

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტის მედიცინის ფაკულტეტი

სადოქტორო პროგრამა: „კლინიკური და ტრანსლაციური მედიცინა“

მაია ჭიოკაძე

**ენდომეტრიუმის ლიმფოციტთა სუბპოპულაციები ქალებში
უცნობი გენეზის ორსულობის განმეორებითი დანაკარგებით**

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის

მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაციის

ავტორეფერატი

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

ჯენარა ქრისტესაშვილი-მედიცინის მეცნიერებათა
დოქტორი, პროფესორი
უდო მარკერტი-იენის საუნივერსიტეტო კლინიკის
სამეცნიერო ცენტრის ლაბორატორია „პლაცენტას“
ხელმძღვანელი, პროფესორი (იენა, გერმანია).

თბილისი

2021 წელი

შესავალი

თემის აქტუალობა

ორსულობის განმეორებითი დანაკარგები (ოგდ) რეპროდუქციული ასაკის ქალების 2-5%-ში გვხვდება და არა მარტო ღრმა ფსიქო-ემოციური ტრავმა წყვილებისათვის, არამედ ჯერ კიდევ დიდი გამოწვევაა მათი მკურნალი გინეკოლოგებისათვის მსოფლიო მასშტაბით. ოგდ ასოცირდება სამეანო გართულებების მომატებულ ალბათობასთან და არასასურველ პერინატალურ გამოსავალთან. ქალებში, რომელთაც ანამნეზში აქვთ ოგდ, ხშირია „დიდი სამეანო სინდრომები“- ნაყოფის საშვილოსნოსშიდა განვითარების შეფერხება, პრეეკლამფსია, ნაადრევი მშობიარობა, და მკვდრადშობადობა. ეს კიდევ უფრო ცხადყოფს, რამდენად რთული და აქტუალურია პრობლემა.

ოგდ პოლიეტიოლოგიური პათოლოგიაა და აერთიანებს სრულიად განსხვავებულ დაავადებათა ჰეტეროგენულ ჯგუფს. ჯერ კიდევ ბოლომდე არაა დადგენილი მისი ეტიო-პათოგენეზი, დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის სტრატეგიები. სრულყოფილი გამოკვლევების შემდეგაც კი ოგდ-ს შემთხვევათა 50% აუხსნელი რჩება (უოგდ), რომელთა ძირითად მიზეზად ორსულობის დროს ფეტო-მატერნალურ ზედაპირზე მიმდინარე ტოლეროგენული ალო-იმუნური მექანიზმების დარღვევები მოიაზრება.

უოგდ-ს ალო-იმუნურ მიზეზთაგან ყველაზე წინააღმდეგობრივი პათოგენეზური რგოლია ენდომეტრიალური ფაქტორი- ენდომეტრიუმის შეცვლილი იმუნორეცეპციულობა, რომელიც გამოწვეულია ენდომეტრიალურ ლიმფოციტთა სუბპოპულაციების რაოდენობისა და ფუნქციების ცვლილებებით.

მათი ყველაზე დიდი პოპულაცია წარმოდგენილია საშვილოსნოს ნატურალური კილერი უჯრედებით-uNK (uterine Natural Killer), რომლებიც კრიტიკულ როლს ასრულებენ იმპლანტაციისა და პლაცენტაციის პროცესების სწორად წარმართვაში და ენდომეტრიუმის იმუნური ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში.

გამოყოფენ uNK-ს 2 ძირითად სუბპოპულაციას: **CD56⁺** ან **CD56^{bright} CD16⁻** უჯრედები (ენდომეტრიუმის იმუნურ უჯრედთა ≈70-90%) აექსპრესირებენ **CD56** (uNK-ს ზოგად ზედაპირულ მარკერს) დიდი სიმკვრივით, მოკლებულნი არიან **ციტოტოქსიურობის მარკერს-CD16-ს**, და წარმოადგენენ სხვადასხვა ციტოკინების, ანგიოგენეზური და ზრდის ფაქტორების მდიდარ წყაროს, რითაც ასრულებენ საკვანძო იმუნომოდულატორულ ფუნქციებს ფეტო-მატერნალურ ზედაპირზე.

მეორე სუბპოპულაცია-CD56^{dim}CD16⁺ ფენოტიპურად და ფუნქციურად განსხვავებულია (ენდომეტრიუმში≈10%). იგი აექსპრესირებს CD56-ს დაბალი სიმკვრივით, შეიცავს დიდი რაოდენობით ციტოტოქსიურ გრანულებს და ძირითადად პასუხისმგებელია NK-ს ციტოტოქსიურობაზე. სავარაუდოდ, სწორედ ეს სუბპოპულაცია არის ჩართული ოგდ-ს ჰათოგენეზში.

NK-ს გამოხატული აქვთ აგრეთვე ციტოტოქსიურობის სხვა მარკერი-CD57. ბოლო კვლევებით დემონსტრირებული იქნა CD57⁺ NK-ის მომატებული რაოდენობა ორსულობის როგორც სპონტანური, ასევე განმეორებითი დანაკარგების ჯგუფებში.

uNK-ს იმუნომოდულატორული და ციტოტოქსიური სუბპოპულაციების არაადექვატური რაოდენობა, მათი თანაფარდობის დარღვევა ასოცირდება ენდომეტრიუმის

იმუნორეგეპციულობისა და მთლიანად იმუნური მიკროგარემოს შეცვლასთან, ორსულობის შეწყვეტასთან და უოგდ-სთან.

ენდომეტრიუმის არაადექვატური იმუნორეაქტიულობის ერთ-ერთ სახედ მიიჩნევა ქრონიკული ენდომეტრიტიც (ქე), რომელიც ასევე იწვევს მისი რეგეპტულობის შეცვლას და ორსულობის შეწყვეტას. ოგდ ჯგუფში ნანახი იქნა ქე-ს გავრცელების მაღალი სიხშირე, თუმცა მონაცემები აქაც საკმაოდ ურთიერთსაწინააღმდეგოა.

ამჟამად მიმდინარე გამოწვევა მეცნიერებისათვის არის მაღალ-ინფორმაციული ენდომეტრიალური იმუნური პარამეტრების მოძიება უოგდ ანამნეზის მქონე ქალებში შემდგომი ორსულობის მოსალოდნელი შეწყვეტის რისკის პროგნოზირებისათვის. სამწუხაროდ, დღემდე არ არსებობს ენდომეტრიუმის იმუნური სტატუსის კვლევის სტანდარტული მეთოდი, არ არის დადგენილი იმუნურ უჯრედთა ზღვრული რეფერენტული ნორმები, რის გამოც ვერ ხერხდება სხვადასხვა კვლევების შედეგების შედარება და მათი ტრანსლაცია კლინიკურ პრაქტიკაში. ამდენად, uNK უჯრედების განსაზღვრა ენდომეტრიუმში მზარდ მნიშვნელობას იძენს როგორც სამეცნიერო-კვლევით ცენტრებში, ასევე რეპროდუქციული დარღვევების კლინიკურ პროტოკოლებშიც.

ყოველივე ზემოაღნიშნულის გათვალისწინებით, ჩვენი **კვლევის ჰიპოთეზა**: ქალებში უცნობი გენეზის ორსულობის განმეორებითი დანაკარგებით, ფერტილური ქალებისაგან განსხვავებით, აღინიშნება დისფუნქციური ენდომეტრიუმი-ენდომეტრიუმის ლიმფოციტების სხვადასხვა სუბპოპულაციათა დისბალანსი, რაც ცვლის ენდომეტრიუმის იმუნორეგეპციულობას და საბოლოოდ იწვევს ორსულობის შეწყვეტას.

კვლევის მიზანი: უცნობი გენეზის ორსულობის განმეორებით დანაკარგებსა და ენდომეტრიუმის ლიმფოციტების სხვადასხვა სუბპოპულაციათა იმუნოფენოტიპების დისბალანსს შორის კავშირის დადგენა და შესაძლო, მაღალ-ინფორმაციული იმუნური პარამეტრების გამოვლენა უოგდ ანამნეზის მქონე ქალებში შემდგომი ორსულობის მოსალოდნელი შეწყვეტის რისკის პროგნოზირებისათვის და იმუნოთერაპიის სამიზნე ჯგუფის შერჩევისათვის.

კვლევის ამოცანები

1.საკვლევ (უოგდ) და საკონტროლო ჯგუფის ქალთა ენდომეტრიუმის ბიოპტატებში იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით uNK უჯრედების CD16⁺, CD56⁺, CD57⁺ სუბპოპულაციებისა და CD45⁺ლეიკოციტთა კონცენტრაციების (უჯრედი/მმ²) განსაზღვრა, და მათი შედარება ჯგუფებში.

2.uNK-ს იმუნომარეგულირებელ (CD56⁺) და ციტოტოქსიურ (CD16⁺, CD57⁺) სუბპოპულაციებს შორისა და მათი ლეიკოციტების (CD45⁺) საერთო რაოდენობასთან თანაფარდობების განსაზღვრა სიხშირეთა განაწილების მიხედვით უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში, მათი სხვადასხვა ფენოტიპებისა და ინფორმაციული პარამეტრების გამოვლენის მიზნით.

3.uNK-ს ორ ციტოტოქსიურ სუბპოპულაციას (CD16⁺, CD57⁺) შორის თანაფარდობისა და კორელაციის განსაზღვრა საკვლევ და საკონტროლო ჯგუფებში უფრო მეტი ციტოტოქსიურობის პოტენციალის მქონე მარკერის გამოსავლენად.

4.უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში uNK უჯრედების სხვადასხვა სუბპოპულაციებსა და ლეიკოციტებს შორის კორელაციების დადგენა.

5. უოგდ და საკონტროლო ჯგუფის ქალთა ენდომეტრიუმში CD138+ პლაზმოციტების მარკერის განსაზღვრა ენდომეტრიუმის იმუნურ მიკროგარემოზე ქრონიკული ენდომეტრიტის ზეგავლენის გამორიცხვის მიზნით.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

მკაცრი კრიტერიუმებით შერჩეულ უოგდ ანამნეზის მქონე ქალებში იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით ენდომეტრიუმის კომპლექსური, დინამიური იმუნური გარემოს გამოსაკვლევად გამოყენებულ იქნა ერთდროულად ხუთი იმუნური მარკერი და მათი კომბინაციები. ლიმფოციტთა სუბპოპულაციების იმუნოფენოტიპთა უკეთ დახასიათებისათვის პირველად ჩვენს მიერ გამოყენებულ იქნა ინოვაციური იმუნური პარამეტრები: თანაფარდობები uNKs იმუნომარეგულირებელ და ციტოტოქსიურ სუბპოპულაციებს შორის, ასევე მათი თანაფარდობები ლეიკოციტთა საერთო რაოდენობასთან. ამან საშუალება მოგვცა გამოგვევლინა ლიმფოციტთა შესაძლო პრო-ფერტილური და ციტოტოქსიური იმუნოფენოტიპები, რაც ადრინდელ შრომებში არ ყოფილა აღწერილი უოგდ ჯგუფში.

კვლევის მასალა და მეთოდები

საკვლევი პოპულაცია

იენის ფრიდრიხ შილერის საუნივერსიტეტო კლინიკის სამეცნიერო-კვლევითი ცენტრის ლაბორატორია „პლაცენტას“ (იენა, გერმანია) ენდომეტრიუმის ბიოხანკიდან და მონაცემთა ბაზიდან (≈ 8000 პაციენტი), შერჩეულ იქნა 61 ენდომეტრიუმის ბიოპტატის პარაფინიზირებული ნიმუში (2015-2018წწ.)

ქალებისაგან, რომელთაც ანამნეზში აღენიშნებოდათ უოვდ. მათ შეადგინეს საკვლევი ჯგუფი.

პაციენტების კვლევაში ჩართვის კრიტერიუმი: ქალები, რომელთაც ანამნეზში აღენიშნებოდათ უცნობი გენზის ოვდ. ეს უკანასკნელი განსაზღვრული იყო, როგორც ≥ 2 ორსულობის განმეორებითი დანაკარგი (ჩასახვის მომენტიდან 24 კვირის გესტაციამდე) [ESHRE Guideline on RPL, 2018].

პაციენტების კვლევაში არჩართვის კრიტერიუმი: ქალები, რომელთაც ანამნეზში ჰქონდათ ოვდ-ს გამომწვევი ცნობილი თანმხლები დაავადებები: პოლიციტური საკვერცხეების სინდრომი, ჰიპერპროლაქტინემია, ჰიპერ/ჰიპოთირეოიდიზმი, აუტოიმუნური თირეოიდიტი, შაქრიანი დიაბეტი, ანტიფოსფოლიპიდური სინდრომი, ლუთეინური დისფუნქცია, მეტაბოლური დარღვევები, ინფექციური დაავადებები.

10 პარაფინიზირებული ენდომეტრიალური ნიმუში მიღებულ იქნა ჯანმრთელი, ფერტილური ქალებისაგან-კვერცხუჯრედის დონორებისაგან, რომლებიც რეკრუტირებულნი იყვნენ უკრაინის ეროვნული მედიცინის აკადემიის პედიატრიისა და მეანობა-გინეკოლოგიის იმუნოლოგიის ლაბორატორიაში (კიევი, უკრაინა). ენდომეტრიუმის ბიოპტატების აღება მოხდა ოოციტების სტიმულაციისა და დონაციის პროტოკოლის დაწყებამდე. მათ შეადგინეს საკონტროლო ჯგუფი.

საკონტროლო ჯგუფში ჩართვის კრიტერიუმები: პრაქტიკულად ჯანმრთელი ქალები, რომელთაც ანამნეზში ჰქონდათ ერთი წარმატებული ორსულობა მაინც და არ აღენიშნებოდათ ორსულობის დანაკარგები (თვითნებითი ან ხელოვნური).

საკონტროლო ჯგუფში არჩართვის კრიტერიუმები: რაიმე აუტოიმუნური დაავადება, ინფექციური დაავადებები, ანტიბიოტიკოთერაპია ან ვაქცინაცია ენდომეტრიუმის ბიოფსიის აღებამდე მინიმუმ 3 თვით ადრე.

მონაწილეთა ასაკი მერყეობდა 20-42წწ. ფარგლებში. ფერტილური კონტროლებისა და უოვდ პაციენტების საშუალო ასაკი შეადგენდა 27წ. და 33,5წ. შესაბამისად. ენდომეტრიუმის ბიოპტატები აღებულ იქნა ლუთეინურ ფაზაში (მენსტრუალური ციკლის 19-22-ე დღეებში) pipelle კათეტერით.

კვლევაში ჩართული ყველა მონაწილისგან მიღებულ იქნა წერილობითი ინფორმირებული თანხმობა. კვლევის ჩატარებაზე გაცემულ იქნა ნებართვა იენის საუნივერსიტეტო კლინიკის მედიცინის ფაკულტეტის ლოკალური ეთიკური კომისიის მიერ (რეგისტრაციის N 2019-1305), 1964 წ. ჰელსინკის დეკლარაციისა და მოგვიანებით მიღებული შესწორებების საფუძველზე.

კვლევის მეთოდოლოგია

იმუნურ უჯრედთა მარკერების დეტექცია

იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით.

პარაფინში ჩაყალიბებულ ენდომეტრიუმის ქსოვილში ხდებოდა uNK-ს სუბპოპულაციათა იმუნური მარკერების- **CD16, CD56, CD57**, პლაზმოციტების-**CD138** და **CD45**-პან-ლეიკოციტარული მარკერების დეტექცია.

CD16 და CD56-ისგან განსხვავებით (uNK-ს კლასიკური მარკერები), CD57 რუტინულად გამოიყენება ტერმინალურად დიფერენცირებული, „დაბერებული“ CD8⁺ Tლიმფოციტების იდენტიფიცირებისათვის, თუმცა განსაზღვრავს აგრეთვე დაბალი პროლიფერაციული აქტივობისა და მომწიფების ყველაზე მაღალი

ხარისხის NK-ს სუბპოპულაციას. **CD45⁺** პანლეიკოციტარული მარკერია და აერთიანებს ლეიკოციტთა ყველა სუბპოპულაციას. **CD138⁺**-კი (Syndecan-1), მიჩნეულია პლაზმოციტების ყველაზე სპეციფიურ მარკერად ქე-ს დიაგნოსტიკისათვის.

აღნიშნული მარკერების დეტექციისათვის ჩვენ გამოვიყენეთ **იჰქ მეთოდი**, რომელიც ტრადიციული ჰემატოქსილინ&ეოზინის ტექნიკისგან განსხვავებით გაცილებით სენსიტიური და სპეციფიურია და ოქროს სტანდარტს წარმოადგენს ქსოვილში იმუნური უჯრედების აღმოჩენის, მათი რაოდენობის, ლოკალიზაციისა და ქსოვილში განაწილების ტიპის დასადგენად. ასევე, რაც ძალზე მნიშვნელოვანია, იჰქ მეთოდით იმუნურ უჯრედთა შეფასება შეიძლება ენდომეტრიუმის მთელ სტრომაში, ქსოვილის სხვა კომპონენტებთან(ლუმინალურ ეპითელიუმთან და ჯირკვლებთან) მიმართებაში. ვინაიდან ოგდ-ს ერთ-ერთი პათოგნომური ნიშანი არის სწორედ uNK უჯრედების მიგრაცია და თავმოყრა სუბლუმინალურად, ეპითელიუმის ქვეშ.

გამდინარე ციტომეტრიულ მეთოდთან შედარებით კი **იჰქ მეთოდის** უპირატესობა ის არის, რომ ამ უკანასკნელის დროს არ ხდება ქსოვილის ფერმენტული დამუშავება და არ იკარგება მნიშვნელოვანი ანტიგენური/იმუნოგენური ინფორმაცია.

ენდომეტრიუმის პარაფინიზირებული ბიოპტატები უოგდ და საკონტროლო ჯგუფიდან დაიჭრა მიკროტომით 4 μ m სისქის ანათლებად და მოხდა მათი დატანება ადჰეზიურ SuperFrost/Plus მინებზე (Menzel, Germany). შემდეგ ხდებოდა მიღებული სლაიდების დეპარაფინირება და დეჰიდრატაცია. ანტიგენის გამოყოფა ხორციელდებოდა ციტრატული ბუფერით მაღალ ტემპერატურაზე (>95°C) 15 წთ. შემდეგ სრულდებოდა ნიმუშების ინკუბაცია პირველადი ანტისხეულებით (1სთ.ოთახის t⁰) CD16,

CD56, CD57, CD45, CD138 მარკერებისათვის. აღნიშნული ანტისხეულების სპეციფიკურობა/განზავებები წარმოდგენილია ცხრილში (ცხრ.1). შემდეგ ეტაპზე მიმდინარეობდა სლაიდების ინკუბირება (30წთ.ოთახის t⁰) მეორადი ანტისხეულებით- polymer-HRP anti-mouse, clone: DAK-GO1, isotype: IgG1; პეროქსიდაზული რეაქცია მიღწეულ იქნა DAB-ით (3,3'-Diaminobenzidine; Dako, Germany). ბირთვები დამატებით იღებებოდა H&E-ით.

ცხრ.1. იმუნოჰისტოქიმიური ანალიზის დროს გამოყენებული ანტისხეულების მახასიათებლები

ანტისხეულის დასახელება	ტიპი/კლონი	მწარმოებელი	განზავება
CD16	Mouse Monoclonal-DJ130c	Santa Cruz, USA	1:200
CD45	Mouse Monoclonal 2B11+PD7/26	Dako, Germany	1:200
CD56	Mouse Monoclonal-123C3	Dako, Germany	1:100
CD57	Mouse Monoclonal-TB01	Dako, Germany	1:100
CD138	Mouse Monoclonal-MI15	Dako, Germany	1:100

მხედველობის ველის შერჩევა და იმუნოჰისტოქიმიური უჯრედთა დათვლის მეთოდოლოგია

ყველა სლაიდი გამოკვლეულ იქნა Zeiss Axio Imager A2 მიკროსკოპით და დოკუმენტირებული იქნა Zen Blue software (Zeiss, გერმანია) პროგრამით. უახლესი პროტოკოლის მიხედვით

(Lash et al. 2016), პირველი საკვლევი ველის შერჩევა ხდებოდა რანდომულად, ლუმინალური ეპითელიუმის მოსაზღვრე სტრომაში. შემდეგი ველების არჩევა ხდებოდა რიგრიგობით მარცხნივ და მარჯვნივ, ისე რომ ლუმინალური ეპითელიუმი შეძლებისდაგვარად დარჩენილიყო მხედველობის არეში. შერჩეულ იქნა 5 არა-გადამფარავი მიკროსკოპული ველი 200x გადიდებაზე, მოხდა მათი მიკროფოტოგრაფირება და დოკუმენტირება თითოეული მონაწილისათვის.

იმუნოჰოზიტიური უჯრედი განსაზღვრული იყო როგორც H&E-ით შედეგილ ბირთვთან ასოცირებული იმუნოჰოზიტიური მემბრანული სტრუქტურა. უჯრედთა შორის არსებული იმუნოჰოზიტიური მემბრანის ცალკეული ფრაგმენტები არ იქნა დათვლილი. ის უჯრედები, რომლებიც მდებარეობდა სისხლძარღვებში, ლუმინალურ და ჯირკვლოვან ეპითელიუმში, ასევე ჭარბი ლორწოთი და ერთროციტებით მოცულ არეებში არ იქნა ჩათვლილი. მონაცემები შეფასდა როგორც იმუნოჰოზიტიურ უჯრედთა საშუალო რაოდენობა მმ² ზე. სხვადასხვა მარკერებს შორის შეფარდებები დათვლილ იქნა და გამოისახა პროცენტულობით (%).

სტატისტიკური ანალიზის მეთოდები

კვლევის შედეგების ანალიზი განხორციელდა GraphPad Prism software-ით (GraphPad software, Inc., San Diego, Ca, USA). მონაცემების განაწილება არ იყო ნორმალური, ამიტომ მათი ანალიზისათვის გამოვიყენეთ არაპარამეტრული მეთოდები.

CD45⁺, CD56⁺, CD16⁺, CD57⁺ იმუნოჰოზიტიური უჯრედები თითოეულ მიკროფოტოგრაფიულ ველში დათვლილი იყო

მანუალურად FIJI/Image J software (National Institutes of Health)ით. გამოთვლილ იქნა მათი კონცენტრაციების საშუალო სიდიდეები (უჯრედი/მმ²). ქრონიკული ენდომეტრიტის მარკერი-CD138⁺ პლაზმოციტები დათვლილი იქნა ხელახლა უახლესი კრიტერიუმის თანახმად (Liu, 2018) და გამოისახა საშუალო კონცენტრაციებით- უჯრედი/10მმ²-ით. გამოთვლილ იქნა თანაფარდობები მარკერებს შორის და გამოხატულ იქნა პროცენტებში. მოხდა მათი კლასიფიცირება დაბალ, საშუალო და მაღალ სიდიდეებად. Mann-Whitney-ს არაპარამეტრული ტესტის საშუალებით განხორციელდა თითოეული მარკერის კონცენტრაციის საშუალო სიდიდეებს შორის შედარება უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში.

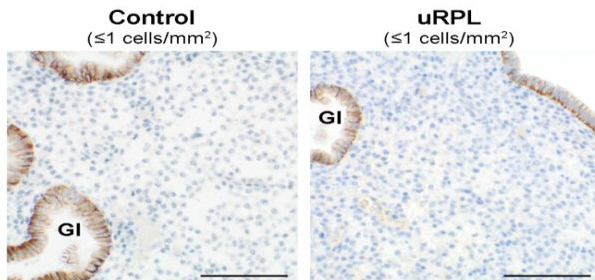
სპირმანის კოეფიციენტის არაპარამეტრული კორელაციური ტესტი (Spearman (r) გამოყენებულ იქნა უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებს შორის: CD45⁺, CD56⁺, CD16⁺, CD57⁺ და CD138⁺ მარკერთა ურთიერთკორელაციის შესაფასებლად და მისი სტატისტიკური სარწმუნოობის შესამოწმებლად უოგდ ჯგუფის CD56^{low}, CD56^{normal} და CD56^{high} ქვეჯგუფების მიხედვით (uNK-ს რაოდენობრივი რანჟირების საფუძველზე).

Chi-square test გამოყენებულ იქნა სიხშირეების განაწილების შესადარებლად უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში. კერძოდ, შედარებულ იქნა CD45⁺ ლეიკოციტებისა და uNK-ს სუბპოპულაციების- CD56⁺, CD16⁺, CD57⁺ მარკერების სიხშირეების განაწილება. სარწმუნოობის კრიტერიუმად გამოყენებულ იქნა P სიდიდე. $P \leq 0.05$ ჩათვლილ იქნა სტატისტიკურად სარწმუნოდ.

კვლევის შედეგები და განსჯა

CD138-ენდომეტრიალური პლაზმური უჯრედების მარკერი

CD138⁺ პლაზმოციტების იმუნოლოკალიზაცია საკონტროლო და საკვლევი ჯგუფების ენდომეტრიუმების ნიმუშებში ჩატარებულ იქნა ქრონიკული ენდომეტრიტის გამოსავლენად (ქე). საკონტროლო ჯგუფში შემთხვევათა 20% წარმოდგენილი იყო <3 CD138⁺ პლაზმური უჯრედი/10მმ²-ზე, შემთხვევათა 80%-ში კი ეს უჯრედები არ იქნა ნანახი. ამის მსგავსად, უოგდ ჯგუფში ნიმუშების 22%-ში აღმოჩნდა <3 CD138⁺ პლაზმური უჯრედი/10მმ²-ზე, 78% კი ნეგატიური იყო აღნიშნული უჯრედების შემცველობაზე. უახლესი კრიტერიუმით [Liu, 2018], (რომლის თანახმად ქე დიაგნოსტირდება ≥ 5.15 CD138⁺ პლაზმური უჯრედი/10მმ²-ზე), ჩვენს საკვლევ და საკონტროლო ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება არ იქნა ნანახი. ამდენად, აღნიშნული ჯგუფების ენდომეტრიუმის ნიმუშებში ქე-ს პოტენციური ზეგავლენა გამოირიცხა (სურ.1). ამის ერთ-ერთი მიზეზი შესაძლოა იყოს საკვლევი პოპულაციის მცირერიცხოვნება და ასევე ქე-ს სხვადასხვა სადიაგნოსტიკო კრიტერიუმები.



სურ.1. CD138⁺ პლაზმოციტების იმუნოჰისტოლოკალიზაცია უოგდ(uRPL) და საკონტროლო ჯგუფებში. სტრომაში პლაზმოციტები $\leq 1/მმ^2$, ენდომეტრიუმის ჯირკვლები (GI) პოზიტიურია CD138⁺ ის მიმართ. სკალის მასშტაბი=100 μ m.

საკონტროლო და საკვლევ ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი განსხვავება არ იქნა ნანახი ცალკე აღებული **CD45+** ($P=0.06$), **CD56+** ($P=0.99$) და **CD57+** ($P=0.14$) მარკერების საშუალო სიდიდეებს შორის: გრაფ.1(a); გრაფ.2(c); გრაფ.3(g) შესაბამისად. თუმცა, ამ მარკერების შემდეგმა ჩაღრმავებულმა ანალიზმა **სიხშირეთა განაწილების მიხედვით** (frequency distributions) აჩვენა მათი განსხვავებული განაწილება ($P<0.001$ **CD45**, **CD56** და **CD16**-სთვის, $P<0.003$ **CD57**-სთვის) უოგდ ჯგუფში კონტროლებთან შედარებით: გრაფ.1,b; გრაფ.2,d; გრაფ.3,f და გრაფ.3,h. შესაბამისად. ამ მარკერთა განაწილების განსაკუთრებული მახასიათებლები ემყარებოდა uNK-ს რაოდენობრივ რანჟირებას (ცხრ.2).

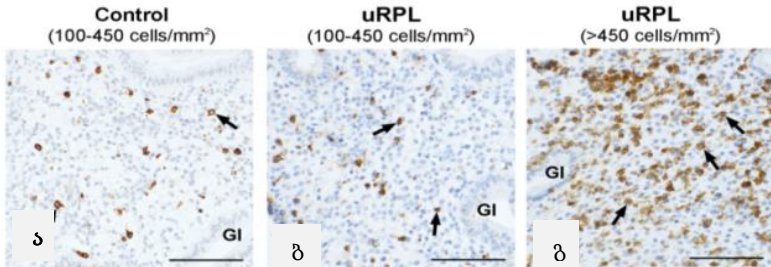
ცხრ.2. uNK-ს სუბპოპულაციათა და ლეიკოციტების რაოდენობრივი რანჟირება უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში.

		CD16 უჯრ/მმ ² . N (%)		CD57 უჯრ/მმ ² . N (%)		CD45 უჯრ/მმ ² . N (%)		CD56 უჯრ/მმ ² . N (%)		
		0-30	>30	0-30	>30	100-450	>450	0-90 (დაბალი)	90-300 (ნორმალ- ური)	>300 (მაღალი)
ჯგუფები	უოგდ	9 (14,8%)	52 (85,2%)	21 (34,4%)	40 (65,6%)	37 (60,7%)	24 (39,3%)	18 (29,5%)	27 (44,3%)	16 (26,2%)
	საკონტროლო	8 (80%)	2 (20%)	6 (60%)	4 (40%)	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (100%)	0 (0%)

CD45-პან-ლეიკოციტარული მარკერი

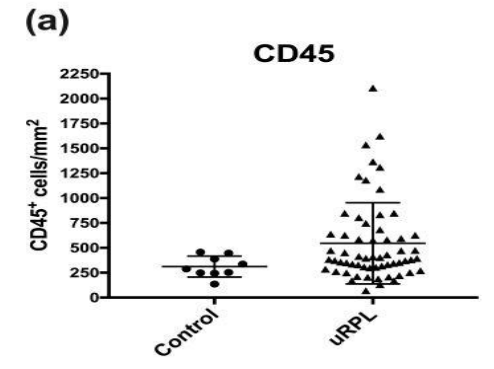
საკონტროლო ჯგუფის ქალთა ენდომეტრიუმის ნიმუშებში CD45+ ლეიკოციტთა კონცენტრაცია იყო 100-450 უჯრ/მმ²-ის ფარგლებში. მხოლოდ ერთ ნიმუშში აღინიშნა ამ უჯრედთა

ძლიერ დიდი რაოდენობა-2160 უჯრ/მმ². რის გამოც იგი კვალიფიცირდა როგორც მწვავე ინფლამატორული პროცესი.



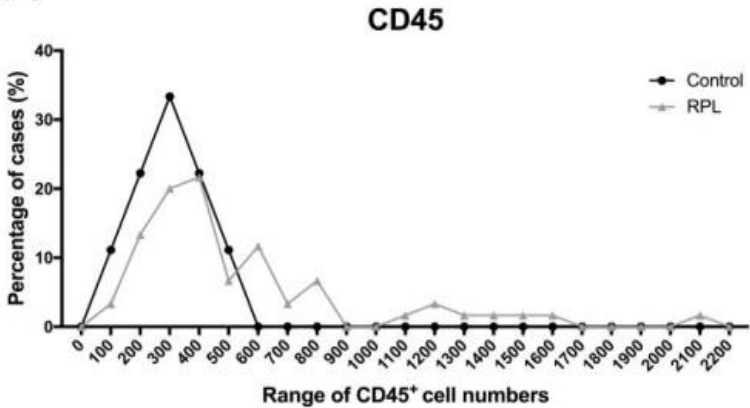
სურ.2. CD45⁺ ლეიკოციტთა იმუნოლოკალიზაცია საკონტროლო(ა) და უოგდ (uRPL) ჯგუფებში: ბ)100-450, გ)>450 უჯრ/მმ² ქვეჯგუფებში. მასშტაბი=100μm.

მიუხედავად ამ შემთხვევის გამოხატულებისა კორელაციურ გრაფიკებზე, მისი სიდიდე არ იქნა ჩათვლილი საკონტროლო ჯგუფის მონაცემთა დათვლისას. უოგდ პაციენტებში შემთხვევათა 65%-ში CD45⁺ რაოდენობა იყო საკონტროლო ჯგუფის მონაცემთა ფარგლებში (100-450 უჯრ/მმ²), მაშინ როცა 35%-ში აღინიშნა >450 უჯრ/მმ² (P<0.001; სურ.2 და გრაფიკი 1.a,b).



გრაფიკი 1.a. CD45-ის კონცენტრაციის საშუალო სიდიდეები უოგდ (uRPL) და საკონტროლო ჯგუფში.

(b)

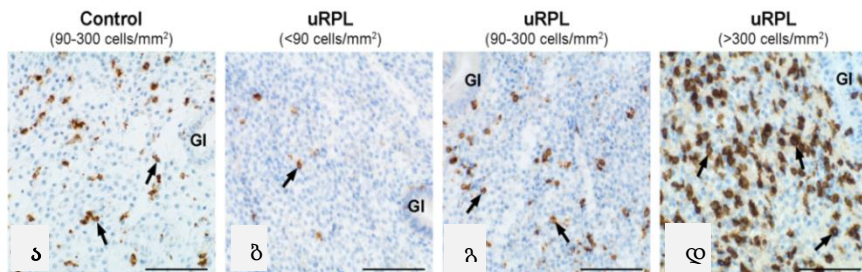


გრაფიკი.1,ბ. CD45-ის ფარდობითი სიხშირის განაწილება ლეიკოციტთა რაოდენობრივი რანჟირების საფუძველზე უოგდ (uRPL) და საკონტროლო ჯგუფებში. საშუალო სიდიდეები კლასიფიცირებულია 100უჯრ/მმ² რანგებად. ფარდობითი სიხშირე უჩვენებს მოცემული უჯრედული რანგის შემცველ ნიმუშთა პროცენტულობას.

CD56-uNK-ს ზოგადი მარკერი

საკონტროლო ჯგუფის ენდომეტრიუმის ნიმუშებში CD56⁺-ს კონცენტრაცია იყო 90-300 უჯრ/მმ² ფარგლებში. ზემოთაღნიშნულ მწვავე ინფლამატორულ ნიმუშში აღინიშნა CD56⁺ uNK-ს მომატებული რაოდენობა (877 უჯრ/მმ²). უოგდ ჯგუფში შემთხვევათა მხოლოდ 47%-ში აღნიშნული მარკერის გავრცელება მსგავსი იყო საკონტროლო ჯგუფის შესაბამისი სიდიდისა, 22%-ს აღნიშნებოდა CD56⁺uNK-ს დაქვეითებული რაოდენობა, 32%-ს კი- მომატებული (>300 უჯრ/მმ², P<0.001).

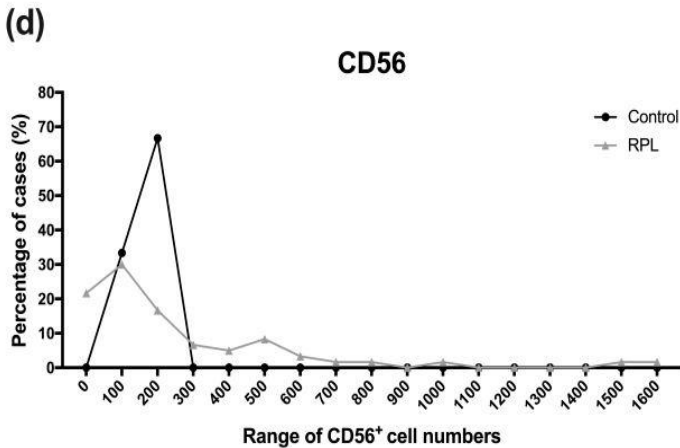
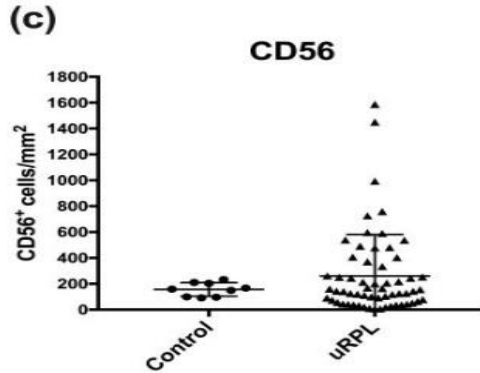
მონაცემთა შემდგომი დამუშავების მიზნით, CD56⁺ uNK-ს მიღებული კონცენტრაციების რანჟირების საფუძველზე უოგდ ჯგუფის პაციენტები დაიყო 3 ქვეჯგუფად: დაბალი (CD56^{low} < 90 უჯრ/მმ²), ნორმალური (CD56^{normal} 90-300 უჯრ/მმ²) და მაღალი კონცენტრაციებით (CD56^{high} > 300 უჯრ/მმ²) (სურ.3, გრაფიკი 2.c,d).



სურ.3. CD56⁺ uNK-ს იმუნოჰისტოლოგალიზაცია საკონტროლო(ა) და უოგდ(uRPL) ჯგუფის ბ) დაბალი, გ) ნორმალური და დ) მაღალი კონცენტრაციების ნიმუშებში. სკალის მასშტაბი=100µm. GI-ენდომეტრიუმის ჯირკვლები

CD56⁺ uNK-ს იპქ მეთოდით დეტექცია ენდომეტრიუმში ბოლო ათწლეულების განმავლობაში ითვლებოდა ენდომეტრიუმის იმუნური სტატუსის განმსაზღვრელ ძირითად მარკერად, თუმცა ძალზე წინააღმდეგობრივი დასკვნებით. წინა კვლევებში, სადაც დემონსტრირებული იყო ოგდ ჯგუფში CD56⁺ uNK-ს მომატებული კონცენტრაცია საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით და ყურადღება არ ექცეოდა მათ დაბალ მაჩვენებელს (რომელიც ასევე მავნე ზეგავლენას ახდენს ენდომეტრიუმის რეცეპციულობაზე), ცალკე აღებულ ამ მარკერს არ აღმოაჩნდა პროგნოზული ღირებულება მომდევნო ორსულობის შესაძლო შეწყვეტის რისკის განსაზღვრისათვის და გაურკვეველი დარჩა მისი „მაღალი მაჩვენებლის“ რელევანტობა.

ამგვარად, ჩვენს შრომაში, ისევე როგორც ზოგიერთ უახლეს კვლევაში, ნანახი იქნა, რომ უოგდ პაციენტთა ენდომეტრიუმი, ფერტილური ქალებისაგან განსხვავებით, ხასიათდება CD56⁺uNK შემცველობის ფართო დიაპაზონით, და შესაძლოა დაყოფილ იყოს



გრაფიკი 2. CD56 კონცენტრაციის საშუალო სიდიდისა (c) და მისი ფარდობითი სიხშირის განაწილება uNK-ს რანჟირების საფუძველზე (d) უოგდ (uRPL) და საკონტროლო ჯგუფებში. მარჯერის სიდიდეები კლასიფიცირებულია 100 უჯრ/მმ²

რანგებად (d). ფარდობითი სიხშირე უზენეს მოცემული უჯრედული რანგის შემცველ ნიმუშთა პროცენტულობას.

დაბალი, ნორმალური და მაღალი შემცველობის შემთხვევებად. ეს უფრო მეტად ამყარებს იმ მოსაზრებას, რომ ჯანმრთელი ქალების ენდომეტრიუმში არსებობს uNK-ს განსაკუთრებული, პროფერტილური კონცენტრაცია. გარდა ამისა, დაბალი, ნორმალური და მაღალი შემცველობის ქვეჯგუფებში მათი განსხვავებული ფენოტიპების არსებობა მიუთითებს განსხვავებული პათოლოგიური მექანიზმების არსებობაზე ამ ქვეჯგუფებში. ეს განსხვავებები განპირობებულია ენდოგენური იმუნური დისფუნქციებით თუ ეგზოგენური ფაქტორებით (შეცვლილი მიკრობიომები ენდომეტრიუმში) ჯერ კიდევ გამოსაკვლევია და ჩაღრმავებულ შესწავლას მოითხოვს.

რიგი ავტორები CD56⁺ uNK-ს ექსპანსიას ენდომეტრიუმში ხსნიან ანთებითი მდგომარეობითა და ბაქტერიალური კომპონენტების მიმართ იმუნური რეაქციებით, რასაც ადგილი აქვს ქრონიკული ენდომეტრიტის დროს. მისი როლი ენდომეტრიუმის ლიმფოციტთა სხვადასხვა სუბპოპულაციებზე არ არის ბოლომდე შესწავლილი. uNK-ს რაოდენობისა და ფუნქციების ცვლილებების გარდა, ენდომეტრიუმის იმუნორეგულაციულობის შეცვლის მიზეზად მიუთითებენ იმუნომარეგულირებელ და ციტოტოქსიურ სუბპოპულაციებს შორის თანაფარდობების დარღვევაზე ამ უკანასკნელთა სასარგებლოდ. ზოგიერთი კვლევის მიხედვით, ქე-ს დროს აღმოჩენილ იქნა CD56⁺ uNK-ს მნიშვნელოვნად დაბალი დონე, ვიდრე შემთხვევებში ქე-ს გარეშე. ამასვე მოწმობს ჩვენი საკვლევი უოგდ ჯგუფის რამდენიმე შემთხვევა CD56^{low} uNK ქვეჯგუფიდან, სადაც დადასტურდა ქე-ს არსებობა. ეს შესაძლოა აიხსნას

ანთებითი ენდომეტრიუმის დეფექტური და შენელებული რემოდელირებით uNK-ს რაოდენობის შემცირების გამო, რომლებიც საკვანძო უჯრედებს წარმოადგენენ ენდომეტრიუმის რეიუვენაციისა და ნორმალური რეცეპციულობის მისაღწევად.

ზოგიერთ ადრეულ პუბლიკაციაში ოგდ ჯგუფში <40 CD56⁺ უჯრ/მმ² ნიმუშები განხილული იყო როგორც uNK-ს დაბალი შემცველობის შემთხვევები. ჩვენს კვლევაში, რომელიც მოიცავდა ფერტილური ქალების მცირე საკონტროლო კოჰორტას, ჩვენ ვერ აღმოვაჩინეთ <90 უჯრ/მმ² -ზე ნაკლები შემცველობის ვერცერთი ნიმუში. გარდა ამისა, CD56^{low}uNK ქვეჯგუფში აღინიშნებოდა საკონტროლო ჯგუფისგან განსხვავებული CD56/CD45, CD16/CD56, CD57/CD56 თანაფარდობები. ამ მონაცემებმა გვაფიქრებინა, რომ დაგვესახა უფრო მკაცრი cut-off სიდიდე (90 უჯრ/მმ²), იმისათვის რათა მოგვეხდინა uNK-ს დაბალი შემცველობის შემთხვევების იდენტიფიცირება, რომელთა ვალიდაციაც უნდა მოხდეს შემთხვევათა უფრო დიდი ნიმუშების კვლევისას.

CD16 და CD57 - uNK უჯრედების ციტოტოქსიურობის მარკერები

ენდომეტრიალური CD16⁺ და CD57⁺ uNK-ს გაზრდილი რაოდენობა, რომელიც ბევრ შრომაში იქნა დემონსტრირებული ოგდ პაციენტებში, მიუთითებს uNK-ს ამ სუბპოპულაციების ციტოტოქსიურობის გაზრდილ პოტენციალზე. თუმცა, დღემდე საკამათოა, რომელი უფრო ციტოტოქსურია მათ შორის. ჩვენს საკვლევ და საკონტროლო ჯგუფებში ენდომეტრიუმის ციტოტოქსიურობის სტატუსის უკეთ შესასწავლად და ამ ორ

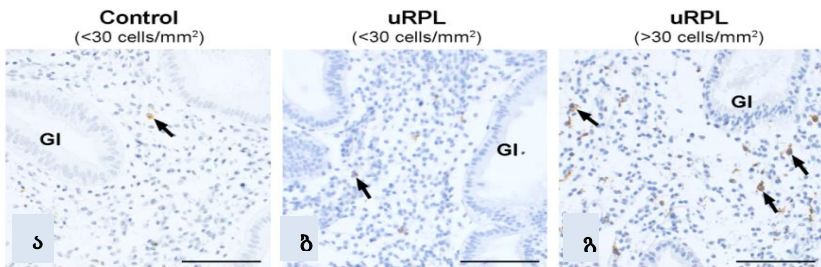
მარკერს შორის მეტი ტოქსიურობის პოტენციალის გამოსავლენად, ენდომეტრიუმის ბიოპტატები გამოვიკვლიეთ ერთდროულად ორივე მარკერზე.

საკონტროლო ჯგუფის ქალთა 89%-ის ენდომეტრიუმში აღინიშნა CD16⁺ uNK-ს შედარებით დაბალი მაჩვენებელი (<30 უჯრ/მმ²). ერთ ნიმუშში (11%) ეს სიდიდე აღწევდა 64 უჯრ/მმ²-ს, ხოლო ზემოთაღნიშნულ ინფლამატორულ ნიმუშში კი - 178 უჯრ/მმ². უოგდ ჯგუფში, საკონტროლსაგან განსხვავებით, შემთხვევათა მხოლოდ 15%-ში იქნა დადგენილი CD16⁺uNK-ს დაბალი მაჩვენებელი (<30 უჯრ/მმ²), დანარჩენ 85%-ს კი აღინიშნა ამ უჯრედების მაღალი კონცენტრაცია.

ჩვენს კვლევაში სტატისტიკურად ყველაზე სარწმუნო განსხვავება საკვლევ და საკონტროლო ჯგუფებს შორის აღმოჩნდა CD16⁺ მარკერის განაწილებაში, როგორც საშუალო სიდიდის მიხედვით (p<0.001), ასევე სიხშირულ განაწილებაში (Chi² ტესტი=9,64; P<0.001) <30 უჯრ. და >30 უჯრ. შემცველი ქვეჯგუფების მიხედვით (ცხრ.3; სურ.4; გრაფ.3,e,f).

ცხრ.3. CD16⁺ -ის სიხშირული განაწილება უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში.

CD16 ⁺	<30 უჯრ/მმ ² .	>30 უჯრ/მმ ²	საერთო რაოდენობა
საკონტროლო ჯგუფი	8 (89%)	2 (11%)	10 (100%)
უოგდ ჯგუფი	15 (15%)	46 (85%)	61 (100%)
საერთო რაოდენობა	23	48	71 (100%)



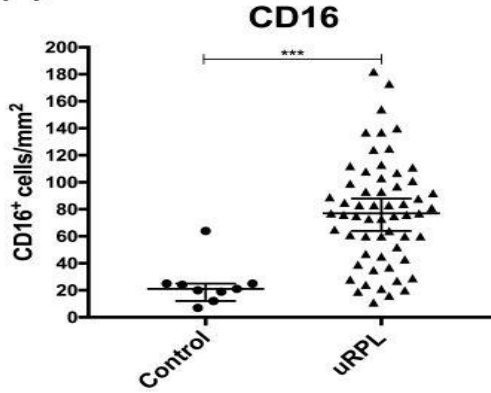
სურ.4. CD16⁺uNK-ს იმუნოჰისტოლოკალიზაცია საკონტროლო(ა) და უოვდ (uRPL) ჯგუფებში: ბ) <30უჯრ/მმ² და გ)>30 უჯრ/მმ². სკალის მასშტაბი= 100 μm.

აღსანიშნავია, რომ CD56^{normal} ქვეჯგუფში, CD16⁺ და CD57⁺ ციტოტოქსიურობის მარკერები იყო მომატებული, ხოლო CD56^{low} ქვეჯგუფში კი მათი გაზრდილი დონე აღმოაჩნდათ პაციენტთა ≈40%-ს. დანარჩენ 60%-ში CD16⁺-ს რაოდენობა აჭარბებდა კიდევ CD56⁺-ს რიცხვს, რაც მიუთითებს CD56⁺ uNK-ს დაქვეითებულ რაოდენობაზე ან CD56^{dim} uNK ან სხვა იმუნური უჯრედების (მაგ. მაკროფაგების) მიერ CD16⁺ -ის გამოხატულ ექსპრესიაზე.

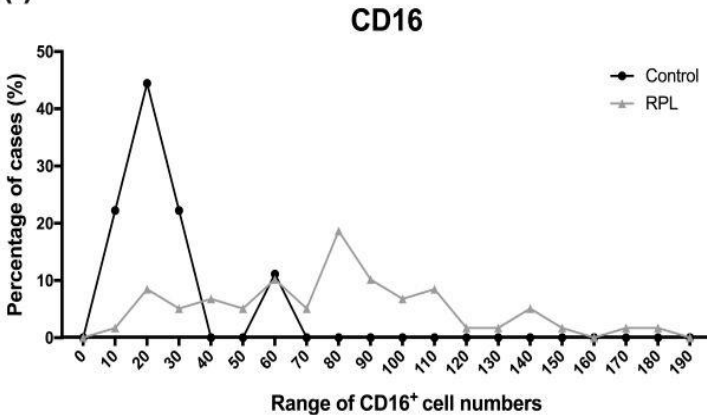
საყურადღებო იყო ერთ-ერთი შემთხვევა ჩვენი საკვლევი CD56^{low} ქვეჯგუფიდან, სადაც uNK-ს დაბალი შემცველობისა და ქეს არარსებობის ფონზე, მხოლოდ CD16⁺ და CD57⁺ ციტოტოქსიურ სუბპოპულაციათა გამოხატული დისბალანსის გამო პაციენტს აღენიშნებოდა ორსულობის 14 თვითნებითი შეწყვეტა.

საკონტროლო ჯგუფის 56%-ში ციტოტოქსიურობისა და ტერმინალური მომწიფების მაჩვენებელი CD57⁺ uNK-ს კონცენტრაცია განისაზღვრა <30 უჯრ/მმ²-ით, 44%-ში კი ამ მაჩვენებელმა შეადგინა >30 უჯრ/მმ². ამის საპირისპიროდ, უოვდ ჯგუფში აღნიშნული მარკერის შედარებით დაბალი კონცენტრაცია (<30 უჯრ/მმ²) აღინიშნა შემთხვევათა 32%-ში, მაშინ როცა ეს მარკერი უფრო მაღალი კონცენტრაციით (>30 უჯრ/მმ²) დადგინდა შემთხვევათა 68%-ში (P<0.001; სურ.5; გრაფიკი 3.გ,ჰ).

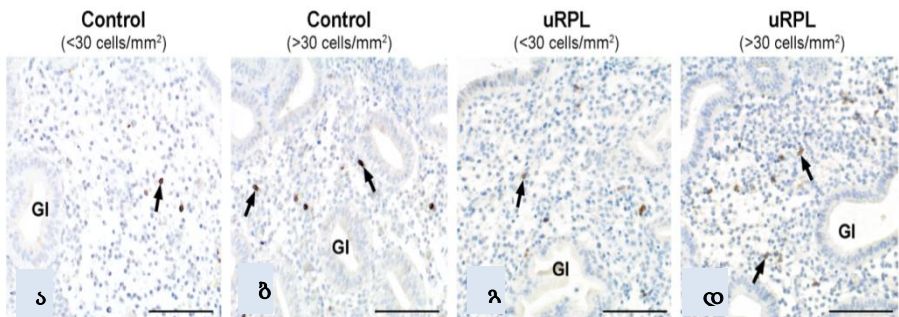
(e)



(f)



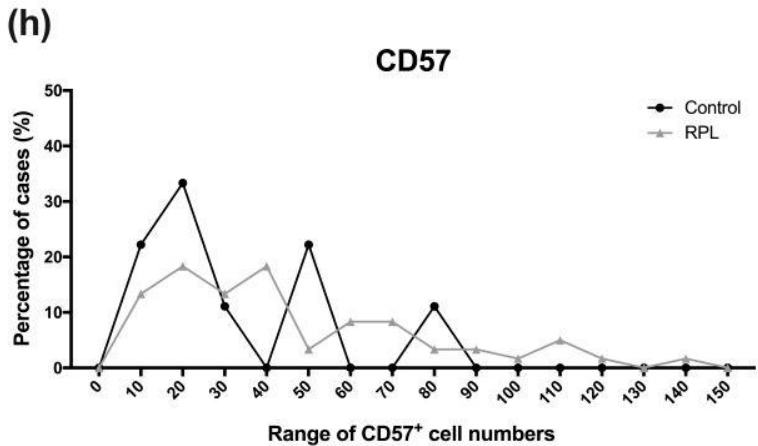
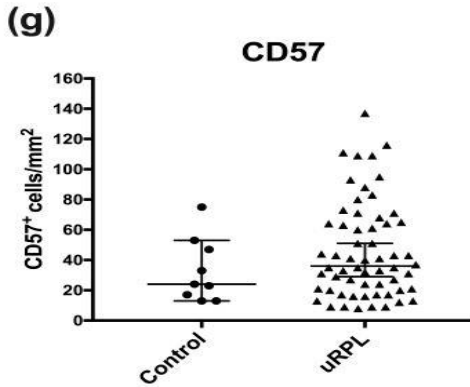
გრაფიკი 3. CD16 კონცენტრაციის საშუალო სიდიდისა (უჯრ/მმ²) (e) და მისი ფარდობითი სიხშირის განაწილება uNK-ს რანჟირების საფუძველზე (f) უოგდ(uRPL) და საკონტროლო ჯგუფებში. CD16 კლასიფიცირებულია 10უჯრ/მმ² რანგებად(f). ფარდობითი სიხშირე უჩვენებს მოცემული უჯრედული რანგის შემცველ ნიმუშთა პროცენტულობას შესაბამის ჯგუფში. *** P<0.001.



სურ.5. CD57⁺ uNK-ს იმუნოჰისტოლოკალიზაცია საკონტროლო: ა) <math><30</math> უჯრ/მმ², ბ) >math>>30</math> უჯრ/მმ² და უოგდ (uRPL) ჯგუფებში: გ) <math><30</math> უჯრ/მმ², დ) >math>>30</math> უჯრ/მმ². სკალის მასშტაბი = 100 μm . GI-ენდომეტრიუმის ჯირკვლები

როგორც ჩვენი კვლევით დადგინდა, CD16⁺ და CD57⁺ უჯრედებს ჰქონდათ განსხვავებული შეფარდებითი დონე უოგდ ჯგუფში (CD56⁺ uNK უჯრედების რაოდენობრივი რანჟირების მიხედვით). გარდა ამისა, ამ ორ ციტოტოქსიურ მარკერს შორის, ჩვენს საკვლევ უოგდ პოპულაციაში, ნანახი იქნა CD16⁺ uNK უჯრედების პრედომინანტურობა CD57⁺ უჯრედებთან შედარებით.

უოგდ-CD56^{high} ქვეჯგუფში, დანარჩენი ქვეჯგუფებისაგან განსხვავებით, CD57⁺ უჯრედები წარმოდგენილი იყო CD56-სთან შედარებით დაბალი პროპორციით. იმის გათვალისწინებით, რომ CD57 მარკერი ექსპრესირებულია ტერმინალურად დიფერენცირებულ NK უჯრედებზე, ეს შედეგი შესაძლოა მიუთითებდეს ამ ტიპის უჯრედების დაყოვნებულ დიფერენციაციაზე უოგდ-ს ზოგიერთ შემთხვევაში.



გრაფიკი 3. CD57 კონცენტრაციის საშუალო სიდიდისა (უჯრ/მმ²) (g) და მისი ფარდობითი სიხშირის განაწილება uNK-ს რანჯირების საფუძველზე (h) უოგდ(URPL) და საკონტროლო ჯგუფებში. CD57 კლასიფიცირებულია 10 უჯრ/მმ² რანგებად. ფარდობითი სიხშირე უჩვენებს მოცემული უჯრედული რანგის შემცველ ნიმუშთა პროცენტულობას შესაბამის ჯგუფში

ლიმფოციტთა სუბპოპულაციებსა და ლეიკოციტებს შორის ურთიერთდამოკიდებულების გარკვევის მიზნით, გამოყენებულ იქნა სპირმანის კოეფიციენტის კორელაციური ტესტი (Spearman (r) უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში CD45⁺, CD56⁺, CD16⁺, და CD57⁺ მარკერთა ურთიერთკორელაციის შესაფასებლად და ამ კორელაციის სტატისტიკური მნიშვნელობის შესამოწმებლად უოგდ-ს CD56^{low}, CD56^{normal} და CD56^{high} ქვეჯგუფებში (გრაფ.4,a,c; გრაფ.5, e,g).

ენდომეტრიუმის რთულ და დინამიურ ქსოვილში იმუნოლოგიური დისბალანსის კომპლექსურობის უკეთ წარმოჩენის მიზნით, გამოვიყენეთ აგრეთვე ახალი ინოვაციური პარამეტრები: ცალკეულ მარკერთა კონცენტრაციების გარდა განვსაზღვრეთ მათი შეფარდებითი წილი ენდომეტრიალური ლეიკოციტების საერთო პოპულაციაში. ასევე, CD16⁺ და CD57⁺ სუბპოპულაციების შეფარდებითი წილი uNK-უჯრედების საერთო რაოდენობასთან მიმართებაში.

CD56/CD45 კორელაცია და თანაფარდობა

CD45⁺ ლეიკოციტების კონცენტრაცია საკონტროლო ჯგუფში დადებითად კორელირებდა CD56⁺ uNK-ს რაოდენობასთან ($r=0.683$; $P<0.01$). ამის საპირისპიროდ, ამ მარკერებს შორის კორელაცია არ გამოვლინდა უოგდ-ს არცერთ ქვეჯგუფში: CD56^{low} ($r=0.004$; $P=0.99$); CD56^{normal} ($r=0.3$; $P=0.14$); CD56^{high} ($r=-0.239$; $P=0.39$).

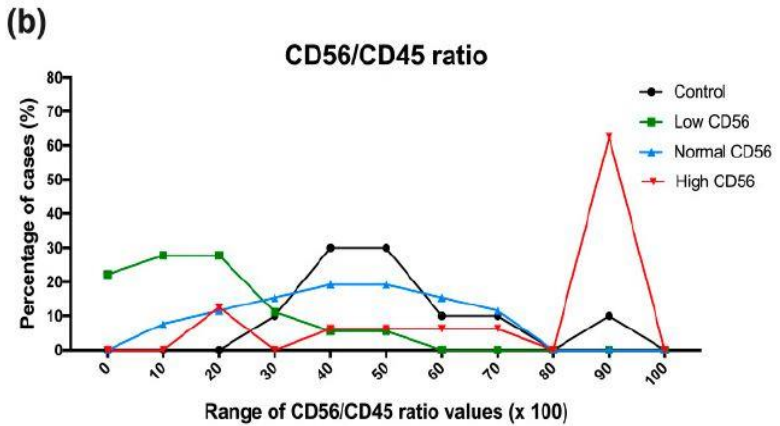
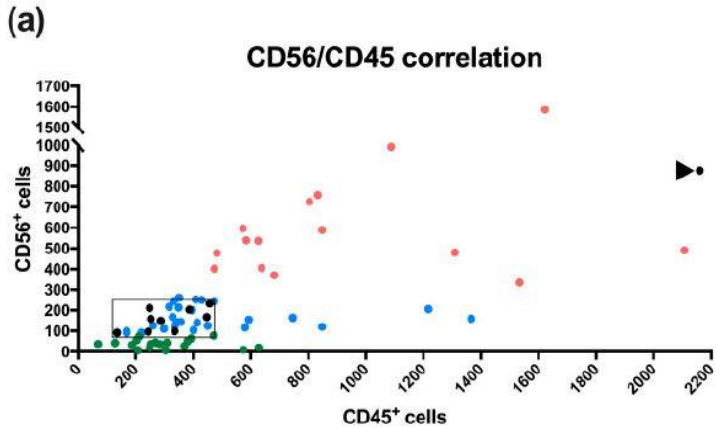
CD56/CD45 თანაფარდობის ანალიზის შედეგად გამოვლინდა, რომ ფერტილური კონტროლების ენდომეტრიუმში uNK უჯრედები შეადგენდნენ ლეიკოციტთა საერთო რაოდენობის

30-70%-ს. ერთ ნიმუშში ამ მაჩვენებელმა მიაღწია 85%-ს. CD56^{normal} ქვეჯგუფში შემთხვევათა 81%-ში აღინიშნა CD56/CD45 თანაფარდობის მსგავსი მაჩვენებელი, როგორც იყო საკონტროლო ჯგუფში. მაშინ როცა ამავე ქვეჯგუფის მცირე ფრაქციაში (19%-ში) აღმოჩენილ იქნა CD45⁺ ლეიკოციტების მაღალი კონცენტრაცია, რის გამოც CD56/CD45 თანაფარდობა იყო ძალიან დაბალი (P=0.5 vs. საკონტროლო ჯგუფი).

უოღ-CD56^{low} ქვეჯგუფში (CD56^{normal} -სგან განსხვავებით) შემთხვევათა მხოლოდ 22%-ში CD56/CD45 თანაფარდობის მაჩვენებელი მსგავსი იყო საკონტროლო ჯგუფის იგივე სიდიდისა. ამ შემთხვევათა დიდ უმრავლესობაში (78%-ში) CD56/CD45 თანაფარდობის მაჩვენებელი იყო დაბალი, რაც იმას მიუთითებს, რომ CD56⁺ uNK-ს რაოდენობას ბევრად აჭარბებდა CD45⁺ ლეიკოციტების ტოტალური რაოდენობა (P<0.001 vs. საკონტროლო ჯგუფი).

უოღ-CD56^{high} ქვეჯგუფში შემთხვევათა 25%-ში CD56/CD45 თანაფარდობის სიდიდე იმყოფებოდა სკონტროლო ჯგუფის იგივე მაჩვენებლის ფარგლებში. 12%ს კი აღინიშნა CD45⁺ ლეიკოციტების უკიდურესად დიდი რაოდენობა და აქედან გამომდინარე CD56/CD45 თანაფარდობის დაქვეითებული სიდიდე, თუმცა CD56^{high} ქვეჯგუფის ენდომეტრიუმის ნიმუშების უმრავლესობას (63%-ს) ჰქონდა CD56/CD45 თანაფარდობის მაღალი მაჩვენებელი (P=0.05; vs. საკონტროლო ჯგუფი), რაც მიუთითებს, რომ CD45⁺ უჯრედების სიჭარბე გამოწვეული იყო CD56⁺ uNK-ს მომატებული რაოდენობით, რამაც შეადგინა ლეიკოციტთა 95%-მდე.

CD56/CD45 თანაფარდობის მაჩვენებელი განსხვავებული იყო ქვეჯგუფებს შორისაც: CD56^{low} vs. CD56^{normal} P=0.005; CD56^{low} vs. CD56^{high} P<0.001; CD56^{normal} vs. CD56^{high} P<0.002. გრაფიკი 4. a,b).



გრაფიკი 4. CD56/CD45 მარკერებს შორის კორელაცია (a) და თანაფარდობა (b). CD56/CD45 თანაფარდობის განაწილება (%) *uNK*-ს რაოდენობრივი რანჟირების საფუძველზე უფდ და საკონტროლო ჯგუფებში. თითოეული ნიშნული წარმოდგენილია წერტილით (შავი:საკონტროლო ჯგუფი; მწვანე: უფდ -CD56^{low}; ცისფერი:CD56^{normal}; წითელი:CD56^{high}). საკონტროლო ჯგუფის მონაცემები

შემოსაზღვრულია ჩარჩოთი. ისრით მითითებულია outlier-ერთადერთი საკონტროლო ნიმუში ანთების ნიშნებით. ნიმუშები კლასიფიცირებულია საფეხურებრივი რანჟირებით, რომელიც ემყარება ჰორიზონტალურ ღერძზე მითითებულ შესაბამის სიდიდეებს.

CD16/CD56 კორელაცია და თანაფარდობა

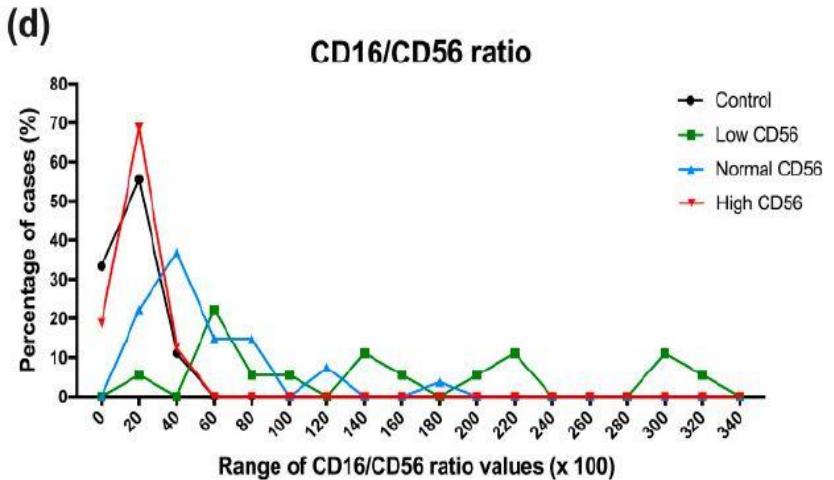
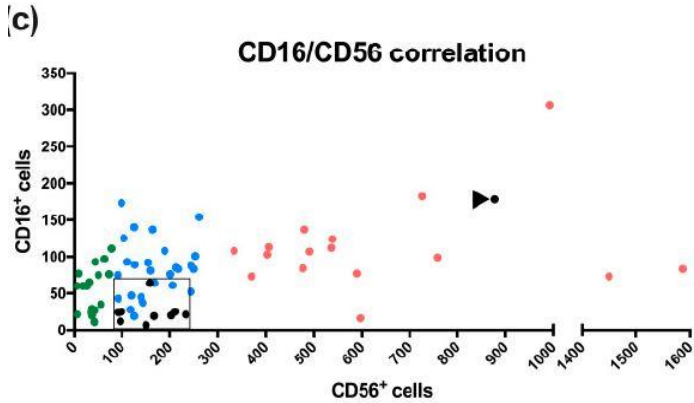
CD16⁺უჯრედების რაოდენობის კორელაცია CD56⁺-თან არ აღმოჩნდა სტატისტიკურად სარწმუნო, როგორც საკვლევი უოგდ ჯგუფის არცერთ ქვეჯგუფში, ასევე საკონტროლო ჯგუფშიც: CD56^{low}, $r=0,361$; $P=0.14$; CD56^{normal}, $r=0.172$, $P=0.40$; CD56^{high}, $r=-0.211$, $P=0.45$; საკონტროლო ჯგუფში: $r=0.126$; $P=0.75$.

CD16/CD56 თანაფარდობის ანალიზმა აჩვენა, რომ CD16⁺-ს კონცენტრაცია შეადგენდა CD56⁺ უჯრედების რაოდენობის 5-25%-ს სკონტროლო ჯგუფში. CD56^{normal} ქვეჯგუფში შემთხვევათა 59%-ს CD16/CD56 თანაფარდობის მაჩვენებელი ჰქონდათ საკონტროლო ჯგუფის იგივე მაჩვენებლის ფარგლებში; 30%-ში CD16⁺-ს კონცენტრაცია იყო გაზრდილი, ხოლო 11%-ში კი მათი რაოდენობა აჭარბებდა კიდევ CD56⁺ უჯრედების რაოდენობას ($P<0.001$ vs. საკონტროლო ჯგუფი).

CD56^{low} ქვეჯგუფში შემთხვევათა 28%-ში CD16⁺ უჯრედების რაოდენობა იყო მომატებული, 56%-ში კი მათი რიცხვი აჭარბებდა CD56⁺ უჯრედების რაოდენობას. ამ ქვეჯგუფის შემთხვევათა მხოლოდ 6%-ში CD16/CD56 თანაფარდობის მაჩვენებელი შეესაბამებოდა საკონტროლო ჯგუფის იგივე მაჩვენებელს ($P<0.001$ vs. საკონტროლო ჯგუფი).

CD56^{high} ქვეჯგუფში CD16/CD56 თანაფარდობის სიდიდე შეესაბამებოდა სკონტროლო ჯგუფის იგივე მაჩვენებელს ($P=0.92$). აღნიშნული თანაფარდობის მაჩვენებელი განსხვავდებოდა

ქვეჯგუფებს შორისაც: CD56^{low} vs. CD56^{normal}, P=0.002; CD56^{low} vs. CD56^{high}, P=0.001; CD56^{normal} vs. CD56^{high}, P<0.001 გრაფ.4. c,d).



გრაფიკი 4. CD16/CD56 მარკერებს შორის კორელაცია (c) და თანაფარდობა (d). CD16/CD56 თანაფარდობის განაწილება (%) *uNK*-ს რაოდენობრივი რანჟირების საფუძველზე უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში. თითოეული ნიშნუში

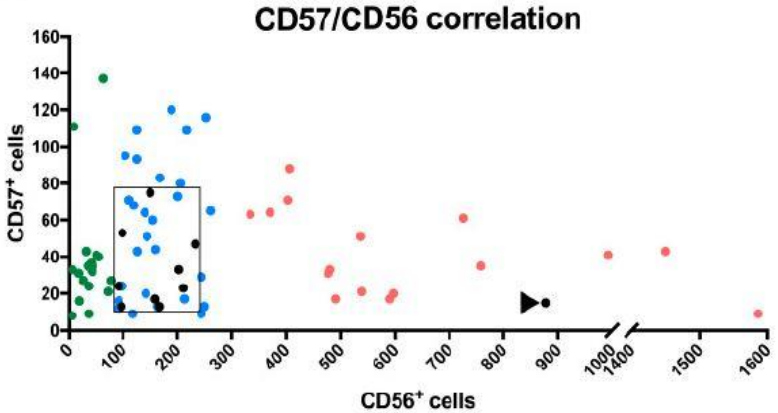
წარმოდგენილია წერტილით (შავი:საკონტროლო ჯგუფი; მწვანე: უოგდ -CD56^{low}; ცისფერი:CD56^{normal}; წითელი:CD56^{high}). საკონტროლო ჯგუფის მონაცემები შემოსაზღვრულია ჩარჩოთი. ისრით მითითებულია outlier-ერთადერთი საკონტროლო ნიმუში ანთების ნიშნებით. ნიმუშები კლასიფიცირებულია საფეხურებრივი რანჟირებით, რომელიც ემყარება ჰორიზონტალურ ღერძზე მითითებულ შესაბამის სიდიდეებს.

CD57/CD56 კორელაცია და თანაფარდობა

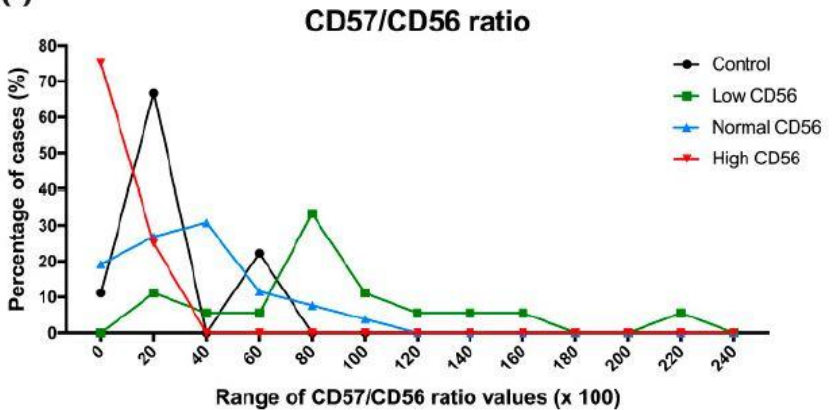
CD57⁺ უჯრედების რაოდენობა ფერტილური კონტროლების ენდომეტრიუმში არ კორელირებდა სტატისტიკურად სარწმუნოდ CD56⁺-ის კონცენტრაციასთან ($r=0.066$, $P=0.87$). ასევე, არ იქნა კორელაცია ნანახი CD56^{low} ($r=0.070$; $P=0.78$) და CD56^{normal} ქვეჯგუფებში($r=0.112$; $P=0.59$). CD56^{high} ქვეჯგუფში კი გამოვლენილ იქნა სტატისტიკურად სარწმუნო უარყოფითი კორელაცია CD57⁺ და CD56⁺ უჯრედების რაოდენობებს შორის: $r=-0.514$; $P=0.04$. ეს უკანასკნელი შესაძლოა აიხსნას იმ ფაქტით, რომ რადგან CD57 ექსპრესირებულია ტერმინალურად დიფერენცირებულ, ციტოტოქსიურ NK უჯრედებზე, სავარაუდოდ ადგილი უნდა ჰქონდეს ამ უჯრედთა დაყოვნებულ დიფერენცირებას უოგდ-ს ზოგიერთ შემთხვევაში.

საკონტროლო და უოგდ ჯგუფის ქვეჯგუფებს შორის განსხვავებათა გამოვლენისთვის CD57/CD56 თანაფარდობასთან მიმართებაში, აღნიშნული თანაფარდობის მაჩვენებელი იქნა კლასიფიცირებული: <20%-დაბალი, 21-60%-საშუალო, >60%-მაღალი.

(e)



(f)



გრაფიკი 5. CD57/CD56 მარკერებს შორის კორელაცია (e) და თანაფარდობა (f). CD57/CD56 თანაფარდობის განაწილება (%) sNK-ს რაოდენობრივი რანჟირების საფუძველზე უფოდ და საკონტროლო ჯგუფებში. თითოეული ნიმუში წარმოდგენილია წერტილით (შავი:საკონტროლო ჯგუფი; მწვანე: უფოდ-CD56^{low}; ცისფერი:CD56^{normal}; წითელი: CD56^{high}). საკონტროლო ჯგუფის მონაცემები შემოსაზღვრულია ჩარჩოთი. ისრით მითითებულია outlier-ერთადერთი საკონტროლო ნიმუში ანთების ნიშნებით. ნიმუშები კლასიფიცირებულია

საფეხურებრივი რანჯირებით, რომელიც ემყარება ჰორიზონტალურ ღერძზე მითითებულ შესაბამის სიდიდეებს.

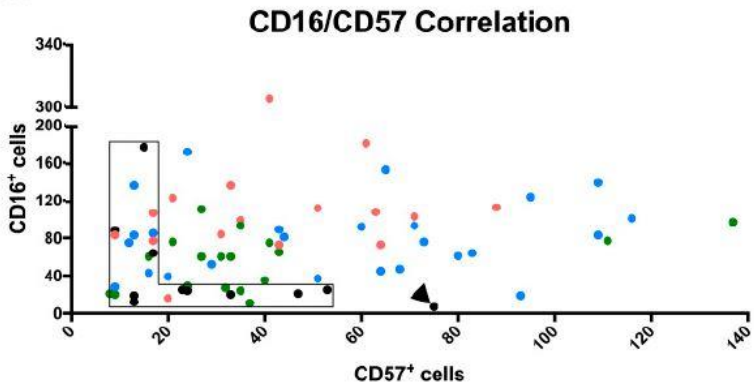
საკონტროლო ჯგუფის მონაწილეთა 11%-ს CD57/CD56 თანაფარდობის მაჩვენებელი ჰქონდა დაბალი, 67%-ს-საშუალო, 22%-ს კი-მაღალი. ამის საპირისპიროდ, უოგდ-ს CD56^{low} ქვეჯგუფში შემთხვევათა 17%-ში CD57/CD56 თანაფარდობის სიდიდე განისაზღვრა როგორც საშუალო, ხოლო 63%-ში კი სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი იყო საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით ($P=0.03$ vs. control).

უოგდ-ს CD56^{normal} ქვეჯგუფში CD57/CD56 თანაფარდობის სიდიდე მსგავსი იყო საკონტროლო ჯგუფის იგივე მაჩვენებლისა ($P=0.84$). CD56^{high} ქვეჯგუფში 75% აღნიშნული თანაფარდობა იყო დაქვეითებული, მაშინ როცა 25%-ს აღნიშნა საშუალო მაჩვენებელი საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით ($P=0.02$). უოგდ-ს ქვეჯგუფებს შორისაც ასევე აღინიშნა CD57/CD56 თანაფარდობის განსხვავებული მაჩვენებელი: CD56^{low} vs. CD56^{normal} $P=0.003$; CD56^{low} vs. CD56^{high} $P<0.001$; CD56^{normal} vs CD56^{high} $P=0.003$. (გრაფ.5. e,f).

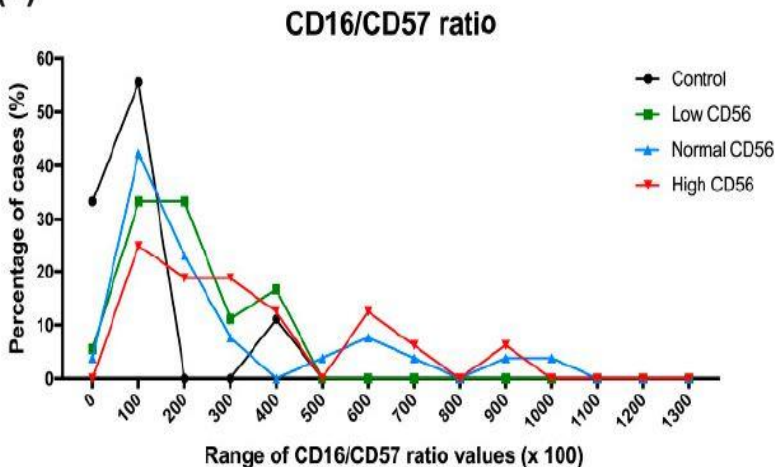
CD16/CD57 კორელაცია და თანაფარდობა

საკონტროლო ჯგუფსა და უოგდ-ს არცერთ ქვეჯგუფში CD16⁺ და CD57⁺ უჯრედების რაოდენობებს შორის სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი კორელაციები არ იქნა დადგენილი. საკონტროლო ჯგუფში: $r=-0.042$; $P=0.92$. უოგდ-ს CD56^{low} ქვეჯგუფში: $r=0.384$, $P=0.12$; CD56^{normal} ქვეჯგუფში: $r=0.166$, $P=0.42$; CD56^{high} ქვეჯგუფში: $r=0.258$, $P=0.33$).

(g)



(h)



გრაფიკი 5. CD16/CD57 მარკერებს შორის კორელაცია (გ) და თანაფარდობა (h). CD16/CD57 თანაფარდობის განაწილება (%) sNK-ს რაოდენობრივი რანეირების საფუძველზე უოგდ და საკონტროლო ჯგუფებში. თითოეული ნიმუში წარმოდგენილია წერტილით (შავი:საკონტროლო ჯგუფი; მწვანე: უოგდ-CD56^{low}; ცისფერი:CD56^{normal}; წითელი:CD56^{high}). საკონტროლო ჯგუფის მონაცემები შემოსაზღვრულია ჩარჩოთი. ისრით მითითებულია outlier-ერთადერთი საკონტროლო ნიმუში ანთების ნიშნებით. ნიმუშები კლასიფიცირებულია

საფეხურებრივი რანჟირებით, რომელიც ემყარება ჰორიზონტალურ ღერძზე მითითებულ შესაბამის სიდიდეებს.

CD16/CD57 თანაფარდობის ანალიზმა აჩვენა, რომ ფერტილური კონტროლების ენდომეტრიუმში 33%-ში პრევალირებდა CD57⁺ უჯრედები, რის გამოც აღნიშნული თანაფარდობის მაჩვენებელი იყო დაქვეითებული. 56%-ში კი CD16/CD57-მაჩვენებელი მსუბუქად იყო მომატებული CD16⁺ -ის ხარჯზე. მხოლოდ ერთ ნიმუშში (11%) აღნიშნული სიდიდე იყო უფრო მაღალი CD16⁺ -ს საკმაოდ ჭარბი რაოდენობის გამო.

უოგდ-CD56^{low} (P=0.14 vs. control), CD56^{normal} (P=0.05 vs. control) და CD56^{high} (P=0.01 vs. control) ქვეჯგუფებში გამოვლინდა შესაბამისად იმ შემთხვევათა 6%, 4% და 0%, სადაც CD57⁺-ის რაოდენობა სჭარბობდა CD16⁺-ს. იგივე ქვეჯგუფებში შემთხვევათა 33%, 42% და 25%-ში CD16⁺ მსუბუქად აღემატებოდა CD57⁺-ის რაოდენობას, ხოლო CD56^{low}-ქვეჯგუფის 61%, CD56^{normal}-ის 54% და CD56^{high}-ის 75% შემთხვევებში კი CD16⁺-ს რაოდენობა მკვეთრად აჭარბებდა CD57⁺-ს საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით. იგივე ქვეჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება არ იქნა აღმოჩენილი CD16/CD57 თანაფარდობის სიდიდის მიხედვით: CD56^{low} vs. CD56^{normal} P=0.95; CD56^{low} vs. CD56^{high} P<0.30; CD56^{normal} vs. CD56^{high} P=0.29 (გრაფიკი.5. g,h).

ჩვენი კვლევის შედეგები ამყარებს არსებულ ჰიპოთეზას, რომ უოგდ და ფერტილური ქალების ენდომეტრიუმში განსხვავებული იმუნური გარემოა. უფრო მეტიც, თვით უოგდ-ს სხვადასხვა ქვეჯგუფებშიც კი (uNK-ს დაბალი, ნორმალური და მაღალი შემცველობით) განსხვავებული იმუნური მახასიათებლებია. ამდენად, მიგვაჩნია რომ, უოგდ-ს მკაცრად განსაზღვრულ ქვეჯგუფებში ენდომეტრიალური uNK-ს ზუსტი

ფენოტიპური/ფუნქციური კლასიფიკაცია და სიღრმისეული შესწავლა უფრო დიდ პოპულაციაში შესაძლებელს გახდის უფრო მეტად მაღალ-ინფორმაციული იმუნური პარამეტრების გამოვლენას შემდგომი ორსულობის მოსალოდნელი შეწყვეტის რისკის პროგნოზირებისათვის და იმუნომაკორეგირებელი თერაპიის სამიზნე ჯგუფის შერჩევისათვის, რითაც ბოლო მოეღება დაუსაბუთებელი, ემპირიული „იმუნო-ტესტირებისა“ და „იმუნური თერაპიების“ გამოყენებას.

დასკვნები და რეკომენდაციები

დასკვნები

1. ჩვენი კვლევის შედეგებით, გამყარდა კავშირი უცნობი გენეზის ორსულობის განმეორებით დანაკარგებსა და ენდომეტრიალურ ლიმფოციტთა დისბალანსს შორის და დადგინდა uNK-ს იმუნოფენოტიპთა მრავალფეროვნება.
2. CD16, CD45, CD56, CD57 მარკერების კომბინაციების გამოკვლევით გამოჩნდა, რომ uNK-ს აბსოლუტური რაოდენობების მიღმა არსებობს უფრო ინფორმაციული პარამეტრები-თანაფარდობები uNK-ს ციტოტოქსიურ და იმუნომოდულატორულ სუბპოპულაციებს შორის და ენდომეტრიუმის ლეიკოციტების საერთო რაოდენობასთან, რაც იძლევა ენდომეტრიუმის იმუნური მიკროგარემოს შეფასების და ციტოტოქსიკური ან პრო-ფერტილური იმუნოფენოტიპების იდენტიფიკაციის შესაძლებლობას.
3. უოგდ ჯგუფში CD16⁺ და CD57⁺ uNK-ს მომატებული რაოდენობა CD16⁺-ის პრევალირებით საკონტროლო

ჯგუფთან შედარებით($P<0.001$), მიუთითებს მათ გაზრდილ ციტოტოქსიურ პოტენციალზე. ამდენად, $CD16^+$ შესაძლოა განხილულ იქნას ციტოტოქსიურობის ერთ-ერთ პოტენციურ მარკერად ორსულობის მოსალოდნელი შეწყვეტის რისკის პროგნოზირებისათვის უოგდ ჯგუფში.

4. უოგდ ჯგუფის პაციენტთა ენდომეტრიუმი ხასიათდებოდა $CD56^+$ uNK -ს შემცველობის ფართო დიაპაზონით: გამოიყო 3 ქვეჯგუფი: დაბალი ($CD56^{low}<90$ უჯრ/მმ²), ნორმალური ($CD56^{normal} 90-300$ უჯრ/მმ²) და მაღალი ($CD56^{high} >300$ უჯრ/მმ²) კონცენტრაციებით.
5. $CD56^{low}$ და $CD56^{normal}$ ქვეჯგუფებში მიუხედავად $CD56^+$ -ის დაბალი შემცველობისა, დადგინდა ციტოტოქსიურ $CD16^+$ და $CD57^+$ -ის გაზრდილი წილი $CD56^+$ -სთან მიმართებაში.
6. $CD56^+$ uNK-ს რაოდენობა საკონტროლო ჯგუფში სტატისტიკურად სარწმუნოდ დადებითად კორელირებდა $CD45^+$ ლეიკოციტებთან. ამის საპირისპიროდ, მათ შორის კორელაცია უოგდ ჯგუფში არ გამოვლინდა. $CD56/CD45$ თანაფარდობის განსხვავებული განაწილება ქვეჯგუფებში დამოკიდებული იყო $CD56^+$ uNK-კონცენტრაციაზე, რაც მიუთითებს ამ ქვეჯგუფებში განსხვავებული პათოგენეზური მექანიზმების არსებობაზე.
7. $CD138^+$ მარკერის იმუნოლოკალიზაციის მიხედვით საკვლევ და საკონტროლო ჯგუფებს შორის სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება არ იქნა ნანახი, რითაც გამორიცხულ იქნა ქრონიკული ენდომეტრიტის ზეგავლენა ჩვენს მიერ შესწავლილ ენდომეტრიუმის ნიმუშებში.

პრაქტიკული რეკომენდაციები:

- უოგდ ანამნეზის მქონე ქალებში uNK-ს სხვადასხვა სუბპოპულაციების იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით კვლევისას, მიზანშეწონილია გამიჯნოს პაციენტების 2 ქვეჯგუფი, რომელთაც აქვთ მსგავსი ანამნეზი და კლინიკური სიმპტომები, მაგრამ იმუნური სტატუსი-რადიკალურად განსხვავებულია(ძალიან დაბალი ან ძალიან მაღალი uNK-ს რაოდენობა) ამდენად, სრულიად განსხვავებულ მიდგომასა და იმუნო-მაკორეგირებელ მკურნალობას საჭიროებენ.
- ენდომეტრიუმის იმუნური გარემოს შეფასებისას მიზანშეწონილია არა მარტო uNK-ს სუბპოპულაციათა აბსოლუტური რაოდენობების განსაზღვრა, არამედ მათი გარკვეული თანაფარდობებისა და იმუნოფენოტიპების (ციტოტოქსიური/პრო-ფერტილური)დადგენა, რაც ხელს შეუწყობს უოგდ ანამნეზის მქონე ქალებში მომდევნო ორსულობების მოსალოდნელი შეწყვეტის რისკის შეფასებას და ინდივიდუალური იმუნომაკორეგირებელი თერაპიის კანდიდატ-პაციენტთა შერჩევას.
- CD138⁺ პლაზმოციტების დეტექცია იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდით სარწმუნო მეთოდი აღმოჩნდა ქრონიკული ენდომეტრიტის დიაგნოსტიკისათვის. მისი დროული დადგენა და მკურნალობა ხელს შეუწყობს არასაჭირო ჰისტერექტომიების პრევენციას იმ გინეკოლოგიურ დაავადებათა ჯგუფში, რომლებიც მიმდინარეობენ უსიმპტომოდ ან არასპეციფიკური, მცირედ გამოხატული სიმპტომებით არადიაგნოსტირებული ქრონიკული ენდომეტრიტის ფონზე.

გამოქვეყნებული პუბლიკაციები

- M.Chiokadze, J.Kristesashvili. On the Issue of Standardization of Uterine Natural Killer Cell Measurement in Patients with Recurrent Pregnancy Loss. Georgian Medical News. No9 (294) 2019. 31-36; ISSN 1512-0112
- M.Chiokadze, J.Kristesashvili. Immunobiological Mechanisms and Management of Recurrent Pregnancy Loss. Georgian Medical News. No6 (291) 2019. 26-31; ISSN 1512-0112
- M.Chiokadze, C.Bär, J.Pastuscheck, P.Streicher, B.Don'skoi, E.Schleußner, U.Markert, R.Favaro. Evaluation of Natural Killer Cell Markers CD16, CD56 and CD57 in the Endometrium of Women with RPL. Abstract. P62. The 39th Annual Meeting of ASRI. 12-15 June, 2019, Grand Rapids, Michigan, USA. Am J Reprod Immunol; 2019;81(suppl.1), p.66.
- U.Markert, B.Toth, J.Pastuscheck, M.Weber, C.Bär, J.Heger, P.Streicher, M.Chiokadze, R.Favaro, E.Schleußner et al., Endometrial NK and Plasma Cells in Infertile Women. Abstract.P2.8. International Federation of Placenta Associations 2019 (IFPA2019) and the 8th Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (VIII SLIMP). 10-13 September, Buenos Aires, Argentina. Placenta Journal, Issue 83, p. e-68
- M.Chiokadze, C.Bär, J. Pastuscheck, B. Dons'koi, K.G.Khazhlyenko, E.Schleussner, U.R.Markert, R.R.Favaro. Beyond uterine Natural Killer cell numbers in unexplained recurrent pregnancy loss: Combined analysis of CD45, CD56, CD16, CD57 and CD138. Diagnostics 2020, 10, 650; doi:10.3390/diagnostics10090650

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Faculty of Medicine

Doctoral Program: “Clinical and Translational Medicine”

Maia Chiokadze

**Pattern of Endometrial Lymphocyte Subpopulations in Women
with Unexplained Recurrent Pregnancy Loss**

The Thesis

of the dissertation submitted for the academic degree of
Doctor of Medicine (PhD)

Scientific supervisors:

Professor Jenara Kristesashvili, MD, PhD, ScD.

Professor Udo R. Markert, Head of Placenta Lab,

Jena University Hospital, Jena, Germany

Tbilisi

2021

Introduction

Recurrent pregnancy loss (RPL) affects 2-5% of women of reproductive age and represents profound psychological stress for couples and still big clinical challenge to their gynaecologists worldwide. RPL has been associated with increased risk of obstetrical complications and unfavourable perinatal outcomes. Women with RPL are frequently reported to have “Great Obstetrical Syndroms”: pre-eclampsia, fetal growth retardation, pre-term delivery and stillbirth, which further emphasize the relevance and complexity of the problem.

The exact aetio-pathophysiology, diagnostic/treatment strategies of this multifactorial, heterogeneous disorder are still controversial. Despite the extensive research ≈50% of cases still remain unexplained (uRPL), the vast majority of which is attributed to the disturbed tolerogenic allo-immune mechanisms at the feto-maternal interface.

Disturbed endometrial immune receptivity due to the inadequate number and function of endometrial immune cells-different subpopulations of endometrial lymphocytes is one of the most controversial immunological pathways, that has been associated with uRPL. Especially, the potential role of altered number and proportions of uterine Natural Killer cell (uNK) subtypes is sharply debated.

uNK cells represent the predominant lymphocyte population in the endometrium, reaching up to ≈80% of the endometrial immune cells. They are key players in tolerogenic immune mechanisms of pregnancy. Particularly, uNK cells play a critical role in normal processes of implantation/placentation, remodelling of uterine spiral arteries and enhancing uterine vascularization by producing angiogenic factors. Excessive angiogenesis due to high uNK cell density or activity, which is also possible during implantation, results in increased blood

flow and can lead to oxidative stress and termination of pregnancy. uNK cells are pivotal in maintenance of endometrial homeostasis and contribute to the normal processes of decidualization.

There are two main populations of phenotypically and functionally distinct uNK cells: **the predominant subset** ($\approx 70-90\%$) encompasses cells expressing CD56—the general molecular surface marker of NK cells at a high density. They lack CD16, classical cytotoxicity marker and are **CD56⁺ or CD56^{bright} CD16⁻ uNK**. These cells have little cytotoxic activity, but are a rich source of many different cytokines and growth factors and are mainly immunoregulatory uNK cells at feto-maternal interface.

The other minor subtype ($\approx 10\%$ in endometrium) comprising 90% of peripheral blood NK cells (pNK), express low-density CD56 and are **CD56^{dim} CD16⁺**. They have limited cytokine output and are primarily responsible for cytotoxicity of NK cells. Supposedly, this subpopulation is involved in the pathogenesis of uRPL.

CD57 is another classical cytotoxicity marker of NK cells. It designates the last stages of NK cell differentiation and a robust cytotoxic potential. It also denotes terminally differentiated senescent immune cells. Recent studies reported the increased number of CD57⁺ NK cells in women with spontaneous, as well as recurrent pregnancy losses.

An imbalance between immunoregulatory and cytotoxic uNK cell subpopulations has been associated with disturbed immune environment and altered receptivity of endometrium in women with unexplained RPL.

Chronic endometritis (CE) constitutes another factor of disturbed immune reactivity/receptivity of endometrium, promoting unfavourable

immune environment for the development of embryo and leads to pregnancy failure. Many studies reported high prevalence of CE in women with uRPL, but data are controversial.

Currently, the on-going challenge for researchers is to find out highly informative, reliable endometrial immune parameters to predict the potential risk for subsequent miscarriage in uRPL patients. Unfortunately, there is no agreed standardized protocol for the assessment of endometrial immune status and no consensus on reference ranges of immune cells. The relevance of “high number” of uNK cells and its link to reproductive failure is also unclear. These hamper the research of endometrial uNK cells and its translation into clinical practice. Therefore, the measurement of uNK cells acquires more significance in research settings, as well as in clinical investigational protocols of reproductive disorders.

Study Hypothesis

Taking into account all the above mentioned, we suggest that in women with unexplained recurrent pregnancy loss, in comparison with healthy, fertile women, there is a dysfunctional endometrium due to the imbalance of immunophenotypes of different subpopulations of endometrial lymphocytes, resulting in altered immune receptivity of endometrial environment and pregnancy loss.

Aim of the Study

To evaluate the association between unexplained recurrent pregnancy loss and imbalance of immunophenotypes of different subpopulations of endometrial lymphocytes and find out more informative endometrial immune parameters in women with unexplained recurrent pregnancy loss to predict the potential risk for

subsequent miscarriage and define specific subgroup of patients for individualized immune treatment.

Study objectives:

1. In endometrial biopsies of uRPL and fertile control women Immunohistochemical assessment of CD16⁺, CD56⁺, CD57⁺ subpopulations of uNK cells, CD45⁺Leucocytes, as well as CD138⁺ plasma cells (marker of Chronic endometritis), and comparison of their concentrations (cells/mm²) between groups.
2. To define in uRPL and fertile control endometria the ratios between immunoregulatory (CD56⁺) and cytotoxic (CD16⁺, CD57⁺) subpopulations of uNK cells, and the ratios between uNK subpopulations and over CD45⁺Leucocytes by frequency distribution, in order to reveal their different immunophenotypes and more informative immune parameters.
3. To reveal more potential cytotoxic marker between CD16⁺, and CD57⁺ cytotoxic subpopulations of uNK by examining the ratios and correlations between them.
4. To assess correlations between different subpopulations of uNK cells and Leucocytes in endometria of uRPL and fertile control women.
5. To detect CD138⁺ plasma cells in endometria of uRPL and fertile control women to exclude the influence of chronic endometritis on immune environment in our investigated endometrial biopsies.

Scientific novelty of the study

To evaluate by Immunohistochemistry the complex and dynamic endometrial immune environment in the well-defined subgroup of

uRPL women, simultaneously a set of 5 immune cell markers and their combinations were applied. To characterize better immunophenotypes of different lymphocyte subpopulations, we have used innovative immune parameters (instead of separate, single immune markers), such as: the ratios between immunoregulatory and cytotoxic subpopulations of uNK cells, as well as their ratios over endometrial leucocytes. That enabled us to unveil previously unappreciated possible pro-fertile and cytotoxic immunophenotypes in uRPL women.

Materials and Methods

Study population

61 paraffin-embedded endometrial biopsies from women with uRPL (2015-2018yy) were selected from the endometrial tissue biobank at the Placenta-Lab, Jena University Hospital, Germany. They comprise the study group.

Inclusion criterium for study group: women with ≥ 2 unexplained recurrent pregnancy losses (from the time of conception until 24th weeks of gestation (ESHRE Guideline on RPL, 2018)).

Exclusion criteria for study group: any of the concomitant identifiable causes of RPL, such as: polycystic ovary syndrome, endocrine disorders, metabolic disturbances, autoimmune disorders, luteal phase deficit, thrombophilia (Anti-phospholipid syndrome), infections (Chlamydia, Gardnerella, Mycoplasma/ureaplasma).

10 endometrial biopsy samples were obtained from healthy, fertile oocyte donors, recruited at the Laboratory of Immunology, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, National Academy of Medical

Sciences of Ukraine (Kiev, Ukraine) (control group). Samples were collected before the beginning of oocyte stimulation protocol.

Inclusion criterium for control group: at least one viable pregnancy and no miscarriage/artificial abortion in anamnesis.

Exclusion criteria for controls: any autoimmune disease, antibiotic therapy and vaccination 3 month before the endometrial sampling.

All participants were from the same age group (under 42 year). The mean age of fertile controls and uRPL patients were 27 and 33.5 years, respectively. Endometrial biopsies were collected in the mid-luteal phase of the menstrual cycle (19-22 days) with the pipelle catheter. All participants gave their written informed consent. The study was approved by the respective local ethic committees of Jena University Hospital (registration number 2019-1305 from 8 February 2019). All procedures were in accordance with ethical standards on human experimentation preconized by the Helsinki Declaration of 1964 and its later amendments.

Methods of study

Immunohistochemical staining of immune cell markers

In our study we used immunohistochemistry (IHC) for the detection of CD56⁺, CD16⁺, CD57⁺ subsets of uNK cells, CD138⁺ endometrial plasmocytes (marker of chronic endometritis) and CD45⁺ (pan-leucocyte marker) in endometrial samples of uRPL and control women.

In comparison with CD56⁺ and CD16⁺ -classical markers of uNK cells, CD57⁺ is routinely used for the identification of terminally differentiated “senescent” CD8⁺ T lymphocytes, also, designates the last stages of NK cell differentiation and a robust cytotoxic potential.

IHC method due to its specificity and sensitivity, compared with other traditional tissue staining techniques (Hematoxylin & Eosin), is regarded as the Gold standard to identify localisation and tissue distribution of immune cells within the whole stroma, quantify them and evaluate their relation to other components of endometrium (luminal epithelium, glands). This is very important, because the main characteristic feature of RPL endometrium is migration and accumulation of uNK cells under the luminal epithelium.

The other advantage of IHC, in comparison with the flow cytometry, is that it does not need enzymatic processing of endometrial tissue and therefore antigenic/immunogenic information is preserved.

In our study paraffin-embedded endometrial biopsies from the control and uRPL groups were sectioned at 4 μm , in a microtome and deposited on SuperFrost slides (Menzel, Germany). The investigated markers were assessed in subsequent sections.

Following dewaxing in xylene and rehydration through descending ethanol concentrations, antigen retrieval was achieved in a citrate buffer at $>95^\circ\text{C}$ for 15 min. Slides were washed in Tris-buffered saline-Tween20 0.05% (TBST). For inhibition of endogenous peroxidase activity, tissue sections were incubated with peroxidase block solution (Dako, Germany) for 10 min and washed in TBST. Primary antibodies were prepared in antibody diluent solution (Dako, Germany) and incubated for 1 h at room temperature (RT). Antibody specifications and dilutions are shown in table.1.

Following washing in TBST, the slides were incubated with the secondary antibody (labelled polymer-horseradish peroxidase (HRP) anti-mouse, clone: DAK-GO1, Dako, Germany) for 30 min at RT. The peroxidase reaction was developed with DAB (3,30-diaminobenzidine;

Dako, Germany) and discontinued with water after 15 min. Counterstaining with hematoxylin was followed by mounting of slides with histofluid and cover slip.

Table.1. List of antibodies used in IHC analysis

Target	Type/Clone	Supplier	Dilution
CD16	Mouse Monoclonal DJ130c	Santa Cruz	1:200
CD45	Mouse Monoclonal2B11+PD7/26	Dako	1:200
CD56	Mouse Monoclonal-123C3	Dako	1:100
CD57	Mouse Monoclonal-TB01	Dako	1:100
CD138	Mouse Monoclonal-MI15	Dako	1:100

Cell counting methodology

Slides were documented and analysed using an Axio Imager A2 microscope and Zen Blue software (Zeiss, Germany). The first field to be captured was selected at random near the luminal epithelial border according to the recently agreed standardized protocol (Lash, 2016). Next fields were selected by moving one field to the left or right of the original field, keeping the luminal epithelium in view. 5 non-

overlapping high power fields were obtained (20x objective) and documented per case.

Positive cell was defined as an immune-positive structure associated with a hematoxylin-stained cell nucleus. Cells were counted manually by two investigators, unaware of the identification of the groups. Cell count tool from FIJI/Image J software (National Institutes of Health) was used. Cells within the glandular epithelium, blood vessels or areas filled with blood and mucus were not considered. Data were expressed as mean number of cells/mm².

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Mean values of concentrations of CD56⁺, CD16⁺, CD57⁺ and CD45⁺ markers (cells/mm²) were evaluated by the nonparametric Mann–Whitney test. CD138⁺ plasmocytes (marker of CE) were recalculated according to the newest criteria (Liu, 2018) and expressed by cells/10mm². The ratios between markers were calculated and expressed as percentages. They were classified as low, medium and high values. Data were compared between uRPL and control groups.

Correlations between CD56⁺, CD16⁺, CD57⁺ and CD45⁺ markers, according to the subgroups (CD56^{low}, CD56^{normal} and CD56^{high}) were determined by the Spearman correlation (r) test.

Frequency distributions of markers were compared between uRPL and control groups using the Chi-square test. Values of p ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion

CD138-marker of endometrial plasma cells

Immunolocalization of CD138⁺ plasma cells was carried out to detect the presence of chronic endometritis (CE). In control group, 20% presented <3 CD138⁺ plasma cells/10mm², whereas in 80% they were absent. Similarly, 22% of uRPL endometria had <3 CD138⁺ plasma cells/10mm² and 78% were negative. Applying the latest criteria (Liu, 2018) by which CE is diagnosed by ≥ 5.15 CD138⁺ plasma cells/10 mm², we have not observed statistically significant difference between study and control groups. Therefore, the potential influence of CE on our investigated samples was excluded (Fig.1).The reasons for that may be the small size of our study populations, and different diagnostic criteria for CE.

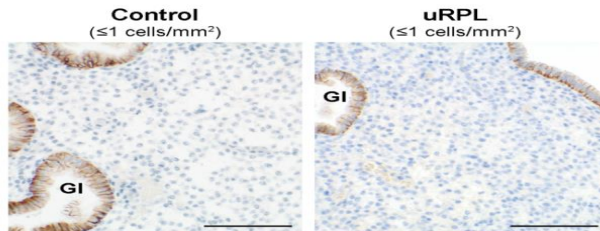


Fig.1.Immunolocalization of CD138 in uRPL and control groups. Plasma cells in stroma <math><1/mm^2</math>. Endometrial glands (GI) positive to CD138. Scale bar-100 μ m

No differences were observed in the mean values of CD45 (p=0.06), CD56 (p=0.99), and CD57 (p=0.14) graf.1(a); graf.2(c); graf.3(g) respectively. Nevertheless, further analysis of these markers showed their different distributions in uRPL patients (p<0.001 for CD45, CD56, and CD16; p=0.003 for CD57) compared to controls. graf.1(b); graf.2(d); graf.3(f) and graf.3(h). Particular features of distribution of these markers were based on uNK cell count ranges (uRPL- CD56^{Low}, uRPL- CD56^{Normal} and uRPL-CD56^{High} subgroups). (Tabl.2).

Table.2. Cell count ranges of uNK cells and leucocytes in N and %

	CD16 cell/mm ²		CD57 cell/mm ²		CD45 cell/mm ²		CD56 cell/mm ²		
	0-30	>30	0-30	>30	100-450	>450	0-90 Low	90-300 normal	>300 High
uRPL	9 14,8%	52 85,2%	21 34,4 %	40 65,6%	37 60,7 %	24 39,3%	18 29,5 %	27 44,3%	16 26,2 %
Control	8 80%	2 20%	6 60%	4 40%	9 100 %	0 0%	0 0%	9 100%	0 0%

CD45-pan-Leucocyte marker

The concentration of CD45⁺ leukocytes in control endometria ranged from 100 to 450 cells/mm². One sample in the control group showed an excessively high number of CD45⁺ leukocytes (2160 cells/mm²) and has been classified as inflamed since a high leukocyte number indicates an acute inflammatory process. Although present in the correlation graphs, values of this case were omitted from the calculations of control values. In uRPL patients, 65% of cases were within the control range (100–450 cells/mm²), whereas 35% showed >450 cells/mm² (p<0.001; Fig.2, graf. 1a,b).

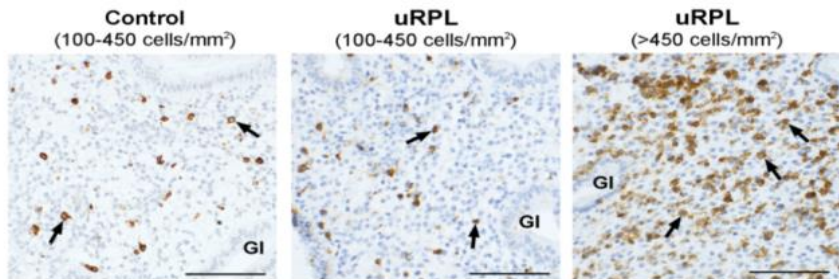
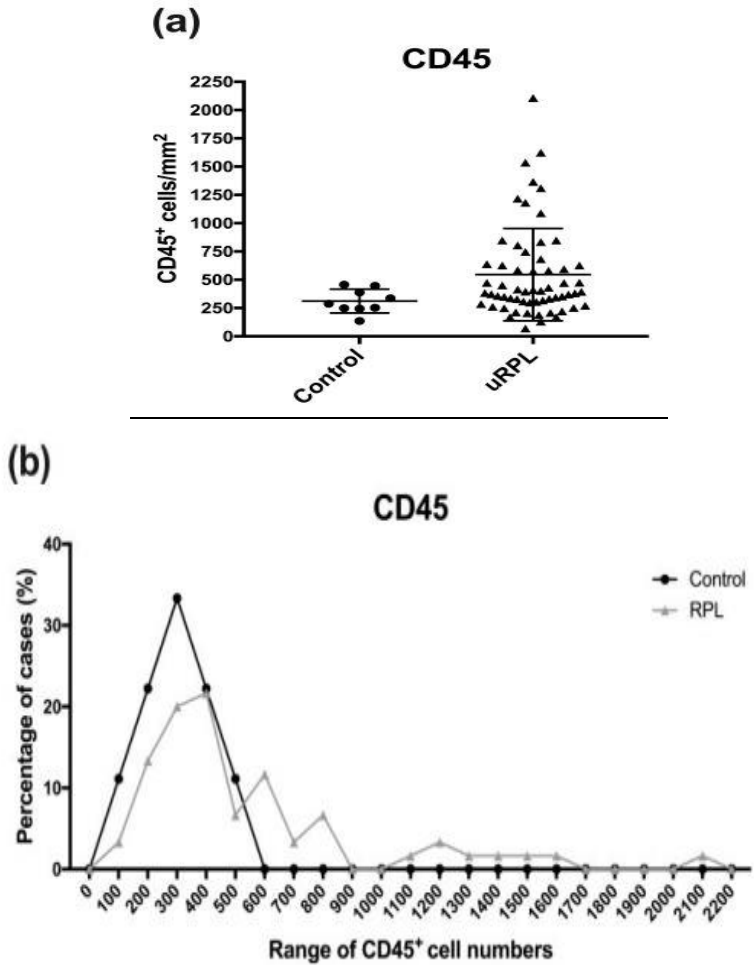


Figure 2. Immunohistocalization of CD45⁺ cells in the endometrium of the control and uRPL groups (100–450 and >450 cells/mm²). Scale bar = 100 µm



Graf.1. Mean values (a) and frequency distribution (b) of cell count ranges for CD45 in controls and uRPL cases. The distribution of values from samples classified in ranges of 100 cells/mm² (CD45 The relative frequency shows the percentage of samples in the respective range.

CD56- general surface marker of uNK cells

In all control endometria, CD56⁺ uNK cells were present at densities: 90 to 300 cells/mm². The inflamed control sample displayed an elevated uNK cell count (877 cells/mm²). Only 47% of uRPL cases displayed values similar to that of controls, 22% had low amounts (<90 cells/mm²), and 32% presented elevated numbers of CD56⁺ uNK cells (>300 cells/mm²) (p<0.001). Based on these results, the uRPL patients were classified into subgroups with low (CD56^{low}<90 cells/mm²), normal (CD56^{normal} 90–300 cells/mm²), and high uNK cell counts (CD56^{high}>300 cells/mm²) for further analysis of the data (Fig.3, graf.2,c,d).

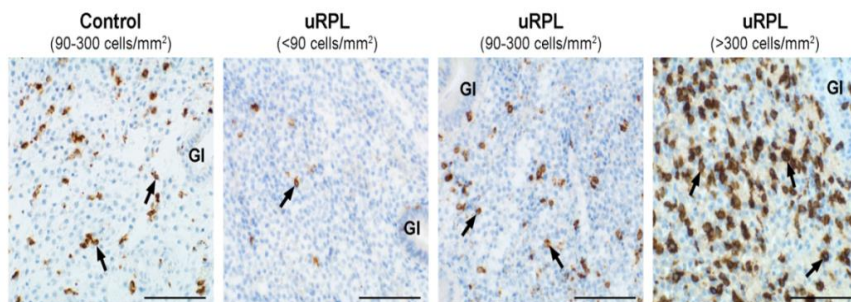
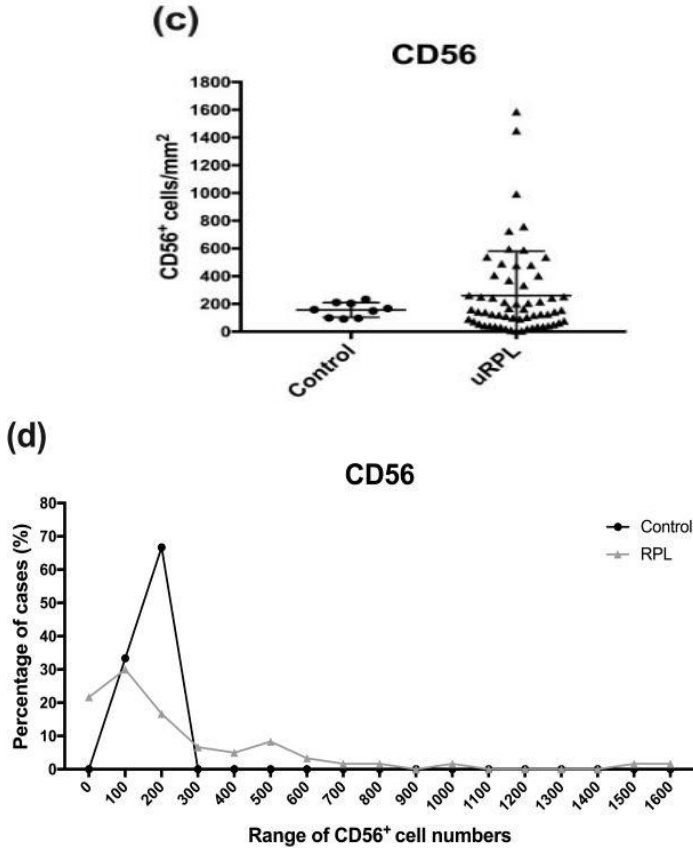


Fig.3. Immunohistolocalization of CD56⁺ cells in control and uRPL group: in CD56^{low} (<90cells/mm²), CD56^{normal} (90-300 cells/mm²) and CD56^{high} (>300cells/mm²) subgroups. Scale bar = 100 μm

During the last two decades CD56⁺ uNK cells, detected by IHC method, was regarded as the main immune marker to evaluate the immune status of endometrium, however with conflicting results. In previous studies, the increased number of CD56⁺ uNK cells was demonstrated in uRPL women compared to fertile controls and low attention was paid to reduced number of these cells (which has also harmful effect on endometrial receptivity). These studies failed to show

any prognostic value of increased number of uNK cells to predict the risk for subsequent miscarriage in uRPL women and the relevance of “high uNK cell count” remained unclear.



Graf.2. Mean values (c) and frequency distribution (d) of cell count ranges for CD56 in controls and uRPL cases. The distribution of values from samples classified in ranges of 100 cells/mm². The relative frequency shows the percentage of samples in the respective range.

As previously reported by some experts, the endometrium of our uRPL patients was characterized by cases with either low, normal, or high uNK cell counts. These results reinforce the existence of a favourable uNK cell concentration range in fertile women. Furthermore, the occurrence of distinct phenotypes in uRPL patients with low and high uNK cell counts indicates distinct pathogenic mechanisms. Whether these alterations are intrinsic to endogenous immune dysfunctions or are caused by exogenous factors (e.g. altered microbiota and pathogens) remains to be elucidated.

Expansion of CD56⁺ uNK cells occurs in inflammatory conditions and immune reactions against bacterial components. The exact influence of chronic endometritis on different subpopulations of endometrial lymphocytes is not clear. Many researchers indicate that increased number of uNK cells in inflamed endometrium, as well as the disturbed ratio between immunoregulatory and cytotoxic uNK subpopulations may cause the alterations in endometrial receptivity. Some researchers, on the contrary, emphasize, that low uNK cell count is the reason for that. This fact might be explained by slow, defective remodelling of endometrium due to the reduced number of CD56⁺ uNK cells, which play critical role in rejuvenation and normal immune receptivity of endometrium.

In some earlier publications, <40 CD56⁺ cells/mm² in the endometrium was defined as cases with low numbers of uNK cells. In the current study, based on a small cohort of fertile women as controls, we did not observe less than 90 cells/mm². Furthermore, uRPL endometria with values below this limit had CD56/CD45, CD16/CD56, or CD57/CD56 ratios different from controls. These data encourage us to

propose a stricter cutoff at 90 cells/mm² to identify cases with low numbers of uNK cells which should be validated in a larger number of samples. Cutoff values may vary among different laboratories because of different immunohistochemical protocols (e.g., antibodies, amplification methods, and counting techniques).

CD16 and CD57-Markers of cytotoxicity of uNK cells

Several reports have shown that uNK cell cytotoxicity may create a hostile endometrial environment affecting embryo implantation and placentation. Elevated levels of CD16⁺ and CD57⁺ cells were reported in the endometrium of RPL patients, pointing to a magnified cytotoxic potential of uNK cells in these conditions. Our findings complement these previous studies by demonstrating that CD16⁺ and CD57⁺ cells have different relative levels in the uRPL endometrium depending on the concentration of CD56⁺ uNK cells.

To evaluate the cytotoxic status in the endometrium, we investigated simultaneously both markers in our samples. Furthermore, a predominance of CD16⁺ cells over CD57⁺ has been observed in uRPL patients. Of note, some patients classified as having normal numbers of uNK cells also present these cytotoxic markers upraised.

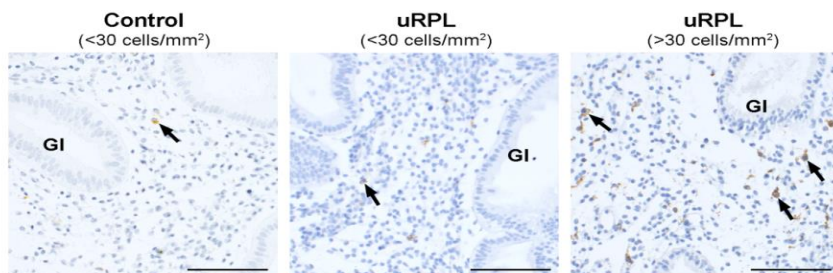
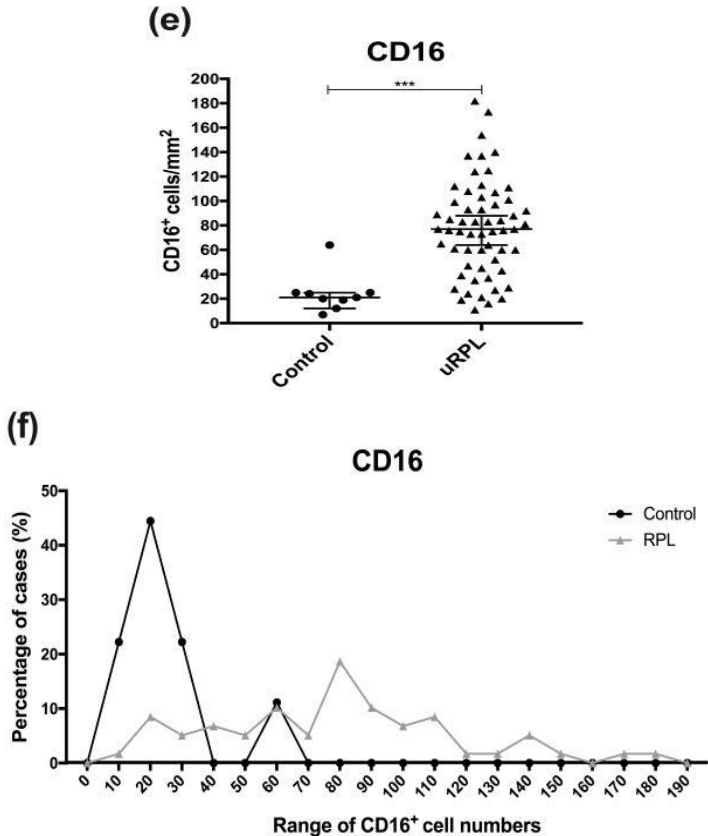


Fig.4.Immunohistocalization of CD16⁺uNK in control (<30cells/mm²) and uRPL subgroups (<30cells/mm² and >30cells/mm²). Scale bar = 100 μm

Eight out of ten control endometria (89%) contained <30 CD16⁺ cells/mm². One control sample (11%) showed 64 cells/mm², and the inflamed one showed 178 CD16⁺ cells/mm². In uRPL cases, 15% showed <30 cells/mm² and 85% had >30 cells/mm² (Fig.4. graf.3,e,f).



*Graf.3. Mean values (cells/mm²)(e) and frequency distribution (f) of cell count ranges for CD16 in controls and uRPL cases. The distribution of values from samples classified in ranges of 10 cells/mm². The relative frequency shows the percentage of samples in the respective range. *** P<0.001.*

In our study the most statistically significant difference was revealed in the distribution of CD16 marker, between uRPL and control groups: by the distribution of mean values ($p < 0.001$), as well as, by frequency distributions (Chi² test=9,64; $P < 0.001$) (Table 3).

Tabl.3. Frequency distributions of CD16 marker in uRPL and control groups

	<30 cells/mm	>30 cells/mm	Total number
Controls	8 (89%)	2 (11%)	10 (100%)
uRPL	15 (15%)	46 (85%)	61 (100%)
Total cases	23	48	71 (100%)

Elevated levels of CD16⁺ and CD57⁺ cells were observed in ≈40% of the uRPL-CD56^{low} subgroup. These results show that even cases with reduced numbers of uNK cells may have heightened cytotoxic potential. In the remaining 60%, CD16⁺ cells were more numerous than CD56⁺ cells, demonstrating a shortage of CD56⁺ uNK cells and the expression of CD16 by CD56⁻ NK or other immune cells. It is noteworthy to mention, that in one case of our uRPL-CD56^{low} subgroup due to high count of CD16⁺ and CD57⁺ cells, even in the absence of CE, patient had 14 spontaneous miscarriage.

In the control group, 56% had <30 CD57⁺ cells/mm² and 44% had >30 cells/mm². uRPL patients presenting <30 cells/mm² encompassed 32% of cases, whereas those with >30 cells/mm² comprised 68% ($p < 0.001$; Fig.5, graf.3,g,h).

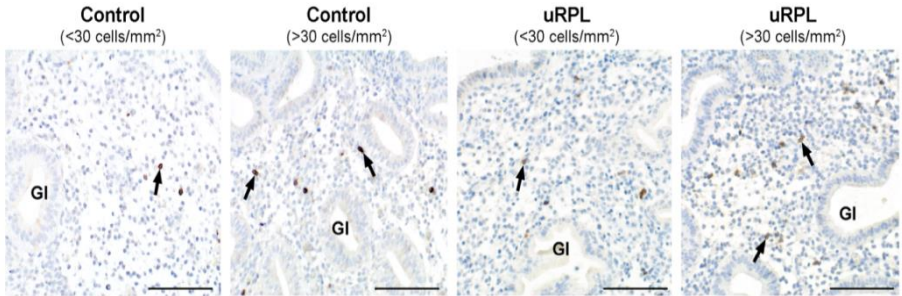
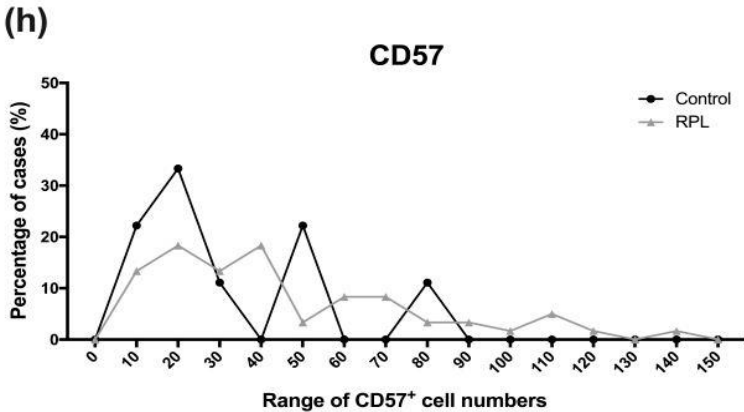
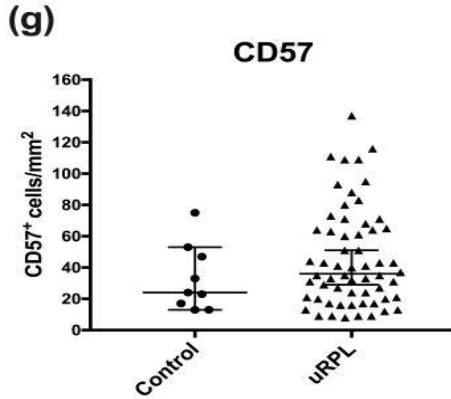


Fig.5.Immunohistocalization of CD57⁺ uNKcells in control (<30 and >30 cells/mm²) and uRPL cases (<30 and >30 cells/mm²). Scale bar = 100 μ m

Differently from other subgroups, the uRPL-CD56^{high} subgroup presented a low proportion of CD57⁺ compared to CD56⁺ cells. Since CD57 is expressed by terminally differentiated cytotoxic NK cells this result suggests impaired differentiation of such cells in some cases of uRPL.

The expression of CD16, followed by CD57 (a terminally sulfated glycan carbohydrate), designates the last stages of NK cell differentiation and a robust cytotoxic potential. Impaired production of cytokines and deregulated cytotoxicity are proposed mechanisms by which CD16⁺ and CD57⁺ uNK subpopulations generate an endometrial environment incompatible with embryo development.

Although the expressions of CD16 and CD57 indicate the cytotoxic potential of uNK cells, their effector functions are ultimately determined by the repertoire of activating and inhibitory receptors expressed at the cell surface, such as NKG2D, killer cell Ig-like receptors (KIR), and natural cytotoxicity receptors (NCR).



Graf.3. Mean values (cells/mm²)(g) and frequency distribution (h) of cell count ranges for CD57 in controls and uRPL cases. The distribution of values from samples classified in ranges of 10 cells/mm². The relative frequency shows the percentage of samples in the respective range.

To evaluate correlations between CD56⁺, CD16⁺, CD57⁺ uNK subpopulations and CD45⁺ leucocytes, according to the subgroups (CD56^{low}, CD56^{normal} and CD56^{high}) Spearman correlation (r) test was used in uRPL and control groups (graf.4,a,c; graf.5,e,g).

In order to characterize better the complex and dynamic endometrial tissue, we used innovative parameters: instead of separate immune markers, we determined the ratios between different subpopulations of uNK cells (among them the ratio of CD16⁺ and CD57⁺ cells to the total uNK cell number), as well their ratios to total leucocyte populations.

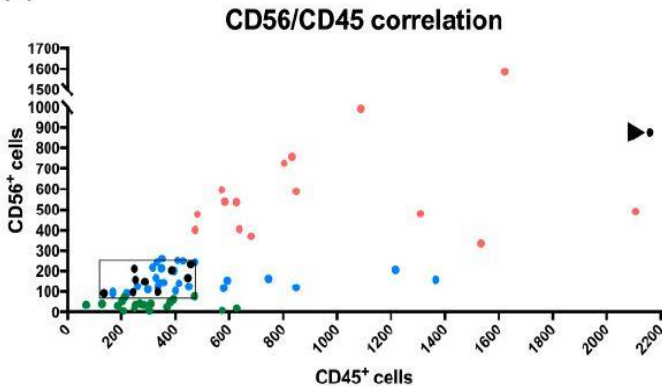
CD56/CD45 Correlation and Ratio

The concentration of CD45⁺ leukocytes in the control group was positively correlated with the number of CD56⁺ cells ($r = 0.683$; $p < 0.01$). In contrast, no correlations were detected in any uRPL subgroup: uRPL-CD56^{low} ($r = 0.004$; $p = 0.99$), uRPL-CD56^{Normal} ($r = 0.3$; $p = 0.14$), and uRPL-CD56^{high} ($r = 0.239$; $p = 0.39$).

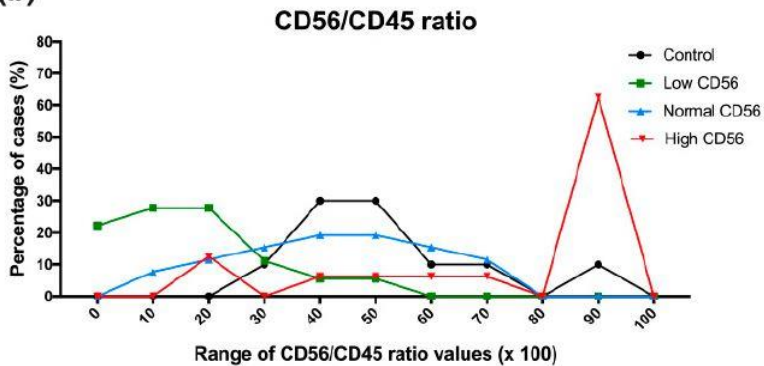
Analysis of the CD56/CD45 ratio revealed that uNK cells accounted for ≈ 30 -70% of all endometrial leukocytes in eight out of nine control endometria. In one control sample, this value reached 85%. In the uRPL-CD56^{Normal} subgroup, 81% had similar CD56/CD45 ratios to those of controls whereas a small fraction (19%) presented high CD45⁺ cell counts and very low CD56/CD45 ratios ($p = 0.5$ vs. control).

Differently, only 22% of cases from the uRPL-CD56^{low} subgroup had CD56/CD45 ratio values similar to that of controls. In the majority of samples (78%), CD56/CD45 ratios were low, indicating that CD56⁺ uNK cells were greatly outnumbered by total CD45⁺ leukocytes ($p < 0.001$ vs. control).

(a)



(b)



Graf.4. Correlation (a) and ratio (b) between CD56/CD45 markers. Distribution of the CD56/CD45 ratio (%) in the control and uRPL groups: each sample is represented by a dot (black: controls; green: CD56^{low}; blue: CD56^{normal}; and red: CD56^{high}). Box surrounds the control values; arrowhead shows a single outlier control sample with signs of inflammation. Samples are classified in stepwise ranges based on their ratios as indicated in the x axis.

In the uRPL-CD56^{high} subgroup, 25% presented CD56/CD45 ratio values within the control range and 12% had extremely high numbers of CD45⁺ leukocytes and, hence, diminished CD56/CD45 ratios. Most endometria in the uRPL-CD56^{high} subgroup (63%), however, had high CD56/CD45 ratio values ($p=0.05$ vs. control), showing that elevated CD45⁺ were due to excessive CD56⁺ uNK cells ($\approx 95\%$).

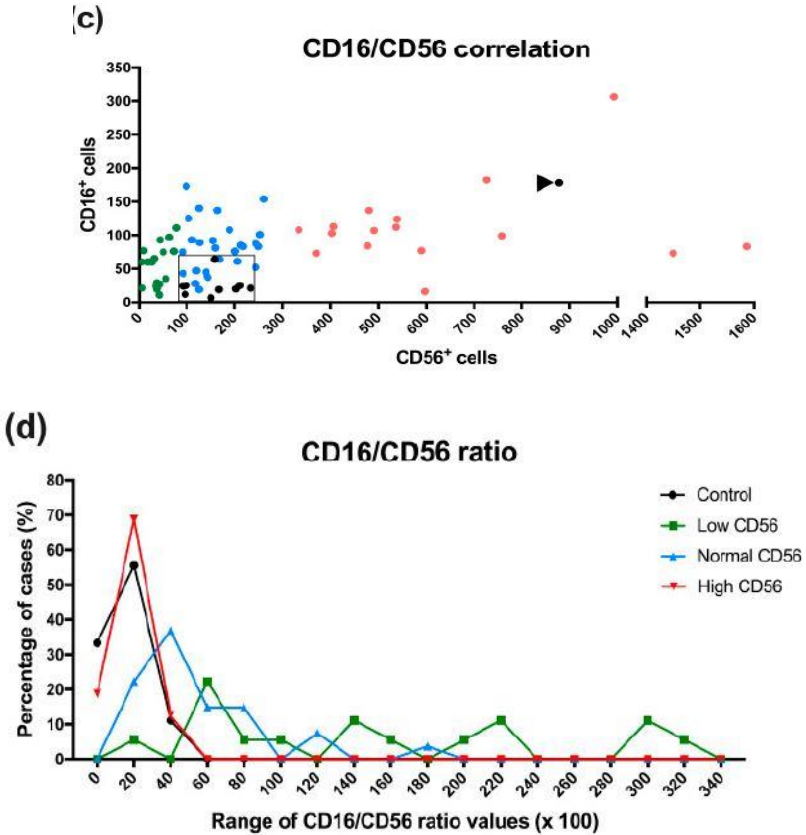
CD56/CD45 ratio values of the uRPL subgroups were different between each other (uRPL-CD56^{low} vs. uRPL-CD56^{Normal} $p=0.005$; uRPL-CD56^{low} vs. uRPL-CD56^{high} groups $p < 0.001$; and uRPL-CD56^{Normal} vs. uRPL-CD56^{high} $p = 0.002$; Graf.4,a,b).

CD16/CD56 Correlation and Ratio

The number of CD16⁺ cells was not significantly correlated to the CD56⁺ cells in any of the analyzed groups: controls ($r=0.126$; $p=0.75$), uRPL-CD56^{low} ($r=0.361$; $p=0.14$), uRPL-CD56^{Normal} ($r=0.172$; $p=0.40$), and uRPL-CD56^{high} ($r=-0.211$; $p=0.45$).

Analysis of the CD16/CD56 ratio demonstrated that the number of CD16⁺ cells was $\approx 5-25\%$ of the concentration of CD56⁺ cells in control endometria. In the uRPL-CD56^{Normal} subgroup, 59% had CD16/CD56 ratios similar to that of the control group. In 30% of cases from this subgroup, the percentage of CD16⁺ cells was increased, and in 11%, the number of CD16⁺ cells surpassed that of CD56⁺ cells ($p<0.001$ vs. control). In 28% of the uRPL-CD56^{low} subgroup, CD16⁺ cells were elevated and in 56%, they exceeded CD56⁺ cells. Only 6% of the uRPL-CD56^{low} subgroup had CD16/CD56 ratios corresponding to the control ($p < 0.001$ vs. control). The uRPL-CD56^{high} subgroup displayed CD16/CD56 ratio values comparable to controls ($p=0.92$ vs. control).

CD16/CD56 ratio values from the uRPL subgroups were different from each other (uRPL-CD56^{low} vs. uRPL-CD56^{Normal} p=0.002; uRPL-CD56^{low} vs. uRPL-CD56^{high} p<0.001; and uRPL-CD56^{Normal} vs. uRPL-CD56^{high} p<0.001) (Graf.4,c,d).



Graf.4. Correlation (c) and ratio (d) between CD16/CD56 markers. Distribution of the CD16/CD56 ratio (%) in the control and uRPL groups: each sample is represented by a dot (black: controls; green: CD56^{low}; blue: CD56^{normal}; and red: CD56^{high}). Box surrounds the control values; arrowhead shows a single outlier

control sample with signs of inflammation. Samples are classified in stepwise ranges based on their ratios as indicated in the x axis.

CD57/CD56 Correlation and Ratio

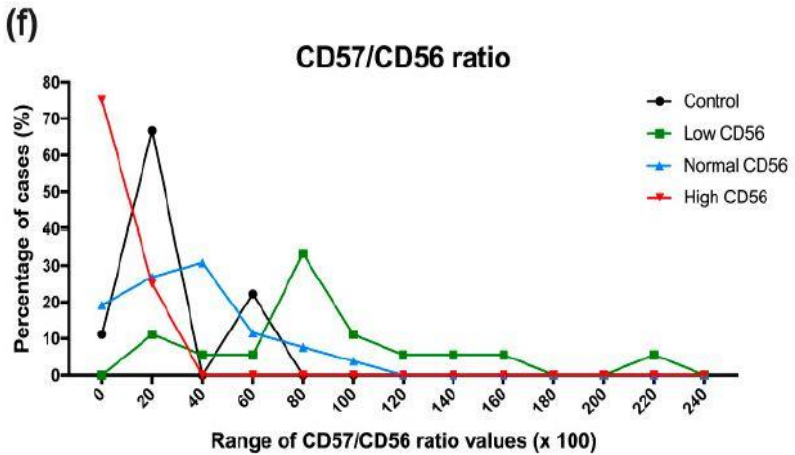
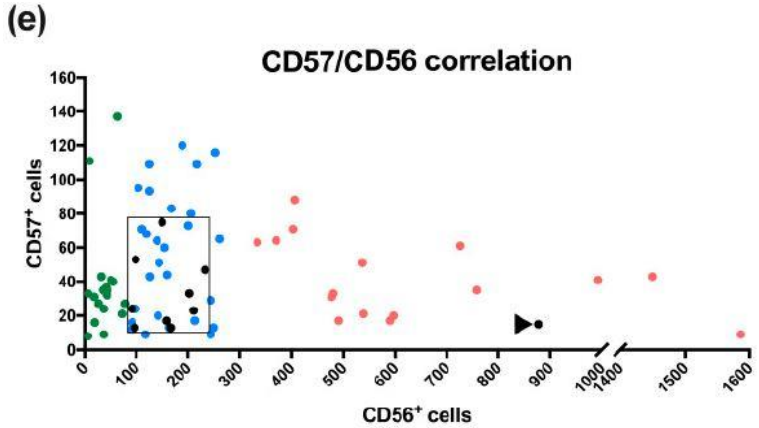
The number of CD57⁺ cells was not correlated with the concentration of CD56⁺ cells in the control ($r=0.066$; $p=0.87$) as well as in the uRPL-CD56^{low} ($r=0.070$; $p=0.78$) and uRPL-CD56^{Normal} groups ($r=0.112$; $p=0.59$). The uRPL-CD56^{high} group showed a negative correlation between CD57⁺ and CD56⁺ cells ($r=-0.514$; $p=0.04$).

In order to identify differences between the control and uRPL subgroups, the CD57/CD56 ratio values were classified as follows: <20% (low), 21–60% (intermediate), and >60% (high). In the control group, 11% had low ratios of CD57⁺ cells, 67% had intermediate values, and 22% presented high ratios of CD57⁺ cells.

Compared to the control, the uRPL-CD56^{low} subgroup showed 17% of cases with intermediate and 63% with elevated CD57/CD56 ratios ($p=0.03$ vs. control).

The uRPL-CD56^{Normal} subgroup presented similar CD57/CD56 ratios to those of the control group ($p=0.84$ vs. control). In the uRPL-CD56^{high} subgroup, 75% showed low CD57/CD56 ratios whereas 25% had intermediate values in relation to the control ($p=0.02$ vs. control).

The uRPL subgroups had distinct CD57/CD56 ratios between each other (uRPL-CD56^{low} vs. uRPL-CD56^{Normal} $p=0.003$; uRPL-CD56^{low} vs. uRPL-CD56^{high} $p<0.001$; and uRPL-CD56^{Normal} vs. uRPL-CD56^{high} $p=0.003$). (Graf.5,e,f).



Graf.5. Correlation (e) and ratio (f) between CD57/CD56 markers. Distribution of the CD57/CD56 ratio (%) in the control and uRPL groups: each sample is represented by a dot (black: controls; green: CD56^{low}; blue: CD56^{normal}; and red: CD56^{high}). Box surrounds the control values; arrowhead shows a single outlier control sample with signs of inflammation. Samples are classified in stepwise ranges based on their ratios as indicated in the x axis.

CD16/CD57 Correlation and Ratio

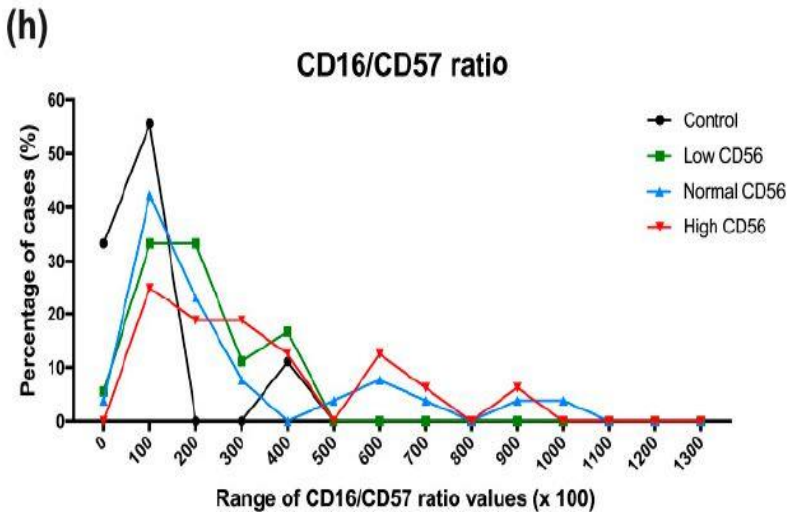
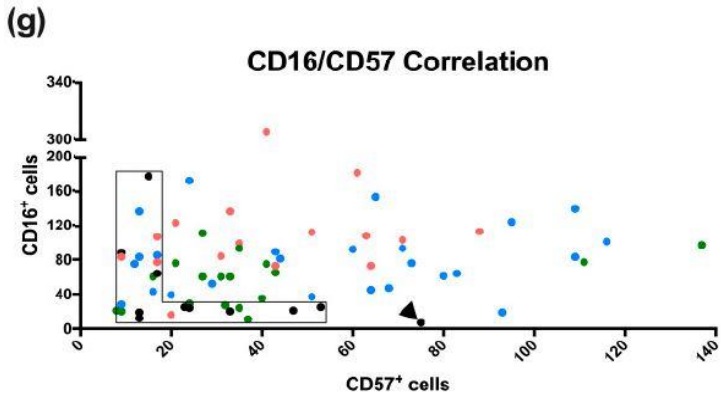
No significant correlations were found between the number of CD16⁺ and CD57⁺ cells in the control ($r=-0.042$; $p=0.92$), uRPL-CD56^{low} ($r=0.384$ $p=0.12$), uRPL-CD56^{Normal} ($r=0.166$ $p=0.42$), or uRPL-CD56^{high} groups ($r=0.258$ $p=0.33$).

Analysis of the CD16/CD57 ratio demonstrated a predominance of CD57⁺ cells in 33% of control endometria (<100%). In 56%, the CD16/CD57 ratio were slightly increased towards CD16⁺ cells (100–200%). One control endometrium (11%) showed a higher ratio of CD16⁺ than CD57⁺ cells (>200%).

The uRPL-CD56^{low} ($p=0.14$ vs.control), uRPL-CD56^{Normal} ($p= 0.05$ vs. control), and uRPL-CD56^{high} subgroups ($p=0.01$ vs. control) had respectively 6, 4, and 0% of cases with ratios indicating more CD57⁺ than CD16⁺ cells. The same subgroups presented 33, 42, and 25% of samples with slightly increased numbers of CD16⁺ cells compared to CD57⁺ cells.

In 61% of uRPL-CD56^{low}, 54% of uRPL-CD56^{Normal}, and 75% of uRPL-CD56^{high} subgroups CD16⁺ cells outnumbered CD57⁺ cells to a great extent.

No statistically significant differences were detected between the CD16/CD57 ratios compared to the uRPL subgroups (uRPL-CD56^{low} vs. uRPL-CD56^{Normal} $p=0.95$; uRPL-CD56^{low} vs.uRPL-CD56^{high} $p<0.30$; and uRPL-CD56^{Normal} vs. uRPL-CD56^{high} $p=0.29$) (Graf.5,g,h).



Graf.5. Correlation (g) and ratio (h) between CD16/CD57 markers. Distribution of the CD16/CD57 ratio (%) in the control and uRPL groups: each sample is represented by a dot (black: controls; green: CD56^{low}; blue: CD56^{normal}; and red: CD56^{high}). Box surrounds the control values; arrowhead shows a single outlier control sample with signs of inflammation. Samples are classified in stepwise ranges based on their ratios as indicated in the x axis.

Our data demonstrate a high diversity of immunophenotypes of endometrial lymphocytes in uRPL women. The ratios between different subpopulations of uNK cells and over total leucocytes, as well as between highly cytotoxic subtypes, were differently expressed in uRPL subgroups, depending on uNK cell concentration in the endometrium. The endometrium of our investigated uRPL patients was characterized by cases with low, normal or high uNK cell count.

Our results reinforce the existence of a favorable uNK cell concentration range in fertile women. Furthermore, the occurrence of distinct immunophenotypes in subgroups of uRPL patients with low, normal and high uNK cell counts indicates distinct pathogenic mechanisms. The results of our study highlight that not only the numbers of uNK cells, but also the immunomodulatory/cytotoxic ratio should be taken into consideration to assess the uRPL endometrium.

Better classification and more in-depth characterization of the endometrial lymphocyte immunophenotypes in women with unexplained recurrent pregnancy loss in larger populations, will help researchers to find out more informative endometrial immune parameters to predict the risk for subsequent miscarriage in uRPL women and to define the specific cases for personalized immunomodulatory treatment. That will facilitate the ending of the groundless, empiric immune testing and treatments in above mentioned group of women.

Conclusions

1. Our results reinforce the link between unexplained recurrent pregnancy loss and imbalance of immunophenotypes of different subpopulations of endometrial lymphocytes. The existence of diversity of uNK immunophenotypes was revealed.
2. Combine analysis of CD16, CD45, CD56, CD57 markers by the Immunohistochemistry has revealed that beyond the absolute numbers of uNK cells there are more informative endometrial immune parameters- the ratios between immunomodulatory and cytotoxic subpopulations of uNK cells and their ratio over the total endometrial leucocytes. This will enable us to evaluate endometrial immune environment and identify possible cytotoxic and pro-fertile immunophenotypes of endometrial lymphocytes.
3. In uRPL group increased level of CD16⁺ and CD57⁺ subpopulations of uNK cells, with the prevalence of CD16⁺ (p<0.001), compared to the control group, indicate heightened cytotoxicity of the endometrium. Therefore, CD16⁺ might be considered as the potential marker of cytotoxicity to predict the risk for subsequent miscarriage in women with uRPL anamnesis.
4. The endometria in our uRPL group was characterized with wide range of CD56⁺uNK cell count. Three subgroups were identified: with low (CD56^{low}<90 cell/mm²), normal (CD56^{normal} 90-300 cell/mm²) and high (CD56^{high}>300 cell/mm²)-concentrations.
5. In CD56^{low} and CD56^{normal} subgroups, despite the relatively low number of uNK cells, high proportion of cytotoxic CD16⁺ and CD57⁺ subpopulations towards the CD56⁺ was revealed.

6. In control group there was statistically significant positive correlation of CD56⁺ uNK cell number with the CD45⁺ leucocytes. In contrast to that, no correlation was observed between these markers in uRPL group. Distinct distribution of CD56/CD45 ratio in different subgroups of uRPL (depending on uNK cell concentrations), indicate on distinct pathophysiological mechanisms in these subgroups.
7. By the immunohistochemical localisation of CD138 marker between uRPL and control groups there was no statistically significant difference, therefore the influence of chronic endometritis on our investigated endometrial samples were excluded.

Practical recommendations

- To assess the different subpopulations of endometrial uNK cells in women with unexplained recurrent pregnancy loss by the Immunohistochemistry, two subgroups should be separated with the similar anamnesis and clinical symptoms, but with rather different immune status (too low or too high uNK cell count) and therefore with different needs of diagnostics and treatment modalities.
- To evaluate the immune microenvironment in uRPL women, not only separate absolute numbers of uNK cells should be assessed, but also their certain ratios and immunophenotypes (cytotoxic/pro-fertile) should be taken into consideration. That

will help to assess the risk for subsequent miscarriage in uRPL women and define the specific cases in this group for individualized immunomodulatory treatment.

- Detection of the endometrial CD138⁺ plasma cells by the Immunohistochemistry is the reliable specific/sensitive method for diagnostics of chronic endometritis. The early diagnostics and treatment of this pathological condition in the endometrium will facilitate the prevention of unnecessary hysterectomies in the group of gynaecological/reproductive disorders, which are characterized with unspecific oligo-symptoms behind the undiagnosed chronic endometritis.

Published scientific papers

- M.Chiokadze, J.Kristesashvili. On the Issue of Standardization of Uterine Natural Killer Cell Measurement in Patients with Recurrent Pregnancy Loss. *Georgian Medical News*. No9 (294) 2019. 31-36; ISSN 1512-0112
- M.Chiokadze, J.Kristesashvili. Immunobiological Mechanisms and Management of Recurrent Pregnancy Loss. *Georgian Medical News*. No6 (291) 2019. 26-31; ISSN 1512-0112
- M.Chiokadze, C.Bär, J.Pastuscheck, P.Streicher, B.Don'skoi, E.Schleußner, U.Markert, R.Favaro. Evaluation of Natural Killer Cell Markers CD16, CD56 and CD57 in the Endometrium of Women with RPL. Abstract. P62. The 39th Annual Meeting of ASRI. 12-15 June, 2019, Grand Rapids, Michigan, USA. *Am J Reprod Immunol*; 2019;81(suppl.1), p.66.
- U.Markert, B.Toth, J.Pastuscheck, M.Weber, C.Bär, J.Heger, P.Streicher, M.Chiokadze, R.Favaro, E.Schleußner et al., Endometrial NK and Plasma Cells in Infertile Women. Abstract.P2.8. International Federation of Placenta Associations 2019 (IFPA2019) and the 8th Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (VIII SLIMP). 10-13 September, Buenos Aires, Argentina. *Placenta Journal*, Issue 83, p. e-68
- M.Chiokadze, C.Bär, J. Pastuscheck, B. Dons'koi, K.G.Khazhlyenko, E.Schleussner, U.R.Markert, R.R.Favaro. Beyond uterine Natural Killer cell numbers in unexplained recurrent pregnancy loss: Combined analysis of CD45, CD56, CD16, CD57 and CD138. *Diagnostics* 2020, 10, 650; doi:10.3390/diagnostics10090650