na limfocytach T pomocniczych, obniżona ekspresja PD1, LAG-3 na limfocytach T regulatorowych, obniżona ekspresja TIM-3 oraz podwyższona ekspresja TIGIT na komórkach NK, obniżona ekspresja PD1 na komórkach NKT. (Tabela 8). Prowadzone badania wykazały, że zastosowanie hormonów płciowych (progesteronu, estradiolu, dihydrotestosteronu) może w istotny sposób wpływać na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy, czyli na funkcjonowanie komórek układu odpornościowego. W tabelach (10 oraz 11) zaprezentowałem jak hormony płciowe wpłynęły w hodowli komórkowej na ekspresję cząsteczek których ekspresja była obniżona u kobiet z poronieniami nawykowymi względem kobiet w ciąży.

Tabela 10: Zestawienie wpływu hormonów płciowych na wykryte różnice pomiędzy kobietami z poronieniami nawykowymi, a kobietami w ciąży. Hodowle nie stymulowane OKT-3.

Hormon	Wpływ na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy	Ilość zmian
Progesteron 20 ng/ml	↑PD1 na CD4, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na CD4, ↑LAG-3 na Treg, ↑VISTA na CD8	5
Progesteron 500 ng/ml	↑TIM-3 na CD8, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na CD4, ↑LAG-3 na Treg, ↓TIGIT na NKT, ↑VISTA na CD8	6
Estradiol 250 pg/ml	↑PD1 na NKT, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na Treg, ↑VISTA na CD8	4
Estradiol 750 pg/ml	↑TIM-3 na CD8, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na Treg,	3
Dihydrotestosteron 250 pg/ml	↑PD1 na NKT, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na CD4, ↑LAG-3 na CD8, ↑LAG-3 na Treg, ↑VISTA na CD8	6
Dihydrotestosteron 500 pg/ml	↑PD1 na NKT, ↑TIM-3 na NK, ↓TIGIT na NKT, ↑VISTA na CD4, ↑VISTA na CD8	5

W hodowlach nie stymulowanych OKT-3 stymulacja progesteronem o stężeniu 500 ng/ml oraz dihydrotestosteronem o stężeniu 250 pg/ml wykazała wpływ na 6 z 12 wykrytych zaburzeń. Wpływ ten miał charakter odwracający zmiany wykryte w ekspresji ICP u kobiet z poronieniami nawykowymi.

Tabela 11: Zestawienie wpływu hormonów płciowych na wykryte różnice pomiędzy kobietami z poronieniami nawykowymi a kobietami w ciąży. Hodowle stymulowane OKT-3.

Hormon	Wpływ na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy	Ilość zmian
Progesteron 20 ng/ml	↑TIM-3 na CD8, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na CD4, ↑LAG-3 na CD8, ↑VISTA na CD8	5
Progesteron 500 ng/ml	↑PD1 na CD4, ↑PD1 na NKT, ↑LAG-3 na CD4, ↑LAG-3 na CD8, ↑VISTA na CD4, ↑VISTA na CD8	6
Estradiol 250 pg/ml	↑PD1 na CD4, ↑TIM-3 na CD8, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na CD4, ↑LAG-3 na CD8, ↑VISTA na CD4	6
Estradiol 750 pg/ml	↑PD1 na NKT, ↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na CD4, ↑LAG-3 na CD8, ↑VISTA na CD4	5
Dihydrotestosteron 250 pg/ml	↑TIM-3 na NK, ↑LAG-3 na CD4,	2
Dihydrotestosteron 500 pg/ml		0

W hodowlach stymulowanych OKT-3 (brak możliwości oceny wpływu hormonów na limfocyty T regulatorowe – ograniczenia zastosowanej metody) stymulacja progesteronem o stężeniu 500 ng/ml oraz estradiolem od stężeniu 250 pg/ml wykazała wpływ aż na 6 z 10 wykrytych zaburzeń. Wpływ ten miał charakter odwracający zmiany wykryte w ekspresji ICP u kobiet z poronieniami nawykowymi.

Wykazane zmiany wskazują, że zastosowanie progesteronu w stężeniu 500 ng/ml wywierało największy wpływ na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w obydwu typach hodowli. Zastosowanie tego hormonu w terapii u kobiet z poronieniami nawykowymi może przyczynić się do zmian, które być może pozwoliłyby na zwiększenie szansy na prawidłowy rozwój ciąży. Uzyskane wyniki przybliżają tylko małą część funkcjonowania układu odporności u kobiet z poronieniami nawykowymi, jednakże mogą one dawać podstawy do wyznaczenia kierunku kolejnych badań w tej tematyce.

5 Dyskusja

5.1 Porównanie otrzymanych wyników ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na powierzchni PBMC pomiędzy badanymi grupami.

Immunologiczne punkty kontrolne (ICP), negatywne (kohamujące) lub pozytywne (kostymulujące), odgrywają ważną rolę w regulacji i utrzymaniu homeostazy układu immunologicznego. Obecnie są szeroko badane w kontekście przywrócenia reaktywności immunologicznej na komórki rakowe, jednak wiadomo, że odgrywają również znaczącą rolę w wielu procesach biologicznych [6]. Receptory kohamujące wiążące się z ligandem mogą aktywnie dostarczać sygnałów hamujących wyciszających aktywację limfocytów T lub równoważących działanie dostarczanych im pozytywnych sygnałów stymulujących [231, 232]. Ponadto receptory kohamujące promują stan anergii na limfocytach T, co ostatecznie prowadzi do tolerancji immunologicznej [232]. Negatywne ICP zapobiega nadmiernej aktywacji efektorowych limfocytów T, która może ostatecznie skutkować autoimmunizacją. Obniżoną ekspresję ICP zaobserwowano w wielu chorobach autoimmunizacyjnych [231]. Cząsteczki kohamujące mogą pośrednio wpływać na limfocyty T poprzez promowanie właściwości supresyjnych za pośrednictwem limfocytów T regulatorowych oraz przez regulację zdolności komórek prezentujących antygen (APC) do pobudzania limfocytów [231, 233]. ICP odgrywają wyraźną rolę również w procesach związanych z produkcją oraz wydzielaniem cytokin, wliczając chemokiny [231, 234], ponadto są dużą grupą cząsteczek silnie sterujących procesami immunologicznymi. Warto zwrócić uwagę, że sprawne funkcjonowanie układu odpornościowego stanowi podstawę do prawidłowego rozwoju ciąży. Dlatego też zbadanie występowania tychże cząstek na powierzchni komórek immunokompetentnych może stanowić podstawę do lepszego zrozumienia matczyno-łożyskowej relacji immunologicznej. Problemy związane z rozwojem ciąży oraz procesy prowadzące do poronień dotyczą coraz większą liczbę par w naszym społeczeństwie. Opracowanie markerów diagnostycznych pozwalających wychwycić nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu odpornościowego w czasie ciąży mogłoby znacząco poprawić sytuację par dotkniętych problemem poronień, u których zostały wykluczone najbardziej powszechne przyczyny zaburzeń w rozwoju ciąży, a przyczyna tych wydarzeń dalej pozostaje nierozpoznana.

5.1.1 Ekspresja PD1

Nasze badania wykazały zmniejszoną ekspresję PD1 na limfocytach obwodowych w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi. W porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży zaobserwowano zmniejszoną ekspresję komórek pomocniczych T i komórek NKT. Natomiast porównując do kobiet w ciąży stwierdzamy obniżoną ekspresję na limfocytach T pomocniczych, limfocytach T cytotoksycznych, limfocytach T regulatorowych, komórkach NKT. Przeprowadzone przez nas badania dotyczące grupy kobiet z poronieniami nawykowymi i grupy kobiet niebędących w ciąży są podobne do tych uzyskanych przez Wang'a i współpracowników. Wang i wsp. w swoich badaniach dotyczących kobiet z nawracającymi poronieniami (RPL) wykazali, że u kobiety z RPL istnieją różnice w ilości limfocytów obwodowych, takich jak komórki Th1, Th17 i Treg, dodatkowo ekspresja PD1 była znacznie obniżona w komórkach Th1 i Th17, ale nie w komórkach T regulatorowych [9]. Wykazali również, że komórki Th17 miały znacząco obniżoną ekspresję PD-L1. Odkrycia te sugerują, że komórki układu odporności u kobiet z RPL mają skłonność do rozwijania immunologicznej odpowiedzi zapalnej oraz posiadają obniżone funkcje regulacji układu odpornościowego, w związku ze zmienioną ekspresją PD1/PD-L1. Dodatkowo, nieprawidłowa ekspresja PD1 i PD-L1 na komórkach Th1 i Th17 bezpośrednio wiąże się z zaburzeniem równowagi immunologicznej w układzie maczyno-łożonowym poprzez zaburzenia w procesie konwersji komórek T regulatorowych do komórek Th17 [9].

Meggyes i wsp. wykazali w badaniu cytometrią przepływową, że ekspresja PD1 przez obwodowe limfocyty cytotoksyczne i pomocnicze limfocyty T była obniżona u zdrowych kobiet ciężarnych w I trymestrze ciąży w porównaniu z kobietami nie ciężarnymi [11]. W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy takich zmian, może to być związane z niedostatecznie dużą liczebnością grupy kobiet niebędących w ciąży. Co więcej, Maggyes i inni zmierzili, że aktywność cytotoksyczna doczesnowych limfocytów T PD1⁺CD8⁺ w porównaniu z ich odpowiednikami peryferyjnymi jest zmniejszona [11]. W swojej najnowszej publikacji Maygges i wsp. zbadali ekspresję PD1 i PD-L1 podczas ciąży. Różnicę wykryto tylko w przypadku limfocytów T CD8⁺, co wskazuje na znaczenie działania hamującego na limfocyty T cytotoksyczne. Znaczący spadek ekspresji hamującego receptora PD1 w I i III trymestrze ciąży mogłyby być częścią wspomnianej przewagi Th1 w tych trymestrach [21]. Postawiono hipotezę, że przewaga odpowiedzi komórkowej typu Th1 może prowadzić do wzrostu ekspresji PD1 przez limfocyty T CD8⁺ do poziomu

obserwowanego w drugim trymestrze ciąży. Dla realizacji efektu hamującego, w którym pośredniczy PD1, kluczowa jest obecność cząsteczek ligandu PD-L1 i PD-L2. W swoich badaniach stwierdzili spadek ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek T CD4⁺ i CD8⁺ w III trymestrze ciąży, co może wpływać na szlak PD1 / PD-L1, skutkując przewagą odpowiedzi Th1 przed i podczas porodu [21]. Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. przyniosły wyniki podobne do wyników przeprowadzonych przez Maygges. Ujawnili również, że w czasie ciąży ekspresja PD1 na limfocytach obwodowych i komórkach NK ulega obniżeniu [235].

Wciąż niewiele jest publikacji związanych z obecnością receptora PD1 na komórkach odpornościowych oraz wpływu cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na maczyno-płodową tolerancję immunologiczną. Taglauer i wsp. zaobserwowali zwiększoną obecność limfocytów T PD1⁺CD3⁺ w pierwszym trymestrze ciąży w porównaniu z komórkami uzyskanymi z endometrium kobiet nieciążarnych stanowiących grupę kontrolną [162]. W innej pracy wykazano podwyższoną ekspresję PD1 przez endometrialną subpopulację limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺ w porównaniu z ich odpowiednikami obwodowymi w pierwszym trymestrze ciąży [236]. U pacjentek z nawracającymi poronieniami stwierdzono, że w komórkach doczesnowych ekspresja białka PD-L1 oraz mRNA dla PD-L1 była znacznie zmniejszona w porównaniu z komórkami doczesnowymi pozyskanymi od kobiet będących w pierwszym trymestrze ciąży. Nie wykazano różnicy w ekspresji PD1 na limfocytach doczesnowych między grupami [237].

Ekspresję PD-L1 zwiększa wiele czynników prozapalnych (LPS, GM-CSF, VEGF) oraz cytokiny (IFN- γ , TNF- α) [7]. Wiadomo już, że komórki trofoblastu zawierają na swojej powierzchni ligandy dla cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy, Veras i wsp. w swoich badaniach wykazują wysoką ekspresję PD-L1 przez syncytiotrofoblast we wczesnym okresie ciąży [24, 124]. Dane dotyczące ekspresji PD1 na limfocytach kobiet ciężarnych są słabo poznane. Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja PD1 na obwodowych limfocytach T kobiet ciężarnych jest podwyższona w porównaniu z kobietami nie będącymi w ciąży, a stężenie rozpuszczalnego PD-L1 wzrasta w czasie trwania ciąży [7, 124]. Interakcja PD-L1 i PD-L2 z PD1 skutkowałą zmniejszeniem produkcji cytokin Th1 przez limfocyty T CD4⁺, co może być korzystne dla prawidłowego rozwoju ciąży [7, 23].

Wszystkie wyżej wymienione badania sugerują, że zaburzenia ekspresji PD1 mogą przyczyniać się do poronienia, a PD1 odgrywa ważną rolę w utrzymaniu równowagi między

komórkami odpornościowymi mając na celu rozwój ciąży. Badania przeprowadzone w obecnym projekcie uwydatniają znacznie PD-1 w utrzymaniu prawidłowego rozwoju ciąży.

5.1.2 Ekspresja TIM-3

W naszych badaniach zaobserwowaliśmy zmniejszoną ekspresję TIM-3 w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi w porównaniu z grupą kobiet w ciąży. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Sun i wsp. [131]. Sun i wsp. podali, że u pacjentek z poronieniami nawykowymi obserwowano obniżoną ekspresję TIM-3 na obwodowych komórkach NK, sytuacja ta może być związana z obniżonym poziomem TGF- β w surowicy chorych lub brakiem odpowiedniej liczby ligandów dla TIM-3 [7, 131]. Badania dowiodły, że TIM-3 działa jako marker w pełni dojrzałych i funkcjonalnych komórek NK. Komórki te są zdolne do wytwarzania dużej ilości cytokin i są wysoce cytotoksyczne. Gleason i wsp. wykazali, że po stymulacji Gal-9 komórki NK TIM-3⁺ wytwarzają duże ilości IFN- γ [234]. Z drugiej strony Ndhlovu i wsp. pokazują, że cytotoksyczność, w której pośredniczą komórki NK, jest tłumiona po aktywacji TIM-3 przez Gal-9 [29, 238]. Meggyes i wps. wykazują inny profil cytokinowy między komórkami NK TIM-3⁺, a komórkami NK TIM-3⁻ we krwi obwodowej kobiet w ciąży w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży. Zarówno u kobiet niebędących w ciąży, jak i kobiet w ciąży, komórki NK TIM-3⁺ mają mniejszą aktywność cytotoksyczną w porównaniu z komórkami NK TIM-3⁻ [29, 129]. Miko i wsp. zaobserwowali zmniejszoną ekspresję TIM-3 na obwodowych komórkach NK, przy zwiększonej aktywności komórek NK. Takie zmiany obserwuje się u kobiet z wczesnym początkiem stanu przedrzucawkowego w porównaniu ze zdrowymi kobietami w ciąży. Wyniki uzyskane przez Miko są podobne do naszych ustaleń- ekspresja TIM-3 na komórkach NK jest zmniejszona w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi w porównaniu z kobietami w ciąży. Wyniki te sugerują, że TIM-3 może regulować funkcję komórek NK i odpowiadać za utrzymanie ciąży [29, 239]. Trofoblast na swojej powierzchni ekspresjuje w dużych ilościach Gal-9 i wydziela sTIM-3. Interakcja TIM-3/Gal-9 może wpływać na funkcjonowanie i różnicowanie komórek NK. Badania wykazały, że komórki dNK TIM-3⁺ wykazują fenotyp podobny do odpowiedzi typu Th2 z niższą cytotoksycznością w porównaniu z komórkami dNK TIM-3⁻ [135]. Dane te sugerują, że trofoblast poprzez TIM-3 indukuje transformację obwodowych komórek NK w doczesnowe komórki NK, które są bardziej tolerancyjne względem płodu [29].

TIM-3 jest ekspresowany na endometrialnych komórkach odpornościowych, takich jak: limfocyty T CD8⁺, CD4⁺ lub komórki NK. Doczesne komórki NK pozytywne pod względem TIM-3 są łączone z profilem cytokin Th2, co koreluje z udaną implantacją i zagnieżdżeniem [131, 132]. Badania wykazały, że komórki dNK stymulowane LPS i Gal-9 pełnią funkcję regulacyjną. Stymulacja powoduje zwiększone wydzielanie IL-4 i zmniejszone wydzielanie TNF- α . Co więcej, trofoblast jest zdolny do wydzielania dużych ilości rozpuszczalnego Gal-9, a endometrium wykazuje wysoką ekspresję Gal-9 [131, 132]. INF- γ wytwarzane przez limfocyty Th1 może regulować ekspresję Gal-9 i przyczyniać się do anergii i apoptozy tych komórek w pętli sprzężenia zwrotnego, a mechanizm ten zapobiega nadmiernej zapalnej odpowiedzi immunologicznej [29]. Hu i wsp. sugerują, że TIM-3 może być odpowiedzialna za utrzymanie fenotypu przeciwzapalnego komórek dNK i sprzyjać rozwijaniu tolerancji wobec płodu [29]. Potwierdzeniem tej koncepcji są ustalenia Li i wsp. oraz Tripathi i wsp., wykazali oni, że ilość komórek dNK TIM-3⁺ w próbkach pobranych od kobiet z poronieniami jest znacznie zmniejszona oraz komórki te wytwarzają więcej cytokin prozapalnych w porównaniu z komórkami pobranymi od kobiet, u których ciąża rozwijała się prawidłowo [132, 240]. Co więcej, komórki dNK wydzielają cytokiny i chemokiny, które są odpowiedzialne za przebudowę tętnicy spiralnej. Jako że szlak TIM-3 może prowadzić do zmian w profilu cytokin w komórkach dNK, jest prawdopodobne, iż TIM-3 może mieć bezpośredni lub pośredni wpływ na przebudowę tętnicy spiralnej i utrzymanie ciąży [29]. Cytotoksyczne limfocyty T TIM-3⁺ są uważane za komórki wyczerpane, które nie mają zdolności usuwania wirów i komórek nowotworowych. Ich większą liczbę obserwuje się u pacjentów z przewlekłymi infekcjami wirusowymi i nowotworami [29]. Na granicy między matką, a płodem limfocyty T CD8 nie występują jako komórki wyczerpane, ale wykazują wysoką aktywność proliferacyjną i mają wydzielają przeciwzapalny profil cytokin [129]. Również Wang i wsp. stwierdzili, że liczba cytotoksycznych limfocytów T TIM-3 dodatnich jest zmniejszona u pacjentek po poronieniu w porównaniu z kobietami w ciąży [241], co jest zgodne z naszymi obserwacjami. Co więcej, donoszą, że blokowanie TIM-3 in vitro powoduje zmniejszenie proliferacji limfocytów T CD8 i zmianę ich profilu cytokinowego poprzez zwiększenie wydzielania INF- γ i zdolności cytotoksycznej. Zmiany te powodują śmierć komórek trofoblastów. Dodatkowo Wang odkrył, że wydzielany czynnik trofoblastu może zwiększać ekspresję TIM-3 na limfocytach cytotoksycznych [241]. Dane te sugerują, że szlak TIM-3 odgrywa istotną rolę w regulowaniu funkcji limfocytów T cytotoksycznych w relacji maczyno-płodowej [29].

W naszych eksperymentach wykazaliśmy, że ekspresja TIM-3 jest zwiększona na komórkach NKT w grupie RSA i grupie kobiet ciężarnych w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży. Komórki NKT sterują zarówno funkcjonowaniem odporności adaptacyjnej i wrodzonej oraz posiadają TIM-3 na swojej powierzchni [29]. Youan i wsp. pokazują, że komórki NKT, chociaż stanowią niewielką część endometrialnych komórek odpornościowych, mogą przyczyniać się do utraty ciąży poprzez szybką i niekontrolowaną aktywację, którą może być sterowana przez TIM-3 [242].

W naszych badaniach nie wykazaliśmy żadnych różnic między grupami w ekspresji TIM-3 na limfocytach T pomocniczych. Jednak są ustalenia, które wskazują na ich znaczenie w relacjach układu odpornościowego pomiędzy matką, a płodem. Zhuang i wsp. zbadali ekspresję TIM-3 mRNA w komórkach PBMC i komórkach Th1 uzyskanych z krwi pobranej od pacjentek z niewyjaśnioną przyczyną poronień nawykowych (unexplained recurrent spontaneous abortion - URSA) i ciężarnych. Okazało się, że ekspresja TIM-3 w PBMC była istotnie wyższa w grupie URSA w porównaniu z kobietami w ciąży. Natomiast, w komórkach Th1 znacznie niższa u pacjentek z URSA [243]. Wyniki cytometrii przepływowowej uzyskane w tym doświadczeniu wskazują, że stosunek komórek $CD4^+TIM-3^+/CD4^+$ w PBMC był istotnie wyższy w grupie URSA, niż w grupie kontrolnej [243]. Wang i wsp. donoszą, że przy poronieniu samoistnym liczba limfocytów T $PD1^+TIM-3^+CD4^+$ jest zmniejszona, a produkcja cytokin typu Th2 jest obniżona. W naszych badaniach wykazaliśmy, że ekspresja PD1 w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi jest zmniejszona w porównaniu z grupą ciężarną i nieciężarną, co potwierdzają badania Wanga. Oddziaływanie PD1 z ligandami hamuje proliferację limfocytów T i produkcję cytokin, a wiązanie TIM-3 ligandami reguluje odpowiedzi limfocytów Th1 poprzez indukowanie apoptozy komórek Th1 [8, 28, 244]. Obserwacje te sugerują, że PD1 i TIM-3 mogą odgrywać rolę w tłumieniu odpowiedzi immunologicznej, w której pośredniczą komórki Th1 podczas ciąży [8]. Co więcej, grupa Wanga spekuluje, że zwiększona liczba limfocytów T $PD1^+TIM-3^+CD4^+$ może przyczynić się do utrzymania prawidłowej ciąży poprzez promowanie odpowiedzi typu Th2 pomiędzy matką, a płodem [8]. Badania przeprowadzone na myszach leczonych przeciwciałem anti-TIM-3 i przeciwciałem anti-PD1 wykazały, że zastosowane przeciwciała były wysoce skuteczne w zmniejszaniu proliferacji i produkcji cytokin typu Th2 przez resztkowe limfocyty T $PD1^+TIM-3^+CD4^+$ zarówno na komórkach pozyskanych od ludzi, jak i w eksperymentalnym mysim modelu ciąży [8]. Badania wskazują, że blokada TIM-3 i PD1 przyczynia się do zmniejszenia produkcji

cytokin. Sugeruje to, że cytokiny odgrywają ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej ciąży [8]. Wang i wsp. wykazali, że ilość limfocytów T PD1⁺TIM-3⁺CD4⁺ była podwyższona podczas prawidłowo przebiegającej ciąży w porównaniu z komórkami ekspresyjnymi osobno PD1 i TIM-3 u pacjentek z poronieniami [8].

W naszych badaniach przeprowadzonych na ludzkich limfocytach obwodowych zaobserwowaliśmy zmniejszoną ekspresję TIM-3 i PD1 na cytotoksycznych limfocytach T u pacjentek z nawracającymi poronieniami w porównaniu z grupą kobiet w ciąży. Nasze wyniki na komórkach pozyskanych od kobiet są podobne do tych wykonanych przez Xu na modelu myszy. Xu i wsp. wykazali na modelu mysim, że limfocyty T CD8⁺ wykazujące ekspresję Tim-3 lub PD1 były zmniejszone w doczesnowych limfocytach pozyskanych od samic myszy, u których dochodziło do poronień w porównaniu z ciężarnymi myszami. Pomimo zmniejszonej ilości komórek T cytotoksycznych, limfocyty T Tim-3⁺ PD1⁺ CD8⁺ wytwarzały mniejsze ilości cytokin przeciwzapalnych IL-4 i IL-10, a także większe ilości prozapalnej cytokiny IFN- γ , w stosunku do ciężarnych myszy [245]. Ponadto normalne ciężarne samice CBA / J stymulowane przeciwciałami blokującymi Tim-3 i / lub PD1 były bardziej podatne na obumarcie płodu. Xu i wsp. doszli do wniosku, że szlaki Tim-3 i PD1 mogą odgrywać kluczową rolę w regulacji funkcji limfocytów T cytotoksycznych i utrzymaniu prawidłowej ciąży [245]. Li i wsp. w swoich eksperymentach na mysich modelach poronienia nawykowego i zdrowej ciąży ustalili, że poziom ekspresji Tim-3 był wyższy w kojarzeniach skłonnych do aborcji, niż w grupie kontrolnej [246]. Obecnie coraz więcej badań wskazuje na związek TIM-3 z prawidłowym przebiegiem ciąży i jego znaczeniem podczas poronień.

5.1.3 Ekspresja LAG-3

Nasze badania wykazały, że w porównaniu do grupy kobiet niebędących w ciąży ekspresja LAG-3 była obniżona zarówno w grupie kobiet będących w ciąży oraz kobiet z poronieniami nawykowymi. Te zależności zaobserwowaliśmy na limfocytach T pomocniczych, cytotoksycznych oraz regulatorowych, dodatkowo na komórkach NK oraz NKT. Co więcej, zaobserwowaliśmy, że u kobiet z poronieniami nawykowymi obniżenie ekspresji LAG-3 było jeszcze większe niż u kobiet będących w ciąży. Dotyczyło to limfocytów T cytotoksycznych, regulatorowych oraz pomocniczych. Analizując literaturę związaną z tematyką ciąży oraz poronień nawykowych nie znalazłem żadnych artykułów dotyczących ekspresji LAG-3 na limfocytach lub komórkach NK oraz NKT. Dlatego też przeprowadzone przez nas badania wydają się być pierwszymi dotyczącymi tego zagadnienia, a dostarczone wyniki wskazują, że LAG-3 może stanowić ważny element regulacji odpowiedzi immunologicznej podczas ciąży.

Dostępne dane dotyczące ciąży lub jej utraty i ekspresji LAG-3 na komórkach odpornościowych związane są z jego ekspresją na monocytach. Zheng i wsp. zbadali ekspresję LAG-3 na monocytach. Zaobserwowali, że w grupie pacjentek z RSA nie było znaczącej różnicy w liczbie monocytów w porównaniu z grupą kobiet niebędących w ciąży. Natomiast, liczba komórek $CD14^+CD49b^+$, $CD14^+LAG-3^+$ i $CD14^+CD49b^+LAG-3^+$ w grupie pacjentek z poronieniami nawykowymi była niższa względem grupy kontrolnej. U pacjentów z RSA, poziomy ekspresji CD49b i LAG-3 na monocytach $CD14^+$ oraz stężenie TGF- β w osoczu były obniżone w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży [247]. Konieczne jest wyjaśnienie, w jaki sposób zmniejszona ekspresja LAG-3 przyczynia się do prawidłowego rozwoju ciąży oraz jaką rolę w poronieniach odgrywa jej nadmierne obniżenie.

5.1.4 Ekspresja TIGIT

Istnieje tylko kilka publikacji związanych z ekspresją TIGIT na limfocytach obwodowych u kobiet w ciąży lub kobiet z RSA. Wang i wsp. udowodnili, że wraz z rozwojem ciąży poziom ekspresji TIGIT na komórkach NK stopniowo wzrasta. Co ciekawe, ekspresja cząsteczek TIGIT i PD1 na limfocytach T wykazywała tendencję spadkową w czasie ciąży. Trendy ekspresji TIGIT w czasie ciąży różnią się między komórkami NK i limfocytami T, ujawniając, że TIGIT może uczestniczyć w utrzymaniu tolerancji matki i płodu w różny sposób między tymi typami komórek [235]. W miarę postępu ciąży poziom ekspresji TIGIT na komórkach NK stopniowo wzrastał. W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy różnic między grupami dotyczących ekspresji TIGIT na komórkach NK. Co więcej, Wang i inni wykazali, że poziomy wszystkich funkcjonalnych cząsteczek stopniowo spadały. Przeprowadzone przez Wanga wcześniejsze badania wykazały, że komórki NK TIGIT⁺ wpływają na obniżenie wydzielania granzymu B, czy IFN- γ oraz na ekspresję CD107a, w porównaniu z komórkami NK TIGIT⁻ [235]. Przeprowadzone przez nich badania wskazują, że ekspresja TIGIT przez komórki NK może osłabiać cytotoksyczność komórek NK i odgrywać ważną rolę w utrzymaniu tolerancji matki i płodu przez cały okres ciąży [235]. Na limfocytach T ekspresja TIGIT oraz PD1 osiągała szczyt w pierwszym trymestrze ciąży wskazując, że aktywacja limfocytów T była hamowana przez oba sygnały na początku ciąży [235]. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy zmniejszoną ekspresję cząsteczki TIGIT w populacji limfocytów T regulatorowych u kobiet w ciąży w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży. W porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży u pacjentek z poronieniami nawykowymi obserwowaliśmy zmniejszoną ekspresję TIGIT na komórkach T regulatorowych i komórkach NKT. Liang i wsp. zbadali ekspresję immunologicznych punktów kontrolnych, takich jak: TIGIT, PD1, ICOS i BTLA na komórkach T cytotoksycznych. Stwierdzili jedynie różnice w ekspresji BTLA na obwodowych limfocytach T cytotoksycznych między kobietami w ciąży i kobietami z nawracającymi poronieniami samoistnymi [248]. Przeprowadzone przez nich badania wskazują, że limfocyty T CD8⁺ nie są głównym czynnikiem prowadzącym do patogenezy nawracających poronień [248]. Obserwacje Liang dotyczące limfocytów T CD8⁺ i ich ekspresji TIGIT są zgodne z naszymi badaniami.

5.1.5 Ekspresja VISTA

VISTA jest niedawno odkrytym immunologicznym punktem kontrolnym, a jego rola i funkcja wciąż pozostają nie w pełni poznane. Nie znalazłem badań związanych z ekspresją VISTA na limfocytach zarówno u kobiet w ciąży, jak i kobiet z nawracającymi poronieniami. Nasze wyniki pokazują, że ekspresja VISTA jest obniżona na limfocytach cytotoksycznych oraz pomocniczych u pacjentek z poronieniami nawykowymi w porównaniu z kobietami w ciąży. Ponadto stwierdzam, że ekspresja VISTA na komórkach NK u kobiet w ciąży jest zmniejszona w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży. Niektóre badania potwierdzają przypuszczenie, że VISTA jest immunologicznym receptorem punktu kontrolnego oznaczanym na naciekających guz limfocytach T (TIL) i komórkach szpikowych, co prowadzi do zahamowania aktywacji, proliferacji i produkcji cytokin oraz służy jako immunologiczny punkt kontrolny [77, 78]. Jednak inne badania wykazały, że VISTA ulega nadekspresji w tkankach guza i działa jako cząsteczka kostymulująca [78]. VISTA może działać zarówno jako ligand, jak i receptor do przewodzenia sygnałów kohamujących w celu stłumienia aktywacji, proliferacji i produkcji cytokin przez limfocyty T [249]. Inne badania wykazały, że VISTA oddziałuje z kompleksem V-set i domeną Ig 3 (VSIG3). Wysoka ekspresja VISTA w tkance łożyska powoduje silną indukcję tolerancji immunologicznej wobec płodu dodatkowe VISTA bierze udział w regulacji różnicowania komórek Th2. Służy jako silny supresor aktywacji limfocytów T i zwiększa ekspresję Foxp3, aby zapobiec rozwojowi GVHD w modelu myszy [250, 251]. Opracowanie nowych terapii związanych z VISTA może poprawić skuteczność immunoterapii.

Ponieważ normalna ciąża sprzyja względnie immunosupresyjnemu środowisku tolerującemu antygeny płodu, VISTA w komórkach odpornościowych może regulować reakcje układu odporność matki na antygeny płodu. Nasze odkrycia, że ekspresja VISTA na limfocytach pacjentek z poronieniami nawykowymi jest zmniejszona w porównaniu z pacjentkami w ciąży, może potwierdzać teorię, że VISTA może odgrywać rolę w relacji immunologicznej między matką a płodem. Zmniejszona ekspresja VISTA na limfocytach CD4 i CD8 może być przyczyną, dla której komórki nie są wystarczająco tolerancyjne i immunosupresyjne względem płodu. Terapia immunologicznymi punktami kontrolnymi guzów ujawniła potencjalny związek między VISTA i PD-L1 [168]. Obecnie badania związane z VISTA koncentrują się bardziej na potencjalnej roli VISTA w odporności przeciwnowotworowej. Badania przeprowadzone na modelach myszy

pokazują, że utrata VISTA wzmacnia odpowiedź guza i przyspiesza autoimmunizację [73]. Myszy VISTA - / - rozwijają kłębuszkowe zapalenie nerek i objawy podobne do toczenia, nasilają zapalenie alergiczne i astmę, co więcej myszy te były bardziej podatne na konkanawalinę A (ConA) [252-254]. Chen i wsp. wykazali, że VISTA może mieć kluczowe znaczenie w zapobieganiu indukcji GVHD [75]. Cadena i wsp. oraz Flies i wsp. udowodnili, że limfocyty T VISTA - / - CD4⁺ wykazują zwiększoną odpowiedź efektorową, a ekspresja VISTA może hamować różnicowanie komórek T [73, 254, 255]. Nadal potrzebne są dalsze badania związane z VISTA, aby lepiej zrozumieć jego rolę w układzie immunologicznym i ustalić, jaką funkcję pełni w czasie ciąży i może przyczynić się do utraty płodu.

5.2 Porównanie pomiędzy badanymi grupami otrzymanych wyników stężeń rozpuszczalnych cząstek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów w surowicy pobranej od pacjentek.

5.2.1 Rozpuszczalne sCTLA-4, sCD28, sCD80 and sCD86

W ostatnich latach, oprócz receptorów i ligandów immunologicznych punktów kontrolnych na błonie komórkowej komórek układu odpornościowego, analizie poddano również szereg rozpuszczalnych form cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy występujących w surowicy. Rozpuszczalne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy odgrywają istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Ich potencjał jest zauważany w prognozowaniu wystąpienia nowotworu oraz śledzenia skuteczności terapii, są uważane za potencjalne biomarkery oraz cele terapeutyczne [256]. Podwyższone stężenie sCTLA-4 opisali Erfani i wsp. u chorych na raka piersi w porównaniu do osób zdrowych [85]. Omura stwierdził, że sCTLA4 i SPD-L1 mogą mieć wpływ prognostyczny u pacjentów z rakiem jelita grubego [257]. Misra w swoich badaniach łączy zmniejszone wydzielanie sCTLA-4 ze zwiększonym ryzykiem idiopatycznych nawracających poronień [258]. Badania wykonane przez Wang i wsp. wykazały, podwyższone stężenie sCD28 i obniżone sCTLA-4 w osoczu u pacjentów z zapaleniem nerwu wzrokowego i stwardnieniem rozsianym [259]. Inne badania pokazują, że sLAG-3 i sCD28 okazały się ujemnie skorelowane z aktywnością cytolityczną limfocytów T w raku nerki [260]. Cao i wsp. ustalili, że sCD28 jest podwyższone u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HBV w porównaniu z osobami zdrowymi, ponadto stężenie sCTLA-4 było wyższe u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HBV względem osób zdrowych [261]. Ip i wsp. stwierdzili, że stężenia sCTLA-4, sCD28, sCD86 i sCD80 w osoczu mogą odzwierciedlać ciężkość ostrej astmy. Cząsteczki te jako markery mogą być przydatne do oceny zaostrzenia astmy u dzieci, ale konieczne są dalsze badania w tym zakresie [262].

W naszych badaniach stwierdzamy zmniejszenie stężenia sCD80 i sCD86 w grupie kobiet w ciąży w porównaniu z pacjentkami z RSA. W zakresie ciąży i powikłań ciąży nasze badania jako pierwsze ujawniają różnice w stężeniu sCD80 i sCD86. W pracach naukowych można znaleźć zastosowanie sCD80 i/lub sCD80 jako markerów w reumatoidalnym zapaleniu stawów lub nowotworach hematologicznych [105, 263]. Wiedza związana z sCTLA-4, stężeniem sCD28 oraz

ciążą lub utratą ciąży jest słabo dostępna. W naszych badaniach nie stwierdziliśmy różnic pomiędzy grupami w stężeniu sCTLA-4 i sCD28 w surowicy osób badanych.

5.2.2 Rozpuszczalne sTIM-3, sGal-9

Badania przeprowadzone przez Rena i Clayтона dowiodły, że sTIM-3 może przyczyniać się do zapewnienia homeostazy immunologicznej. Clayton w swoich badaniach wykazał, że TIM-3 może zostać odcięty z limfocytów CD8⁺ i monocytów pacjentów z HIV, a stężenie sTIM-3 wzrasta wraz z rozwojem choroby [125]. Ren oraz wsp. w swoich badaniach wykazali, że stężenie sTIM-3 w osoczu pacjentów z sepsą i ciężką sepsą było obniżone, ale podwyższone u pacjentów we wstrząsie septycznym. Ren spekuluje, że sTIM-3 jest zaangażowany w patofizjologiczny proces sepsy i odgrywa rolę hamującą w inny sposób niż TIM-3, który ulega ekspresji na błonie komórkowej. Aby potwierdzić tę hamującą rolę, przeanalizowano korelacje sTim-3 z IL-6, IL-10, IL-12 i TNF- α . IL-12, TNF- α i IL-6, które odgrywają istotną rolę w zwalczaniu infekcji, a IL-10 jest jedną z ważniejszych cytokin przeciwzapalnych w sepsie. Badania wykazały ujemną korelację sTIM-3 z IL-12 i TNF- α . Wyniki te są zgodne z wynikami poprzedniego badania, w którym doniesiono, że zmniejszone wydzielanie sTim-3 przez monocyty indukowane LPS znacząco zwiększają wydzielanie IL-12 i TNF- α in vitro [264].

Powyższe badania sugerują, że sTIM-3 może odgrywać ważną rolę podczas ciąży, gdzie odpowiednie stężenia cytokin warunkują prawidłowy rozwój płodu. U kobiet, u których ciąża rozwijała się prawidłowo Meggyes i wsp. odkryli, że rozpuszczalna Gal-9 wzrastała w każdym trymestrze, podczas gdy ekspresja TIM-3 na matczynych limfocytach T cytotoksycznych i komórkach NK nie zmieniała się [129]. W naszych badaniach, podobnie jak Meggyes, wykazaliśmy, że stężenie Gal-9 w surowicy kobiet w ciąży jest zwiększone w porównaniu do kobiet niebędących w ciąży. Enninga i wsp. w swoich badaniach dodali dodatkowe punkty czasowe, aby wykazać, że poziom Gal-9 we krwi matki pozostaje podwyższony przez cały okres ciąży. Meggyes i Enninga ujawniają, że zarówno stężenie rozpuszczalnej Gal-9, jak i sPD-L1 wzrasta w czasie ciąży [124]. W pobranych próbkach surowicy nie stwierdziliśmy wzrostu stężenia sPD-L1 podczas ciąży. Wiadome jest, że łożysko silnie ekspresjuje Gal-9 i PD-L1, a wzrost ten może być związany ze wzrostem łożyska w czasie ciąży. Łožysko nie jest jedynym źródłem tych białek. Podczas procesu dojrzewania komórki dendrytyczne uwalniają coraz większe ilości sPD-L1, co może inicjować apoptozę limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ jako mechanizm homeostazy

immunologicznej [265]. Stwierdzono, że limfocyty CD4⁺ wydzielają Gal-9 po aktywacji TCR, ale mechanizm ten pozostaje nadal niejasny [266]. Dodatkowo Wu i wsp. u pacjentek z poronieniami nawykowymi zaobserwowali, że w porównaniu do kobiet u których ciąża rozwijała się prawidłowo w przebadanych surowicach stężenie rozpuszczalnego TIM-3 (sTIM-3) było podwyższone, a sGal-9 obniżone [130]. Sytuacja ta może prowadzić do zwiększonego konkurencyjnego wiązania Gal-9 i prowadzić do niezdolności wysyłania sygnałów hamujących kontrolujących stan zapalny przez komórki układu oporności [130]. W naszych badaniach przeprowadzonych na podobnej grupie jak u Wu, tylko w grupie kobiet będących w ciąży zaobserwowaliśmy wyższe stężenie sTIM-3 w porównaniu z grupą pacjentek z poronieniami nawykowymi. Nasze odkrycia związane z sGal-9 pokrywają się z odkryciami uzyskanymi przez Wu. W naszych badaniach stwierdziliśmy, że stężenie sGal-9 było obniżone w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi w porównaniu z grupą kobiet w ciąży.

Różnice w stężeniach rozpuszczalnych ligandów dla ICP były brane pod uwagę jako potencjalna przyczyna samoistnych poronień lub nawracających poronień. Badania Li wykazały, że ekspresja mRNA PD-L1 jest znacznie zmniejszona w tkankach doczesnej w przypadku nawracających poronień w porównaniu z grupą kontrolą [237]. Podobnie Wu i wsp. stwierdzili, że ekspresja Gal-9 jest wyższa w grupie kobiet ciężarnych oraz kobiet z RSA względem kobiet niebędących w ciąży. Dodatkowo, kobiety ze spontanicznymi nawracającymi poronieniami, w porównaniu z kobietami w ciąży, miały niższy poziom Gal-9 we krwi obwodowej [130]. Wu w swoim eksperymencie oznaczył również stężenie sTIM-3. W grupie badanej kobiet z poronieniami zauważył, że stężenie TIM-3 w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży było wyższe zarówno u kobiet ciężarnych, jak i kobiet z poronieniami nawykowymi. Co więcej, stężenie sTIM-3 w surowicy z grupy kobiet z poronieniami nawykowymi było wyższe niż w grupie kobiet ciężarnych [130]. Zwiększone stężenie Gal-9 obserwowano u pacjentek z nawracającymi spontanicznymi poronieniami, co wskazuje, że sTIM-3 blokuje wiązanie TIM-3 z Gal-9 i hamuje szlak sygnałowy TIM-3/Gal-9. Osłabia to działanie hamujące na komórki Th1 wywołane połączeniem TIM-3/Gal-9, w konsekwencji komórki Th1 były w stanie normalnej proliferacji i przeżycia [130]. Przeprowadzone przez Wu badania pokazują, że ekspresja TIM-3 wzrasta w prawidłowej ciąży, a po połączeniu z ligandem Gal-9 uwalniany jest sygnał hamujący, który hamuje komórki Th1, powodując, że odpowiedź immunologiczna limfocytów Th1/Th2 matki względem płodu przesuwa się w kierunku Th2, aby zapewnić prawidłowy rozwój ciąży [10]. Wu

i wsp. wykazali, że sTIM-3 może wiązać ligand kompetycyjnie z błonowym TIM-3, stąd TIM-3 nie może normalnie łączyć się z Gal-9, w wyniku czego sygnały hamujące do komórek Th1 są blokowane i prowadzą w ostatecznym rozrachunku do aborcji [130]. Co więcej, połączenie sTIM-3 z Gal-9 kompetycyjnie zmniejsza hamujący wpływ szlaku sygnałowego TIM-3/Gal-9 na komórki Th1, powodując nadmierne wydzielanie IFN- γ przez komórki typu Th1. W rezultacie różnicowanie komórek typu Th2 zostaje zakłócone, a sekrecja IL-4 zmniejsza się, powodując zakłócenie równowagi komórek Th1/Th2, a tym samym zaburzając implantację zarodka i rozwój zarodka oraz prowadząc do poronienia [130].

5.2.3 Rozpuszczalne sPD1, sPD-L1, sPD-L2

Oznaczanie rozpuszczalnych form PD1, PL-L1 i PD-L2 we krwi pacjentów jest coraz częściej wykorzystywane w diagnostyce i leczeniu oraz jako marker występowania lub/i progresji choroby. Hadley i wsp. wykazali, że poziomy sPD1 koreluje z aktywnym stanem chorobowym autoimmunologicznego zapalenia wątroby i nieswoistego zapalenia jelit u dzieci [267]. Zhou i wsp. w swoich badaniach wykazali, że poziom sPD1 w surowicy koreluje z różnymi parametrami klinicznymi odzwierciedlającymi stan zapalny i replikację wirusa u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby wywołanym wirusem zapalenia wątroby typu B. Ustalili, że sPD1 może służyć jako nowy wskaźnik do oceny zwłóknienia wątroby i może dodatkowo pomóc w podjęciu decyzji o leczeniu przeciwwirusowym [268]. Chang przeprowadził badania dotyczące raka wątrobowokomórkowego i stwierdził, że sPD1 i sPD-L1 mogą być markerami prognostycznymi w tej chorobie [269]. Gu i wsp. stwierdzili, że stężenia sPD1 były istotnie, a PD-L1 stosunkowo wyższe u kobiet w stanie przedrzucawkowym niż u kobiet ciężarnych z prawidłowym ciśnieniem [117]. He i wsp. swoich badaniach wykazali, że sPD1 i sPD-L1 w osoczu były wyższe u chorych na NSCLC niż u zdrowych osób z grupy kontrolnej, a stosunek sPD-L1 i sPD-L1/sPD1 w osoczu niezależnie i dodatnio korelował z całkowitym przeżyciem chorych na NSCLC [270]. Pawłowska i wsp. odkryli, że wyższy poziom limfocytów T CD4⁺PD1⁺ w krążeniu i wyższy poziom sPD1 w osoczu koreluje z niską przeżywalnością pacjentek z rakiem jajnika [271]. Li i wsp. sprawdzili, że stężenie sPD1 w surowicy było istotnie podwyższone u chorych na potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC) przed chemioterapią neoadjuwantową (NAC), oraz że występuje tendencja wzrostowa dla sPD-L1 [272]. Stężenia sPD1 i sPD-L1 w surowicy przed NAC u pacjentów z TNBC wzrastały wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu. Pacjenci, którzy doświadczyli całkowitej lub

częściowej remisji po NAC mieli znacznie obniżone poziomy sPD1 i sPD-L1 w surowicy w porównaniu z pacjentami ze słabą odpowiedzią na NAC [272]. Li i wsp. doszli do wniosku, że poziomy sPD1 i sPD-L1 w surowicy mogą być wykorzystane jako nieinwazyjne biomarkery do oceny złośliwości TNBC przed NAC oraz do przewidywania odpowiedzi na NAC u pacjentów z TNBC [272]. Du i wsp. w toczeniu rumieniowatym układowym wykazali, że stężenie sPD1 i sPD-L1 w surowicy było znacząco wyższe u pacjentów z SLE niż w grupie kontrolnej [273]. Hirahara i wsp. zademonstrowali związek sPD1 i sPD-L2 z SLE i sugerują ich przydatność jako biomarkerów aktywności choroby dla SLE [274]. Santoso i wsp. stwierdzili, że podwyższony poziom sPD-L1 w surowicy i płynie otrzewnowym może być cechą charakterystyczną regulacji immunologicznej w endometriozie, co można wykorzystać jako potencjalny nieinwazyjny biomarker endometriozy [275]. W moich badaniach nie znalazłem żadnych różnic w stężeniach sPD1, sPD-L1 i sPD-L2 między grupami. Są jednak publikacje, które przedstawiają inne dane i wnioski niż nasze. Gu i wsp. wnioskują, że w stanie przedrzucawkowym występuje nieprawidłowa sygnalizacja sPD1/sPD-L1. Zwiększone matczyne poziomy sPD1 i sPD-L1 wiązały się z różnicą płci płodu lub odmiennością tolerancji immunologicznej podczas ciąży u kobiet ze stanem przedrzucawkowym [117]. Okuyama odkrył, że poziom sPD-L1 był podwyższony u kobiet w ciąży w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży [123].

5.2.4 Rozpuszczalne sHVEM

Badania związane z sHVEM lub mHVEM w ciąży lub chorobach związanych z ciążą są ograniczone. Pewne informacje można uzyskać dodatkowo z badań białka LIGHT w tych obszarach. Wand i wsp. badali związek immunologicznego punktu kontrolnego LIGHT z ciążą lub zaburzeniami ciąży. W swoich badaniach na pacjentach ze stanem przedrzucawkowym mierzą wpływ przeciwciała anti-HVEM na nieciążarne myszy, którym wstrzyknięto LIGHT. Podobnie jak w przypadku ciężarnych myszy, blokowanie HVEM przez neutralizację przeciwciałem znacząco zmniejszyło nadciśnienie indukowane przez LIGHT u myszy niebędących w ciąży [276]. Wykazali, że podwyższony poziom LIGHT, w połączeniu ze zwiększoną aktywacją receptora HVEM, sprzyja uszkodzeniu łożyska i wyzwala uwalnianie silnych czynników wazoaktywnych (sFlt-1 i ET-1) zarówno w ciąży ludzkiej, jak i mysiej, a także sugerują, że sygnalizacja LIGHT jest prawdopodobnie ważnym mediatorem patogenezy związanej ze stanem przedrzucawkowym [276]. Gill i wsp. ujawniają, że HVEM został zidentyfikowany na syncytiotrofoblastach i komórkach nabłonka owodni, ale nie na kosmkach mezenchymalnych i cytotrofoblastach [277]. Nasze badania są pierwszymi, które bezpośrednio mierzą poziom sHVEM w surowicy w grupach kobiet ciężarnych, nieciążarnych i kobiet z poronieniami nawykowymi. Wykazaliśmy, że poziom sHVEM jest obniżony w ciąży i grupie kobiet z poronieniami w porównaniu z pacjentami niebędącymi w ciąży.

sHVEM były częściej wykrywane i badane w innych chorobach. Badania przeprowadzone na pacjentach z rakiem żołądka pokazują, że rozpuszczalny HVEM może przyczynić się do rozwoju lub progresji choroby. Poziom sHVEM był podwyższony u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym. Takie paradoksalne zmiany błonowej i rozpuszczalnej formy HVEM są prawdopodobnie związane z patogenezą chorób nowotworowych [152]. Co więcej, poziomy sHVEM były podwyższone w surowicy pacjentów z astmą alergiczną, atopowym zapaleniem skóry i reumatoidalnym zapaleniem stawów [156]. Dalsze badania są niezbędne w celu dalszego zbadania wykorzystania mHVEM i sHVEM we krwi obwodowej jako markerów diagnostycznych i do celów terapeutycznych.

5.2.5 Rozpuszczalne sLAG-3, sVISTA

Sierro i wsp. w swoich eksperymentach stosowali rekombinowaną rozpuszczalną dimeryczną formę LAG-3 (sLAG-3-Ig, IMP321), która wykazywała właściwości adiuwantowe i wzmacniały immunogenność szczepionek przeciwnowotworowych. Ostatnie badania kliniczne przyniosły zachęcające wyniki zwłaszcza, gdy ludzka dimeryczna rozpuszczalna forma LAG-3 (hLAG-3-Ig) była stosowana w połączeniu z chemioterapią [278]. Cui i wsp. mierzyli poziomy sLAG-3 w surowicy u pacjentów z chorobą Parkinsona. Odkryli, że stężenie tego białka było znacznie wyższe u pacjentów z chorobą Parkinsona niż u pacjentów z drżeniem pierwotnym oraz w grupie kontrolnej dobranej pod względem wieku i płci. Doszli do wniosku, że sLAG-3 może być kandydatem jako nowy biomarker choroby Parkinsona [279]. Pacjenci z zaawansowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NSCLC) mieli niższą ekspresję sLAG-3. He. i wsp. stwierdzili, że może to być związane ze słabą odpowiedzią immunologiczną raka i wnioskują, że zwiększenie poziomu sLAG-3 może być obiecującym leczeniem u pacjentów z zaawansowanym NSCLC [280]. Li i wsp. pokazują, że sLAG-3 pozytywnie reguluje funkcjonowanie limfocytów T CD8⁺ zwiększając wydzielanie IL-12 i IFN- γ oraz działa jako marker prognostyczny raka żołądka, który może być potencjalnym celem w leczeniu tych chorób [281]. Wyniki Triebel i wsp. wskazują, że sLAG-3 może być cennym markerem rokowniczym w niektórych podgrupach raków piersi [282]. W naszych badaniach stwierdzamy, że pacjentki w ciąży mają niższe stężenie sLAG-3 w surowicy względem kobiet niebędących w ciąży. Dodatkowo kobiety, które miały poronienia, mają podwyższone stężenie sLAG-3 w porównaniu do kobiet w ciąży.

Rozpuszczalna forma VISTA (B7-H1) może być nowym użytecznym markerem diagnostycznym. Wu i wsp. ustalili, że rozpuszczalna w surowicy VISTA może być nowym potencjalnym biomarkerem diagnostycznym dla raka trzustki [283]. W naszych badaniach ustaliliśmy, że kobiety z nawracającymi poronieniami, w porównaniu do kobiet w ciąży, mają obniżony poziom sVISTA w surowicy.

5.2.6 Rozpuszczalne sCD112, sCD155

Iguchi-Manaka i wsp. w swoich badaniach zmierzili stężenie sCD155 w surowicy w różnych chorobach nowotworowych. Odkryli, że w porównaniu do zdrowych osób stężenie sCD155 było podwyższone w surowicy uzyskanej od pacjentów z rakiem płuca, przełyku, żołądka, jelita grubego, dróg żółciowych, trzustki, piersi, jajnika, trzonu macicy i szyjki macicy. Doszli do wniosku, że może być użytecznym biomarkerem w diagnostyce chorób nowotworowych [145]. Iguchi-Manaka kontynuował swoje badania i ustalił, że poziomy sCD155 w surowicy pacjentów z rakiem piersi były dodatnio skorelowane z wiekiem pacjentki, stadium choroby i wielkością guza inwazyjnego. Ponadto stężenie sCD155 było wyższe u pacjentów z nowotworami bez receptora estrogenowego (ER) niż u pacjentów z guzami ER-dodatnimi i wyższe u pacjentów z nowotworami Ki-67-high niż u osób z nowotworami Ki-67-low [284] .

Nasze badania związane z ciążą i poronieniami pokazują, że kobiety w ciąży mają wyższe stężenie sCD155 w porównaniu z kobietami niebędącymi w ciąży i kobietami z poronieniami nawykowymi. Kobiety z poronieniami nawykowymi mają niższe stężenie CD155 w porównaniu do kobiet ciężarnych. Nie ma dostępnych danych na temat użycia sCD112 jako markera w przypadku chorób. W naszych badaniach oceniliśmy drugi znany ligand dla TIGIT rozpuszczalną formę Nektyny-2 (CD112). Stwierdziliśmy, że stężenie sNectin-2 jest obniżone u pacjentek z poronieniami w porównaniu z kobietami w ciąży. W literaturze nie ma dostępnych danych dotyczących wykorzystania tego rozpuszczalnego ligandu jako markera w jakimkolwiek przypadku chorób. Ogólnie funkcja tych ligandów jest słabo poznana i zbadana.

5.3 Omówienie danych dotyczących wpływu hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy.

5.3.1 Wpływ progesteronu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy.

Progesteron jest jednym z podstawowych leków, który znajduje szerokie zastosowanie w ginekologii. Stosowany jest u kobiet niebędących w ciąży w suplementacji II fazy cyklu miesięczkowego, w okresie klimakterium oraz podczas leczenia rozrostów endometrium, jak i raka endometrium [285, 286]. U kobiet z cyklami anowulacyjnymi zaleca się stosowanie progesteronu w formie dopochwowej (25 - 50 mg, dwa razy dziennie) lub doustnej (50 mg, trzy, cztery razy dziennie) przez 10 - 12 dni. Progesteron i jego pochodne (octan medroksyprogesteronu) znajdują od dawna zastosowanie w leczeniu rozrostów endometrium bez atypii, zwłaszcza u kobiet przed menopauzą. Leczenie progesteronem powoduje regresję zmian hiperplastycznych u ponad 90% chorych, zarówno miesiączkujących, jak i w okresie klimakterium [285, 287]. Progesteron jest wykorzystywany ramach procedur zapłodnienia pozaustrojowego jako leczenie wspomagające. Wykorzystywane są różne drogi podawania progesteronu: domięśniowa, dopochwowa, doustna, doodbytnicza i przezskórna. Obecnie w większości ośrodków stosowane jest aplikacja dopochwowa [286]. Metaanalizy pokazały porównywalny odsetek ciąż, żywych urodzeń i poronień bez względu na zastosowaną formę podawania progesteronu [288]. Jedynie przy terapii kombinowanej podawania doustnego i dopochwowego progesteronu uzyskano wyższy odsetek ciąż klinicznych i obserwowano niższy odsetek poronień [285, 289]. Progesteron wytwarzany przez ciało żółte jest podstawowym hormonem niezbędnym do zaistnienia i podtrzymania ciąży. Odpowiada za przygotowanie endometrium do implantacji, jak również modyfikację odpowiedzi immunologicznej matki zapobiegającej odrzuceniu allogenicznego płodu. Wpływa na bezpośrednie hamowanie „proporonnej” odpowiedzi komórkowej typu Th1 poprzez indukcję syntezy PIBF (progesterone -induced blocking factor) we krwi krążącej oraz na poziomie trofoblastu, supresję wydzielania cytokin „antyciążowych”, a także na drodze blokowania aktywności i proliferacji cytotoksycznych limfocytów T oraz komórek NK [285].

Dzięki wspólnemu działaniu układu neuroendokrynnego i odpornościowego dochodzi do wytworzenia optymalnego środowiska immunologicznego dla rozwijającego się płodu. W czasie ciąży równowaga cytokin w układzie peryferyjnym krwi jest przesunięta w kierunku odpowiedzi

Th2 [172]. Niektóre fazy ciąży, na przykład na przykład implantacji lub porodu towarzyszy stan łagodnego zapalenia. Stosunek Th1/Th2 jest niższy we krwi obwodowej zdrowych kobiet w ciąży niż u osób niebędących w ciąży lub kobiet z ciążami patologicznymi [290]. Podawanie cytokin Th1 ciężarnym myszom powoduje utratę ciąży. Zarówno progesteron, jak i PIBF zmieniają równowagę cytokin na korzyść odpowiedzi Th2 [172]. W macicy, progesteron indukuje różnicowanie naiwnych limfocytów T po rozpoznaniu antygeny do limfocytów Th2 pamięci [291]. Limfocyty kobiet w ciąży reagują na leczenie progesteronem zmniejszoną produkcją cytokin Th1 i zwiększoną produkcją cytokin Th2 [292].

Limfocyty u kobiet z nawracającymi poronieniami lub przedwczesnym porodem mają tendencję do wytwarzania podwyższonego poziomu cytokiny Th2 w obecności PIBF [293]. Dane te wskazują, że progesteron i PIBF zmieniają równowagi cytokin i przyczyniają się do zmniejszenia odpowiedzi komórkowych podczas ciąży [172].

W drugiej połowie ciąży progesteron odpowiada za relaksację powiększającej się macicy i hamowanie jej skurczów, między innymi poprzez zmniejszanie wrażliwości na działanie oksytocyny oraz obniżenie produkcji prostaglandyn. Badania z ostatnich lat wskazują również na bardzo ważną rolę progesteronu w utrzymywaniu prawidłowej struktury i funkcji szyjki macicy w ciąży [294]. Podawanie antagonistów receptora progesteronowego powoduje przedwczesne dojrzewanie i rozwieranie szyjki macicy.

Podejmowane są próby wykorzystania progesteronu w leczeniu poronień. Do poronień samoistnych dochodzi zarówno w wyniku nieprawidłowości chromosomalnych zarodka, jak również przyczyn matczynych związanych najczęściej z zaburzeniami procesu implantacji. Do nieprawidłowego zagnieżdżenia przyczynia się między innymi nieodpowiednie przygotowanie endometrium spowodowane niedomogą lutealną, jak również zaburzenia immunologiczne, metaboliczne (hyperinsulinemia) oraz dotyczące układu krzepnięcia (trombofilie) [285, 295]. Wydaje się, iż przyczyny matczyne mają szczególne znaczenie w występowaniu poronień nawracających, gdzie rzadziej stwierdza się nieprawidłowości chromosomalne u płodów. Niewydolność ciała żółtego i niedomoga lutealna może dotyczyć aż 23- 50% kobiet z poronieniami nawracającymi. Niestety, w chwili obecnej brak jednoznacznych dowodów wskazujących na skuteczność podawania gestagenów w profilaktyce poronień. Metaanaliza przeprowadzonych badań wskazuje jedynie na możliwą korzyść takiego postępowania u kobiet z

trzema lub więcej poronieniami [295]. Badania przeprowadzone przez Coomarasamy nie wykazały wpływu podawania progesteronu na zmniejszenie liczby poronień u kobiet z nawracającymi poronieniami [296]. Natomiast, badania kliniczne z zastosowaniem progestagenów, w tym pochodnych progesteronu wykazały, że w przypadku kobiet z niewyjaśnionymi nawracającymi poronieniami suplementacja terapią progestagenową może zmniejszyć częstość poronień w kolejnej ciąży [297]. Wang w swojej pracy wskazuje, że związki zawierające progesteron są skuteczne w zmniejszaniu częstości poronień. Meta-analiza danych wykazała, że dydrogesteron jest bardziej skuteczny w zmniejszaniu ryzyka poronień niż czysty progesteron [298]. Badania kliniczne PROMISE oraz PRISM wykazały, że zastosowanie u kobiet z poronieniami nawykowymi mikronizowanego progesteronu w dawce 400 mg dwa razy dziennie zwiększyło liczbę żywych urodzeń wśród kobiet z poronieniami nawykowymi [299]. Badania, które przeprowadziliśmy wykazały, że stymulacja komórek jednojądrzastych wyizolowanych z krwi obwodowej kobiet ciężarnych oraz kobiet z poronieniami nawykowymi progesteronem w stężeniu 20 ng/ml oraz 500 ng/ml w istotny sposób wpływa na ekspresję cząsteczek kontrolujących funkcjonowanie układu odpornościowego (Tabele 12-19). Przeprowadzone badania mogą stanowić wyjaśnienie w jaki sposób podawanie progesteronu kobietom z poronieniami nawykowymi wpływa na funkcjonowanie układu odpornościowego i dawać wyjaśnienie wnioskowi wyciągniętemu w wyżej wymienionych badaniach klinicznych czy eksperymentów. Przeprowadzone badania wpływu progesteronu na cząsteczki układu odpornościowego wydają się unikatowe, ponieważ w literaturze do tej pory nie odnalazłem żadnej pracy naukowej informującej o tej tematyce. Fakt, że progesteron wpływa na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy wyjaśnia znane działania progesteronu na funkcjonowanie komórek układu odpornościowego, takie jak zmiana profilu wydzielanych cytokin na przeciwzapalny czy zmniejszenie cytotoxyczości komórek układu odpornościowego [168]. Wzrost ekspresji cząsteczek PD1 wpływa na hamowanie proliferacji limfocytów T i produkcję cytokin. Zwiększenie ekspresji TIM-3 na limfocytach T pomocniczych przyczynia się do większej podatności komórek Th1 na apoptozę, co wpłynie na zmniejszenie wydzielania cytokin Th1, a to może przyczynić się do wytworzenia środowiska sprzyjającego rozwojowi ciąży [8, 244]. Wykazaliśmy również, że komórki kobiet z poronieniami nawykowymi są bardziej podatne na stymulację progesteronem niż komórki kobiet będących w ciąży. Wykazany wpływ progesteronu na ekspresję LAG-3, TIGIT czy Vista nadal pozostaje kwestią, którą należy dokładnie zbadać oraz wyjaśnić w jaki sposób zmiany

w ekspresji tych cząsteczek mogą przyczyniać się do wpływu na funkcjonowanie komórek układu odporności u kobiet ciężarnych oraz kobiet z poronieniami nawykowymi.

Tabela 12: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresją.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	↑	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	↑	-	-	-
Limfocyty T regulatorowe	↑	↑	-	-	-
Komórki NK	-	↑	-	↑	↓
Komórki NKT	-	-	-	-	-

Tabela 13: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	↑	-	-	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	↑	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	-	-

Tabela 14: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	↑	↑	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	↑	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	-	-

Tabela 15: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	↓	-	-	↓
Komórki NK	-	-	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	-	-

Tabela 16: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	↓	↑
Limfocyty T pomocnicze	-	-	↑	↓	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	↑	-	-
Komórki NK	-	↑	↑	-	↑
Komórki NKT	-	↑	-	-	-

Tabela 17: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	↑	--	↓	-
Limfocyty T pomocnicze	-	↑	↑	↓	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	↑	↓	-
Komórki NK	-	↑	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	↓	-

Tabela 18: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	↑	↑	↑	↑
Limfocyty T pomocnicze	-	↑	↑	-	-
Komórki NK	-	-	-	↑	-
Komórki NKT	-	-	-	↑	-

Tabela 19: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	↑	-	↑
Limfocyty T pomocnicze	↑	-	↑	-	↑
Komórki NK		↑	-	-	-
Komórki NKT	↑	-	-	-	-

5.3.2 Wpływ β -estradiolu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy.

Estrogeny a w szczególności estradiol znalazły zastosowanie w regulowaniu funkcji organizmu kobiet w okresie post-menopauzalnym oraz pre-menopauzalnym, jako hormonalna terapia zastępcza. Dodatkowo estradiol używany jest w leczeniu takich zaburzeń jak: schorzenia uroginekologiczne, zanikowe zapalenie cewki moczowej, zanikowe zapalenie pochwy, Hipostrogenizm, usunięcie jajników, osteoporoza, pierwotna niewydolność jajników, czy u mężczyzn rak prostaty [300-303]. Walker w swojej publikacji przekonuje, że użycie estrogenów mogłoby stanowić opcję terapeutyczną dla toczenia czy reumatoidalnego zapalenia stawów [304]. Tonguc wraz z zespołem w swoich badaniach wykazali, że u pacjentek u których wykonano zapłodnienie metodą *in vitro* zauważyli, że wspieranie fazy lutealnej poprzez dodanie 2, 4 lub 6 mg estradiolu do progesteronu nie powodowało statystycznej różnicy pod względem częstości ciąży. Jednak znacznie niższy wskaźnik poronień stwierdzono, gdy 4 mg E2 zastosowano jako wsparcie fazy lutealnej. Dlatego też w celu zmniejszenia częstości poronień podczas zapłodnienia metodą *in vitro*, aby wspomóc fazę lutealną, można rozważyć podawanie doustnie 4 mg estradiolu oprócz progesteronu [305]. Najnowsze badania wskazują, że kobiety które przyjmowały estradiol są mniej narażone na śmierć spowodowaną zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 czy występowanie ciężkich objawów choroby [306]. Praca wydana przez Elguero wskazuje, że leczenie wczesnej fazy lutealnej skojarzonym estrogenem i progesteronem przyniosło wyższe wskaźniki progresji ciąży po 10 tygodniach życia zarodka i więcej żywych urodzeń w porównaniu z samym progesteronem w fazie lutealnej lub bez leczenia u kobiet z nawracającymi poronieniami [307]. Obecnie w Egipcie prowadzone są badania kliniczne dotyczące zastosowania estradiolu i misoprostolu w zapobieganiu poronień występujących w drugim trymestrze ciąży [308].

Estradiol oddziałuje zarówno na odpowiedź wrodzoną, jak i nabytą, co ciekawe, kierunek działania estrogenów silnie zależy od ich stężenia. I tak w przypadku niskich stężeń estrogenów (np. u mężczyzn lub u kobiet w trakcie menstruacji czy w czasie menopauzy) dochodzi do stymulacji i produkcji cytokin prozapalnych, prowadzących do wzmocnienia odpowiedzi komórkowej [309, 310]. U kobiet podczas menopauzy znacznie spada liczba limfocytów Th2 i B, a zwiększa się liczba limfocytów Tc. Zastosowanie hormonalnej terapii zastępczej powoduje odwrócenie tego zjawiska. Z kolei wysoki poziom estrogenów, np. taki, jaki jest obserwowany u kobiet w czasie owulacji i w ciąży, powoduje zwiększoną produkcję przeciwciał i wzmocnienie, zależnej od limfocytów Th2,

odpowiedzi humoralnej oraz zwiększone uwalnianie limfocytów Treg [193, 309]. Estrogeny działają również hamująco na komórki NK, a także powodują zmniejszenie napływu neutrofilów i monocytów, hamując ich chemotaksję i migrację do ogniska zapalnego, ochraniając organizm przed długotrwałym stanem zapalnym [309]. Badania przeprowadzone przez Lelu wskazują na przeciwzapalne działanie estrogenów (zmniejszenie wydzielania cytokin Th1 oraz Th17) na funkcjonowanie układu odporności w przeciwieństwie do badań prowadzonych przez Maret i jego zespół (różnicowanie limfocytów w kierunku Th1 oraz zwiększone wydzielanie IFN- γ) [199, 200]. W danych literaturowych nie znalazłem informacji o wpływie estradiolu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy. Uzyskane przez nas dane wskazują, że stymulacja β -estradiolem o stężeniu 250 oraz 750 pg/ml wyizolowanych komórek układu odpornościowego (limfocytów T, komórek NK oraz NKT) w istotny sposób wpływa na ekspresję cząsteczek, takich jak PD1, TIM-3, TIGIT, VISTA, LAG-3 na komórkach układu odpornościowego. Zwiększona ekspresja cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy może przyczyniać się do hamowania funkcji limfocytów T pomocniczych oraz cytotoksycznych, jak i zmieniać profil wydzielanych cytokin na przeciwzapalny (Th2), co może sprzyjać rozwojowi ciąży oraz wspomagać implantację zarodka. (Tabele 20-27) Stymulacja komórek pobranych od kobiet w ciąży wskazuje na supresyjne działanie estradiolu w obydwu dawkach związane ze zwiększeniem ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (Tabela 20 i 21). Natomiast w hodowlach stymulowanych OKT-3 oraz w hodowli stymulowanej estradiolem o stężeniu 250 pg/ml (Tabela 22) zauważyliśmy zwiększenie ekspresji cząsteczek, a w hodowli stymulowanej estradiolem o stężeniu 750 pg/ml (Tabela 23) zmniejszenie ekspresji cząsteczek tj. TIM-3, LAG-3 czy VISTA, co może wskazywać na prozapalne działanie hormonu w tej hodowli. Nasze badania wykazały, że u kobiet z poronieniami nawykowymi stymulacja komórek w hodowlach stymulowanych OKT-3 oraz estradiolem w stężeniu 250 oraz 750 pg/ml (Tabela 26 i 27) powodowała wzrosty ekspresji PD1, TIM-3 TIGIT, VISTA, LAG-3, co wskazują na supresyjny charakter wpływu tego hormonu na komórki układu odpornościowego oraz przestawienie jego funkcjonowania w kierunku Th2. Co ciekawe, w hodowlach niestymulowanych u kobiet z poronieniami nawykowymi otrzymaliśmy podobne rezultaty jak w hodowlach stymulowanych OKT-3 z wyjątkiem ekspresji TIGIT (Tabela 24 i 25). Zauważyliśmy również, że komórki wyizolowane od kobiet z poronieniami nawykowymi wykazały mocniejszą odpowiedź na stymulacje hormonem względem kobiet ciężarnych. Może to wskazywać na większą ilość dostępnych receptorów dla estradiolu, co może być spowodowane

niedostateczną dostarczoną ilością hormonu w trakcie trwania ciąży u kobiet z poronieniami nawykowymi.

Tabela 20: Wpływ 17β -estradiolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego, Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	↓	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	-	↓	-
Komórki NK	-	↑	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	-	↑

Tabela 21: Wpływ 17 β -estradiolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. \uparrow - zwiększenie ekspresji, \downarrow - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	\uparrow	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	\uparrow	-	-	-
Limfocyty T regulatorowe	-	\uparrow	-	-	-
Komórki NK	-	\uparrow	-	-	\downarrow
Komórki NKT	-	\uparrow	\uparrow	-	-

Tabela 22: Wpływ 17 β -estradiolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. \uparrow - zwiększenie ekspresji, \downarrow - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	\uparrow	\uparrow	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	\uparrow	\uparrow	-	-	-
Komórki NK	-	\uparrow	-	-	-
Komórki NKT	-	\uparrow	-	\uparrow	-

Tabela 23: Wpływ 17 β -estradiolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. \uparrow - zwiększenie ekspresji, \downarrow - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	\downarrow	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	\downarrow	\downarrow	-	\downarrow
Komórki NK	-	-	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	\uparrow	-

Tabela 24: Wpływ 17 β -estradiolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. \uparrow - zwiększenie ekspresji, \downarrow - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	\downarrow	\uparrow
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	\downarrow	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	\uparrow	\downarrow	-
Komórki NK	-	\uparrow	-	-	-
Komórki NKT	\uparrow	\uparrow	-	-	-

Tabela 25: Wpływ 17 β -estradiolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. \uparrow - zwiększenie ekspresji, \downarrow - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	\uparrow	-	\downarrow	\uparrow
Limfocyty T pomocnicze	-	\uparrow	-	\downarrow	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	\uparrow	\downarrow	-
Komórki NK	-	\uparrow	-	-	\uparrow
Komórki NKT	-	\uparrow	\uparrow	-	-

Tabela 26: Wpływ 17 β -estradiolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. \uparrow - zwiększenie ekspresji, \downarrow - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	\uparrow	\uparrow	\uparrow	-
Limfocyty T pomocnicze	\uparrow	\uparrow	\uparrow	-	\uparrow
Komórki NK	-	\uparrow	\uparrow	\uparrow	
Komórki NKT	-	\uparrow	\uparrow	-	-

Tabela 27: Wpływ 17 β -estradiolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. \uparrow - zwiększenie ekspresji, \downarrow - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	\uparrow	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Komórki NK	-	\uparrow	-	-	\uparrow
Komórki NKT	\uparrow	-	-	-	-

5.3.3 Wpływ dihydrotestosteronu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy.

Terapia testosteronem głównie kojarzona jest z leczeniem zaburzeń dysfunkcji seksualnych związanych z hypogonadyzmem u mężczyzn, zaburzeniami erekcji [311]. Wykazano również korzystny wpływ leczenia testosteronem u pacjentów zakażonych wirusem HIV, z cukrzycą typu 2 jak i podczas leczenia pacjentów z przebyłym rakiem prostaty [311-314]. Niedobór testosteronu to zespół kliniczny składający się z różnych charakterystycznych objawów i oznak w połączeniu z niskimi stężeniami testosteronu w surowicy. Objawy obejmują niskie libido, zaburzenia erekcji, zmniejszone poranne erekcje, obniżony nastrój i zmęczenie [315]. Objawy obejmują anemię, zmniejszoną masę mięśniową, zwiększoną masę tłuszczową i zmniejszoną gęstość mineralną kości. Chociaż szacunki częstości występowania różnią się, jednostka kliniczna TD jest powszechna u dorosłych mężczyzn i zwiększa się wraz z wiekiem [313, 315]. Lepsze zrozumienie negatywnych skutków niedoboru testosteronu na zdrowie i jakość życia związaną ze zdrowiem – oraz zdolność terapii testosteronem do łagodzenia tych skutków – spowodowało ponowną ocenę roli testosteronu w raku prostaty. W tej dziedzinie nastąpiła ważna zmiana paradygmatu, w której terapia testosteronem może być obecnie uważana za realną opcję dla wybranych mężczyzn z rakiem prostaty cierpiących na niedobór testosteronu [312]. Obecnie uważa się, że terapia testosteronem nie wpływa na rozwój raka prostaty [316]. Testosteron jest używany również w leczeniu zaburzeń seksualnych u kobiet zwłaszcza w przypadku rozpoznania hipoaktywnego zaburzenia/dysfunkcji pożądania seksualnego (hypoactive sexual desire disorder/dysfunction) i zaburzenia podniecenia seksualnego kobiet (female sexual arousal disorder). Terapia testosteronem w dawkach zbliżonych do fizjologicznych dla stężenia testosteronu u kobiet przed menopauzą, wywiera korzystny wpływ na funkcje seksualne, w tym wzrosty w subdomenach pożądania seksualnego, podniecenia, funkcji orgazmu, przyjemności i reaktywności seksualnej wraz ze zmniejszeniem problemów seksualnych, w tym cierpienia seksualnego (poziom I, stopień A) [317]. Znany jest wpływ androgenów na funkcjonowanie układu odpornościowego zarówno odpowiedzi swoistej jak i nieswoistej. W badaniach wykazano, że testosteron ma ogólne działanie hamujące na układ odpornościowy, w szczególności podczas infekcji wirusowych oraz przy stymulacji autoantygenami [206]. Komórki Th1 odgrywają kluczową rolę w ochronie jednostki przed zakażeniami bakteriami, grzybami i wirusami [318]. Wytwarzane przez te komórki prozapalne cytokiny, IFN- γ i TNF- α/β , stymulują odpowiedzi wrodzone i komórkowe, co skutkuje usunięciem

patogenu oraz działaniem przeciwnowotworowym [206]. Mniejsza częstość występowania chorób autoimmunologicznych, jak i większa zachorowalność na choroby nowotworowe u mężczyzn prowadzi do spekulacji na temat wpływu androgenów na funkcjonowanie komórek Th1 [206]. Liva w swoich badaniach wykazał, że podawanie dihydrotestosteronu myszom powodowało wzrost stężenia interleukiny 10, co może wskazywać na właściwości przeciwzapalne związane z aktywowaniem limfocytów Th2. Nasze badania również wskazują, że stymulacja komórek jednojądrzastych dihydrotestosteronem o stężeniu 250 oraz 500 pg/ml wpływa na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy, co może przekładać się na wytworzenie stanu przeciwzapalnego w organizmie oraz wyhamowanie odpowiedzi komórek układu odpornościowego. U kobiet ciężarnych w hodowlach nie stymulowanych OKT-3 wykazaliśmy nieznaczny wpływ dihydrotestosteronu o stężeniach 250 pg/ml oraz 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (Tabela 28 oraz 29). W hodowlach stymulowanych OKT-3 wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml był niezauważalny (Tabela 30), natomiast przy stymulacji komórek kobiet ciężarnych dihydrotestosteronem w stężeniu 500 pg/ml zauważyliśmy obniżenie ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (Tabela 31). Komórki kobiet z poronieniami nawykowymi stymulowane dihydrotestosteronem o stężeniu 250 pg/ml wykazały wzrost ekspresji cząsteczek LAG-3, TIM-3, PD1, Vista na poszczególnych populacjach komórek oraz obniżenie ekspresji TIGIT na limfocytach T cytotoksycznych oraz komórkach NK (Tabela 32). W hodowli stymulowanej dihydrotestosteronem o stężeniu 500 pg/ml wykazaliśmy wzrost ekspresji wszystkich badanych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na poszczególnych populacjach komórek (Tabela 33). Komórki stymulowane OKT-3 w hodowlach założonych z komórek wyizolowanych od kobiet z poronieniami nawykowymi po stymulacji dihydrotestosteronem o stężeniach 250 oraz 500 pg/ml wykazały nieznaczny wpływ hormonu na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy (Tabela 34 oraz 35).

Tabela 28: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienniona ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	↓	-
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	-	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	↑	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	-	↑

Tabela 29: Wpływ dihydrotestosteronu u o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienniona ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	-	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	-	-	-	-
Komórki NKT	-	↑	↑	-	↑

Tabela 30: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	-	-	-	-
Komórki NKT	-	-	-	-	↑

Tabela 31: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	↓	↓	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	↓	↓	-	↓
Komórki NK	-	-	↓	↓	-
Komórki NKT	-	-	-	-	-

Tabela 32: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	↑	↓	↑
Limfocyty T pomocnicze	-	-	↑	-	-
Limfocyty T regulatorowe	-	-	↑	-	-
Komórki NK	-	↑	↑	↓	-
Komórki NKT	↑	-	↑	-	-

Tabela 33: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienną ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	↑	↑
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	↑	↑
Limfocyty T regulatorowe	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	↑	-	↑	-
Komórki NKT	↑	↑	↑	↑	↑

Tabela 34: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	-		-	-
Komórki NK	-	↑	↑	-	-
Komórki NKT	-	-	↑	-	-

Tabela 35: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmienna ekspresja.

	PD1	TIM-3	LAG-3	TIGIT	VISTA
Limfocyty T cytotoksyczne	-	-	-	-	-
Limfocyty T pomocnicze	-	-	-	-	-
Komórki NK	-	-	-	↓	-
Komórki NKT	-	-	↑	-	↑

6 Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że stymulacja komórek układu odpornościowego hormonami płciowymi wpływa na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy. Z pośród testowanych hormonów stymulacja **progesteronem o stężeniu 500 ng/ml** wykazała największy wpływ na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w badanych populacjach komórek.

Wykazane zmiany:

- Zwiększenie ekspresji PD1, LAG-3, VISTA na limfocytach T pomocniczych,
- Zwiększenie ekspresji TIM-3, LAG-3, VISTA na limfocytach T cytotoksycznych
- Zwiększenie ekspresji TIM-3 na komórkach NK
- Zmniejszenie ekspresji TIGIT na komórkach NKT
- Zwiększenie ekspresji PD1 na komórkach NKT
- Zwiększenie ekspresji LAG-3 na limfocytach T regulatorowych

Wydaje się, że podawanie progesteronu kobietom z poronieniami nawykowymi mogłoby stanowić element terapii i przyczynić się do zwiększenia szansy na prawidłowy przebieg ciąży u tych kobiet.

Dodatkowo przeprowadzone badania wykazały istotne różnice pomiędzy kobietami ciężarnymi oraz kobietami z poronieniami nawykowymi zarówno w **ekspresji błonowych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy**, jak i w **stężeniach rozpuszczalnych form cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów**.

Różnice w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy wykryte u kobiet z poronieniami względem kobiet, u których ciąża rozwijała się prawidłowo.

- Obniżona ekspresja PD1, TIM-3, LAG-3, VISTA na limfocytach T cytotoksycznych
- Obniżona ekspresja PD1, LAG-3 oraz VISTA na limfocytach T pomocniczych
- Obniżona ekspresja PD1, LAG-3 na limfocytach T regulatorowych
- Obniżona ekspresja TIM-3 na komórkach NK,
- Podwyższona ekspresja TIGIT na komórkach NK
- Obniżona ekspresja PD1 na komórkach NKT.

Różnice w stężeniach rozpuszczalnych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów wykryte u kobiet z poronieniami względem kobiet, u których ciąża rozwijała się prawidłowo.

- Obniżone stężenie sGal-9, sTIM-3, sCD112, sCD155, sVISTA
- Podwyższone stężenie sLAG-3, sCD80 oraz sCD86

Wykazane różnice mogą zostać wykorzystane jako markery diagnostyczne dla kobiet z poronieniami nawykowymi oraz do kontrolowania przebiegu ciąży. Dodatkowo wykryte zaburzenia mogą wskazywać kierunki dla rozwoju terapii u kobiet z poronieniami nawykowymi.

7 Bibliografia

1. Grimstad F, Krieg S. Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(7):833-47.
2. RPL TEGGo, Bender Atik R, Christiansen OB, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction Open.* 2018;2018(2).
3. Beaman KD, Ntrivalas E, Mallers TM, et al. Immune etiology of recurrent pregnancy loss and its diagnosis. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(4):319-25.
4. Krieg S, Westphal L. Immune Function and Recurrent Pregnancy Loss. *Semin Reprod Med.* 2015;33(4):305-12.
5. Śledzińska A, Menger L, Bergerhoff K, et al. Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy. *Mol Oncol.* 2015;9(10):1936-65.
6. Marhelava K, Pilch Z, Bajor M, et al. Targeting Negative and Positive Immune Checkpoints with Monoclonal Antibodies in Therapy of Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(11).
7. Miko E, Meggyes M, Doba K, et al. Immune Checkpoint Molecules in Reproductive Immunology. *Front Immunol.* 2019;10:846.
8. Wang S, Zhu X, Xu Y, et al. Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4+ T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface. *Hum Reprod.* 2016;31(4):700-11.
9. Wang WJ, Salazar Garcia MD, Deutsch G, et al. PD-1 and PD-L1 expression on T-cell subsets in women with unexplained recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol.* 2020;83(5):e13230.
10. Zhang M, Xiao JW, Liu WH, et al. Abnormal expression of Tim-3 in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Chin J Birth Health & Heredity.* 2012;20:31-4.
11. Meggyes M, Miko E, Szigeti B, et al. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2019;19(1):74.
12. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology.* 2008;26(1):677-704.
13. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol.* 2019;234(10):16824-37.

14. Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, et al. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cellular Immunology*. 2016;310:27-41.
15. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015;21(1):24-33.
16. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29-37.
17. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, et al. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:539-73.
18. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543-53.
19. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*. 2001;2(3):261-8.
20. Asano T, Meguri Y, Yoshioka T, et al. PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy. *Blood*. 2017;129(15):2186-97.
21. Meggyes M, Nagy DU, Szereday L. Investigation of the PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Molecules Throughout Healthy Human Pregnancy and in Nonpregnant Women. *J Clin Med*. 2020;9(8).
22. Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, et al. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol*. 2010;22(8):651-60.
23. Nagamatsu T, Schust DJ, Sugimoto J, et al. Human decidual stromal cells suppress cytokine secretion by allogenic CD4+ T cells via PD-1 ligand interactions. *Human Reproduction*. 2009;24(12):3160-71.
24. Veras E, Kurman RJ, Wang TL, et al. PD-L1 Expression in Human Placentas and Gestational Trophoblastic Diseases. *Int J Gynecol Pathol*. 2017;36(2):146-53.
25. Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(3):173-85.
26. van de Weyer PS, Muehlfeit M, Klose C, et al. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;351(2):571-6.
27. Davidson D, Schraven B, Veillette A. PAG-associated FynT regulates calcium signaling and promotes anergy in T lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 2007;27(5):1960-73.

28. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1245-52.
29. Hu XH, Tang MX, Mor G, et al. Tim-3: Expression on immune cells and roles at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol.* 2016;118:92-9.
30. Shimizu Y, Kabir-Salmani M, Azadbakht M, et al. Expression and localization of galectin-9 in the human uterodome. *Endocr J.* 2008;55(5):879-87.
31. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, et al. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2010;235(1):172-89.
32. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, et al. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood.* 2009;113(16):3821-30.
33. Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol.* 2012;13(9):832-42.
34. Huang YH, Zhu C, Kondo Y, et al. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature.* 2015;517(7534):386-90.
35. Curtin JF, Liu N, Candolfi M, et al. HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med.* 2009;6(1):e10.
36. De Sousa Linhares A, Kellner F, Jutz S, et al. TIM-3 and CEACAM1 do not interact in cis and in trans. *Eur J Immunol.* 2020;50(8):1126-41.
37. Yan J, Zhang Y, Zhang JP, et al. Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors. *PLoS One.* 2013;8(3):e58006.
38. Liu Y, Shu Q, Gao L, et al. Increased Tim-3 expression on peripheral lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis negatively correlates with disease activity. *Clin Immunol.* 2010;137(2):288-95.
39. Yang L, Anderson DE, Kuchroo J, et al. Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2008;180(7):4409-14.
40. Koguchi K, Anderson DE, Yang L, et al. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2006;203(6):1413-8.
41. Sakuishi K, Ngiow SF, Sullivan JM, et al. TIM3(+)FOXP3(+) regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology.* 2013;2(4):e23849.

42. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, et al. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2).
43. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DA. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J Immunol*. 2002;169(10):5392-5.
44. Crise B, Rose JK. Identification of palmitoylation sites on CD4, the human immunodeficiency virus receptor. *J Biol Chem*. 1992;267(19):13593-7.
45. Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, et al. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell*. 1990;60(5):755-65.
46. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989-1004.
47. Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004;21(4):503-13.
48. Sun H, Sun C, Xiao W. Expression regulation of co-inhibitory molecules on human natural killer cells in response to cytokine stimulations. *Cytokine*. 2014;65(1):33-41.
49. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, et al. Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(4):412-23.
50. Okazaki T, Okazaki IM, Wang J, et al. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *J Exp Med*. 2011;208(2):395-407.
51. Huard B, Prigent P, Tournier M, et al. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol*. 1995;25(9):2718-21.
52. Maruhashi T, Okazaki IM, Sugiura D, et al. LAG-3 inhibits the activation of CD4(+) T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat Immunol*. 2018;19(12):1415-26.
53. Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, et al. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol*. 2002;32(8):2255-63.
54. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):823-36.

55. Wang J, Sanmamed MF, Datar I, et al. Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell*. 2019;176(1-2):334-47.e12.
56. Maeda TK, Sugiura D, Okazaki IM, et al. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. *J Biol Chem*. 2019;294(15):6017-26.
57. Tian X, Zhang A, Qiu C, et al. The upregulation of LAG-3 on T cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. *J Immunol*. 2015;194(8):3873-82.
58. Dong Y, Li X, Zhang L, et al. CD4(+) T cell exhaustion revealed by high PD-1 and LAG-3 expression and the loss of helper T cell function in chronic hepatitis B. *BMC Immunol*. 2019;20(1):27.
59. Bettini M, Szymczak-Workman AL, Forbes K, et al. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. *J Immunol*. 2011;187(7):3493-8.
60. Jha V, Workman CJ, McGaha TL, et al. Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3) negatively regulates environmentally-induced autoimmunity. *PLoS One*. 2014;9(8):e104484.
61. Joller N, Hafler JP, Brynedal B, et al. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol*. 2011;186(3):1338-42.
62. Boles KS, Vermi W, Facchetti F, et al. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):695-703.
63. Levin SD, Taft DW, Brandt CS, et al. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol*. 2011;41(4):902-15.
64. Joller N, Lozano E, Burkett PR, et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity*. 2014;40(4):569-81.
65. Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 2003;198(4):557-67.
66. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, et al. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol*. 2014;15(5):431-8.
67. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell*. 2014;26(6):923-37.

68. Stengel KF, Harden-Bowles K, Yu X, et al. Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(14):5399-404.
69. Li M, Xia P, Du Y, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon- γ production of natural killer cells via β -arrestin 2-mediated negative signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(25):17647-57.
70. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17858-63.
71. Liu S, Zhang H, Li M, et al. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ*. 2013;20(3):456-64.
72. Nowak EC, Lines JL, Varn FS, et al. Immunoregulatory functions of VISTA. *Immunol Rev*. 2017;276(1):66-79.
73. ElTanbouly MA, Schaafsma E, Noelle RJ, et al. VISTA: Coming of age as a multi-lineage immune checkpoint. *Clin Exp Immunol*. 2020;200(2):120-30.
74. Mehta N, Maddineni S, Mathews, II, et al. Structure and Functional Binding Epitope of V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation. *Cell Rep*. 2019;28(10):2509-16.e5.
75. Flies DB, Wang S, Xu H, et al. Cutting edge: A monoclonal antibody specific for the programmed death-1 homolog prevents graft-versus-host disease in mouse models. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;187(4):1537-41.
76. Wang L, Le Mercier I, Putra J, et al. Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(41):14846-51.
77. Lines JL, Pantazi E, Mak J, et al. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer Res*. 2014;74(7):1924-32.
78. Huang X, Zhang X, Li E, et al. VISTA: an immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13(1):83.
79. Wang J, Wu G, Manick B, et al. VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunology*. 2019;156(1):74-85.

80. Johnston RJ, Su LJ, Pinckney J, et al. VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature*. 2019;574(7779):565-70.
81. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin Ther*. 2015;37(4):764-82.
82. Chakrabarti R, Kapse B, Mukherjee G. Soluble immune checkpoint molecules: Serum markers for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Reports*. 2019;2.
83. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423(6939):506-11.
84. Simone R, Tenca C, Fais F, et al. A soluble form of CTLA-4 is present in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia and correlates with CD1d+ expression. *PloS one*. 2012;7(9):e44654-e.
85. Erfani N, Razmkhah M, Ghaderi A. Circulating soluble CTLA4 (sCTLA4) is elevated in patients with breast cancer. *Cancer Invest*. 2010;28(8):828-32.
86. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, et al. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*. 1997;185(3):393-403.
87. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002;17(2):201-10.
88. Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, et al. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol*. 1999;29(11):3596-602.
89. Oaks MK, Hallett KM, Penwell RT, et al. A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol*. 2000;201(2):144-53.
90. Ward FJ, Dahal LN, Wijesekera SK, et al. The soluble isoform of CTLA-4 as a regulator of T-cell responses. *Eur J Immunol*. 2013;43(5):1274-85.
91. Oaks MK, Hallett KM. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol*. 2000;164(10):5015-8.
92. Liu MF, Wang CR, Chen PC, et al. Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*. 2003;57(6):568-72.

93. Wang XB, Kakoulidou M, Giscombe R, et al. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J Neuroimmunol.* 2002;130(1-2):224-32.
94. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. Serum soluble CTLA-4 levels are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(10):1261-6.
95. Purohit S, Podolsky R, Collins C, et al. Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes. *J Autoimmune Dis.* 2005;2:8.
96. Wong CK, Lun SWM, Ko FWS, et al. Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma. *Clinical and experimental immunology.* 2005;141(1):122-9.
97. Saverino D, Brizzolara R, Simone R, et al. Soluble CTLA-4 in autoimmune thyroid diseases: relationship with clinical status and possible role in the immune response dysregulation. *Clin Immunol.* 2007;123(2):190-8.
98. Liu Q, Hu P, Deng G, et al. Soluble cytotoxic T-lymphocyte antigen 4: a favorable predictor in malignant tumors after therapy. *Onco Targets Ther.* 2017;10:2147-54.
99. Roncella S, Laurent S, Fontana V, et al. CTLA-4 in mesothelioma patients: tissue expression, body fluid levels and possible relevance as a prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(8):909-17.
100. Hebbar M, Jeannin P, Magistrelli G, et al. Detection of circulating soluble CD28 in patients with systemic lupus erythematosus, primary Sjögren's syndrome and systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(2):388-92.
101. Isitmangil G, Gurleyik G, Aker FV, et al. Association of CTLA4 and CD28 Gene Variants and Circulating Levels of Their Proteins in Patients with Breast Cancer. *In Vivo.* 2016;30(4):485-93.
102. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233-58.
103. Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, et al. Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia.* 1996;10(7):1168-76.

104. Pope B, Brown RD, Gibson J, et al. B7-2-positive myeloma: incidence, clinical characteristics, prognostic significance, and implications for tumor immunotherapy. *Blood*. 2000;96(4):1274-9.
105. Hock BD, Starling GC, Patton WN, et al. Identification of a circulating soluble form of CD80: levels in patients with hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(10):2111-8.
106. Hock BD, Patton WN, Budhia S, et al. Human plasma contains a soluble form of CD86 which is present at elevated levels in some leukaemia patients. *Leukemia*. 2002;16(5):865-73.
107. Hock BD, Drayson M, Patton WN, et al. Circulating levels and clinical significance of soluble CD86 in myeloma patients. *Br J Haematol*. 2006;133(2):165-72.
108. Wang L, Wang H, Chen H, et al. Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015;6(38):41228-36.
109. Rossille D, Gressier M, Damotte D, et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia*. 2014;28(12):2367-75.
110. Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, et al. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol*. 2005;235(2):109-16.
111. Birtas Atesoglu E, Tarkun P, Demirsoy ET, et al. Soluble Programmed Death 1 (PD-1) Is Decreased in Patients With Immune Thrombocytopenia (ITP): Potential Involvement of PD-1 Pathway in ITP Immunopathogenesis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2016;22(3):248-51.
112. Cheng HY, Kang PJ, Chuang YH, et al. Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(11):e95870.
113. Elhag OA, Hu XJ, Wen-Ying Z, et al. Reconstructed adeno-associated virus with the extracellular domain of murine PD-1 induces antitumor immunity. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(8):4031-6.
114. He L, Zhang G, He Y, et al. Blockade of B7-H1 with sPD-1 improves immunity against murine hepatocarcinoma. *Anticancer Res*. 2005;25(5):3309-13.

115. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27(1):111-22.
116. Song MY, Park SH, Nam HJ, et al. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *J Immunother*. 2011;34(3):297-306.
117. Gu Y, Morgan J, Lewis DF, et al. Maternal soluble PD-1 levels are significantly increased in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2020;83(1):e13193.
118. Okuma Y, Hosomi Y, Nakahara Y, et al. High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer. *Lung Cancer*. 2017;104:1-6.
119. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP, et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity*. 2000;13(3):303-12.
120. Zhang Y, Liu Z, Tian M, et al. The altered PD-1/PD-L1 pathway delivers the 'one-two punch' effects to promote the Treg/Th17 imbalance in pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(7):710-23.
121. Dong H, Strome SE, Matteson EL, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2003;111(3):363-70.
122. Amancha PK, Hong JJ, Rogers K, et al. In vivo blockade of the programmed cell death-1 pathway using soluble recombinant PD-1-Fc enhances CD4+ and CD8+ T cell responses but has limited clinical benefit. *J Immunol*. 2013;191(12):6060-70.
123. Okuyama M, Mezawa H, Kawai T, et al. Elevated Soluble PD-L1 in Pregnant Women's Serum Suppresses the Immune Reaction. *Front Immunol*. 2019;10:86.
124. Enninga EAL, Harrington SM, Creedon DJ, et al. Immune checkpoint molecules soluble program death ligand 1 and galectin-9 are increased in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2018;79(2).
125. Clayton KL, Douglas-Vail MB, Nur-ur Rahman AK, et al. Soluble T cell immunoglobulin mucin domain 3 is shed from CD8+ T cells by the sheddase ADAM10, is increased in plasma during untreated HIV infection, and correlates with HIV disease progression. *J Virol*. 2015;89(7):3723-36.

126. Möller-Hackbarth K, Dewitz C, Schweigert O, et al. A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). *J Biol Chem.* 2013;288(48):34529-44.
127. Hansen JA, Hanash SM, Tabellini L, et al. A novel soluble form of Tim-3 associated with severe graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(9):1323-30.
128. Ge W, Li J, Fan W, et al. Tim-3 as a diagnostic and prognostic biomarker of osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2017;39(7):1010428317715643.
129. Meggyes M, Miko E, Polgar B, et al. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ T cells throughout pregnancy: TIM-3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One.* 2014;9(3):e92371.
130. Wu M, Zhu Y, Zhao J, et al. Soluble costimulatory molecule sTim3 regulates the differentiation of Th1 and Th2 in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):8812-9.
131. Sun J, Yang M, Ban Y, et al. Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147186.
132. Li YH, Zhou WH, Tao Y, et al. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(1):73-81.
133. Moar P, Tandon R. Galectin-9 as a biomarker of disease severity. *Cell Immunol.* 2021;361:104287.
134. Li N, Wang Y, Forbes K, et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *Embo j.* 2007;26(2):494-504.
135. Annunziato F, Manetti R, Tomasévic I, et al. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4+ T cells are associated with IFN-gamma production. *Faseb j.* 1996;10(7):769-76.
136. Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, et al. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliiovirus receptor interaction. *Cancer Res.* 2004;64(24):9180-4.
137. Koike S, Horie H, Ise I, et al. The poliiovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *The EMBO journal.* 1990;9(10):3217-24.

138. Baury B, Masson D, McDermott BM, Jr., et al. Identification of secreted CD155 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309(1):175-82.
139. Triki H, Charfi S, Bouzidi L, et al. CD155 expression in human breast cancer: Clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration. *Life Sciences.* 2019;231:116543.
140. Negishi N, Sato T, Yamashita-Kanemaru Y, et al. CD155-Transducing Signaling through TIGIT Plays an Important Role in Transmission of Tolerant State and Suppression Capacity. *ImmunoHorizons.* 2018;2(10):338.
141. Bevelacqua V, Bevelacqua Y, Candido S, et al. Nectin like-5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma. *Oncotarget.* 2012;3(8):882-92.
142. Ikeda W, Kakunaga S, Takekuni K, et al. Nectin-like molecule-5/Tage4 enhances cell migration in an integrin-dependent, Nectin-3-independent manner. *J Biol Chem.* 2004;279(17):18015-25.
143. Kakunaga S, Ikeda W, Shingai T, et al. Enhancement of serum- and platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by Nectin-5/Tage4/poliovirus receptor/CD155 through the Ras-Raf-MEK-ERK signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(35):36419-25.
144. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, et al. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(8):603-15.
145. Iguchi-Manaka A, Okumura G, Kojima H, et al. Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLOS ONE.* 2016;11(4):e0152982.
146. Miao X, Yang ZL, Xiong L, et al. Nectin-2 and DDX3 are biomarkers for metastasis and poor prognosis of squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinoma of gallbladder. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(2):179-90.
147. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* 2005;105(5):2066-73.
148. Karabulut M, Gunaldi M, Alis H, et al. Serum nectin-2 levels are diagnostic and prognostic in patients with colorectal carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2016;18(2):160-71.
149. Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *The Journal of experimental medicine.* 2008;205(13):2959-64.

150. Ono E, Yoshino S, Amagai K, et al. Enhanced resistance to herpes simplex virus type 1 infection in transgenic mice expressing a soluble form of herpesvirus entry mediator. *Virology*. 2004;320(2):267-75.
151. Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol Rev*. 2009;229(1):244-58.
152. Zhao Q, Zhang GL, Zhu X, et al. The paradoxical changes of membrane and soluble herpes virus entry mediator in hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(8):1520-4.
153. Pasero C, Speiser DE, Derré L, et al. The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(4):478-85.
154. M'Hidi H, Thibault ML, Chetaille B, et al. High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(4):589-96.
155. Derré L, Rivals JP, Jandus C, et al. BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination. *J Clin Invest*. 2010;120(1):157-67.
156. Jung HW, La SJ, Kim JY, et al. High levels of soluble herpes virus entry mediator in sera of patients with allergic and autoimmune diseases. *Exp Mol Med*. 2003;35(6):501-8.
157. Brunel S, Aubert N, Olive D, et al. TNFRSF14 (HVEM) is a novel immune checkpoint blockade that can be targeted by a monoclonal antibody to improve anti-tumor response in humanized mice. *bioRxiv*. 2020:711119.
158. Dutta S, Sengupta P. Defining pregnancy phases with cytokine shift. *Journal of pregnancy*. 2017;1.
159. Lajko A, Meggyes M, Polgar B, et al. The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194870.
160. Zhao J, Lei Z, Liu Y, et al. Human pregnancy up-regulates Tim-3 in innate immune cells for systemic immunity. *J Immunol*. 2009;182(10):6618-24.
161. Habicht A, Dada S, Jurewicz M, et al. A link between PDL1 and T regulatory cells in fetomaternal tolerance. *J Immunol*. 2007;179(8):5211-9.

162. Taglauer ES, Trikhacheva AS, Slusser JG, et al. Expression and function of PDCD1 at the human maternal-fetal interface. *Biol Reprod.* 2008;79(3):562-9.
163. Petroff MG, Chen L, Phillips TA, et al. B7 family molecules: novel immunomodulators at the maternal-fetal interface. *Placenta.* 2002;23 Suppl A:S95-101.
164. Petroff MG, Kharatyan E, Torry DS, et al. The immunomodulatory proteins B7-DC, B7-H2, and B7-H3 are differentially expressed across gestation in the human placenta. *Am J Pathol.* 2005;167(2):465-73.
165. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:387-411.
166. Solano ME, Arck PC. Steroids, Pregnancy and Fetal Development. *Frontiers in Immunology.* 2020;10(3017).
167. Johnson JV. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *Fertility and Sterility.* 2009;92(6):2125.
168. Shah NM, Lai PF, Imami N, et al. Progesterone-Related Immune Modulation of Pregnancy and Labor. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:198-.
169. Lee CL, Lam KK, Koistinen H, et al. Glycodelin-A as a paracrine regulator in early pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2011;90(1):29-34.
170. Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, et al. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e009.
171. Lissauer D, Eldershaw SA, Inman CF, et al. Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *European journal of immunology.* 2015;45(10):2858-72.
172. Szekeres-Bartho J, Schindler AE. Progesterone and immunology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2019;60:17-23.
173. Areia A, Vale-Pereira S, Alves V, et al. Can membrane progesterone receptor α on T regulatory cells explain the ensuing human labour? *J Reprod Immunol.* 2016;113:22-6.
174. Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S, et al. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J Biol Chem.* 1998;273(20):12378-82.

175. Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, et al. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol.* 2008;196(1):67-77.
176. Ndiaye K, Poole DH, Walusimbi S, et al. Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. *J Reprod Immunol.* 2012;95(1-2):15-26.
177. Kuwabara T, Matsui Y, Ishikawa F, et al. Regulation of T-Cell Signaling by Post-Translational Modifications in Autoimmune Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):819.
178. Solano ME. Decidual immune cells: Guardians of human pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2019;60:3-16.
179. Mao G, Wang J, Kang Y, et al. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology.* 2010;151(11):5477-88.
180. Solano ME, Kowal MK, O'Rourke GE, et al. Progesterone and HMOX-1 promote fetal growth by CD8+ T cell modulation. *J Clin Invest.* 2015;125(4):1726-38.
181. Mulac-Jeričević B, Šučurović S, Gulic T, et al. The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the mouse endometrium. *Am J Reprod Immunol.* 2019;81(5):e13104.
182. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med.* 2007;13(12):1450-7.
183. Hudić I, Fatusić Z, Szekeres-Bartho J, et al. Progesterone-induced blocking factor and cytokine profile in women with threatened pre-term delivery. *Am J Reprod Immunol.* 2009;61(5):330-7.
184. Shah NM, Imami N, Johnson MR. Progesterone Modulation of Pregnancy-Related Immune Responses. *Frontiers in immunology.* 2018;9:1293-.
185. Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, et al. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(3):268-79.
186. Yao Y, Li H, Ding J, et al. Progesterone impairs antigen-non-specific immune protection by CD8 T memory cells via interferon- γ gene hypermethylation. *PLOS Pathogens.* 2017;13(11):e1006736.

187. Wu C, Thalhamer T, Franca RF, et al. Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. *Immunity*. 2014;41(2):270-82.
188. Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, et al. NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J Immunol*. 2008;180(8):5746-53.
189. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3):561-70.
190. Karpuzoglu E, Zouali M. The multi-faceted influences of estrogen on lymphocytes: toward novel immuno-interventions strategies for autoimmunity management. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;40(1):16-26.
191. Bai J, Qi Q-R, Li Y, et al. Estrogen Receptors and Estrogen-Induced Uterine Vasodilation in Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4349.
192. Pierdominici M, Maselli A, Colasanti T, et al. Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett*. 2010;132(1-2):79-85.
193. Moulton VR. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2018;9:2279.
194. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30.
195. Barton M, Filardo EJ, Lolait SJ, et al. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;176:4-15.
196. Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*. 2010;204(2):105-14.
197. Dai R, Phillips RA, Ahmed SA. Despite inhibition of nuclear localization of NF-kappa B p65, c-Rel, and RelB, 17-beta estradiol up-regulates NF-kappa B signaling in mouse splenocytes: the potential role of Bcl-3. *J Immunol*. 2007;179(3):1776-83.
198. Moulton VR, Holcomb DR, Zajdel MC, et al. Estrogen upregulates cyclic AMP response element modulator α expression and downregulates interleukin-2 production by human T lymphocytes. *Mol Med*. 2012;18(1):370-8.
199. Maret A, Coudert JD, Garidou L, et al. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):512-21.

200. Lélou K, Laffont S, Delpy L, et al. Estrogen receptor α signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2011;187(5):2386-93.
201. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol.* 2004;173(4):2227-30.
202. Nie J, Li YY, Zheng SG, et al. FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology.* 2015;6:493-.
203. Dinesh RK, Hahn BH, Singh RP. PD-1, gender, and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2010;9(8):583-7.
204. Pernis AB. Estrogen and CD4+ T cells. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(5):414-20.
205. Luetjens CM, Weinbauer GF. Testosterone: biosynthesis, transport, metabolism and (non-genomic) actions. In: Nieschlag E, Behre HM, editors. *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution.* 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2012. p. 15-32.
206. Trigunaite A, Dimo J, Jørgensen TN. Suppressing effects of androgens on the immune system. *Cell Immunol.* 2015;294(2):87-94.
207. Rahman F, Christian HC. Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(10):371-8.
208. Koh YT, Gray A, Higgins SA, et al. Androgen ablation augments prostate cancer vaccine immunogenicity only when applied after immunization. *Prostate.* 2009;69(6):571-84.
209. Wang JP, Zhang L, Madera RF, et al. Plasmacytoid dendritic cell interferon- α production to R-848 stimulation is decreased in male infants. *BMC immunology.* 2012;13:35-.
210. Posma E, Moes H, Heineman MJ, et al. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. *Am J Reprod Immunol.* 2004;52(4):237-43.
211. Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, et al. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology.* 2001;142(3):1278-83.
212. Roden AC, Moser MT, Tri SD, et al. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *J Immunol.* 2004;173(10):6098-108.
213. Sutherland JS, Goldberg GL, Hammett MV, et al. Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade. *J Immunol.* 2005;175(4):2741-53.

214. Goldberg GL, Sutherland JS, Hammet MV, et al. Sex steroid ablation enhances lymphoid recovery following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2005;80(11):1604-13.
215. Olsen NJ, Kovacs WJ. Evidence that androgens modulate human thymic T cell output. *J Invest Med*. 2011;59(1):32-5.
216. Wang B, André I, Gonzalez A, et al. Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):13844-9.
217. Hu HZ, Li GL, Lim YK, et al. Kinetics of interferon-gamma secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease. *Immunology*. 1999;98(3):379-85.
218. Filella X, Alcover J, Zarco MA, et al. Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer. *Prostate*. 2000;44(4):271-4.
219. Kissick HT, Sanda MG, Dunn LK, et al. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9887-92.
220. Myers MP, Andersen JN, Cheng A, et al. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 2001;276(51):47771-4.
221. Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003;38(1):13-22.
222. Girón-González JA, Moral FJ, Elvira J, et al. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *Eur J Endocrinol*. 2000;143(1):31-6.
223. Taneja V. Sex Hormones Determine Immune Response. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1931-.
224. Dalal M, Kim S, Voskuhl RR. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunol*. 1997;159(1):3-6.
225. Liva S, Voskuhl R. Testosterone Acts Directly on CD4+ T Lymphocytes to Increase IL-10 Production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167:2060-7.
226. Hepworth MR, Hardman MJ, Grecis RK. The role of sex hormones in the development of Th2 immunity in a gender-biased model of *Trichuris muris* infection. *European journal of immunology*. 2010;40(2):406-16.

227. Hong Li Y, Marren A. Recurrent pregnancy loss: A summary of international evidence-based guidelines and practice. *Aust J Gen Pract.* 2018;47(7):432-6.
228. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(1):71-81.
229. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W, et al. *Immunologia: Wydawnictwo naukowe PWN;* 2018.
230. Deakin JE, Papenfuss AT, Belov K, et al. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. *BMC Genomics.* 2006;7(1):281.
231. Joller N, Kuchroo VK. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;410:127-56.
232. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, et al. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity.* 2016;44(5):955-72.
233. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008;322(5899):271-5.
234. Gleason MK, Lenvik TR, McCullar V, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood.* 2012;119(13):3064-72.
235. Wang Y, Li D, Yu T, et al. Dynamics of TIGIT and PD-1 expression on NK cells during the course of normal pregnancy. *Immunol Lett.* 2021;230:42-8.
236. Sayama S, Nagamatsu T, Schust DJ, et al. Human decidual macrophages suppress IFN- γ production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2013;100(2):109-17.
237. Li G, Lu C, Gao J, et al. Association between PD-1/PD-L1 and T regulate cells in early recurrent miscarriage. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):6512-8.
238. Ndhlovu LC, Lopez-Vergès S, Barbour JD, et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* 2012;119(16):3734-43.
239. Miko E, Meggyes M, Bogar B, et al. Involvement of Galectin-9/TIM-3 Pathway in the Systemic Inflammatory Response in Early-Onset Preeclampsia. *PLOS ONE.* 2013;8(8):e71811.

240. Tripathi S, Chabtini L, Dakle PJ, et al. Effect of TIM-3 Blockade on the Immunophenotype and Cytokine Profile of Murine Uterine NK Cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123439.
241. Wang SC, Li YH, Piao HL, et al. PD-1 and Tim-3 pathways are associated with regulatory CD8+ T-cell function in decidua and maintenance of normal pregnancy. *Cell Death Dis*. 2015;6(5):e1738.
242. Yuan J, Li J, Huang SY, et al. Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol*. 2015;110:81-8.
243. Zhuang X, Xia X, Liu L, et al. Expression of Tim-3 in peripheral blood mononuclear cells and placental tissue in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(38):e12099.
244. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-48.
245. Xu YY, Wang SC, Lin YK, et al. Tim-3 and PD-1 regulate CD8(+) T cell function to maintain early pregnancy in mice. *J Reprod Dev*. 2017;63(3):289-94.
246. Li F, Dang J, Jiang M, et al. Upregulation of Tim-3 expression at feto-maternal interface may explain embryo survival in the CBAXDBA/2 model of abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2018;79(1).
247. Zeng H, Liu Y, Guo W, et al. [Decreased expression levels of LAG-3 and CD49b on CD14+ cells in peripheral blood of patients with recurrent spontaneous abortion]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2016;32(3):369-72.
248. Liang Q, Tong L, Xiang L, et al. Distinct changes of in BTLA, ICOS, PD-1, and TIGIT expression on peripheral blood and decidual CD8+ T cells in women with unexplained recurrent spontaneous abortion†. *Biol Reprod*. 2020;103(5):1012-7.
249. Lines JL, Sempere LF, Broughton T, et al. VISTA is a novel broad-spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(6):510-7.
250. Ohno T, Zhang C, Kondo Y, et al. The immune checkpoint molecule VISTA regulates allergen-specific Th2-mediated immune responses. *Int Immunol*. 2018;30(1):3-11.
251. Zhao Y, Zheng Q, Jin L. The Role of B7 Family Molecules in Maternal-Fetal Immunity. *Front Immunol*. 2020;11:458.

252. Yoon KW, Byun S, Kwon E, et al. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*. 2015;349(6247):1261669.
253. Liu H, Li X, Hu L, et al. A crucial role of the PD-1H coinhibitory receptor in suppressing experimental asthma. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(9):838-45.
254. Flies DB, Han X, Higuchi T, et al. Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4⁺ T cell-mediated immunity. *J Clin Invest*. 2014;124(5):1966-75.
255. Hid Cadena R, Reitsema RD, Huitema MG, et al. Decreased Expression of Negative Immune Checkpoint VISTA by CD4⁺ T Cells Facilitates T Helper 1, T Helper 17, and T Follicular Helper Lineage Differentiation in GCA. *Front Immunol*. 2019;10:1638.
256. Gu D, Ao X, Yang Y, et al. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):132.
257. Omura Y, Toiyama Y, Okugawa Y, et al. Prognostic impacts of tumoral expression and serum levels of PD-L1 and CTLA-4 in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(12):2533-46.
258. Misra MK, Mishra A, Phadke SR, et al. Association of functional genetic variants of CTLA4 with reduced serum CTLA4 protein levels and increased risk of idiopathic recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2016;106(5):1115-23.e6.
259. Wang H, Wang K, Zhong X, et al. Plasma sCD28, sCTLA-4 levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Neuroimmunol*. 2012;243(1-2):52-5.
260. Wang Q, Zhang J, Tu H, et al. Soluble immune checkpoint-related proteins as predictors of tumor recurrence, survival, and T cell phenotypes in clear cell renal cell carcinoma patients. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):334.
261. Cao J, Zhang L, Huang S, et al. Aberrant production of soluble co-stimulatory molecules CTLA-4 and CD28 in patients with chronic hepatitis B. *Microbial Pathogenesis*. 2011;51(4):262-7.
262. Ip WK, Wong CK, Leung TF, et al. Plasma concentrations of soluble CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 costimulatory molecules reflect disease severity of acute asthma in children. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41(7):674-82.
263. Cao J, Zou L, Luo P, et al. Increased production of circulating soluble co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(4):585-92.

264. Ren F, Li J, Jiang X, et al. Plasma soluble Tim-3 emerges as an inhibitor in sepsis: sepsis contrary to membrane Tim-3 on monocytes. *Tissue Antigens*. 2015;86(5):325-32.
265. Frigola X, Inman BA, Krco CJ, et al. Soluble B7-H1: differences in production between dendritic cells and T cells. *Immunol Lett*. 2012;142(1-2):78-82.
266. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, et al. Cell surface galectin-9 expressing Th cells regulate Th17 and Foxp3+ Treg development by galectin-9 secretion. *PLoS One*. 2012;7(11):e48574.
267. Hadley T, Gillespie S, Espinoza H, et al. Soluble PD1 levels are increased with disease activity in paediatric onset autoimmune hepatitis and inflammatory bowel disease. *Autoimmunity*. 2020;53(5):253-60.
268. Zhou L, Li X, Huang X, et al. Soluble programmed death-1 is a useful indicator for inflammatory and fibrosis severity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2019;26(7):795-802.
269. Chang B, Huang T, Wei H, et al. The correlation and prognostic value of serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(3):353-63.
270. He J, Pan Y, Guo Y, et al. Study on the Expression Levels and Clinical Significance of PD-1 and PD-L1 in Plasma of NSCLC Patients. *J Immunother*. 2020;43(5):156-64.
271. Pawłowska A, Suszczyk D, Tarkowski R, et al. Programmed Death-1 Receptor (PD-1) as a Potential Prognosis Biomarker for Ovarian Cancer Patients. *Cancer Manag Res*. 2020;12:9691-709.
272. Li Y, Cui X, Yang YJ, et al. Serum sPD-1 and sPD-L1 as Biomarkers for Evaluating the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer*. 2019;19(5):326-32.e1.
273. Du Y, Nie L, Xu L, et al. Serum levels of soluble programmed death-1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1(sPD-L1) in systemic lupus erythematosus: Association with activity and severity. *Scand J Immunol*. 2020;92(1):e12884.
274. Hirahara S, Katsumata Y, Kawasumi H, et al. Serum levels of soluble programmed cell death protein 1 and soluble programmed cell death protein ligand 2 are increased in systemic lupus erythematosus and associated with the disease activity. *Lupus*. 2020;29(7):686-96.
275. Santoso B, Sa'adi A, Dwiningih SR, et al. Soluble immune checkpoints CTLA-4, HLA-G, PD-1, and PD-L1 are associated with endometriosis-related infertility. *Am J Reprod Immunol*. 2020;84(4):e13296.

276. Wang W, Parchim NF, Iriyama T, et al. Excess LIGHT contributes to placental impairment, increased secretion of vasoactive factors, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Hypertension*. 2014;63(3):595-606.
277. Gill RM, Ni J, Hunt JS. Differential expression of LIGHT and its receptors in human placental villi and amniochorion membranes. *Am J Pathol*. 2002;161(6):2011-7.
278. Sierra S, Romero P, Speiser DE. The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(1):91-101.
279. Cui SS, Du JJ, Liu SH, et al. Serum soluble lymphocyte activation gene-3 as a diagnostic biomarker in Parkinson's disease: A pilot multicenter study. *Mov Disord*. 2019;34(1):138-41.
280. He Y, Wang Y, Zhao S, et al. sLAG-3 in non-small-cell lung cancer patients' serum. *Oncotargets Ther*. 2018;11:4781-4.
281. Li N, Jilishan B, Wang W, et al. Soluble LAG3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8+T cell frequency and secretion of IL-12 and INF- γ in peripheral blood. *Cancer Biomark*. 2018;23(3):341-51.
282. Triebel F, Hacene K, Pichon MF. A soluble lymphocyte activation gene-3 (sLAG-3) protein as a prognostic factor in human breast cancer expressing estrogen or progesterone receptors. *Cancer Lett*. 2006;235(1):147-53.
283. Wu W, Xia X, Cheng C, et al. Serum Soluble PD-L1, PD-L2, and B7-H5 as Potential Diagnostic Biomarkers of Human Pancreatic Cancer. *Clin Lab*. 2021;67(6).
284. Iguchi-Manaka A, Okumura G, Ichioka E, et al. High expression of soluble CD155 in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2020;27(1):92-9.
285. Bomba-Opoń D, Czajkowski K, Karowicz-Bilińska A, et al. [Recommendations of the Polish Gynecological Society concerning application of progesterone in obstetrics and gynecology]. *Ginekol Pol*. 2015;86(3):234-8.
286. Filicori M. Clinical roles and applications of progesterone in reproductive medicine: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015;94 Suppl 161:3-7.
287. Ford O, Lethaby A, Roberts H, et al. Progesterone for premenstrual syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;2012(3):Cd003415.
288. van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, et al. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015(7):Cd009154.

289. Patki A, Pawar VC. Modulating fertility outcome in assisted reproductive technologies by the use of dydrogesterone. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23 Suppl 1:68-72.
290. Salazar Garcia MD, Mobley Y, Henson J, et al. Early pregnancy immune biomarkers in peripheral blood may predict preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*. 2018;125:25-31.
291. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *Journal of Reproductive Immunology*. 2000;47(2):87-103.
292. Raghupathy R, Al Mutawa E, Makhseed Ma, et al. Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2005;112(8):1096-101.
293. Raghupathy R, Al-Mutawa E, Al-Azemi M, et al. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *Journal of Reproductive Immunology*. 2009;80(1):91-9.
294. Romero R, Yeo L, Miranda J, et al. A blueprint for the prevention of preterm birth: vaginal progesterone in women with a short cervix. *J Perinat Med*. 2013;41(1):27-44.
295. Oates-Whitehead RM, Haas DM, Carrier JA. Progesterone for preventing miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003(4):Cd003511.
296. Coomarasamy A, Williams H, Truchanowicz E, et al. A Randomized Trial of Progesterone in Women with Recurrent Miscarriages. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2141-8.
297. Haas DM, Hathaway TJ, Ramsey PS. Progesterone for preventing miscarriage in women with recurrent miscarriage of unclear etiology. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2019;2019(11):CD003511.
298. Wang XX, Luo Q, Bai WP. Efficacy of progesterone on threatened miscarriage: Difference in drug types. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(4):794-802.
299. Coomarasamy A, Devall AJ, Brosens JJ, et al. Micronized vaginal progesterone to prevent miscarriage: a critical evaluation of randomized evidence. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(2):167-76.
300. Lynch C. Vaginal estrogen therapy for the treatment of atrophic vaginitis. *J Womens Health (Larchmt)*. 2009;18(10):1595-606.
301. Rechberger T, Kulik-Rechberger B, Bartuzi A, et al. Local estrogen therapy – clinical implications – 2012 update. *Ginekologia Polska*. 2012;83(10).

302. Levin VA, Jiang X, Kagan R. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. *Osteoporos Int.* 2018;29(5):1049-55.
303. Ockrim J, Lalani el N, Abel P. Therapy Insight: parenteral estrogen treatment for prostate cancer--a new dawn for an old therapy. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006;3(10):552-63.
304. Walker S. Estrogen and Autoimmune Disease. *Clinical reviews in allergy & immunology.* 2010;40:60-5.
305. Tonguc E, Var T, Ozyer S, et al. Estradiol supplementation during the luteal phase of in vitro fertilization cycles: a prospective randomised study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;154(2):172-6.
306. Seeland U, Coluzzi F, Simmaco M, et al. Evidence for treatment with estradiol for women with SARS-CoV-2 infection. *BMC Medicine.* 2020;18(1):369.
307. Elguero S, Patel B, Rostami P, et al. Estrogen supplementation in the early luteal phase as treatment for unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility.* 2013;100:S298-S9.
308. Estradiol Pretreatment With Misoprostol in Second Trimester Miscarriage. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03479879>.
309. Cunningham M, Gilkeson G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;40(1):66-73.
310. Lee SK, Kim CJ, Kim DJ, et al. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw.* 2015;15(1):16-26.
311. Tsametis CP, Isidori AM. Testosterone replacement therapy: For whom, when and how? *Metabolism.* 2018;86:69-78.
312. Kaplan AL, Hu JC, Morgentaler A, et al. Testosterone Therapy in Men With Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2016;69(5):894-903.
313. Tostain JL, Blanc F. Testosterone deficiency: a common, unrecognized syndrome. *Nat Clin Pract Urol.* 2008;5(7):388-96.
314. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, et al. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(5):1715-44.
315. Morales A, Schulman CC, Tostain J, et al. Testosterone Deficiency Syndrome (TDS) needs to be named appropriately--the importance of accurate terminology. *Eur Urol.* 2006;50(3):407-9.

316. Salter CA, Mulhall JP. Guideline of guidelines: testosterone therapy for testosterone deficiency. *BJU Int.* 2019;124(5):722-9.
317. Davis SR, Baber R, Panay N, et al. Global Consensus Position Statement on the Use of Testosterone Therapy for Women. *Climacteric.* 2019;22(5):429-34.
318. Lai R, Jeyanathan M, Shaler CR, et al. Restoration of innate immune activation accelerates Th1-cell priming and protection following pulmonary mycobacterial infection. *Eur J Immunol.* 2014;44(5):1375-86.

Spis tabel

Tabela 1: Porównanie między grupami: wiek, BMI, średnia liczba ciąż donoszonych, średnia liczba poronień.....	60
Tabela 2: Występowanie chorób przewlekłych w grupach.	61
Tabela 3: Przyjmowanie suplementów diety i kwasu foliowego przed ciążą i w czasie ciąży Grupa kobiet z poronieniami n = 20, kobiet ciężarnych n = 20, kobiet niebędących w ciąży n = 10.....	63
Tabela 4: Stężenia przetestowane podczas wybierania optymalnych stężeń dla doświadczeń.....	67
Tabela 5: Schemat przygotowania płytki hodowlanej. Każde pole tabeli odpowiada dołkowi na płytce.	71
Tabela 6: Spis przeciwciał użytych do pierwszego etapu barwienia	72
Tabela 7: Spis przeciwciał użytych do drugiego etapu barwienia	72
Tabela 8: Różnice w ekspresji cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u kobiet z poronieniami nawykowymi względem kobiet ciężarnych. ↑ - zwiększona ekspresja, ↓ - obniżona ekspresja, - niezmiennona ekspresja.....	92
Tabela 9: Zestawienie różnic w stężeniach rozpuszczalnych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy oraz ich ligandów w formie rozpuszczalnej pomiędzy kobietami z poronieniami nawykowymi a kobietami będącymi w ciąży.	99
Tabela 10: Zestawienie wpływu hormonów płciowych na wykryte różnice pomiędzy kobietami z poronieniami nawykowymi, a kobietami w ciąży. Hodowle nie stymulowane OKT-3.	138
Tabela 11: Zestawienie wpływu hormonów płciowych na wykryte różnice pomiędzy kobietami z poronieniami nawykowymi, a kobietami w ciąży. Hodowle stymulowane OKT-3.....	139
Tabela 12: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	162
Tabela 13: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	163

Tabela 14: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 163

Tabela 15: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 164

Tabela 16: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 164

Tabela 17: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 165

Tabela 18: Wpływ progesteronu o stężeniu 20 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 165

Tabela 19: Wpływ progesteronu o stężeniu 500 ng/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 166

Tabela 20: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego, Hodowla założona z komórek

wyzolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	169
Tabela 21: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	170
Tabela 22: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	170
Tabela 23: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	171
Tabela 24: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	171
Tabela 25: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	172
Tabela 26: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmiennona ekspresja.	172
Tabela 27: Wpływ 17β-estradolu o stężeniu 750 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek	

wyzolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 173

Tabela 28: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 176

Tabela 29: Wpływ dihydrotestosteronu u o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 176

Tabela 30: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 177

Tabela 31: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet ciężarnych, hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 177

Tabela 32: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi, hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, - niezmieniona ekspresja. 178

Tabela 33: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi,

hodowla nie stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, -
niezmieniona ekspresja. 178

Tabela 34: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 250 pg/ml na ekspresję cząsteczek
kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona
z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi,
hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, -
niezmieniona ekspresja. 179

Tabela 35: Wpływ dihydrotestosteronu o stężeniu 500 pg/ml na ekspresję cząsteczek
kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego. Hodowla założona
z komórek wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od kobiet z poronieniami nawykowymi,
hodowla stymulowana OKT-3, n=20. ↑ - zwiększenie ekspresji, ↓ - zmniejszenie ekspresji, -
niezmieniona ekspresja. 179

Zgoda komisji Bioetycznej



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/13./2020

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
w dniu 13 stycznia 2019 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

Dr hab.n.med.Radosław Zagożdżon,
Zakład Immunologii Klinicznej,
ul.Nowogrodzka 59,
02-006 Warszawa

otyżającym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: „Wpływ hormonów płciowych na cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy u kobiet dotkniętych problemem poronień nawykowych oraz kobiet rodzących bez komplikacji.”

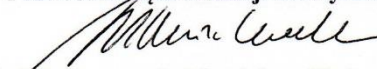
wyraża następującą
opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- ~~• stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*~~

Uwagi Komisji – verte

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

*niepotrzebne skreślić