



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ - ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ  
ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΑΠΟΒΑΛΛΟΜΕΝΑ ΕΜΒΡΥΑ ΜΕ ΕΓΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ  
ΧΟΡΙΑΜΝΙΟΝΙΤΙΔΑ ΚΑΤΑ ΤΟ 2<sup>Ο</sup> ΤΡΙΜΗΝΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

***ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΝΙΚ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018**











**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ - ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ  
ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΑΠΟΒΑΛΛΟΜΕΝΑ ΕΜΒΡΥΑ ΜΕ ΕΓΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ  
ΧΟΡΙΑΜΝΙΟΝΙΤΙΔΑ ΚΑΤΑ ΤΟ 2<sup>Ο</sup> ΤΡΙΜΗΝΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

***ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΝΙΚ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αίτησης του κ. Παπαδόπουλου Εμμανουήλ: 20-5-2013

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 753\*/18-6-2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Στεφάνου Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα, Αναπλήρωτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Γούσια Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 4-7-2013

*«Διαγνωστική προσέγγιση και μελέτη πιθανών διαταραχών αιμοποίησης σε αποβαλλόμενα έμβρυα με εγκατεστημένη χοριοαμνιονίτιδα κατά το 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης»*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 859/21-6-2018**

<b>Μακροδήμας Γεώργιος</b>	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Στεφάνου Δημήτριος</b>	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Γούσια Άννα</b>	Αναπλήρωτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Λαμπροπούλου Μαρία</b>	Αναπλήρωτρια Καθηγήτρια Εμβρυολογίας-Ιστολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης
<b>Βρεκούσης Θωμάς</b>	Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-7-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



***Στους Γονείς Μου :***

***Νικόλαο Εμμ. Παπαδόπουλο***

***Μαρία Κων/νου Μενεγάκη***

***Φωτεινά Παραδείγματα στη Ζωή μου***





# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μια από τις λοιμώξεις που απασχολεί τη σύγχρονη Μαιευτική είναι οι αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, η ενδομήτρια φλεγμονή των εμβρυικών υμένων (χόριο και άμνιο) κατά την κύηση και οφείλεται σε μυκοπλάσματα (*Ureaplasma Urealyticum* 47%), μικρόβια, ιούς, μύκητες, παράσιτα και χλαμύδια.

Ο Gotsch και συν. (2007) συνέδεσαν τη χοριοαμνιονίτιδα με το Σύνδρομο Φλεγμονώδους Αντίδρασης του Εμβρύου και λίγο αργότερα ο Gantert και συν. (2010), χαρακτήρισαν τη χοριοαμνιονίτιδα ως πολυοργανική νόσο του Εμβρύου.

Η λοίμωξη ξεκινάει συνήθως από τη μητέρα, η συχνότητα όμως της νοσηρότητας της εγκύου και η επέκταση της λοίμωξης στο έμβρυο δεν έχουν ακόμη διευκρινισθεί. Παραμένουν άγνωστοι διάφοροι μηχανισμοί (μητρικοί, πλακουντικοί, εμβρυικοί) που σε συνδυασμό με τη λοιμογόνο δράση του αιτίου της λοίμωξης, καθορίζουν το βαθμό, την έκταση και την εξέλιξη της φλεγμονής στους εμβρυικούς υμένες και κατ' επέκταση στα διάφορα όργανα του εμβρύου.

Η χοριοαμνιονίτιδα συνδυάζεται με υψηλό ποσοστό εμβρυϊκής νοσηρότητας και θνητότητας που ανέρχεται σε ποσοστό 43 - 45.5% (ίσως και παραπάνω, σύμφωνα με νεότερες έρευνες) κατά το δεύτερο τρίμηνο της ανάπτυξης, χρονική περίοδο που συμπίπτει με την έντονη εξωμυελική αιμοποίηση στο έμβρυο και την έναρξη λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος.

Έχει αποδειχθεί ότι, η φλεγμονώδη αντίδραση των εμβρυικών υμένων επάγει δευτεροπαθώς διαταραχές στη ανάπτυξη, οι οποίες έχουν συνδυασθεί με την εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών και συγγενών διαμαρτιών σε διάφορα όργανα του εμβρύου. Διαταραχές οι οποίες έχουν καταγραφεί στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, των αισθητηρίων οργάνων όρασης και ακοής, στο αναπνευστικό, γαστρεντερικό και ουροποιητικό σύστημα και τέλος διαταραχές στη διεργασία της εμβρυϊκής εξωμυελικής αιμοποίησης.

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας ήταν:

1<sup>ο</sup> Να αξιολογήσουμε ανοσοιστοχημικά, στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης (αρχή, μέσο και τέλος), την αιμοποίηση σε δείγματα ήπατος, σπλήνα και θύμου αδένων ανθρώπινων εμβρύων, η ιστολογική εικόνα των οποίων έδειξε, σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας. 2<sup>ο</sup> Να αξιολογήσουμε με την ίδια μέθοδο, τυχόν μεταβολές έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, CD44, E-Καντερίνης (E-Cadherin) και E-Σελεκτίνης (E-Selectin).

Η μελέτη περιελάμβανε εκατόν είκοσι έμβρυα, (τριάντα έμβρυα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και ενενήντα έμβρυα με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας) που ανήκουν στο Αρχαικό Υλικό του Εργαστηρίου Ιστολογίας - Εμβρυολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης στην Αλεξανδρούπολη.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω θερμά τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. **Δημήτριο Στεφάνου**, για την ανάθεση της μελέτης αυτής, την καθοδήγησή του αλλά και την αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Διπλωματικής Εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες επιστημονικές επισημάνσεις του σε όλα τα στάδια της μελέτης. Η εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε, χαρακτηριστικό γνώρισμα ενός Πανεπιστημιακού Δασκάλου, ήταν καθοριστικής σημασίας.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, κ. **Άννα Μπατιστάτου**, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. **Άννα Γούσια**, Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. **Γεώργιο Μακρυδήμα**, Καθηγητή Μαιευτικής - Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. **Μαρία Λαμπροπούλου**, Αναπλ. Καθηγήτρια Ιστολογίας - Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, κ. **Θωμά Βρεκούση**, Επικ. Καθηγητή Μαιευτικής - Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κ. **Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα**, Επικ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την

τιμή που μου έδωσαν να αποτελούν μέλη της και να συμβάλουν με αυτόν τον τρόπο στην ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής με τα σχόλια και τις διορθώσεις των.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. **Μαρία Λαμπροπούλου**, που μου πρόσφερε κάθε δυνατή βοήθεια, συμβουλή και συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας που έκανα για να ολοκληρώσω τη διδακτορική μου διατριβή.

Τον κ. **Κωνσταντίνο Αναγνωστόπουλο**, Αναπλ. Καθηγητή της Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, για την ολοκλήρωση της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων της διδακτορικής διατριβής και τα πολύτιμα σχόλια του.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τους Δασκάλους μου, από το Δημοτικό Σχολείο μέχρι σήμερα, διότι με τη μεταλαμπάδευση των γνώσεών τους μου έδωσαν τη δυνατότητα να γράψω αυτή την ερευνητική εργασία.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος.....	1
Πίνακας Περιεχομένων.....	5
Εισαγωγή.....	7
Αιμοποίηση - Ανοσοποιητικό Σύστημα.....	9
Εμβρυική Καταβολή Ήπατος - Σπλήνα - Θύμου αδένα.....	28
Εμβρυικοί Υμένες - Χόριο και Άμνιο.....	37
Χοριοαμνιονίτιδα.....	39
Μόρια Κυτταρικής Προσκόλλησης.....	49
Σκοπός Ερευνητικής Εργασίας.....	53
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>55</b>
Υλικό και μέθοδος.....	57
Αποτελέσματα.....	63
Συζήτηση.....	77
Συμπεράσματα.....	89
Παράρτημα (Πίνακες, Εικόνες, Γραφήματα).....	95
Περίληψη στην Ελληνική.....	143
Περίληψη στην Αγγλική.....	151
Βιβλιογραφία.....	153



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ





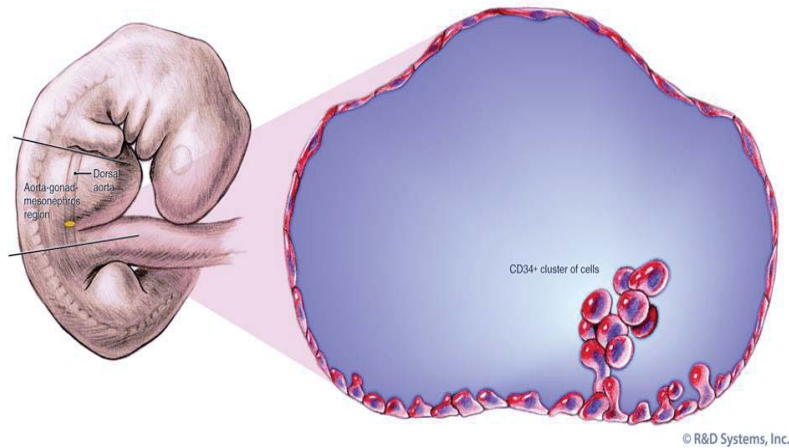
## ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΖΩΗ

Η αιμοποίηση είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο που εξασφαλίζει την κανονική αναπλήρωση των κυττάρων του αίματος που χάνονται κατά την λειτουργία τους και ρυθμίζεται μέσω ενός πλήθους μορίων, τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα του υποστρώματος, από άλλα ειδικά κύτταρα αλλά και από αυτά τα ίδια τα αιμοποιητικά κύτταρα. Τα ώριμα κύτταρα του αίματος δεν διαιρούνται, έχουν μικρή διάρκεια ζωής και είναι απαραίτητη η συνεχής αντικατάστασή τους από τα προγονικά τους αρχέγονα κύτταρα στα αιμοποιητικά όργανα. Η συνεχής προσφορά νέων κυττάρων στις επιμέρους μορφολογικά αναγνωρίσιμες κυτταρικές σειρές εξασφαλίζεται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων που αποτελεί ανεξάντλητη πηγή παραγωγής αιμοποιητικών κυττάρων.

Η θέση της αιμοποίησης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και η παραγωγή ώριμων κυττάρων του αίματος από πρόδρομες κυτταρικές μορφές πραγματοποιείται σε διάφορα όργανα του εμβρύου πριν τη διαφοροποίηση του ερυθρού μυελού των οστών.

**Η αιμοποίηση** διακρίνεται: α) στην **εμβρυϊκή αιμοποίηση**, διεργασία η οποία ξεκινά στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης (3<sup>η</sup> εβδομάδα) και καταλήγει με το σχηματισμό του αίματος ως ιστό, και β) στην **μετε-εμβρυϊκή αιμοποίηση**, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως μια διεργασία φυσιολογικής αναγέννησης των κυττάρων του αίματος από αρχέγονα προγονικά κύτταρα στον ερυθρό μυελό των οστών.

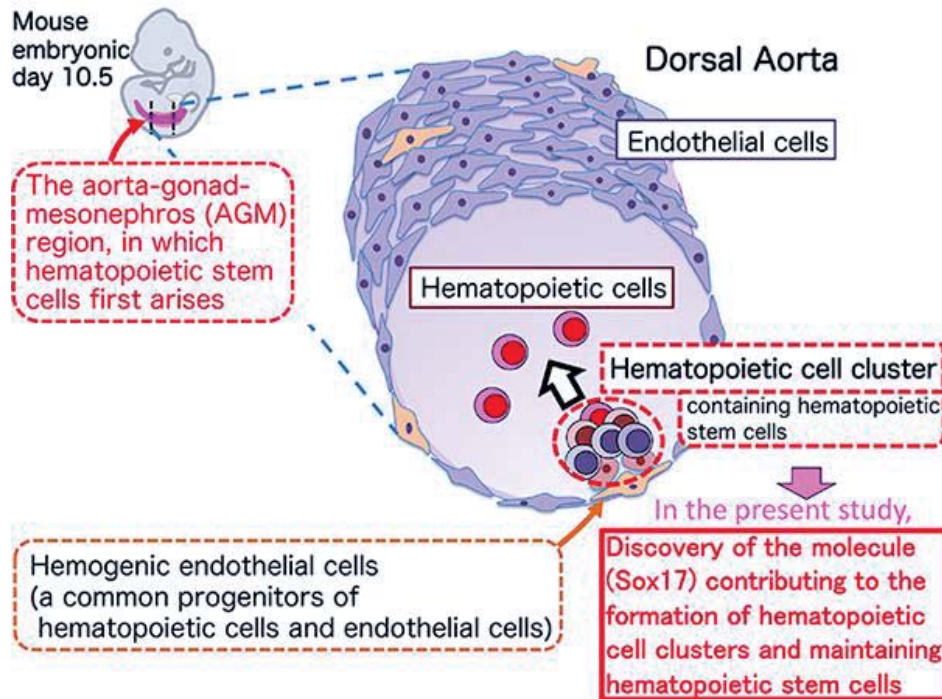
Σύμφωνα με τα νεότερα στοιχεία της βιβλιογραφίας, στα θηλαστικά, το αιμοποιητικό σύστημα αναπτύσσεται από δυο διαφορετικές πηγές πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων. Η πρώτη αφορά το τοίχωμα του λεκιθικού ασκού, όπου την 3<sup>η</sup> εβδομάδα της ανάπτυξης σχηματίζονται αιμοποιητικές νησίδες αποτελούμενες από αθροίσεις μεσεγχυματικών κυττάρων, γνωστές ως αιμαγγειοβλάστες **(1 - 4)**.



© R&amp;D Systems, Inc.

<https://www.rndsystems.com/resources/articles/cytokine-regulation-during-embryonic-hematopoiesis> **Εικόνα 1**

Το ενδοθήλιο των πρώτων αγγείων σχηματίζεται από τα επιφανειακά κύτταρα αυτών των νησίδων, ενώ τα πιο εσωτερικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα του αίματος (**Εικόνα 1**). Τα κύτταρα του αίματος στο στάδιο αυτό σχηματίζουν: 1<sup>ο</sup> αρχέγονα εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα που περιέχουν εμβρυική αιμοσφαιρίνη και επιτελούν την πρώτη μεταφορά οξυγόνου στο έμβryo και ουσιαστικά αποτελούν τον σημαντικότερο παράγοντα επιβίωσης του και 2<sup>ο</sup> μυελοειδή κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν: α) στο νευρικό σύστημα όπου και θα σχηματίσουν τα κύτταρα της μικρογλοίας (μονοκύτταρα / μακροφάγα, την τέταρτη ποικιλία κυττάρων της νευρογλοίας) και β) στο δέρμα όπου και θα αποτελέσουν τα εξειδικευμένα μακροφάγα (αντιγόνο – παρουσιαστικά κύτταρα), γνωστά ως κύτταρα του Langerhans (**1**). Στη στάδιο αυτό δεν σχηματίζονται λευκοκύτταρα ή αιμοπετάλια. Η δεύτερη πηγή αιμοποιητικών κυττάρων αποτελούν τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (pluripotential Haematopoietic Stem Cells - pHSCs), που αναγνωρίζονται την 5<sup>η</sup> εβδομάδα της ανάπτυξης και προέρχονται από μετατροπή των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται κοιλιακά στον αυλό της ραχιαίας αορτής στην περιοχή γνωστή ως αορτή - γονάδες - μεσόνεφρος (AGM) (**Εικόνα 2**), υπό την επαγωγή των παραγώγων του μεσοδέρματος που περιβάλλει το αγγείο (**1, 5, 6**).



<http://www.tmd.ac.jp/english/press-release/20140423/index.html>

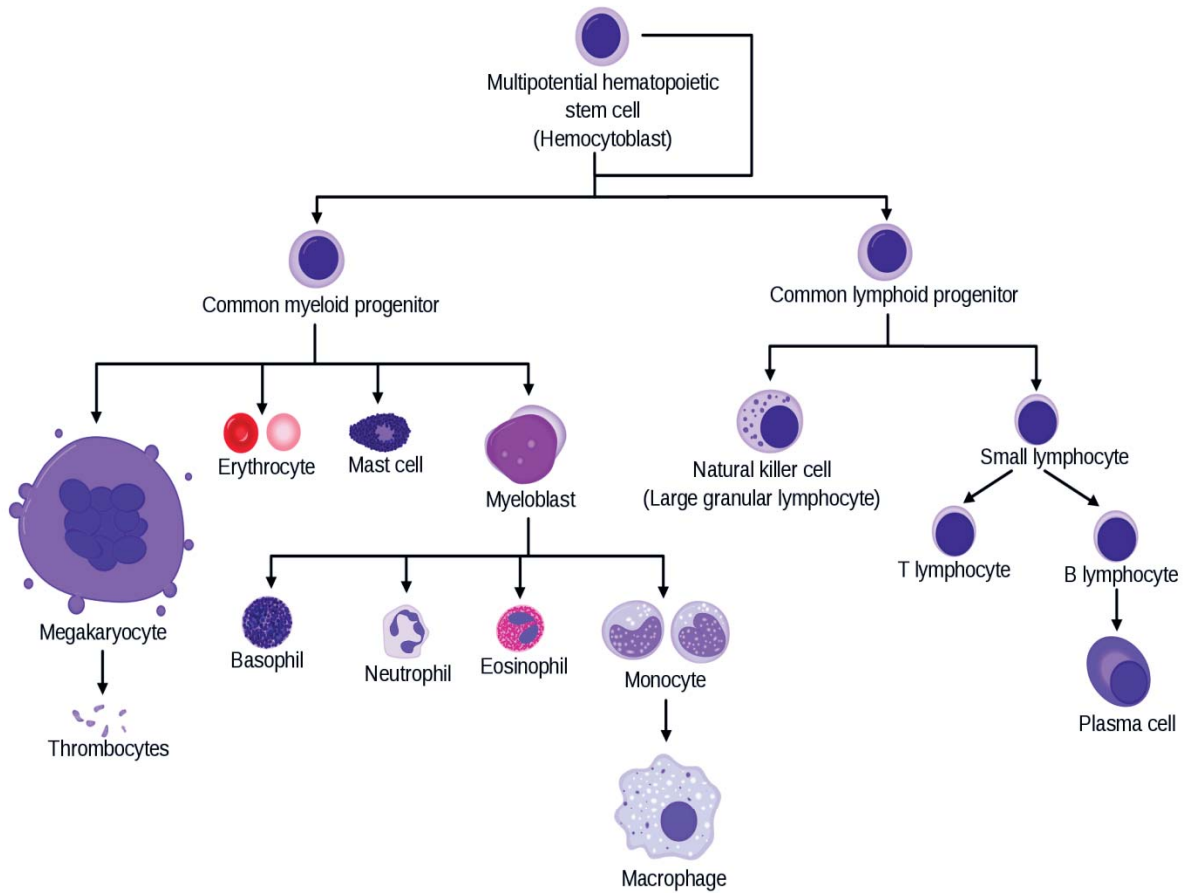
## Εικόνα 2.

Τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (pHSCs) αποτελούν τα βασικά κύτταρα της αιμοποίησης. Τα κύτταρα αυτά στο τέλος της 5<sup>ης</sup> εμβρυικής εβδομάδας μεταναστεύουν αρχικά στο παρέγχυμα του αναπτυσσόμενου ήπατος και αργότερα στο σπλήνα, θύμο αδέν, νεφρούς, επινεφρίδια, λεμφαδένες, περιοχή διεγκέφαλου και τελικά στον ερυθρό μυελό των οστών. Από την 6<sup>η</sup> εβδομάδα το ήπαρ μετατρέπεται ταχέως στο βασικότερο όργανο σχηματισμού των στοιχείων του εμβρυικού αίματος, διατηρώντας την αιμοποιητική δραστηριότητα περίπου έως τον έβδομο μήνα της ανάπτυξης (7 - 10). Η αιμοποίηση ελαττώνεται στο ήπαρ κατά τον πέμπτο μήνα, αλλά συνεχίζεται σε χαμηλά επίπεδα λίγες εβδομάδες μετά τη γέννηση. Το ήπαρ παράγει εμπύρνα ερυθροκύτταρα (ερυθροβλάστες) ή απύρνα ερυθροκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και αιμοπετάλια. Αν και το ήπαρ αποτελεί την κύρια θέση αιμοποίησης μέχρι το 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της εμβρυικής ανάπτυξης, η παραγωγή κυττάρων του αίματος λαμβάνει χώρα επίσης, την ίδια χρονική περίοδο αλλά με μικρότερη ένταση στο σπλήνα, θύμο αδέν, νεφρούς, επινεφρίδια, πρωτογενείς καταβολές λεμφαδένων και τέλος στην περιοχή του διεγκέφαλου (11 - 13). Κατά τον έβδομο μήνα της ενδομήτριας ζωής, ο ερυθρός μυελός των οστών αποτελεί την κύρια περιοχή αιμοποίησης, αν και

έρευνες έδειξαν ότι αιμοποιητικά κύτταρα αναγνωρίστηκαν στις οστικές κοιλότητες μετά την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της ανάπτυξης (14 - 20).

**Οντογένεση των έμμορφων στοιχείων του αίματος.** Η φυλετική θεωρία της αιμοποίησης βασιζόμενη σε μελέτες διαφόρων ερευνητών υποστηρίζει δύο θεωρίες σχετικά με την προέλευση των αιμοποιητικών κυττάρων: α) την **μονοφυλετική (monophyletic theory)** θεωρία και β) την **πολυφυλετική (polyphyletic theory)** θεωρία. Σύμφωνα με τη μονοφυλετική θεωρία της αιμοποίησης, τα ώριμα κύτταρα του αίματος προέρχονται από ένα κοινό αρχέγονο προγονικό κύτταρο. Τη θέση αυτή υποστήριζαν επί πολλά έτη εμπειριστατωμένες μελέτες και ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες όλα τα έμμορφα στοιχεία του αίματος προκύπτουν από ένα κοινό αρχέγονο κύτταρο. Στον αντίποδα αυτής της άποψης είναι η πολυφυλετική θεωρία, κατά την οποία κάθε κυτταρικός τύπος έχει το δικό του αρχέγονο κύτταρο προέλευσης. Η απομόνωση και απόδειξη της ύπαρξης του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (pluripotential Haematopoietic Stem Cell (pHSC)), που αποτελεί ένα περιγραφικό όρο που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του πολυδύναμου αιμοποιητικού αρχέγονου κυττάρου από το οποίο προκύπτουν όλα τα υπόλοιπα προγονικά αρχέγονα κύτταρα, αποτέλεσε καθοριστική ένδειξη για την ισχύ αυτής της θεωρίας (21 - 26).

**Το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (pluripotential Haematopoietic Stem Cell (pHSC)),** αυτοανανεώνεται και διαφοροποιείται. Αυτό σημαίνει ότι κατά την κυτταρική διαίρεση το προγονικό κύτταρο παραμένει ως πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο, ενώ το θυγατρικό δεσμεύεται για την εξέλιξη, δηλαδή διαφοροποιείται για να παράγει τα έμμορφα στοιχεία του αίματος (**Εικόνα 3**). Τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα δύσκολα αναγνωρίζονται μορφολογικά στο μικροσκόπιο, κυρίως γιατί αντιπροσωπεύουν περίπου το 0.05% του συνόλου των αιμοποιητικών κυττάρων (περίπου  $10^6$  έως  $10^7$  πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα) ή ένα αρχέγονο κύτταρο ανά  $5 \times 10^4$  κύτταρα του ερυθρού μυελού των οστών. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζονται με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας από την παρουσία του CD34+ πρωτεϊνικού δείκτη στην κυτταροπλασματική τους επιφάνεια και κυτταροκαλλιέργειες (27).



[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f0/Hematopoiesis\\_simple.svg/2000px-Hematopoiesis\\_simple.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f0/Hematopoiesis_simple.svg/2000px-Hematopoiesis_simple.svg.png) **Εικόνα 3**

Η μελέτη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι δύσκολη, εξαιτίας του πολύ μικρού αριθμού τους και των δυσχερειών που προκύπτουν κατά την καλλιέργειά τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η κατανόηση του μηχανισμού ρύθμισης του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησής τους να βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο. Εξαιτίας του πλεονεκτήματος της αυτόματης ανανέωσης που τα χαρακτηρίζει, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα παραμένουν σε σταθερά επίπεδα κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής. Η αυτο-ανανέωση είναι υπεύθυνη για τη συντήρηση μιας σταθερής δεξαμενής από πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και είναι κρίσιμη για την τροφοδότηση της οδού διαφοροποίησης ή ωρίμανσης σε προγονικά κύτταρα της μυελικής και λεμφικής σειράς (25). Συμπερασματικά, η αιμοποίηση σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου, με παραγωγή

απροσμέτρητων ώριμων κυττάρων, βασίζεται σε μερικές χιλιάδες αρχέγονων κυττάρων, τα οποία υπάρχουν κατά τη γέννηση.

**Αιμοποίηση - Πληθυσμοί αιμοποιητικών κυττάρων.** Τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (pHSCs), έχουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης αλλά και τη δυναμικότητα παραγωγής δυο δεσμευμένων προγονικών κυττάρων: το μυελικό προγονικό κύτταρο (myeloid stem cell) και το λεμφικό προγονικό κύτταρο (lymphoid stem cell), που εξελίσσονται σε διακριτούς κυτταρικούς απογόνους (μυελοκυτταρικές και λεμφοκυτταρικές σειρές αντίστοιχα). Τα κύτταρα αυτά χάνουν την ικανότητα αυτόματης ανανέωσης και ανήκουν πλέον σε μια από τις παραπάνω σειρές. Η αυτο-ανανέωση αποτελεί μια σημαντική ιδιότητα των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Τα μυελικά και τα λεμφικά προγονικά κύτταρα θεωρούνται και αυτά ως πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα (multipotential cells), αλλά με πιο περιορισμένη δυνατότητα. Είναι κύτταρα δεσμευμένα για το σχηματισμό των κυττάρων του αίματος και των λεμφοκυττάρων των οργάνων του λεμφικού συστήματος αντίστοιχα (25).

Η καλλιέργεια πρώιμων κυττάρων σε άγαρ δημιουργεί ομάδες πιο ώριμων και αναγνωρίσιμων προγονικών κυττάρων που καλούνται μονάδες παραγωγής αποικιών (CFU, colony forming unit). Πέντε μονάδες σχηματισμού αποικιών (colony-forming units - CFUs) προέρχονται από το μυελικό προγονικό κύτταρο : η *CFU της* ερυθροκυτταρικής σειράς (**erythroid CFU**), η *CFU της* μεγακαρυοκυτταρικής σειράς (**megakaryocyte CFU**), η *CFU της* βασεόφιλης σειράς (**basophil CFU**), η *CFU της* ηωσινόφιλης σειράς (**eosinophil CFU**) και η *CFU της* σειράς των κοκκιοκυττάρων - μακροφάγων (**granulocyte - macrophage CFU**). Το λεμφικό προγονικό κύτταρο δίνει γένεση στα πρόδρομα κύτταρα των T και B λεμφοκυττάρων (25).

**Ρύθμιση της αιμοποίησης.** Η αιμοποίηση συνιστά μια διεργασία που ρυθμίζεται με τη μεσολάβηση άνω των είκοσι ρυθμιστικών μορίων ή αυξητικών παραγόντων, τα οποία συνήθως είναι γλυκοπρωτείνες, παραγόμενες από κύτταρα του στρώματος και από διαφοροποιημένα κύτταρα του αίματος. Εξαίρεση αποτελεί η ερυθροποιητίνη που εκκρίνεται από τα



κύτταρα του νεφρού, και η θρομβοποιητίνη, που συντίθεται κατά βάση στο ήπαρ. Τα μόρια αυτά μπορεί να δράσουν σε περισσότερες της μιας κυτταρικές σειρές και συχνά εκδηλώνουν αθροιστικές και συνεργικές αλληλεπιδράσεις. (28 - 31). Ο γενικός μηχανισμός αυτών των αλληλεπιδράσεων αρχίζει με την σύνδεση των κυτταροκινών με υποδοχείς που αναπτύσσονται, επίσης διαδοχικά, στην επιφάνεια των εξελισσόμενων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί την ενδομεμβρανική πλευρά του υποδοχέα (κατά κανόνα οι υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, σελεκτίνη, καντερίνη) και αυτή, με τη σειρά της, μεταφέρει το σήμα και ενεργοποιεί μία ακολουθία άλλων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών (μεταγωγή σήματος). Στη συνέχεια, οι τελικοί ενεργοποιημένοι διαβιβαστές εισέρχονται στον πυρήνα, συνδέονται με το σύμπλεγμα της πολυμεράσης επάνω στις κατάλληλες νουκλεοτιδικές ακολουθίες (κατά βάση τους υποκινητές) και ξεκινούν τη σύνθεση πρωτεϊνών, με τις οποίες το κύτταρο επιτελεί την λειτουργία του (στην προκείμενη περίπτωση τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση). Η δράση αυτών των παραγόντων είναι κατά κανόνα αυξητική (αυξητικοί παράγοντες). Ενδέχεται όμως σε άλλες περιπτώσεις η δράση αυτή να γίνει ανασταλτική ή αντιαποπτωτική.

Συμπερασματικά, ο έλεγχος της αιμοποίησης πραγματοποιείται με ομάδα ρυθμιστών (αυξητικοί παράγοντες) - δι' αλληλεπίδρασης με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των αιμοποιητικών κυττάρων.

Κύριες δράσεις μερικών ρυθμιστών της αιμοποίησης:

**Ιντερλευκίνη 1** → μεσολαβεί στις απαντήσεις της οξείας φάσης φλεγμονής.

**Ιντερλευκίνη 2** → αυξητικός παράγων για ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα.

**Ιντερλευκίνη 3** → ενισχύει την πρώιμη αιμοποίηση προάγοντας την ανάπτυξη των αρχέγονων κυττάρων.

**Σύνδεσμος c-kit (παράγοντας αρχέγονων κυττάρων)** → αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες για να διεγείρει πολυδύναμα αδέσμευτα αρχέγονα κύτταρα.

**Ερυθροποιητίνη** → αυξητικός παράγοντας με ειδικότητα σε κυτταρική σειρά που προάγει την παραγωγή ερυθροκυττάρων.

**GM-CSF** → αυξητικός παράγοντας που προάγει την παραγωγή ουδετεροφίλων, μονοκυττάρων/μακροφάγων, ηωσινοφίλων, ερυθροκυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων.

**G-CSF** → αυξητικός παράγοντας με ειδικότητα σε κυτταρική σειρά που προάγει την παραγωγή ουδετεροφίλων.

**M-CSF** → αυξητικός παράγοντας με ειδικότητα σε κυτταρική σειρά που προάγει την παραγωγή μονοκυττάρων/μακροφάγων.

**Θρομβοποιητίνη** → αυξητικός παράγοντας με ειδικότητα σε κυτταρική σειρά που προάγει την παραγωγή αιμοπεταλίων.

**Η αιμοποίηση ρυθμίζεται σε γενετικό επίπεδο** Η θεωρία της ρύθμισης της αιμοποίησης σε γενετικό επίπεδο στηρίζεται στη διαφοροποίηση των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που απαιτεί την έκφραση διαφορετικών ομάδων που είναι ειδικά και προσδιορίζουν την κάθε σειρά κυττάρων σε κατάλληλες χρονικές στιγμές και με τη σωστή σειρά. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια αποτελούν βασικά συστατικά ρυθμιστικών δικτύων, που κατευθύνουν τη διαδικασία διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων, καθώς και των απογόνων τους. Οι περισσότερες γνώσεις για την εξάρτηση της αιμοποίησης από ένα συγκεκριμένο γονίδιο, έχουν προκύψει και αποκτηθεί από μελέτες σε ποντίκια τα οποία έχουν υποστεί απενεργοποίηση ενός γονιδίου τους με κατευθυνόμενη εξάλειψη (knockout), η οποία παρεμποδίζει την παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό. Στην περίπτωση κατά την οποία τα ποντίκια, που έχουν υποστεί τεχνητή εξάλειψη ενός γονιδίου τους, δεν παράγουν ερυθροκύτταρα ή συγκεκριμένα λευκοκύτταρα, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη που παράγει το συγκεκριμένο γονίδιο είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων. Η κατευθυνόμενη εξάλειψη γονιδίων είναι ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία που υπάρχουν, για τον προσδιορισμό του ρόλου συγκεκριμένων γονιδίων σε ένα ευρύ φάσμα διεργασιών και έχει συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στην ταυτοποίηση πολλών γονιδίων που ρυθμίζουν τη



διαδικασία της αιμοποίησης. Αν και απομένουν πολλά να υλοποιηθούν, η κατευθυνόμενη εξάλειψη γονιδίων, καθώς και άλλες προσεγγίσεις, έχουν συντελέσει στον προσδιορισμό ενός πλήθους μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση. Μερικοί από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες επηρεάζουν πολλές διαφορετικές αιμοποιητικές σειρές, ενώ άλλοι επηρεάζουν μόνο μία συγκεκριμένη σειρά, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του αναπτυσσιακού μονοπατιού που οδηγεί στην παραγωγή λεμφοκυττάρων. Ένας μεταγραφικός παράγοντας που επηρεάζει πολλαπλές σειρές είναι ο GATA-2, μέλος μίας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων που αναγνωρίζουν την τετρανουκλεοτιδική αλληλουχία GATA, που συναντάται στα γονίδια στόχους (32 - 38). Το λειτουργικό γονίδιο GATA-2 (GATA-2 gene), που κωδικοποιεί αυτόν το μεταγραφικό παράγοντα, είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη της λεμφοειδούς, της ερυθροειδούς και της μυελοειδούς σειράς. Όπως είναι αναμενόμενο, τα ποντίκια που έχουν υποστεί τεχνητή εξάλειψη του γονιδίου αυτού, πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης. Αντίθετα με τον GATA-2, ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας, ο Ίκαρος (Ikaros), απαιτείται μόνο για την ανάπτυξη των κυττάρων της λεμφοειδούς σειράς (39 - 45). Παρόλο που τα ποντίκια, που έχουν υποστεί κατευθυνόμενη εξάλειψη του γονιδίου Ίκαρος, δεν παράγουν σημαντικούς αριθμούς B, T και NK κυττάρων, παράγουν φυσιολογικούς αριθμούς ερυθροκυττάρων, κοκκιοκυττάρων και άλλων κυττάρων της μυελοειδούς σειράς. Τα ποντίκια αυτά επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, αλλά παρουσιάζουν σοβαρές ανοσολογικές ανεπάρκειες και πεθαίνουν από μολύνσεις σε νεαρή ηλικία.

## ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

**Το Ανοσοποιητικό Σύστημα** αποτελείται από πολλά διαφορετικά όργανα και ιστούς, που βρίσκονται σχεδόν σε κάθε σημείο του σώματος. Τα όργανα αυτά κατατάσσονται λειτουργικά σε δυο κατηγορίες. Τα **πρωτογενή λεμφικά όργανα (ερυθρός μυελός των οστών, θύμος αδένας)** παρέχουν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων, ενώ τα **δευτερογενή ή περιφερικά λεμφικά όργανα** (σπλήνας, λεμφαδένες, οι διάφοροι λεμφικοί ιστοί που σχετίζονται με τους βλεννογόνους - Mucosal Associated Lymphoid Tissue - MALT, όπως ο λεμφικός ιστός που σχετίζεται με το έντερο - Gut Associated Lymphoid Tissue GALT), αποτελούν περιοχές όπου παγιδεύονται και εγκλωβίζονται τα αντιγόνα που προέρχονται από συγκεκριμένους ιστούς ή από τον αγγειακό χώρο και προσφέρουν τη δυνατότητα στα λεμφοκύτταρα να αλληλεπιδράσουν με αυτά και επακόλουθα να ωριμάσουν. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και **οι τριτογενείς λεμφικοί ιστοί (tertiary lymphoid tissues)**, οι οποίοι σε φυσιολογικές συνθήκες, περιέχουν λιγότερα λεμφοειδή κύτταρα από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, αλλά μπορούν να φιλοξενήσουν λεμφοειδή κύτταρα κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους απόκρισης. Ο πιο σημαντικός από αυτούς τους ιστούς είναι ο λεμφικός ιστός που σχετίζεται με το δέρμα. Τα αιμοφόρα αγγεία και το λεμφικό σύστημα συνδέουν μεταξύ τους όλα αυτά τα όργανα, καθιστώντας τα μια ενιαία οντότητα (**46 - 51**).

Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν το 20 - 40% των λευκοκυττάρων του οργανισμού και το 99% των κυττάρων της λέμφου (**51**). Τα λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα για την ανοσία. Στο ανθρώπινο σώμα, υπάρχουν περίπου  $10^{11}$  λεμφοκύτταρα (κυμαίνονται ανάλογα με το σωματικό βάρος και την ηλικία, μεταξύ  $10^{10}$  και  $10^{12}$ ). Τα λεμφοκύτταρα αυτά κυκλοφορούν συνεχώς ανάμεσα στο αίμα και τη λέμφο και μπορούν να μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς και λεμφικά όργανα, καθιστώντας το ανοσοποιητικό σύστημα ένα ενιαίο σύνολο.

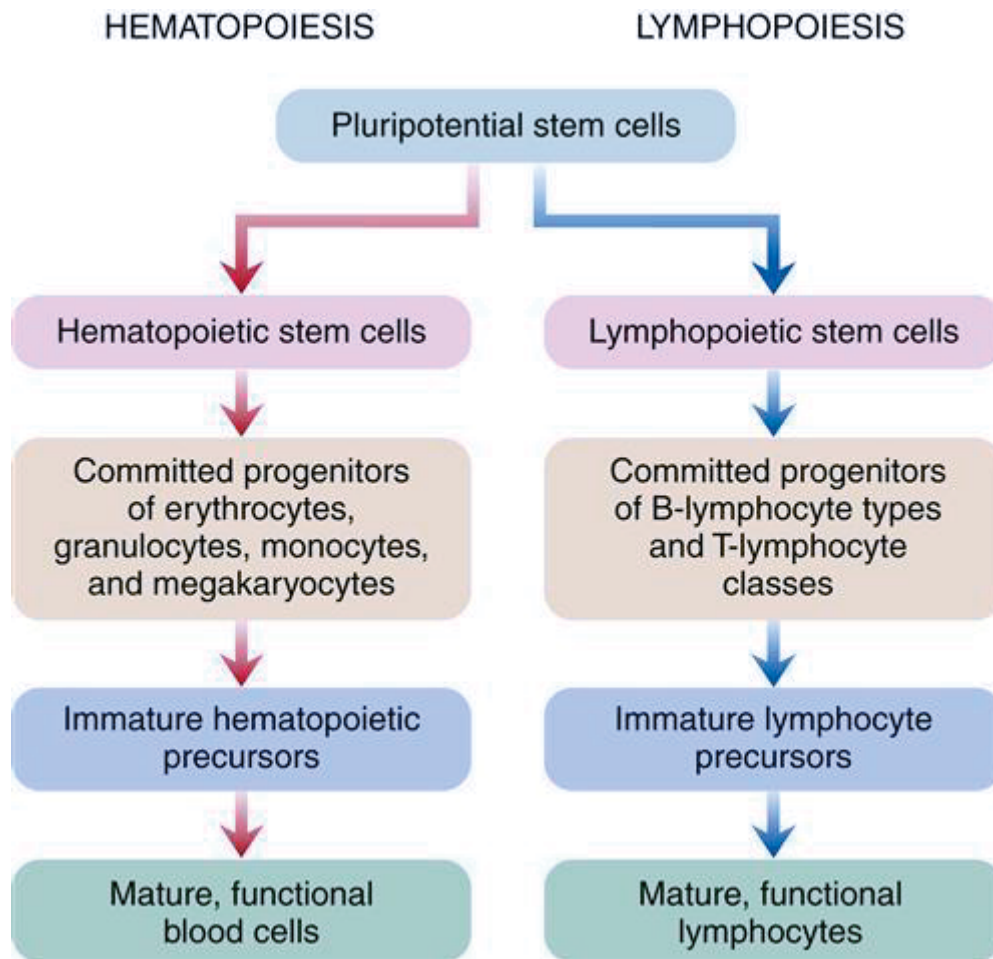
Τα λεμφοκύτταρα, γενικά, υποδιαιρούνται σε τρεις πληθυσμούς: **B-λεμφοκύτταρα**, **T-λεμφοκύτταρα** και **Φυσικά Φονικά κύτταρα (Natural Killer cells, NK)** με βάση τη λειτουργία και τα μόρια που φέρουν στην

επιφάνεια της μεμβράνης τους. Τα Φυσικά Φονικά κύτταρα είναι μεγάλα, κοκκιώδη λεμφοκύτταρα, που δεν εκφράζουν τους χαρακτηριστικούς επιφανειακούς δείκτες των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Τα ήρεμα Β και Τ λεμφοκύτταρα, είναι μικρά κινητικά κύτταρα, χωρίς φαγοκυτταρικές ιδιότητες και δεν είναι δυνατόν να διακριθούν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά.

Τα **Β-λεμφοκύτταρα** παράγουν αντισώματα κατά συγκεκριμένων αντιγόνων (χυμική ανοσία), ενώ τα **Τ-λεμφοκύτταρα** είναι υπεύθυνα για την κυτταροεξαρτώμενη απάντηση (κυτταρική ανοσία). Τα Τ-λεμφοκύτταρα χρειάζονται την παρουσίαση αντιγόνων από άλλα κύτταρα, στα οποία περιλαμβάνονται τα μεταμορφωμένα μονοκύτταρα που αποκαλούνται μακροφάγα. Οι διαφορετικές σειρές ή τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων, διακρίνονται από την έκφραση μεμβρανικών μορίων που αναγνωρίζονται από συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας. Στο οπτικό μικροσκόπιο, τα περισσότερα ώριμα λεμφοκύτταρα είναι κύτταρα με στρογγυλούς πυρήνες και λεπτή εξωτερική στεφάνη κυτταροπλάσματος χωρίς κοκκία.

**Ο σχηματισμός των λεμφοκυττάρων είναι γνωστός ως λεμφοποίηση.** Η διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων ακολουθεί διάφορα μονοπάτια με ιεραρχικό τρόπο (**Εικόνα 4**). Τα Β κύτταρα ωριμάζουν σε **Β-λεμφοκύτταρα** στον μυελό των οστών, ενώ τα Τ κύτταρα ωριμάζουν σε **Τ-λεμφοκύτταρα** στο θύμο αδένα.

Μετά τον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ωρίμανση στα πρωτογενή λεμφικά όργανα τα Β και Τ λεμφοκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία και εγκαθίστανται στα περιφερικά λεμφικά όργανα και συγκεκριμένα στον σπλήνα, στους λεμφαδένες και στο λεμφικό ιστό των βλεννογόνων (MALT), με κύρια λειτουργία την ανεύρεση παθογόνων μικροοργανισμών (βακτήρια, ιοί, παράσιτα) ή παθογόνων κυττάρων (νεοπλασματικά κύτταρα). Δηλαδή, τα περιφερικά λεμφικά όργανα είναι ο χώρος στον οποίο τα λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρούν με το εκάστοτε αντιγόνο.



<https://basicmedicalkey.com/alterations-in-oxygen-transport/> **Εικόνα 4**

Τα λεμφοκύτταρα παίζουν βασικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς είναι υπεύθυνα για την προσαρμοστική ανοσία και φέρουν τα ανοσολογικά γνωρίσματα της ποικιλομορφίας, της εξειδίκευσης, της μνήμης και της διάκρισης του εαυτού από το ξένο. Οι άλλοι τύποι λευκοκυττάρων παίζουν επίσης σημαντικούς ρόλους, αφού συμμετέχουν στην ενδοκυττάρωση και την καταστροφή μικροοργανισμών, την παρουσίαση αντιγόνων και την έκκριση κυτταροκινών (52 - 55).

Μια από τις ιδιότητες του ανοσολογικού συστήματος είναι η ικανότητα επικοινωνίας, συντονισμού και μετακίνησης των κυττάρων του (B και T λεμφοκυττάρων), προκειμένου να επιτευχθεί η προστασία του οργανισμού

από ξένους εισβολείς. Διεργασία η οποία επιτυγχάνεται μέσω μικρών πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία καλούνται κυτταροκίνες ή κυτοκίνες. Τα μόρια αυτά εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όταν αυτά έλθουν σε επαφή με ένα παθογόνο μικροοργανισμό, ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αυξάνοντας έτσι την ανοσιακή απόκριση. Μια άλλη σημαντική ιδιότητα των κυτταροκινών είναι η συμμετοχή τους στην ανάπτυξη του οργανισμού κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής διάπλασης. Οι κυτταροκίνες με βάση τη λειτουργία τους, τα κύτταρα που τις εκκρίνουν ή τα κύτταρα - στόχους στα οποία δρούν, χωρίζονται σε χημειοκίνες, ιντερλευκίνες και λεμφοκίνες.

Τα **B – λεμφοκύτταρα** όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι υπεύθυνα για την χυμική ανοσία και προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Στις άωρες μορφές των B-λεμφοκυττάρων του μυελού των οστών εκφράζεται ο B-λεμφοκυτταρικός υποδοχέας αποτελούμενος από την βαρεία και την κάππα ή λάμδα ελαφρά αλυσίδα. Στο στάδιο αυτό, άωρα λεμφοκύτταρα που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τον ανασυνδιασμό των V(D)J περιοχών των γονιδίων για την ολοκλήρωση της δομής της βαριάς και ελαφράς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, εκφυλίζονται και αποπίπτουν. Ακολουθεί η έξοδος των άωρων B-λεμφοκυττάρων από το μυελό των οστών, η διαφοροποίηση των σε naïve (παρθένα) B-λεμφοκύτταρα και η είσοδος στα περιφερικά (δευτερογενή) λεμφικά όργανα. Στο στάδιο αυτό τα B-λεμφοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα της δέσμευσης των κυκλοφορούντων αντιγόνων, λειτουργία η οποία επιτυγχάνεται μέσω του ειδικού BCR υποδοχέα τον οποίο φέρουν στην επιφάνεια τους (μόριο μεμβρανικού αντισώματος). Μετά από το κατάλληλο αντιγονικό ερέθισμα μετασχηματίζονται σε πλασματοκύτταρα και εκκρίνουν αντίσωμα ειδικό γι' αυτό το αντιγόνο.

#### **Στάδια ωρίμανσης των B-λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών:**

Αρχέγονο κύτταρο → Προ-B-λεμφοκύτταρο → Πρώιμο B-λεμφοκύτταρο → Ώριμο B-λεμφοκύτταρο → Έξοδος στα περιφερικά λεμφικά όργανα → Ενεργοποιημένο B-λεμφοκύτταρο → Πλασματοκυτταροειδές → Πλασματοκύτταρο → Έκκριση Ανοσοσφαιρινών (Αντισώματα) (Igs).

Η ανοσοιστοχημική αναγνώριση των Β-λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται με το αντίσωμα CD20.

Τα **T-λεμφοκύτταρα** αποτελούν το 75% περίπου των λεμφοκυττάρων του αίματος και όπως αναφέρθηκε παραπάνω απαρτίζουν τη βάση της κυτταρικής ανοσίας. Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης τους εκφράζουν ένα ξεχωριστό μόριο με την ικανότητα δέσμευσης αντιγόνου, που ονομάζεται υποδοχέας του T-λεμφοκυττάρου (TCR, T-cell receptor). Ο υποδοχέας αυτός μπορεί να αναγνωρίσει αντιγόνα τα οποία είναι συνδεδεμένα με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα μόρια MHC είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτείνες που βρίσκονται στις επιφάνειες διαφόρων τύπων κυττάρων και διακρίνονται στα μόρια τάξης I που εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα εμπύρνηνα κύτταρα και είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και στα μόρια τάξης II που εκφράζονται στα κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα, δηλ. στα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα (51). Μετά την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων από την αλληλεπίδραση ειδικού αντιγόνου με τον TCR, ο κλωνικός πολλαπλασιασμός ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων συντηρείται με την έκκριση κυτταροκινών. Κύριος αυξητικός παράγοντας των T-λεμφοκυττάρων είναι η ιντερλευκίνη-2. Η διαδικασία της ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζεται από αλλαγές των μορίων της κυτταρικής επιφάνειας. Τα ώριμα T-λεμφοκύτταρα υποδιαιρούνται σε τρεις κύριους τύπους. Τα βοηθητικά (helper) T-λεμφοκύτταρα (T<sub>H</sub>) που εκφράζουν τον επιφανειακό ανοσοιστοχημικό δείκτη CD4, αποτελούν τα δύο τρίτα περίπου των T-λεμφοκυττάρων του αίματος και εκκρίνουν κυτταροκίνες. Τα κυτταροτοξικά (cytotoxic) T-λεμφοκύτταρα (T<sub>C</sub>), που εκφράζουν τον ανοσοιστοχημικό δείκτη CD8 και τέλος, μία τρίτη ποικιλία T-λεμφοκυττάρων, που αποτελούν τα ρυθμιστικά (regulatory) T-λεμφοκύτταρα (T<sub>REG</sub>).

#### **Στάδια ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο αδέν:**

Αρχέγονο κύτταρο (Μυελός των οστών) → (Θύμος αδέν) Προ-T-λεμφοκύτταρο → Μεγάλο φλοιώδες θυμοκύτταρο → Μικρό φλοιώδες θυμοκύτταρο → Μυελώδες θυμοκύτταρο → Έξοδος στα περιφερικά λεμφικά όργανα.

Η ανοσοιστοχημική αναγνώριση των T-λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται με το αντίσωμα CD3.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα B και T λεμφοκύτταρα που δεν έχουν αλληλεπιδράσει με κάποιο αντιγόνο - αναφέρονται ως παρθένα (naive) - είναι ήρεμα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G<sub>0</sub> του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, είναι γνωστά ως μικρά λεμφοκύτταρα, έχουν διάμετρο περίπου 6μm και το κυτταρόπλασμά τους σχηματίζει μια στεφάνη γύρω από το πυρήνα, που είναι μόλις διακριτή. Τα μικρά λεμφοκύτταρα διαθέτουν πυκνά δομημένη χρωματίνη, λίγα μιτοχόνδρια και φτωχά ανεπτυγμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και σύστημα Golgi. Ένα παρθένο λεμφοκύτταρο θεωρείται ότι έχει μικρή διάρκεια ζωής. Η αλληλεπίδραση των μικρών λεμφοκυττάρων με αντιγόνο, παρουσία συγκεκριμένων κυτταροκινών επάγει τη μετάπτωσή τους από τη φάση G<sub>0</sub> στη φάση G<sub>1</sub> και έπειτα στη S, G<sub>2</sub>, και M. Καθώς τα λεμφοκύτταρα προχωρούν στον κυτταρικό κύκλο, αυξάνουν το μέγεθός τους φτάνοντας σε διάμετρο τα 15μm και μετατρέπονται σε λεμφοβλάστες (lymphoblasts). Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλότερο λόγο κυτταροπλάσματος/πυρήνα και από μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στη δομή των οργανιδίων, σε σχέση με τα μικρά λεμφοκύτταρα. Οι λεμφοβλάστες πολλαπλασιάζονται και τελικά διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα (effector cells) ή σε κύτταρα μνήμης (memory cells). Τα δραστικά (ενεργοποιημένα) κύτταρα δρουν κατά διάφορους τρόπους, με απώτερο στόχο την εξάλειψη του αντιγόνου. Έχουν μικρή διάρκεια ζωής που συνήθως κυμαίνεται μεταξύ λίγων ημερών και μερικών εβδομάδων. Τα πλάσματοκύτταρα (plasma cells, κύτταρα της B λεμφοειδούς σειράς που εκκρίνουν αντισώματα), διαθέτουν χαρακτηριστικό κυτταρόπλασμα που περιέχει άφθονο ενδοπλασματικό δίκτυο (για την υποστήριξη του υψηλού ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης) σε διάταξη ομοκεντρικών στιβάδων, καθώς επίσης και πολλά κυστίδια Golgi.

Μερικά από τα προγονικά B και T λεμφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα μνήμης. Η παρουσία αυτού του πληθυσμού κυττάρων ευθύνεται για τη μακράς διάρκειας ανοσία εναντίον πολλών παθογόνων μικροοργανισμών. Τα κύτταρα μνήμης φαίνονται σαν μικρά



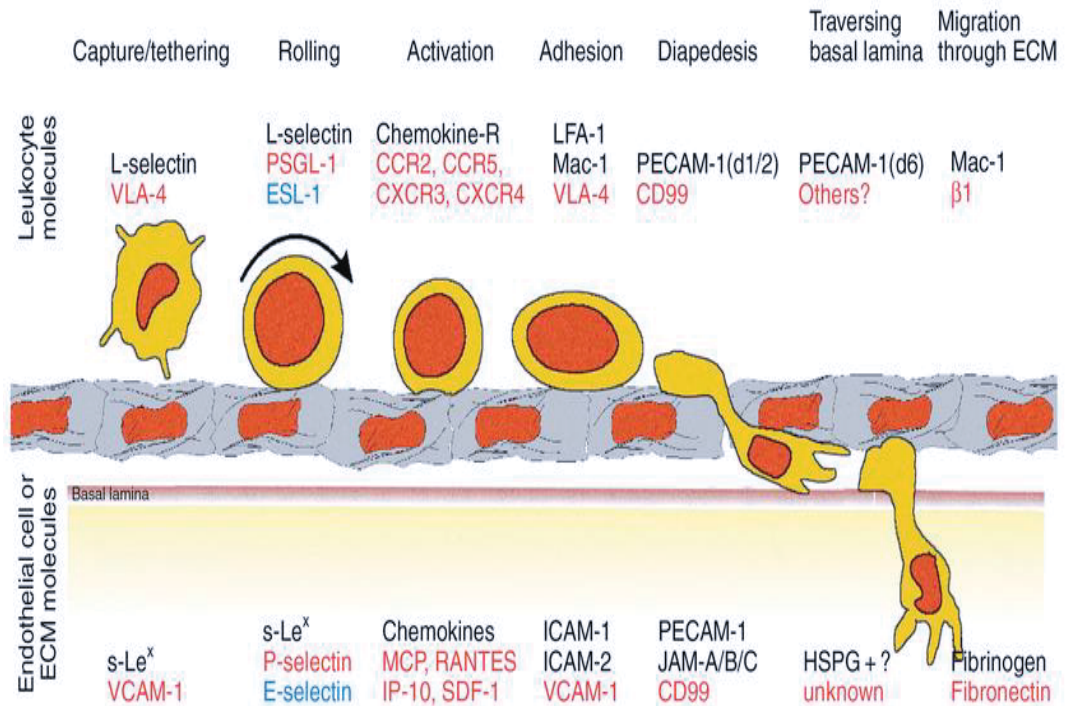
λεμφοκύτταρα, αλλά διακρίνονται από τα παρθένα κύτταρα με βάση την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων μεμβρανικών μορίων.

**Στην ανοσολογική απόκριση**, συμμετέχουν διάφορα λευκοκύτταρα, που κυκλοφορούν στο αίμα και τη λέμφο και εντοπίζονται σε μεγάλους αριθμούς στα λεμφικά όργανα. Από αυτά τα κύτταρα μόνο τα λεμφοκύτταρα κατέχουν τις ιδιότητες της ποικιλομορφίας, της εξειδίκευσης, της μνήμης και της διάκρισης του εαυτού από το μη εαυτό, που αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της προσαρμοστικής (επίκτητης) ανοσίας. Όλα τα υπόλοιπα κύτταρα παίζουν επικουρικούς ρόλους στην προσαρμοστική ανοσία, εξυπηρετώντας την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, την αποτελεσματικότερη κάθαρση των αντιγόνων διαμέσου της φαγοκυττάρωσης ή την έκκριση διαφόρων ανοσοδραστικών μορίων (51).

**Εξαγγείωση των λευκοκυττάρων.** Είναι γνωστό ότι το αγγειακό ενδοθήλιο (μονήρης στοιβάδα αποπλατυσμένων κυττάρων που επαλείφει το έσω τοίχωμα των αγγείων) αποτελεί ένα φραγμό, το οποίο ρυθμίζει την κίνηση των μορίων της αιματικής κυκλοφορίας προς τους ιστούς. Για να εισέλθουν τα μόρια της αιματικής κυκλοφορίας και ιδιαίτερα τα λευκοκύτταρα σε ένα φυσιολογικό ιστό (π.χ. λεμφοκύτταρα στα δευτερογενή - περιφερικά όργανα) ή σε ένα ιστό που φλεγμαίνει, θα πρέπει να προσκολληθούν και να περάσουν ανάμεσα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, με μια διαδικασία που ονομάζεται **εξαγγείωση** (51). Η διεργασία της κυκλοφορίας των λευκοκυττάρων στα αγγεία καθώς και η μετανάστευση αυτών των κυττάρων από το αίμα στους ιστούς είναι αυστηρά ελεγχόμενη, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η παρουσία των κατάλληλων πληθυσμών λευκοκυττάρων στους διάφορους ιστούς. Ρυθμίζεται από μικρού μεγέθους μοριακούς μεσολαβητές (χημειοκίνες, συμπλήρωμα), κυτταροκίνες καθώς και από μεμβρανικές πρωτεΐνες - μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion molecules). Ιδιαίτερα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων εκφράζουν διάφορους τύπους μορίων προσκόλλησης, όπως η E-Καντερίνη (E-Caderin) και η E-Σελεκτίνη (Selectin), που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων καθώς και στην ενεργοποίηση των αντιδράσεων της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας.



Η διεργασία της εξαγγείωσης των λευκοκυττάρων περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: 1) κύλιση, 2) ενεργοποίηση του χημειοτακτικού ερεθίσματος, 3) ακινητοποίηση και προσκόλληση και 4) μετανάστευση διαμέσου του ενδοθηλίου (**Εικόνα 5**).



[https://www.researchgate.net/publication/7662641\\_Experimental\\_approaches\\_to\\_lymphocyte\\_migration\\_in\\_dermatology\\_in\\_vitro\\_and\\_in\\_vivo/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/7662641_Experimental_approaches_to_lymphocyte_migration_in_dermatology_in_vitro_and_in_vivo/figures?lo=1) **Εικόνα 5**

**Διαταραχές της λειτουργίας των λευκοκυττάρων. Απελευθέρωση των προϊόντων των λευκοκυττάρων και η επαγόμενη από τα λευκοκύτταρα ιστική βλάβη.** Κατά την εξέλιξη της φλεγμονώδους απόκρισης, διάφορες κυτταροκίνες και άλλοι φλεγμονώδεις παράγοντες δρουν στα τοπικά αιμοφόρα αγγεία και αυξάνουν την έκφραση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης. Το αγγειακό ενδοθήλιο τότε είναι ενεργοποιημένο (activated) ή αλλιώς φλεγμαίνον (inflamed).

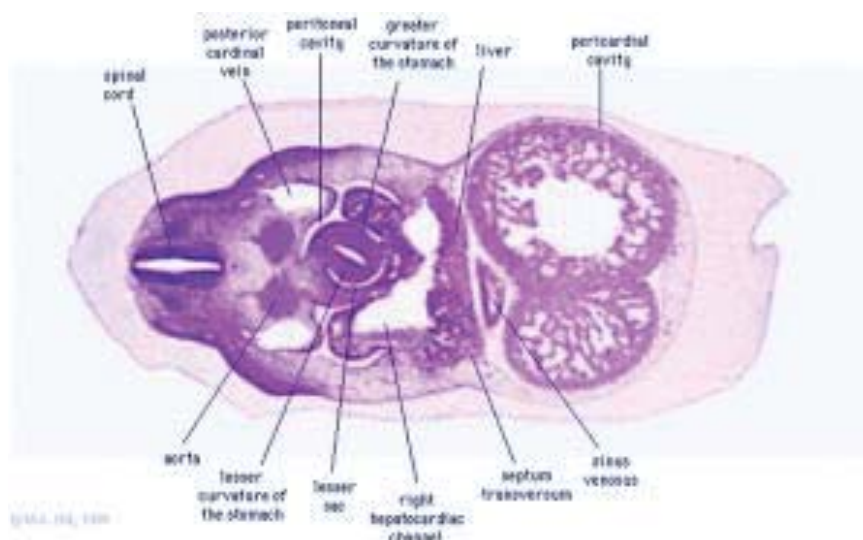
Στο πρώτο στάδιο (κύλιση), τα λευκοκύτταρα προσκολλώνται χαλαρά στο ενδοθήλιο μέσω αλληλεπιδράσεων χαμηλής συγγένειας, μεταξύ

σελεκτίνης και υδατανθράκων. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης, διάφορες κυτταροκίνες και άλλοι μεσολαβητές της φλεγμονής δρουν στο ενδοθήλιο και επάγουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης της οικογένειας των σελεκτινών. Τα μόρια σελεκτίνης ακολούθως συνδέονται με μια γλκοσυλιωμένη λακτοζαμινογλυκάνη των λευκοκυττάρων που ονομάζεται sialyl Lewis. Η αλληλεπίδραση αυτή συγκρατεί για λίγο το λευκοκύτταρο πάνω στο ενδοθήλιο, αλλά η δύναμη της αιματικής ροής προκαλεί, σύντομα, την αποκόλληση του λευκοκυττάρου. Στη συνέχεια, τα μόρια σελεκτίνης ενός άλλου ενδοθηλιακού κυττάρου συγκρατούν πάλι για λίγο το λευκοκύτταρο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται, έτσι ώστε το λευκοκύτταρο να περιστρέφεται πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγείου, δηλαδή να προσκολλάται με τη διαδικασία της κύλισης. Το λευκοκύτταρο, καθώς περιστρέφεται, ενεργοποιείται από διάφορους χημειοτακτικούς παράγοντες (chemo attractants). Οι παράγοντες αυτοί είτε βρίσκονται μόνιμα πάνω στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων ή εκκρίνονται τοπικά από κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απόκριση. Στους χημειοτακτικούς παράγοντες ανήκει και μια μεγάλη οικογένεια χημειοτακτικών κυτταροκινών, οι οποίες ονομάζονται χημειοκίνες (chemokines). Χημειοκίνες που συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων (Macrophage Inflammatory Protein, MIP-1B), καθώς επίσης και άλλοι παράγοντες όπως, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF), τα προϊόντα διάσπασης του συμπληρώματος C5a, C3a και C5b67 και διάφορα N-φορμυλοπεπτίδια, τα οποία παράγονται από τη διάσπαση των βακτηριακών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Η σύνδεση των χημειοτακτικών αυτών παραγόντων με τους υποδοχείς τους στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων, πυροδοτεί ένα σήμα ενεργοποίησης το οποίο μεσολαβείται από τις G πρωτεΐνες, που σχετίζονται με τον υποδοχέα. Το σήμα αυτό επάγει τη μεταβολή της στερεοχημικής διαμόρφωσης των ιντεγκρινών της μεμβράνης του λευκοκυττάρου, αυξάνοντας τη συγγένεια τους με τα μόρια προσκόλλησης της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Η αλληλεπίδραση που ακολουθεί μεταξύ των ιντεγκρινών με τα μόρια προσκόλλησης της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών σταθεροποιείται ενισχύοντας την προσκόλληση του

λευκοκυττάρου πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Στη συνέχεια, το λευκοκύτταρο μεταναστεύει διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος προς τους ιστούς. Τα στάδια της μετανάστευσης αυτής και οι παράγοντες που την καθορίζουν, δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί. Μπορεί να μεσολαβείται από την περαιτέρω ενεργοποίηση από χημειοτακτικούς παράγοντες και στη συνέχεια, από αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιντεγκρινών και μορίων της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών ή από ένα διαφορετικό ερέθισμα για μετανάστευση. Όσο αφορά την εξαγγείωση των λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες, τα φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο εκκρίνουν ειδικούς για τα λεμφοκύτταρα χημειοτακτικούς παράγοντες και αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα δεν εξαγγειώνονται και δεν εισέρχονται στο διάμεσο ιστό των λεμφαδένων (51).

## ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΚΑΤΑΒΟΛΗ ΗΠΑΤΟΣ - ΣΠΛΗΝΑ - ΘΥΜΟΥ ΑΔΕΝΑ

**Ήπαρ** Η καταβολή του ήπατος εμφανίζεται στο μέσο της τρίτης εβδομάδας της διάπλασης με τη μορφή μιας εκβλαστήσεως του έσω βλαστικού δέρματος στο οπίσθιο άκρο του προσθίου εντέρου. Η εκβλάστηση αυτή καλείται ηπατικό βλάστημα και αναπτύσσεται στο εγκάρσιο διάφραγμα.. Από τη θέση αυτή το ηπατικό βλάστημα αυξάνεται προσθίως εντός του σπλαγχνικού μεσοδέρματος του εγκαρσίου διαφράγματος και την 5η εβδομάδα εμφανίζεται η βασική του διακλάδωση σε δεξιό και αριστερό κλάδο. Οι κλάδοι αυτοί αποτελούν την αρχή της ανάπτυξης των ηπατικών χορδών, οι οποίες αναπτύσσονται στη συνέχεια εντός του μεσοδέρματος, διακλαδιζόμενες και αναστομούμενες. Οι ομφαλικές λεκιθικές φλέβες, μοίρα των οποίων ευρίσκεται εντός του εγκαρσίου διαφράγματος, διασπώνται από την συνεχή ανάπτυξη των ηπατικών δοκίδων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των ηπατικών κολποειδών. Η συνένωση των λεκιθικών φλεβών οδηγεί στη δημιουργία της πυλαίας φλέβας, η οποία πραγματοποιεί πληθώρα διακλαδώσεων εντός του αναπτυσσόμενου ήπατος. Οι διακλαδώσεις αυτές λαμβάνουν χώρα παραπλεύρως μεσεγγυματικών νησιδίων, των πυλαίων διαστημάτων. Η ινώδης κάψα, ο αιμοποιητικός αλλά και ο συνδετικός ιστός του αναπτυσσόμενου ήπατος σχηματίζονται από το μεσόδερμα του εγκαρσίου διαφράγματος (**Εικόνα 6**).

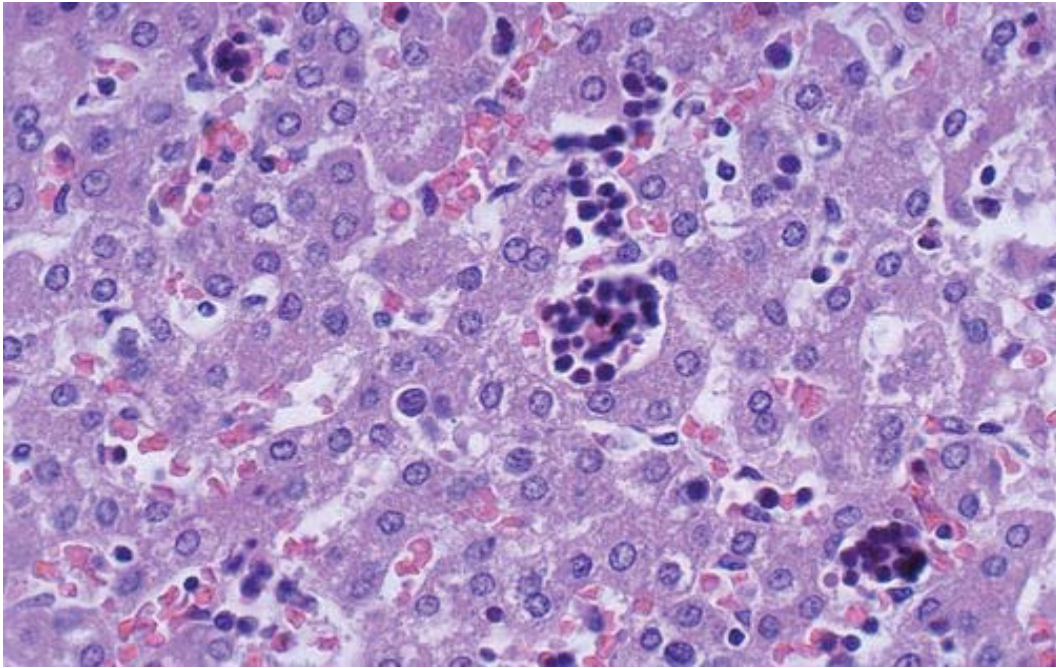


[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Gastrointestinal Tract - Liver Development#Liver Development Stages](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Gastrointestinal%20Tract%20-%20Liver%20Development#Liver%20Development%20Stages) **Εικόνα 6**

Η κύρια ιστολογική αρχιτεκτονική του ήπατος λαμβάνει τέλος την 16η εβδομάδα της εμβρυικής ανάπτυξης. Καθώς όμως αυξάνεται το μέγεθος του οργάνου συνεχίζεται η ανάπτυξή του. Τελικά, το ήπαρ καταλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα της κοιλιακής κοιλότητας, όντας πλήρως ώριμο μεταγεννητικά. Το ήπαρ ζυγίζει 125 gr στη γέννηση, ενώ η μάζα του φτάνει τα 255 gr, 430 gr, 530 gr στο πρώτο, δεύτερο και πέμπτο έτος αντίστοιχα. Οι δύο λοβοί είναι αρχικά ισομεγέθεις, αλλά η ανάπτυξη του δεξιού λοβού γίνεται μεγαλύτερη μετά το πέρας της 6<sup>ης</sup> εβδομάδας. Κατά τη δέκατη εβδομάδα της διάπλασης το βάρος του ήπατος είναι περίπου το 1/10 του συνολικού βάρους του σώματος του εμβρύου. Ο όγκος του είναι εξαιρετικά μεγάλος, καταλαμβάνει σχεδόν όλη την περιτοναϊκή κοιλότητα και οφείλεται πρωτίστως στην αυξημένη αιμοποιητική λειτουργία του οργάνου και αφετέρου στον αυξημένο αριθμό των κολποειδών. Η υποστροφή του λεκιθικού ασκού, που είναι το πρώτο αιμοποιητικό όργανο, συνδυάζεται χρονολογικά με την εμφάνιση ευμεγέθων αιμοποιητικών νησιδίων και αγγείων εν μέσω των ηπατοκυττάρων που περιέχουν ομάδες ερυθροβλαστών, μυελοκυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων τα οποία παράγουν ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Η διαφοροποίηση των ερυθροβλαστών και η τελική απελευθέρωση τους στην κυκλοφορία ως ερυθρά αιμοσφαίρια πραγματοποιείται στον μεσοκυττάριο χώρο μεταξύ των ηπατοκυττάρων (**Εικόνα 7**).

Η λειτουργία της αιμοποίησης διαρκεί περίπου τρεις μήνες, με τη μεγαλύτερη παραγωγή να σημειώνεται εντός της χρονικής περιόδου μεταξύ 12<sup>ης</sup> και 24<sup>ης</sup> εβδομάδας. Οι τελευταίοι δύο μήνες της εμβρυϊκής ζωής χαρακτηρίζονται από τη σταδιακή έκπτωση της αιμοποιητικής λειτουργίας του ήπατος με συνέπεια, κατά τη γέννηση, να ανευρίσκονται μόνο μικρά αιμοποιητικά νησίδια. Στη γέννηση η μάζα του ήπατος ανέρχεται τότε στο 5% της συνολικής σωματικής μάζας του σώματος (**57 - 68**).



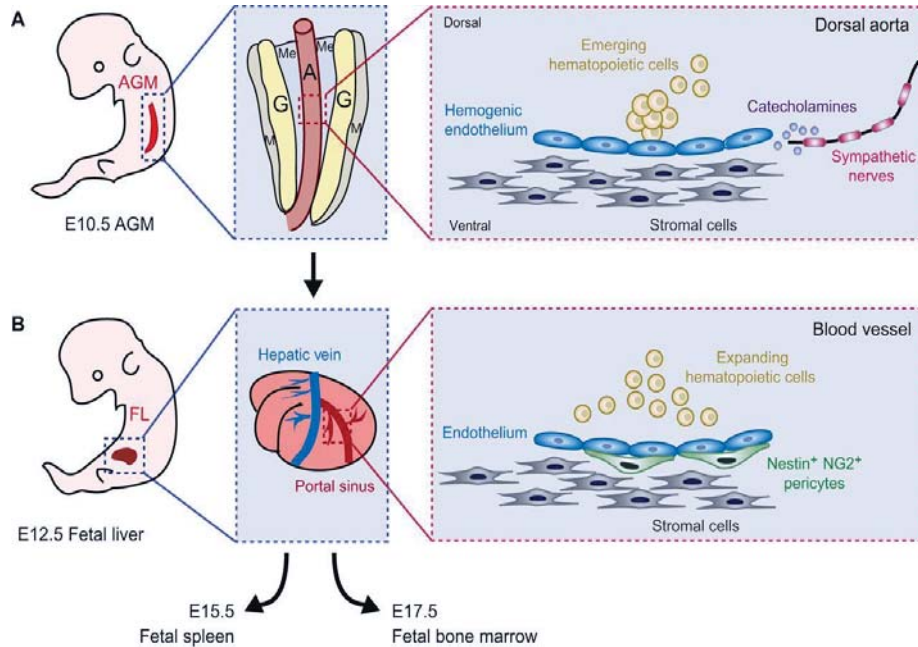


<https://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/NORMAL/NORM118.html> **Εικόνα 7**

**Σπλήνας** Αν και ο σπλήνας ήταν γνωστός από την αρχαιότητα η λειτουργία του παρέμενε ασαφής μέχρι σχετικά πρόσφατα. Ο Ιπποκράτης τον θεωρούσε πηγή της «μαύρης χολής». Ο Γαληνός υπέθετε ότι ήταν κάποιο φίλτρο, λόγω της σπογγώδους υφής του. Οι σημερινές γνώσεις μας για το σπλήνα προήλθαν από τη λεπτομερή κατανόηση του αγγειακού του δικτύου και από την οργάνωση των βασικών τμημάτων του: του λευκού πολφού, του ερυθρού πολφού και της παρεμβαλλόμενης οριακής ζώνης.

Ο σπλήνας αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του περιφερικού λεμφικού ιστού του ανθρώπινου οργανισμού και βρίσκεται στην αριστερή πλευρά της κοιλιακής χώρας μεταξύ της 9<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> πλευράς. Ο σπλήνας είναι πρσαρτημένος στην αιματική κυκλοφορία και σηματοδοτεί την έναρξη της ανοσολογικής ανταπόκρισης έναντι των αντιγόνων που μεταφέρονται με το αίμα, καθώς και για το φιλτράρισμα του αίματος από τοξικές ουσίες και κατεστραμμένα κύτταρα (69). Ο σπλήνας προέρχεται απ' ευθείας από το μεσέγχυμα (μεσόδερμα - μέσο βλαστικό δέρμα) στην αριστερή πλευρά του οπίσθιου (ραχιαίου) μεσογαστρίου του εμβρύου (**Εικόνα 8**). Ο σπλήνας μπορεί να αναγνωρισθεί από την 5<sup>η</sup> εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης και αναλαμβάνει αιμοποιητική λειτουργία μετά την 9<sup>η</sup> εβδομάδα, διεργασία η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία στον ερυθρό πολφό του οργάνου

ομάδων ερυθροβλαστών, μυελοκυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων τα οποία παράγουν ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. (70 - 71).

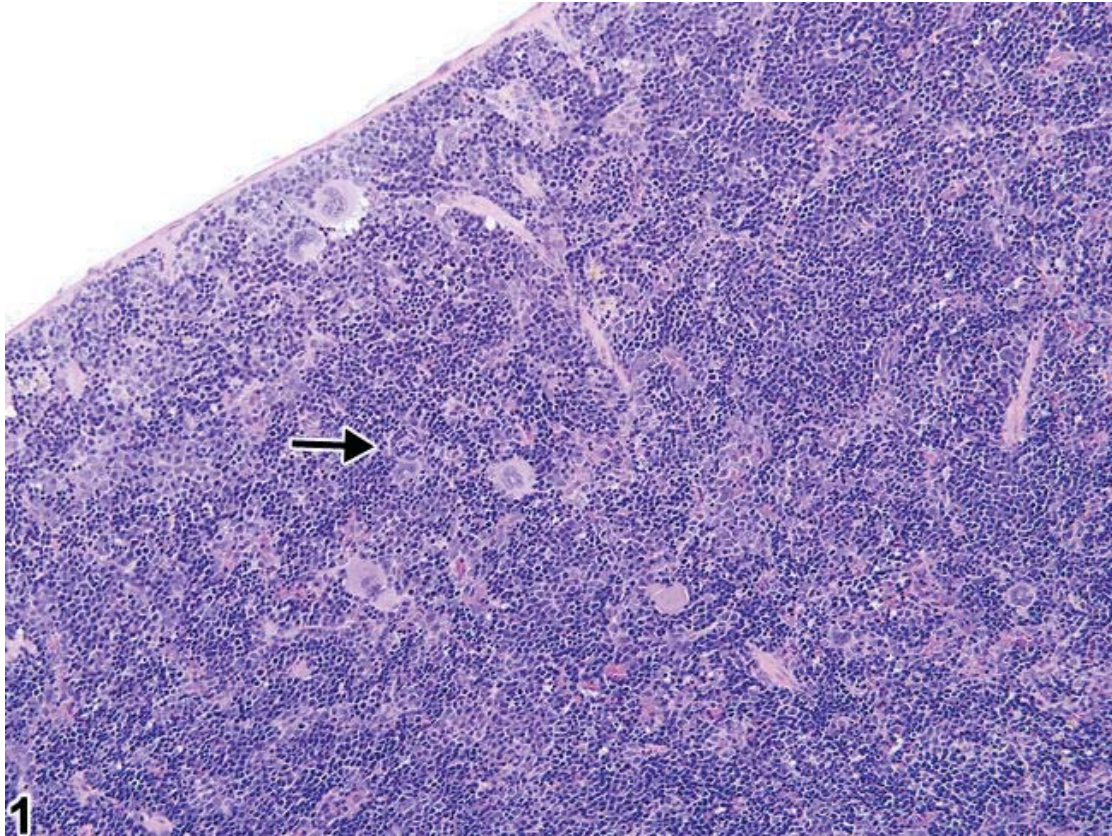


<http://dev.biologists.org/content/145/2/dev139691> **Εικόνα 8**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα σχηματίζουν το δικτυωτό υπόστρωμα του σπλήνα (δικτυωτά κύτταρα και δικτυωτές ίνες), ενώ τα λεμφοκύτταρα που εμπλουτίζουν το υπόστρωμα προέρχονται από τα πρωτογενή λεμφικά όργανα (ερυθρό μυελό των οστών και θύμο αδένες). Στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ο ανθρώπινος σπλήνας λειτουργεί ως αιμοποιητικό όργανο και μόνον αργότερα αποκτά τον οριστικό λεμφικό χαρακτήρα του (**Εικόνα 9**). Κατά το προκαταρκτικό στάδιο (**preliminary stage**) της ανάπτυξής του μέχρι τη 14<sup>η</sup> εβδομάδα, ο σπλήνας αποτελεί αποκλειστικώς αιμοποιητικό όργανο και στον ερυθρό πολφό αναγνωρίζονται ομάδες ερυθροβλαστών, μυελοκυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων. Από τη 15<sup>η</sup> μέχρι τη 18<sup>η</sup> εβδομάδα, στάδιο μετασχηματισμού (**transformation stage**), το όργανο αναπτύσσει τη χαρακτηριστική λοβιώδη αρχιτεκτονική και ακολουθεί το στάδιο του λεμφικού αποικισμού (**stage of lymphoid colonization**), καθώς πρόδρομες μορφές των T και B-λεμφοκυττάρων αρχίζουν να εισέρχονται στο σπλήνα σχηματίζοντας αντίστοιχα τις T και B εξαρτώμενες περιοχές του οριστικού



σπλήνα. Από το μέσο του 2<sup>ου</sup> τριμήνου της ανάπτυξης ο σπλήνας λειτουργεί πλέον ως ανοσοποιητικό όργανο παράγοντας μόνο λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα, σε όλη τη διάρκεια της ζωής (72 - 82). Η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης στο σπληνικό παρέγχυμα ξεκινά την 12<sup>η</sup> εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης (79).

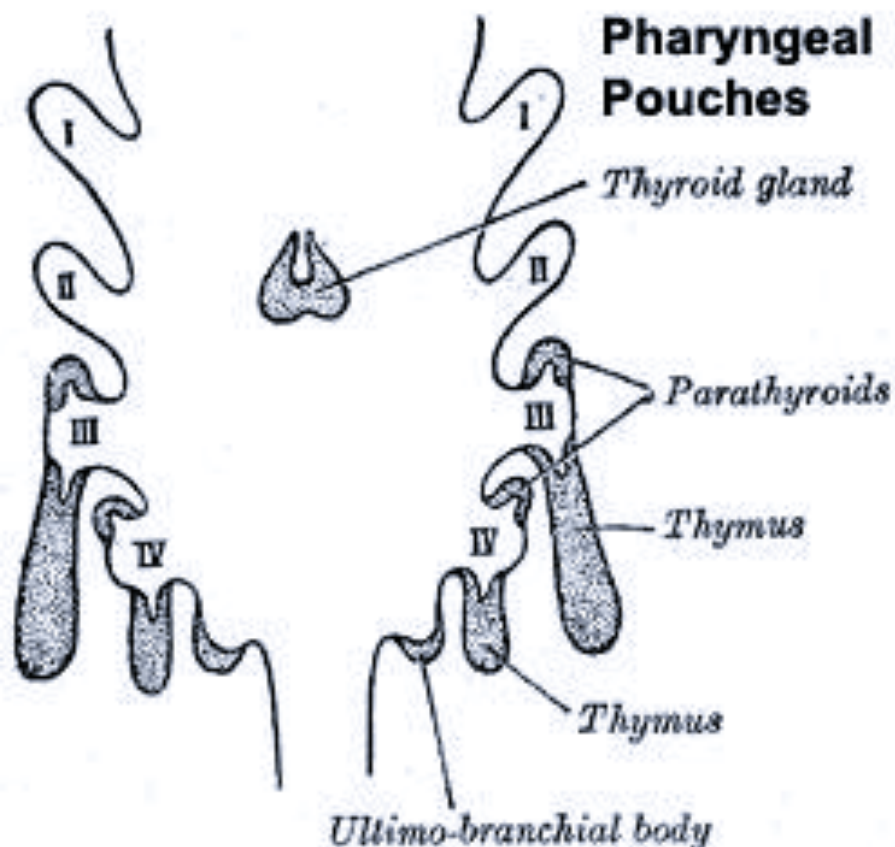


<https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/immune/spleen/exmh/index.htm> **Εικόνα 9**

**Ο θύμος αδένας** είναι το δεύτερο κεντρικό όργανο του λεμφικού - ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού (το άλλο όπως αναφέραμε παραπάνω είναι ο ερυθρός μυελός των οστών) όπου λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη και η ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων και βρίσκεται στο πρόσθιο ανώτερο μεσοθωράκιο (μεσοπνευμόνιο) τμήμα, πίσω από τη λαβή του στέρνου και μπροστά από το περικάρδιο. Ο θύμος σχηματίζεται από την καταβολή της κοιλιακής μοίρας του 3<sup>ου</sup> φαρυγγικού θυλάκου, που είναι ορατή κατά την 6<sup>η</sup> εβδομάδα της ανάπτυξης. Επίσης, στην κοιλιακή μοίρα του 4<sup>ου</sup> φαρυγγικού θυλάκου, υπάρχει μια συμπληρωματική καταβολή του θύμου αδένου, η οποία όμως συνήθως εκφυλίζεται, ώστε, φυσιολογικά, δεν

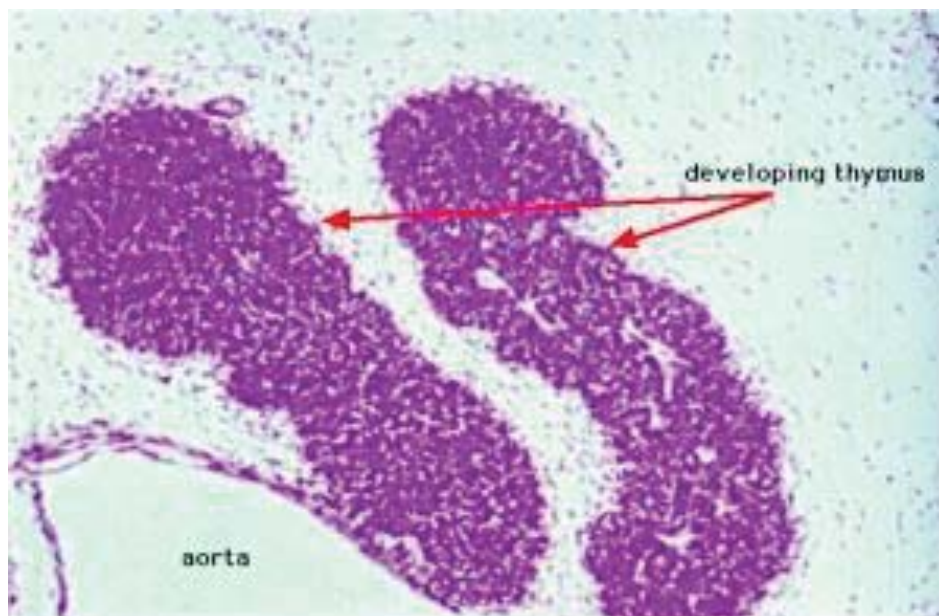
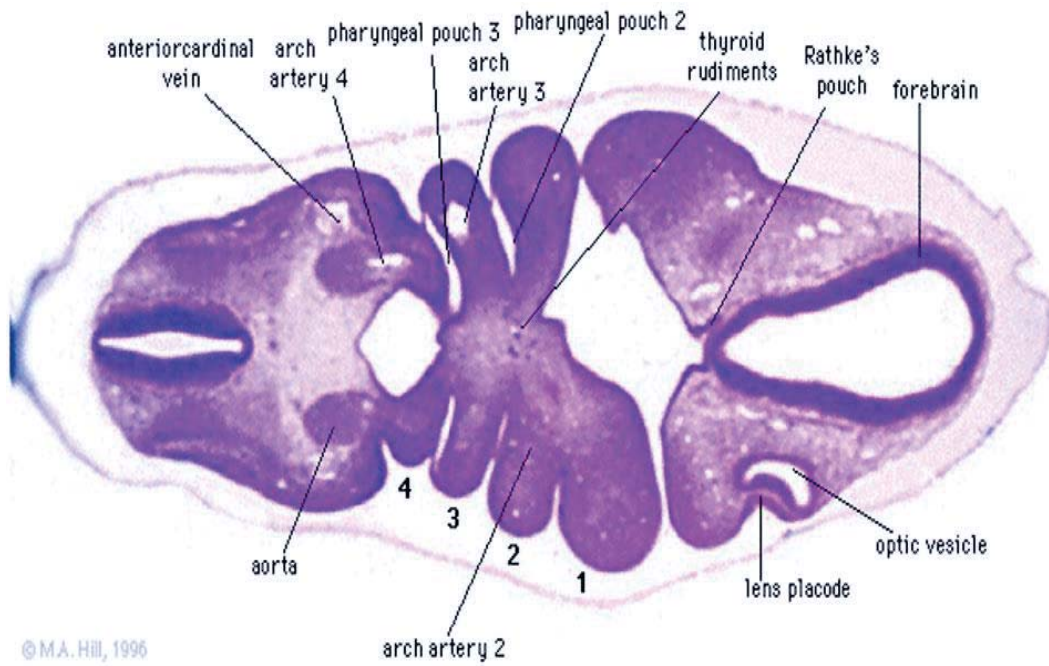


συμμετέχει στον τελικό σχηματισμό του οργάνου. Το επιθήλιο του θύμου, που αποτελείται από δικτυωτό ιστό, σχηματίζεται την 6<sup>η</sup> εβδομάδα της διάπλασης και προέρχεται από το ενδόδερμα (έσω βλαστικό δέρμα) του 3<sup>ου</sup> φαρυγγικού θυλάκου. Το μεσεγχυματικό στοιχείο του αδένα, το οποίο χορηγεί το διάμεσο ιστό, προέρχεται από την νευρική ακρολοφία. Η επαγωγική αλληλεπίδραση επιθηλίου (δικτυωτός ιστός) και μεσεγχύματος αποτελεί τη βάση για τη μετέπειτα ανάπτυξη και διαφοροποίηση του οργάνου. Κατά την 7<sup>η</sup> εμβρυική εβδομάδα, οι καταβολές του θύμου αποχωρίζονται από την αρχική τους θέση και φέρονται προς την μέση γραμμή του τραχήλου, ενώ την 8<sup>η</sup> εβδομάδα συνενώνονται και εγκαθίστανται στην οριστική τους θέση, μέσα στον μεσοπνευμόνιο χώρο πίσω από τη λαβή του στέρνου (**Εικόνα 10 & 11**).



<https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Endocrine> -

Thymus Development **Εικόνα 10**



[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Endocrine\\_-\\_Thymus\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Endocrine_-_Thymus_Development) **Εικόνα 11**

Ο θύμος αδένας είναι καλά αναπτυγμένος κατά τη γέννηση και εξακολουθεί να αναπτύσσεται ως την εφηβική ηλικία. Αποτελείται από δυο πανομοιότυπους λοβούς που συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικό ιστό και το μέγεθός του ποικίλει ανάλογα με την ηλικία. Κάθε λοβός περιβάλλεται από κάψα και διαιρείται σε λοβίδια, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους από δοκίδες συνδετικού ιστού. Κάθε λοβίδιο είναι οργανωμένο σε δυο διαμερίσματα: το εξωτερικό που ονομάζεται φλοιός και περιέχει πυκνούς πληθυσμούς ανώριμων T κυττάρων, που ονομάζονται θυμοκύτταρα και το εσωτερικό που ονομάζεται μυελός που χαρακτηρίζεται από την παρουσία των σωματίων Hassal και σπάνια περιέχει θυμοκύτταρα. Τόσο ο φλοιός όσο και ο μυελός του θύμου, διατρέχονται από ένα τρισδιάστατο δίκτυο στρωματικών κυττάρων, που συντίθεται από επιθηλιακά κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά δημιουργούν το σκελετό του οργάνου και συνεργάζονται για την ανάπτυξη και ωρίμανση των θυμοκυττάρων. Πολλά από αυτά τα στρωματικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αναπτυσσόμενα θυμοκύτταρα. Μερικά επιθηλιακά κύτταρα του θύμου στο εξωτερικό τμήμα του φλοιού, που καλούνται τροφικά κύτταρα (nurse cells), διαθέτουν επιμήκεις μεμβρανικές προσεκβολές, που περιβάλλουν περίπου 50 θυμοκύτταρα, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο μεγάλα πολυκυτταρικά συμπλέγματα. Άλλα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού διαθέτουν επιμήκεις κυτταροπλασματικές προσεκβολές που επικοινωνούν μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα δίκτυο το οποίο αλληλεπιδρά με διάφορα θυμοκύτταρα, καθώς αυτά διέρχονται από το φλοιό. Λειτουργικά, το όργανο εκκρίνει διάφορα μόρια με δράση αυξητικού παράγοντα, κυτταροκίνες και μόρια επαγωγής της λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης. Ως κλασσικό παράδειγμα τέτοιου παραγώγου αναφέρεται η θυμοσίνη. Στο έμβρυο, τόσο η βασική δομή - αρχιτεκτονική του ώριμου, όσο και η διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων παρατηρούνται στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης, οπότε και το όργανο θεωρείται πλέον λειτουργικό.

Η λειτουργία του θύμου συνίσταται στη δημιουργία και την επιλογή μιας πλειάδας T λεμφοκυττάρων, δραστήρια ανοσοκύτταρα διαφορετικών υποτύπων και εξειδικεύσεων ανάλογα με την έκφραση συγκεκριμένων δεικτών επιφανείας (CD), τα οποία θα αναλάβουν την προστασία του οργανισμού από διάφορες λοιμώξεις. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των

θυμοκυττάρων, δημιουργείται με τυχαία διαδικασία μια τεράστια ποικιλία Τ κυτταρικών υποδοχέων, που παράγει μερικά Τ κύτταρα με υποδοχείς ικανούς να αναγνωρίζουν συμπλέγματα μορίων ΜΗC-αντιγόνου. Οι περισσότεροι όμως Τ κυτταρικοί υποδοχείς, που παράγονται με την παραπάνω διαδικασία, δεν μπορούν να αναγνωρίζουν συμπλέγματα μορίων ΜΗC-αντιγόνου και ένα μικρό ποσοστό τους αντιδρά με συνδυασμούς συμπλεγμάτων εαυτών αντιγόνων - μορίων ΜΗC. Τα Τ κύτταρα που δεν αναγνωρίζουν συμπλέγματα μορίων ΜΗC-αντιγόνου, καθώς και αυτά που αντιδρούν με συμπλέγματα εαυτών αντιγόνων-μορίων ΜΗC, καταστρέφονται από το θύμο αδένα, διασφαλίζοντας έτσι την αποφυγή πρόκλησης αυτοάνοσων νοσημάτων. Ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 95% όλων των θυμοκυττάρων, πεθαίνουν με απόπτωση στο θύμο, χωρίς ποτέ να ωριμάσουν. Τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν συνολικά την ανοσολογική αντίδραση και προάγουν την απόπτωση, στο θύμο αδένα. Αντίθετα, υφίστανται και κυτταροκίνες με αντιαποπτωτική λειτουργία, όπως η ιντερλευκίνη 1β και ο αυξητικός παράγοντας των αποικιών των κοκκιοκυττάρων (GCSF - Granulocyte Colony Stimulating Factor) (**80, 83 - 85**).

Με τα πρώτα χρόνια της εφηβείας, περίοδο που συνδυάζεται με την ανοσολογική ωρίμανση του ατόμου και τη επιλογή των λεμφοκυτταρικών κλώνων, ο θύμος αρχίζει να ατροφεί και το θυμικό στρώμα αντικαθίσταται από λιπώδη ιστό. Παρόλα αυτά, η Τ-λεμφοποίηση συνεχίζεται σε όλη την ενήλικη ζωή (**50**).



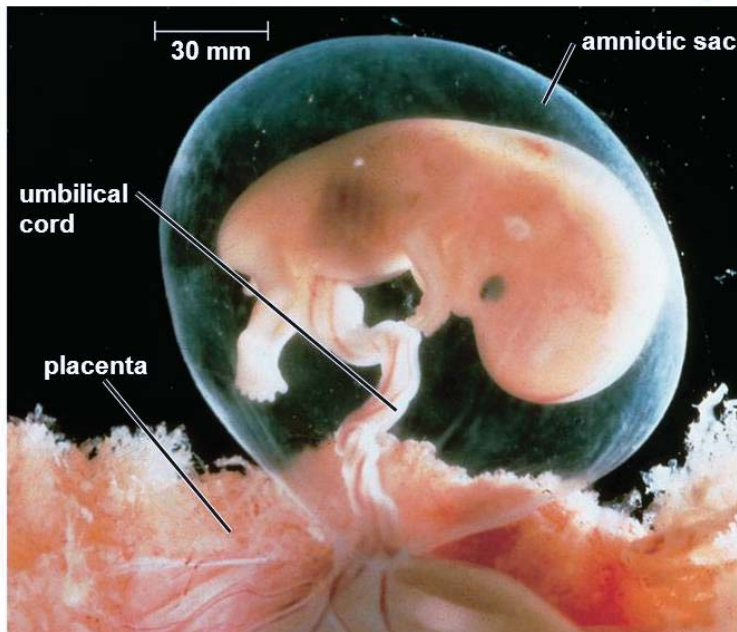
## ΕΜΒΡΥΙΚΟΙ ΥΜΕΝΕΣ - ΧΟΡΙΟ ΚΑΙ ΑΜΝΙΟ

Στη Μαιευτική υπάρχει το δόγμα, ότι κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης το περιεχόμενο της μήτρας προστατεύεται από τον κίνδυνο ανιούσας φλεγμονής, εφόσον οι υμένες είναι άρρηκτες. **Οι εμβρυικοί υμένες**, το **χόριο** και το **άμνιο**, αποτελούν μεμβράνες μέσα στις οποίες περικλείεται το έμβρυο σχηματίζοντας έτσι το εμβρυικό θυλάκιο (**Εικόνα 12 & 13**). Το **χόριο** αποτελεί το εξωτερικό περίβλημα του εμβρυοθυλακίου, σχηματίζεται από το τμήμα του μεσοδέρματος που καλύπτει εσωτερικά την τροφοβλάστη, αναπτύσσεται κάτω από το άμνιο και περικλείει τα ομφαλικά αγγεία. Το **άμνιο**, είναι μια λεπτή διάφανη μεμβράνη που αποτελεί το εσωτερικό περίβλημα του εμβρυοθυλακίου που σχηματίζεται από την κυτταροτροφοβλάστη. Όσο προχωρά η εγκυμοσύνη και ταυτόχρονα η ανάπτυξη του εμβρύου, ο αμνιακός σάκος διατείνεται και περί την 16<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης έρχεται σε άμεση επαφή με την εσωτερική επιφάνεια του χορίου (**86, 87**).



<https://www.alamy.com/stock-photo-fetus-in-amniotic-sac-60096549.html> **Εικόνα 12**

## An 8-Week-Old Human Embryo



[https://www.reddit.com/r/UpliftingNews/comments/5hl7t0/worlds\\_oldest\\_known\\_seabird\\_lays\\_an\\_egg\\_at\\_age\\_of/](https://www.reddit.com/r/UpliftingNews/comments/5hl7t0/worlds_oldest_known_seabird_lays_an_egg_at_age_of/) **Εικόνα 13**

**Λειτουργίες των εμβρυικών υμένων.** Οι σπουδαιότερες λειτουργίες των εμβρυικών υμένων είναι:

- 1). Παράγουν και συντηρούν την ποσότητα του αμνιακού υγρού.
- 2). Επιτρέπουν την δίοδο του νερού ανάμεσα στην μητέρα και στο αμνιακό υγρό.
- 3). Παράγουν ένζυμα που σχετίζονται στεροειδογένεση (δημιουργία στεροειδών ορμονών δηλ. ανδρογόνων, προγεστερόνης, οιστρογόνων, κορτιζόνης και αλδοστερόνης. Η κύρια πρόδρομη ουσία για τη στεροειδογένεση είναι η χοληστερόλη που προέρχεται από το οξικό οξύ. Οι αδένες στους οποίους επιτελείται η στεροειδογένεση είναι οι ωοθήκες - ωοθυλάκιο, ωχρό σωματίο, οι όρχεις, τα επινεφρίδια και ο πλακούντας).
- 4). Παράγουν πρόδρομες ουσίες των προσταγλανδινών E2 και F2, το ένζυμο της φωσφολιπάσης A2 που εμπλέκεται στην σύνθεση των προσταγλανδινών.

## ΧΟΡΙΟΑΜΝΙΟΝΙΤΙΔΑ

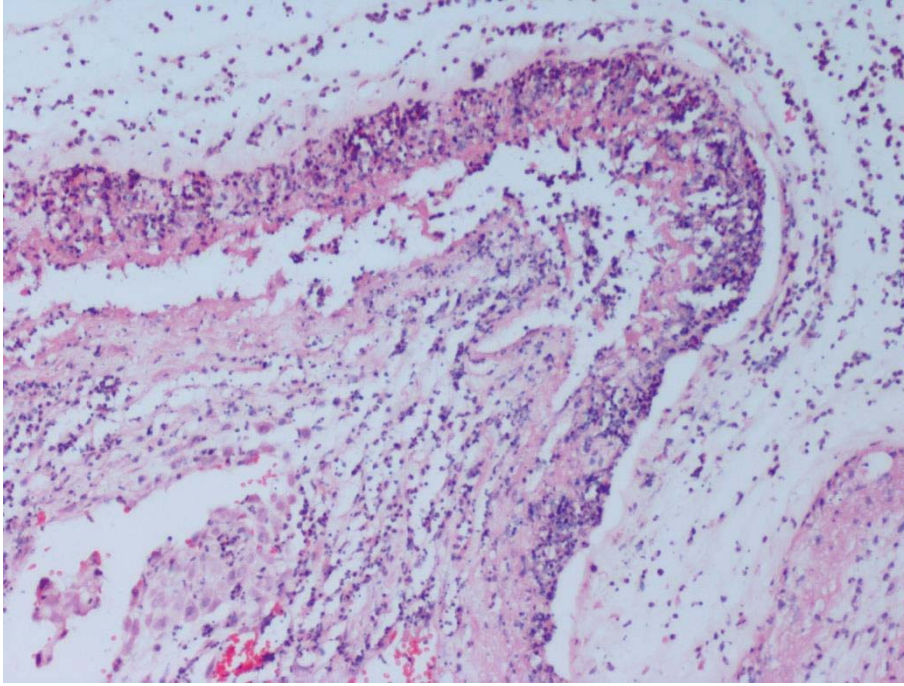
Η χοριοαμνιονίτιδα - ενδομήτρια φλεγμονή των εμβρυικών υμένων (άμνιο - χόριο), είναι μια σοβαρή επιπλοκή της εγκυμοσύνης και αποτελεί απειλή τόσο για τη μητέρα, στην οποία είναι δυνατόν να προκαλέσει σηψαιμία, όσο και το έμβρυο, στο οποίο μπορεί να προκαλέσει ενδομήτρια φλεγμονή, πρόωρη ρήξη των υμένων, συγγενείς διαμαρτίες της ανάπτυξης σε διάφορα όργανα ή ενδομήτριο θάνατο

Ποικίλα λοιμογόνα αίτια της έμβρυο -πλακουντιακής μονάδας μπορεί να προκαλέσουν, ανάλογα με την οδό της προσβολής τους, δυο ευδιάκριτες μεταξύ τους φλεγμονώδεις αντιδράσεις: α) φλεγμονή των εμβρυικών υμένων, χόριο και άμνιο (χοριοαμνιονίτιδα) και β) φλεγμονή των χοριακών λαχνών (πλακουντίτιδα). Το έμβρυο προσβάλλεται, στην πρώτη περίπτωση, από το αμνιακό υγρό, με αποτέλεσμα τη λοίμωξη του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος, των επιπεφυκότων, καθώς και άλλων οργάνων. Στη δεύτερη περίπτωση - που είναι και η συχνότερη - ακολουθεί εμβρυική μικροβιαμία. **(88 - 96)**.

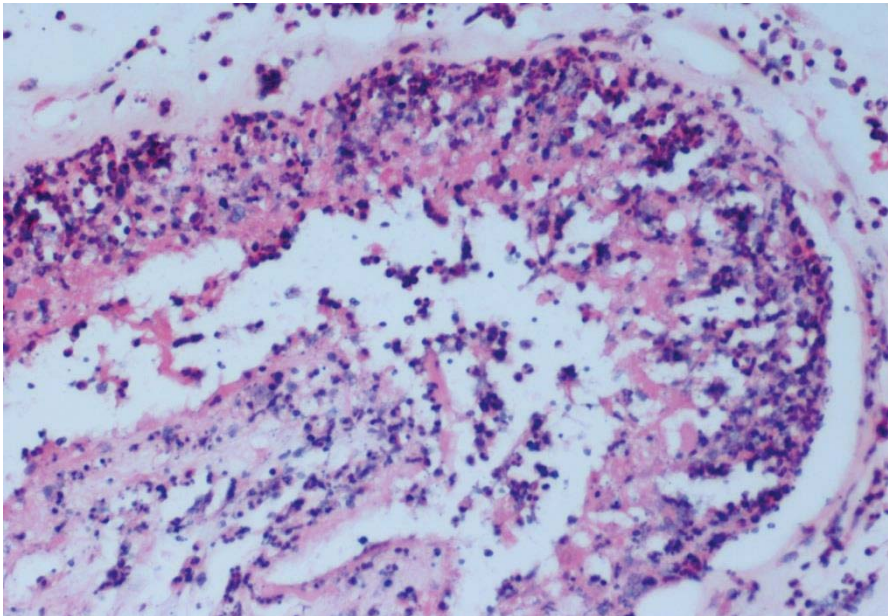
Ο Blanc **(97)** θεώρησε τη χοριοαμνιονίτιδα σαν τμήμα του Συνδρόμου Αμνιακής Λοίμωξης που περιέγραψε ο ίδιος και περιελάμβανε: α) τη φλεγμονή του πλακούντα (φθαρτίτις, υποχοριονική μεσολαχνίτις, αγγείτις - φλεβίτις και αρτηρίτις), β) τη φλεγμονή του ομφαλίου λώρου, και γ) τη φλεγμονή των εμβρυικών υμένων, χόριο και άμνιο (χοριοαμνιονίτιδα).

Η διάγνωση της χοριοαμνιονίτιδας βασίζεται στην μικροσκοπική εξέταση των εμβρυικών υμένων χόριου και αμνίου που εμφανίζουν διατοιχωματικά διαφόρου βαθμού φλεγμονώδη διήθηση από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα **(Εικόνα 14A & 14B)**. Η πρόωρη ρήξη των υμένων είναι το αποτέλεσμα της μεγάλης ευθρυπτότητας που εμφανίζουν οι υμένες λόγω της έντονης λευκοκυτταρικής διήθησης **(98-100)**.





**Εικόνα 14Α.** (Χρώση Ε - Α, Χ100). Σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας. Μικροσκοπική εξέταση εμβρυικών υμένων που εμφανίζουν έντονη φλεγμονώδη διήθηση από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, ΔΠΘ).



**Εικόνα 14Β.** (Χρώση Ε - Α, Χ200). Μεγαλύτερη μεγένθυση. Σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας. Μικροσκοπική εξέταση εμβρυικών υμένων που εμφανίζουν έντονη φλεγμονώδη διήθηση από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, ΔΠΘ).



**Συχνότητα:** Από αναδρομικές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία η συχνότητα της χοριοαμνιονίτιδας κυμαίνεται από 1 - 4% στο σύνολο των κήσεων (**101 - 107**).

Η χοριοαμνιονίτιδα συνδυάζεται με υψηλό ποσοστό εμβρυϊκής νοσηρότητας και θνητότητας που ανέρχεται σε ποσοστό 43 - 45.5% κατά το δεύτερο τρίμηνο της εμβρυϊκής ανάπτυξης, χρονική περίοδο που συμπίπτει με την έντονη εξωμυελική αιμοποίηση στο έμβρυο και την έναρξη της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (**108 - 109**).

**Επιδημιολογία:** Έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα ΧΑ στη Μαύρη Φυλή, σε γυναίκες ηλικίας κάτω των 21 ετών, σε πρωτότοκες, σε γυναίκες χαμηλής κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης, με διαταραχές διατροφής (παχυσαρκία - λιμοκτονία), με εθισμό διαφόρων ουσιών (καπνός, οινόμνευμα, ναρκωτικά), με χρόνια νοσήματα (σακχαρώδης διαβήτης, αυτοάνοσοι νόσοι), με AIDS και, τέλος, μετά χρήση στεροειδών, ανοσοκατασταλτικών και κυτταροστατικών φαρμάκων (**102, 104, 110 - 114**).

**Αιτιολογία:** Η χοριοαμνιονίτιδα προκαλείται από ποικιλία παθογόνων μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν: 1) **Μυκοπλάσματα** (*Ureaplasma urealyticum*, *M. Hominis*), 2) **Πρωτόζωα** (*Toxoplasma Gondii*), 3) **Μύκητες** (*Candida albicans*, *Histoplasma*), 4) **Χλαμύδια** (Τραχώματος), 5) **Μικρόβια:** **Αερόβια gram (+)** (Σταφυλόκοκος, Στρεπτόκοκος-β, Λιστέρια), **Μικρόβια Αερόβια gram (-)** (Κολοβακτηρίδιο, Πρωτέας, Ψευδομονάδα, Κλεμπσιέλλα). **Αναερόβια gram (+)** (Πεπτόκοκος, Πεπτοστρεπτόκοκος, Κλωστηρίδια), **Αναερόβια gram (-)** (Βακτηριοειδή, *Gardnerellavaginalis*), 6). **Ιούς** (Ερυθράς, Έρπης II, Παρωτίτιδας, Ιλαράς, Γρίππης, Κυτταρομεγαλιός CMV, HPV, HIV, Coxsackie B, Ανεμευλογιάς, Πολυομυελίτιδας, Ηπατίτιδας B, Εντεροϊό, Εγκεφαλίτιδας ίππου) (**102, 115 - 128**).

**Οδοί μόλυνσης:** Οι οδοί που ακολουθούν κατά την κύηση τα διάφορα λοιμογόνα αίτια για την πρόκληση χοριοαμνιονίτιδας είναι τέσσερις (**Εικόνα 15**), (**101, 104, 129 - 132**).

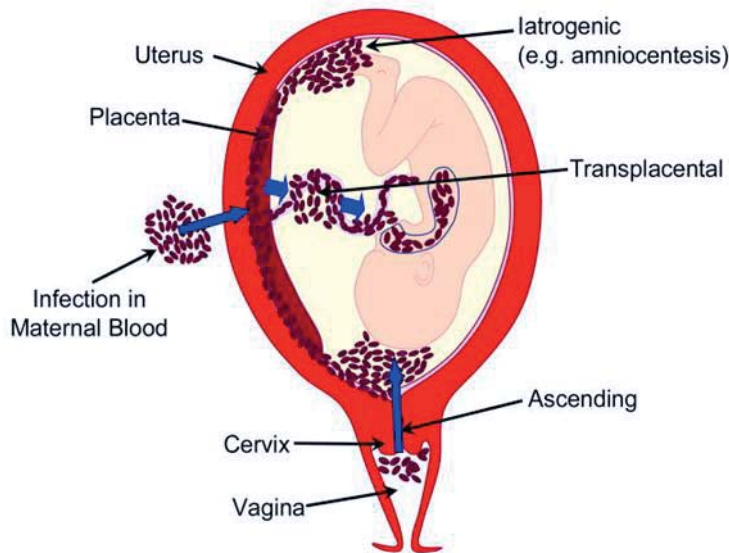
- Η ανιούσα οδός
- Η κατά συνέχεια ιστών οδός
- Η διασαλπικτική οδός
- Η αιματογενής οδός

**Η ανιούσα οδός** ακολουθείται κυρίως από θετικά και αρνητικά κατά Gram μικρόβια, μυκοπλάσματα, χλαμύδια, παράσιτα, τα οποία από το αιδοίο, τον κόλπο, τον τράχηλο και την ενδοτραχηλική κοιλότητα εισέρχονται στην αμνιακή κοιλότητα προσβάλλοντας αρχικά το αμνιακό υγρό, εν συνεχεία το άμνιο και το χόριο, και τέλος το έμβρυο. Η πλειοψηφία αυτών των μικροοργανισμών αποτελεί μόνιμο ξενιστή του κολεού και του τραχήλου των έγκυων γυναικών, με άγνωστη την αιτιολογία της μετακίνησης τους στην αμνιακή κοιλότητα.

**Η αιματογενής οδός** (διαπλακούντια) αφορά τη μεταφορά διαφόρων λοιμογόνων αιτίων από την κυκλοφορία του αίματος της μητέρας προς τον πλακούντα και την είσοδό του στο μεσολάχνιο χώρο από όπου προσβάλλονται τα αγγεία των λαχνών και, τέλος, μολύνεται το αμνιακό υγρό που καταπίνεται από το έμβρυο και προσβάλλονται έτσι το πεπτικό και το αναπνευστικό του σύστημα ή προσβάλλεται άμεσα η εμβρυϊκή κυκλοφορία από τις χοριακές λάχνες, από τη μητρική κυκλοφορία.

**Η κατά συνέχεια ιστών οδός** είναι πολύ σπάνια, η δε λοίμωξη μεταδίδεται από το μυομήτριο και ενδομήτριο (φθαρτός) προς τους εμβρυϊκούς υμένες.

**Η διασαλπικτική (από τις σάλπιγγες) οδός** από παλινδρόμηση πύου ή μεταφορά μικροβίων από την περιτοναϊκή κοιλότητα προς την αμνιακή κοιλότητα μετά από ενδοπυελικές φλεγμονές.



**Οδοί Μόλυνσης ( Alan T. N. Tita , 2010) Εικόνα 15**

**Προδιαθεσικοί παράγοντες χοριοαμνιονίτιδας.** Διακρίνονται σε αυτούς που επιδρούν στη διάρκεια της κύησης, όπως **α)** η αμνιοπαρακέντηση που πραγματοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς (κένωση του υδραμνίου ή έκχυση διαφόρων διαλυμάτων στον αμνιακό σάκο) (**101**), **β)** η περίδεση του έσω τραχηλικού στομίου που εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση της ανεπάρκειας του στομίου (**101**), **γ)** η ενδομήτρια μετάγγιση αίματος στο έμβryo (αιμολυτική νόσος - ασυμβατότητα της ομάδας Rh) (**133 - 134**). Παράγοντες που επιδρούν κατά τον τοκετό, όπως **α)** η τεχνητή ρήξη των εμβρυικών υμένων που πραγματοποιείται με σκοπό την πρόκληση έναρξης του τοκετού (**135**), **β)** η παράταση του τοκετού, **γ)** η διακολπική τοποθέτηση και στερέωσης ηλεκτροδίου στο τριχωτό της κεφαλής του εμβρύου (εσωτερική καρδιοτοκογραφία) (**101**), **δ)** οι πολλές κολπικές εξετάσεις στη διάρκεια του τοκετού (**102 - 103**).

**Παθοφυσιολογία:** Η οξεία χοριοαμνιονίτιδα είναι μια παρατεταμένη φλεγμονώδη αντίδραση η δημιουργία της οποίας αρχίζει μετά την είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών στην αμνιακή κοιλότητα. Τα μικρόβια παράγουν πρωτεάσες οι οποίες δρουν απευθείας στους εμβρυικούς υμένες **α)** ελευθερώνοντας φωσφολιπάση A, η οποία με τη σειρά της προάγει τη σύνθεση προσταγλαδινών, **β)** διεγείροντας τη σύνθεση κυτοκινών από τα μακροφάγα του φθαρτού όπως ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-6, ιντερλευκίνη-8. Παράλληλα η ενεργοποίηση των μακροφάγων απελευθερώνει ένζυμα όπως

κολλαγενάσες, ζελατινάσες και πρωτεογλυκανάσες, που ελαττώνουν την ελαστικότητα και ανθεκτικότητα των εμβρυικών υμένων. Τόσο οι προσταγλαδίνες όσο οι κυτοκίνες και τα ένζυμα διεγείρουν τη δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεϊνάσης η οποία προκαλεί την αποδόμηση του κολλαγόνου (βασική πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας) των εμβρυικών υμένων με αποτέλεσμα την πρόωρη ρήξη τους. Ακολουθεί η παραγωγή και δραστηριότητα του τριπεπτιδίου ΠΓΠ (προλίνης - γλυκίνης - προλίνης), το οποίο με τη σειρά του έλκει τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα στο σημείο της βλάβης με αποτέλεσμα τη μικροσκοπική εικόνα της οξείας χοριοαμνιονίτιδας που εμφανίζεται με τη χαρακτηριστική φλεγμονώδη διήθηση των εμβρυικών υμένων από τα παραπάνω κύτταρα. Όταν οι εμβρυικοί υμένες ραγούν ο κίνδυνος για ανιούσα μόλυνση αυξάνει, διότι κάθε μικρόβιο της κολποτραχηλικής χλωρίδας μπορεί να εισέλθει στην αμνιακή κοιλότητα και να δράσει ως παθογόνο για τη μητέρα και το έμβρυο. Μετά τη μικροβιακή προσβολή του αμνιακού υγρού και των εμβρυικών υμένων μπορούν να προσβληθούν η μητέρα και το έμβρυο ως εξής: Η **μητέρα** προσβάλλεται από ενδοτοξίνες, που φθάνουν στο αγγειακό της διαμέρισμα δια του μεσολαχνίου χώρου και προκαλούν μικροβιαμία που εκδηλώνεται με πυρετό, λευκοκυττάρωση και κολπική υπερέκκριση ή προκαλούν σηψαιμία και σπανιότερα το θάνατό της μετά από διάφορες επιπλοκές. Το **έμβρυο** προσβάλλεται μετά από κατάποση μολυσμένου αμνιακού υγρού, οπότε οι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται στους ενδοκυψελιδικούς χώρους του πνεύμονά του δημιουργώντας αρχικά πνευμονία και ακολούθως σηψαιμία.

**Παθολογοανατομικά Ευρήματα.** Λίγα είναι τα γνωστά στοιχεία για το μηχανισμό άμυνας της μήτρας εναντίον της φλεγμονής. Το υγιές ενδομήτριο ενός φυσιολογικού γεννητικού κύκλου έχει πλήθος από λεμφοκύτταρα, ιστιοκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα κατά την έμμηνη ρύση. Μονοπύρρηνα φλεγμονώδη κύτταρα παρατηρούνται σε κάθε φυσιολογικό ενδομήτριο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Πιθανόν αυτό αποτελεί ένδειξη της ανοσολογικής αδράνειας, που αναπτύσσεται μεταξύ της εγκύου και του κυήματος. Μετά την εγκυμοσύνη το απογυμνωμένο ενδομήτριο καθώς αποκαθίσταται ανατομικά διηθείται από πλασματοκύτταρα.

Μακροσκοπικά σε φυσιολογικές συνθήκες οι εμβρυικοί υμένες (χόριο και άμνιο) είναι στυλπνοί, υποκύανοι και εμφανίζουν λεία επιφάνεια, η δε μικροσκοπική εξέταση των υμένων σπάνια εμφανίζει διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα.

Κατά τη χοριοαμνιονίτιδα, μακροσκοπικά η φλεγμονώδη αντίδραση των εμβρυικών υμένων εκδηλώνεται με θολερότητα και κοκκιώδη επιφάνεια που γίνεται ιδιαίτερα αντιληπτή στο διαφανές άμνιο.

Μικροσκοπικά παρατηρείται εκτεταμένη φλεγμονώδη διήθηση των υμένων από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Συνέπεια της έντονης λευκοκυτταρικής διήθησης των υμένων είναι η μακροσκοπική κοκκιώδη εμφάνιση καθώς και η ευθρυπτότητα των υμένων, όπως την περιγράψαμε και αναλύσαμε παραπάνω. Αυτή η ευθρυπτότητα αποτελεί και το σημαντικότερο παράγοντα για την πρόωρη ρήξη των υμένων, που αναπόφευκτα οδηγεί στη συνέχεια σε πρόωρο τοκετό. Πολυμορφοπυρηνικές φλεγμονώδεις διηθήσεις παρατηρούνται επίσης στο θυλακιοειδή φθαρτό, στο χοριακό πέταλο του πλακούντα και στις χοριακές λάχνες.

**Διάγνωση.** Η διάγνωση της χοριοαμνιονίτιδας στηρίζεται σε κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Στην υποψήφια μητέρα η κλινική εκδήλωση χαρακτηρίζεται από πυρετό με ρίγος, δύσσομη κοιλιακή υπερέκκριση, πόνο και ευαισθησία στην ψηλάφηση της μήτρας, ταχυκαρδία (πάνω από 100/1'), και υπόταση. Η μητρική ταχυκαρδία συνήθως συνοδεύεται και από ταχυκαρδία του εμβρύου. Εργαστηριακά, η λευκοκυττάρωση δε σημαίνει απαραίτητα φλεγμονή, γιατί φυσιολογικά η επίτοκος είναι δυνατό να παρουσιάζει λευκά μέχρι 15.000/mm<sup>3</sup> και ίσως και πάρα πάνω. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη θεωρείται παθολογική και χαρακτηριστική της χοριοαμνιονίτιδας όταν υπερβαίνει τα 2 mg/dl. Η πλέον αξιόπιστη εξέταση αποτελεί η μελέτη και ιδιαίτερα η ποσοτική καλλιέργεια των στοιχείων του αμνιακού υγρού (γλυκόζη, κυτοκίνες, εστεράση των λευκοκυττάρων, χρώση κατά Gram και οι καλλιέργειες αερόβιες και αναερόβιες) που λαμβάνεται με αμνιοπαρακέντηση (**101, 104, 136 - 138**).

## Επιπλοκές

Οι επιπλοκές της χοριοαμνιονίτιδας διακρίνονται σε επιπλοκές από τη μητέρα, από το έμβρυο και από το νεογνό.

**Επιπλοκές από τη μητέρα.** Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί διάφορες επιπλοκές όπως: οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, οξύ πνευμονικό οίδημα, σηπτική πνευμονία, σηπτική καταπληξία, περιτονίτιδα, νέκρωση ουροφόρων σωληναρίων, οξεία ανεπάρκεια επινεφριδίων, σύνδρομο διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης (Disseminated Intravascular Coagulation - DIC) και τέλος, θάνατος. Η σηπτική καταπληξία και το σύνδρομο διάσπαρτης ενδοαγγειακής πήξης αποτελούν τις σοβαρότερες επιπλοκές της χοριοαμνιονίτιδας. Για την εγκατάσταση της σηπτικής καταπληξίας φαίνεται ότι είναι απαραίτητη η απελευθέρωση ενδοτοξίνης, που είναι ένα σύμπλεγμα λιποπολυσακχαριδίων. Αυτή παράγεται από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια στους κατεστραμμένους από την αρχική βλάβη ιστούς των γεννητικών οργάνων και του παραμητρίου. Ακολουθεί η αύξηση των τιμών ισταμίνης, σεροτονίνης και γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα σοβαρής μεταβολικής οξέωσης που οδηγεί σε ελάττωση του αγγειακού τόνου και λίμνασμα του αίματος στους περιφερικούς αγγειακούς χώρους συμπεριλαμβανομένου και του μυοκαρδίου, με αποτέλεσμα την ελάττωση της συσταλτικότητάς του. Όλα αυτά ερμηνεύουν την υποβολαιμική φύση της σηπτικής καταπληξίας, καθώς επίσης και πτώση της κεντρικής φλεβικής πίεσης. Εκτός από τα παραπάνω, λόγω του φαινομένου Schwartzman, είναι δυνατό να προκληθούν διαταραχές της πήκτικότητας του μητρικού αίματος - διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (Disseminated Intravascular Coagulation - DIC) που οδηγεί σε εναπόθεση ινωδογόνου στα μικρά αγγεία, με αποτέλεσμα την απόφραξή τους και ισχαιμία σε διάφορα όργανα, όπως την υπόφυση, τα επινεφρίδια, το ήπαρ και τη φλοιώδη μοίρα των νεφρών (95, 96).

**Επιπλοκές από το έμβρυο.** Η προσβολή του εμβρύου από τη χοριοαμνιονίτιδα μπορεί να προκαλέσει σ' αυτό, ανάλογα με την ηλικία της κύησης, συγγενείς διαμαρτίες της ανάπτυξης σε διάφορα όργανα όπως στον εγκέφαλο, πνεύμονες, καρδιά, νεφρούς, έντερο, αμφιβληστροειδή χιτώνα του

οφθαλμού, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, πρόωρη ρήξη των υμένων, πρόωρο τοκετό, σηψαιμία και τέλος, ενδομήτριο θάνατο (139, 140).

**Θεραπευτική αντιμετώπιση.** Παρόλο που όπως έχει αναφερθεί, η χοριοαμνιονίτιδα αποτελεί μια πολύ συχνή αιτία νοσηρότητας κατά την κύηση και φέρει κινδύνους τόσο για την ίδια τη μητέρα όσο και για το έμβρυο, δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμα κάποιος αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης, ούτε κάποια θεραπεία για τη φλεγμονή που δημιουργείται. Η μόνη μέθοδος αντιμετώπισης, εκτός από τη φυσική άμυνα του οργανισμού, είναι συμπτωματική και γίνεται με τη χορήγηση αντιβιοτικών ενδοφλεβίως μόνα τους ή σε συνδυασμό με αντιπυρετικά. Κάποιοι από τους μηχανισμούς έμφυτης ανοσίας που συμμετέχουν στην αντιμετώπιση της νόσου είναι η παραγωγή βλέννας από τον τράχηλο της μήτρας, η μεγαλύτερη παραγωγή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως είναι τα λευκά αιμοσφαίρια καθώς και η αύξηση της παραγωγής κυτταροκινών. Σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της νόσου παίζουν και κάποια βακτήρια που ανήκουν στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του τραχήλου, οι γαλακτοβάκιλλοι. Τα συγκεκριμένα βακτήρια Gram+ παράγουν, υπεροξειδίο ( $H_2O_2$ ), μεταβάλλοντας έτσι το μικροπεριβάλλον του τραχήλου, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της ανάπτυξης και της δράσης άλλων παθογόνων μικροοργανισμών.

Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι μετά την κλινική διάγνωση και την εργαστηριακή επιβεβαίωση της νόσου με θετικές καλλιέργειες αίματος και αμνιακού υγρού απαιτείται η άμεση αντιμετώπιση της με κατάλληλη θεραπεία και κένωση της μήτρας με πρόκληση του τοκετού χρησιμοποιώντας διάλυμα ωκυτοκίνης ή με καισαρική τομή. Τα αντιβιοτικά που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να διέρχονται με ευχέρεια από τον πλακούντα και να μην προκαλούν προβλήματα στο έμβρυο. Η χορήγηση κατάλληλων αντιβιοτικών εξαστομικεύεται σε κάθε περίπτωση. Σε μητέρες που βρίσκονται στη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> τριμήνου της κύησης και εμφανίζουν πρόωρη ρήξη των υμένων, συνηθίζεται η χορήγηση προγεννητικών αντιβιοτικών. Μελέτες έδειξαν, ότι η αποτελεσματικότητά τους αυξάνεται θεαματικά, όσο νωρίτερα γίνεται η χορήγηση. Παράλληλα, παρατηρήθηκε πως ευεργετικά αποτελέσματα εμφανίζει και η χορήγηση προγεννητικών στεροειδών (βεταμεθαζόνη). Η χρήση τους αποδείχθηκε ότι περιορίζει τις επιβλαβείς επιπτώσεις της νόσου

και αυξάνει τη διάρκεια της κύησης σε περιπτώσεις όπου ο κίνδυνος προώρου τοκετού ήταν αυξημένος (141 - 143).



## ΜΟΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

Η αρχική συγκρότηση των διαφόρων ιστών των οργάνων στη περίοδο της εμβρυογένεσης, η ανάπτυξη, η φυσιολογική αρχιτεκτονική και λειτουργία τους, ελέγχεται από ένα σύνολο αντιδράσεων που πραγματοποιούνται είτε μεταξύ κυττάρων (cell-cell), είτε μεταξύ κυττάρων και στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (cell-matrix). Δηλαδή, η αρχιτεκτονική των ιστών απαιτεί από τα κύτταρα που το συνθέτουν να έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν δομές μέσω της ένωσης τους με άλλα γειτονικά κύτταρα. Αυτό εξασφαλίζεται από τα μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις και διακρίνονται με βάση το συγκεκριμένο διαχωρισμό σε μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν σε αντιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο (**ομόφυλη ένωση**) (*cell - cell adhesion molecules, CAMs*) και σε μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν σε αντιδράσεις κυττάρου προς στοιχεία της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (**ετερόφυλη ένωση**) (*cell - substratum adhesion molecules, SAMs*). Μερικά μόρια προσκόλλησης είναι δυνατόν να μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις και των δύο τύπων που περιγράφηκαν παραπάνω, μπορούν δηλαδή να δρουν τόσο ως CAMs, όσο και ως SAMs (144). Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία είναι μια δυναμική δομή αποτελούμενη από ένα πολύπλοκο δίκτυο σύνθετων μορίων, που οργανωμένα μεταξύ τους, καταλαμβάνουν τους χώρους μεταξύ των κυττάρων, οριοθετούν, διαμερισματοποιούν, υποστηρίζουν και σταθεροποιούν την αρχιτεκτονική και την ακεραιότητα όλων των ιστών. Πέρα από την αναφερόμενη δομική υποστήριξη, τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας συνεισφέρουν στη διακυτταρική επικοινωνία και τη μεταφορά χρήσιμων βιολογικών πληροφοριών, συμμετέχοντας έτσι σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες όπως προσκόλληση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και απόπτωση των κυττάρων (143).

Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης είναι πρωτείνες και εκφράζονται στις κυτταρικές μεμβράνες υπό την επίδραση συγκεκριμένων κατά περίπτωση ερεθισμάτων και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης τόσο στη διαδικασία της διακυτταρικής σύνδεσης και σύνδεσης των κυττάρων με τα στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όσο και στη μεταβίβαση προς το εσωτερικό των κυττάρων μηνυμάτων που

προάγουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίησή τους (πχ. φαινόμενο μεταβολικής συνεργασίας, μεταφορά κυκλικού AMP) (144, 145). Έως σήμερα λόγω της έκρηξης των γνώσεων στους τομείς της φυσιολογίας, της βιολογίας, της βιοχημείας και της γενετικής, έχει προσδιοριστεί ένας μεγάλος αριθμός μορίων προσκόλλησης (>100), καθώς επίσης και ο ρόλος που διαδραματίζουν σε διάφορες καταστάσεις, όπως στην εμβρυογένεση, στη φυσιολογική ανάπτυξη, στην εξαγγείωση των λευκών αιμοσφαιρίων (λευκοκυττάρων), στη φλεγμονή, στην επούλωση των τραυμάτων, στην πήξη του αίματος και την αιμόσταση, αλλά επιπλέον και στην καρκινική διήθηση και τη μεταστατική διαδικασία (144).

Τα μόρια προσκόλλησης ταξινομούνται σε 5 κατηγορίες: α) στις ιντεγκρίνες, β) στις σελεκτίνες, γ) στις καντερίνες, δ) στη γονιδιακή υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και ε) το CD44. Στην έρευνά μας μελετήσαμε την ανοσοιστοχημική έκφραση σε τρία από τα πέντε κύρια μόρια προσκόλλησης: του CD44, της E-Καντερίνης (E-Cadherin) και της E-Σελεκτίνης (E-Selectin) λόγω της κυρίαρχης θέσης που έχουν οι πρωτείνες αυτές στην εμβρυογένεση και ιδιαίτερα στην εξαγγείωση των λευκοκυττάρων, διεργασία που φαίνεται ότι έχει καίριο ρόλο στη διάρκεια της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων στη εμβρυική εξωμυελική αιμοποίηση και κατ' επέκταση στη λειτουργία του λεμφαιμοποιητικού συστήματος του εμβρύου στο δεύτερο τρίμηνο της ανάπτυξης.

**Καντερίνες (Cadherins).** Οι καντερίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτείνες και αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της κυττάρου προς κύτταρο προσκόλλησης (144, 146, 147). Η προσκόλληση με τις καντερίνες πραγματοποιείται με μια σειρά ομοτυπικών αντιδράσεων που εξαρτώνται πλήρως από την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Δηλαδή, ένα μόριο καντερίνης ενός κυττάρου συνδέεται με ένα άλλο μόριο καντερίνης του ίδιου τύπου σε ένα παρακείμενο κύτταρο (144, 147, 148). Υπάρχουν διάφοροι τύποι καντερινών, που έχουν λάβει την ονομασία τους από τον τύπο και το είδος του ιστού όπου ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά. Ο σπουδαιότερος εκπρόσωπος των καντερινών είναι η ενδοθηλιακή E-Καντερίνη (E-Cadherin, Endothelial Cadherin), που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και η οποία στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται και ως LCAM (149). Οι καντερίνες

επειδή έχουν πρωτεύοντα ρόλο στη διεργασία διαχωρισμού και συσσώρευσης των κυττάρων, θεωρούνται μόρια-κλειδιά στη διεργασία της μορφογένεσης στη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Έχουν όμως και μετέπειτα άμεση επίδραση στη μορφολογία, αρχιτεκτονική και φυσιολογική γενικά λειτουργία των κυττάρων.

**Σελεκτίνες (Selectins).** Οι σελεκτίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτείνες που μεσολαβούν για την αρχική προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων κατά τη διάρκεια της λεμφοκυτταρικής εγκατοίκησης και λευκοκυτταρικής εγκατάστασης (152 - 155). Υπάρχουν τρία στενά συσχετιζόμενα μέλη της ομάδας των σελεκτινών. HL- σελεκτίνη (leucocyte selectin) που εκφράζεται από τα λευκοκύτταρα (156), η E- σελεκτίνη (endothelial selectin) που εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (157) και η P-σελεκτίνη (platelet selectin) που εκφράζεται από τα αιμοπετάλια (156). Για την μελέτη μας εξετάσαμε την E- σελεκτίνη που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

**CD44.** Το CD44 αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης που μεσολαβεί σε αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είτε μεταξύ κυττάρων (cell-cell), είτε μεταξύ κυττάρου και στοιχείων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (cell-matrix). Το CD44 συνδέεται με το υαλουρονικό οξύ, καθώς και με άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίαςόπως το κολλαγόνο, η ινονεκτίνη, η λαμινίνη, η οστεοποντίνη και η σεργλυκίνη, (144). Στον ανθρώπινο οργανισμό, το γονίδιο της γλυκοπρωτεΐνης CD44 εδράζεται στο χρωμόσωμα 11p12 και αποτελείται από 21 κατά προσέγγιση εξόνια.

Το CD44 εμπλέκεται σε διεργασίες τηςεμβρυϊκής ανάπτυξηςκαι ιδιαίτερα της αιμοποίησης, συμβάλλοντας ενεργά στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (προγονικά κύτταρα CFU-E για την ερυθροκυτταρική σειρά, CFU-GM για τις κυτταρικές σειρές των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων, CFU-Eo για τα ηωσινόφιλα, CFU-Ba για τα βασεόφιλα, και CFU-Meg για τα μεγακαρυοκύτταρα) στα όργανα της εξωμυελικής εμβρυϊκής αιμοποίησης (ήπαρ, σπλήνα και θύμο), καθώς επίσης και την μετανάστευση (έξοδο) των

προϊόντων της αιμοποίησης στη κυκλοφορία (**160 - 164**). Επιπλέον, συμμετέχει στην αγγειογένεση καθώς και τον αποικισμό των λεμφοκυττάρων από τα πρωτογενή λεμφικά όργανα (ερυθρό μυελό των οστών - θύμο αδένες) στα δευτερογενή (περιφερικά) λεμφικά όργανα (σπλήνας - λεμφαδένες - λεμφικό ιστό των βλεννογόνων MALT), καθώς μεσολαβεί στην απόσπαση των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων από το αίμα και στην είσοδό τους στο λεμφικό ιστό. Το CD44 εκφράζεται ευρέως σε ποικίλους τύπους κυττάρων, με ιδιαίτερη έμφαση στα λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα (**165, 166**). Η έκφραση του CD44 στο κεντρικό νευρικό σύστημα περιορίζεται στη λευκή ουσία και συγκεκριμένα στα αστροκύτταρα. Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 10 ισότυποι του CD44 (variant isoforms, CDv) (**165, 166**). Ο πλέον συχνός ισότυπος, που αναφέρεται και ως «σταθερός» ή αιμοποιητικός τύπος (CD44s ή CD44H), έχει μοριακό βάρος 85kDa και εκφράζεται κυρίως στα λεμφοκύτταρα, στους ινοβλάστες, στα αιμοποιητικά κύτταρα και σε ορισμένους όγκους μεσεγχυματικής και νευροεκτοδερμικής προέλευσης. Το CD44 συνδέεται με το υαλουρονικό οξύ, που αποτελεί βασικό συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επίσης συνδέεται και με άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και συγκεκριμένα με τις πολυσυγκολλητικές (μη νηματοειδείς) γλυκοπρωτεΐνες (λαμίνη, εντακτίνη και τενασκίνη), το κολλαγόνο, την οστεοποντίνη και τη σεργλυκίνη, διευκολύνοντας έτσι την αλληλεπίδραση και σύνδεση ανάμεσα στα κύτταρα και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, και τέλος τη σταθεροποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Το CD44, μαζί με το CD25, χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της πρώιμης ανάπτυξης T κυττάρων στον θύμο αδένες (**167 - 168**).

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας ήταν:

**1<sup>ο</sup>** Να αξιολογήσουμε ανοσοιστοχημικά, στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης (αρχή, μέσο και τέλος), την αιμοποίηση σε δείγματα ήπατος, σπλήνα και θύμου αδένων ανθρώπινων εμβρύων, η ιστολογική εικόνα των οποίων έδειξε, σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας. Να αξιολογήσουμε με την ίδια μέθοδο την αιμοποίηση αντίστοιχων δειγμάτων και αντίστοιχης χρονικής περιόδου, ανθρώπινα έμβρυα χωρίς αλλοιώσεις (φυσιολογικοί μάρτυρες).

**2<sup>ο</sup>** Να αξιολογήσουμε με την ίδια μέθοδο, τόσο στις περιπτώσεις εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, όσο και στις περιπτώσεις εμβρύων χωρίς φλεγμονώδη αντίδραση, για τυχόν μεταβολές έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, CD44, E-Καντερίνης (E-Cadherin) και E-Σελεκτίνης (E-Selectin). Ακολούθησε στατιστική ανάλυση, συγκριτική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και εξαγωγή συμπερασμάτων για τις επιπτώσεις της οξείας χοριοαμνιονίτιδας στην ανάπτυξη του λεμφοαιμοποιητικού συστήματος.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## Υλικό και μέθοδος

Το υλικό που εξετάστηκε προήλθε από το Εργαστήριο Ιστολογίας - Εμβρυολογίας του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου της Θράκης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες για την ανάλυση των εμβρυικών ιστών και κυττάρων και αφορούσε 120 ανθρώπινα έμβρυα με τους αντίστοιχους εμβρυικούς υμένες (χόριο και άμνιο) που συλλέχθηκαν από τον Ιανουάριο του 2002 έως τον Δεκέμβριο του 2014. Τα στοιχεία της ιστολογικής εξέτασης των οργάνων των ανθρώπινων εμβρύων, εμβρυικών υμένων, πλακούντα, καθώς και σχετικές πληροφορίες για τις υποψήφιες μητέρες, ήταν διαθέσιμα για την έρευνα μας. Αναλυτικότερα, για την έρευνα μας χρησιμοποιήσαμε δείγματα ήπατος, σπλήνα και θύμου αδένα από ενενήντα (90) ανθρώπινα έμβρυα (44 θήλεα και 46 αρρένα) ηλικίας μεταξύ 13<sup>ης</sup> και 24<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης, με βάση την ημερομηνία της τελευταίας εμμήνου ρύσεως της υποψήφιας μητέρας. Όσο αφορά την ηλικία των υποψήφιων μητέρων αυτή εκυμαινέτο μεταξύ 18 και 43 ετών, η δε κατανομή του φύλου των εμβρύων με την ηλικία των υποψήφιων μητέρων είχε ως ακολούθως: ηλικία υποψήφιας μητέρας 18 ετών → 3 έμβρυα (1 ♀ + 2 ♂), 19 → 3 (2 ♀ + 1 ♂), 20 → 5 (2 ♀ + 3 ♂), 22 → 5 (3 ♀ + 2 ♂), 23 → 6 (4 ♀ + 2 ♂), 24 → 6 (3 ♀ + 3 ♂), 25 → 6 (2 ♀ + 4 ♂), 26 → 4 (2 ♀ + 2 ♂), 27 → 5 (3 ♀ + 2 ♂), 28 → 3 (1 ♀ + 2 ♂), 29 → 4 (2 ♀ + 2 ♂), 30 → 8 (3 ♀ + 5 ♂), 32 → 5 (2 ♀ + 3 ♂), 33 → 4 (3 ♀ + 1 ♂), 35 → 3 (2 ♀ + 1 ♂), 36 → 3 (1 ♀ + 2 ♂), 37 → 4 (2 ♀ + 2 ♂), 38 → 3 (1 ♀ + 2 ♂), 39 → 3 (1 ♀ + 2 ♂), 40 → 3 (1 ♀ + 2 ♂), 42 → 3 (1 ♀ + 2 ♂) και τέλος 43 → 3 (1 ♀ + 2 ♂).

Τα έμβρυα προήλθαν από αυτόματες αποβολές και ομαδοποιήθηκαν σε τρεις διακριτές ομάδες: αρχή 2<sup>ου</sup> τριμήνου κύησης, μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου κύησης και τέλος 2<sup>ου</sup> τριμήνου κύησης. Στις παραπάνω περιπτώσεις η μικροσκοπική εξέταση ρουτίνας που πραγματοποιήθηκε στους εμβρυικούς υμένες χόριο και άμνιο έδειξε σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας σύμφωνα με την υποκειμενική εκτίμηση και την μορφολογική ανάλυση της φλεγμονώδους διήθησης των υμένων από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα (**Εικόνες 1 & 2**). Ένα δεύτερο στοιχείο που αξιολογήσαμε στην έρευνά μας ήταν η παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων και ιδιαίτερα πολυμορφοπύρρηνων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και αμνιακού υγρού

στις κυψελίδες των πνευμόνων των εμβρύων, ένα από τα στοιχεία που θεωρείται ενδεικτικό της διασποράς της λοίμωξης από το χοριοάμνιο. Δεν συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας περιπτώσεις εμβρύων με συνοδές εστιακές, ελαφρού ή μέτριου βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

Αναλυτικότερα εξετάσθηκαν και ταυτοποιήθηκαν:

1). Τριάντα έμβρυα (30) από την 13<sup>η</sup> έως την 16<sup>η</sup> εβδομάδα της ανάπτυξης (10X13<sup>η</sup>, 10X15<sup>η</sup> και 10X16<sup>η</sup>),

2). Τριάντα έμβρυα (30) από την 17<sup>η</sup> έως την 20<sup>η</sup> εβδομάδα (10X17<sup>η</sup>, 10X19<sup>η</sup> και 10X20<sup>η</sup>),

3). Τριάντα έμβρυα (30) από την 21<sup>η</sup> έως την 24<sup>η</sup> εβδομάδα (10X21<sup>η</sup>, 10X23<sup>η</sup> και 10X24<sup>η</sup>).

Εξετάσθηκαν επίσης δείγματα ήπατος, σπλήνα και θύμου αδένα τριάντα (30) ανθρώπινων εμβρύων (18 αρρένα και 12 θήλεα), που προήλθαν από διακοπή της κύησης. Τα έμβρυα αυτά ομαδοποιήθηκαν επίσης σε τρεις διακριτές ομάδες: αρχή 2<sup>ου</sup> τριμήνου κύησης, μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου κύησης και τέλος 2<sup>ου</sup> τριμήνου κύησης. Όσο αφορά την ηλικία των υποψήφιων μητέρων αυτή εκυμαίνετο μεταξύ 19 και 41 ετών, η δε κατανομή του φύλου των εμβρύων με την ηλικία των υποψήφιων μητέρων είχε ως ακολούθως: ηλικία υποψήφιας μητέρας 19 ετών → 2 έμβρυα (1♀ + 1♂), 20 → 3 (2♀ 1♂), 23 → 3 (1♀ + 2♂), 25 → 2 (1♀ + 1♂), 29 → 4 (3♀+ 1♂), 30 → 3 (1♀ + 2♂), 32 → 2 (1♀+1♂), 33 → 3 (2♀+ 1♂), 35 ετών → 3 (1♀ + 2♂), 39 → 3 (2♀ + 1♂), 41 → 2 (1♀+1♂). Στις παραπάνω περιπτώσεις εμβρύων δεν παρατήθηκαν αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, συγγενείς ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή περίσφιξη ομφαλίου λώρου και θεωρήθηκαν ως φυσιολογικά. Τα αίτια διακοπής της κύησης, σύμφωνα με το κλινικό ιστορικό το οποίο και συλλέξαμε από τις δυο Μαιευτικές - Γυναικολογικές Κλινικές του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης, οφείλονταν στα παρακάτω αίτια: 1) Ανωμαλίες της μήτρας (ινομύματα, ανεπάρκεια τραχήλου), 15 περιπτώσεις, 2). Ενδοκρινολογικά αίτια (αρρυθμιστος σακχαρώδης διαβήτης και παθήσεις του θυρεοειδούς αδένου). Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου - μέσο σύγκρισης για την έρευνα μας.

Αναλυτικότερα εξετάστηκαν και ταυτοποιήθηκαν:

- 1). Δέκα (10) έμβρυα από την 13<sup>η</sup> έως την 16<sup>η</sup> εβδομάδα της ανάπτυξης (3Χ13<sup>η</sup>, 2Χ15<sup>η</sup> και 5Χ16<sup>η</sup>),
- 2). Δέκα (10) έμβρυα από την 17<sup>η</sup> έως την 20<sup>η</sup> εβδομάδα (5Χ17<sup>η</sup>, 3Χ18<sup>η</sup> και 2Χ20<sup>η</sup>),
- 3). Δέκα (10) έμβρυα από την 21<sup>η</sup> έως την 24<sup>η</sup> εβδομάδα (2Χ21<sup>η</sup>, 4Χ22<sup>η</sup> και 4Χ24<sup>η</sup>).

Τα έμβρυα που προήλθαν από δίδυμη ή πολλαπλή κύηση αποκλείστηκαν από την έρευνα.

Σε όλα τα έμβρυα πραγματοποιήθηκε νεκροψία - νεκροτομή στο Εργαστήριο Ιστολογίας - Εμβρυολογίας του ΓΠΝΑ. Σε κάθε έμβρυο ελήφθησαν οι κατάλληλες τομές από όλα τα όργανα σύμφωνα με τα πρωτόκολλα μακροσκοπικού και μικροσκοπικού χειρισμού και ακολούθησε, για την πραγματοποίηση της μελέτης μας, η λεπτομερής μακροσκοπική εξέταση και η λήψη τομών ηπατικού ιστού, σπλήνα και θύμου αδένα για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση καθώς και εμβρυικών υμένων για ιστολογική εξέταση.

Η βασική τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της απλής ιστοχημείας (χρώσεις Εωσίνης - Αιματοξυλίνης) και της ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας ειδικά εκλεκτικά αντισώματα: **Γλυκοφορίνη C (Glycophorin C)** που εκφράζει τα κύτταρα της ερυθράς σειράς, **Μυελοπεροξειδάση (MPO)** που εκφράζει τα κύτταρα της λευκής σειράς, **CD34** που εκφράζει τα αρχέγονα (βλαστικά) αιμοποιητικά κύτταρα, **CD61** που εκφράζει τα κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, **CD68** που εκφράζει τα μονοκύτταρα (μακροφάγα), **LCA** που εκφράζει γενικά το λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, **CD20** που εκφράζει ειδικά τα Β-λεμφοκύτταρα, **CD3** που εκφράζει ειδικά τα Τ-λεμφοκύτταρα, **CD8** που εκφράζει τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, καθώς και αντισώματα για την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης: **CD44**, **E-Καντερίνη (E-Cadherin)** και **E-Σελεκτίνης (E-Selectin)** που εκφράζουν αντίστοιχα τα αιμοποιητικά/λεμφικά κύτταρα, και ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τα δείγματα εμβρυικού ηπατικού ιστού, σπλήνα, θύμου αδένου και εμβρυικών υμένων χορίου - αμνίου μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% για 24 ώρες. Ακολούθησε η σκλήνωση των τομών και ο μόνιμος εγκλεισμός σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους παραφίνης ελήφθησαν τομές πάχους 4μm σε μικροτόμο LEICARM 2255. Οι τομές τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο και στη συνέχεια σε αντικειμενοφόρες γυάλινες πλάκες και για 30 λεπτά σε κλίβανο στους 75°C. Στη συνέχεια με δίωρη αυτοματοποιημένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε η χρώση εωσίνης - αιματοξυλίνης. Ακολούθησε με το κοινό οπτικό (φωτονικό) μικροσκόπιο η λεπτομερής ιστολογική εξέταση τομών όλων των δειγμάτων με τη κοινή χρώση εωσίνης - αιματοξυλίνης.

**Ανοσοιστοχημεία** Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο ανοσοιστοχημικός έλεγχος έκφρασης αντιγόνων τα οποία ήταν παρόντα στα αιμοποιητικά και τα λεμφικά κύτταρα στο εμβρυϊκό ηπατικό παρέγχυμα, σπλήνα και θύμο αδένου, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα:

**Γλυκοφορίνη C (Glycophorin C) (DAKO),**

**Μυελοπεροξειδάση (MPO) (DAKO),**

**CD34 (DAKO),**

**CD61 (DAKO),**

**CD68 (DAKO),**

**LCA (DAKO),**

**CD20 (DAKO),**

**CD3 (DAKO),**

**CD8 (DAKO),**

καθώς και αντισώματα για την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης:

**CD44** (DAKO),

**E-Καντερίνη (E-Cadherin)** (SANTA CRUZ),

**E-Σελεκτίνης (E-Selectin)** (SANTA CRUZ).

Από κάθε μπλόκ παραφίνης κόπηκαν σειριακές τομές πάχους 5μm, οι οποίες επιστρώθηκαν σε πλακίδια καλυμμένα με poly-L-lysine.

Εφαρμόστηκε η ανοσοιστοχημική τεχνική στρεπταβιδίνης - βιοτίνης-υπεροξειδάσης σε ιστικές τομές παραφίνης πάχους 4 μm. Μετά τη σταδιακή αποπαραφίνωση και ενυδάτωση σε κατιόντα διαλύματα αιθανόλης (αιθανόλη 100%, αιθανόλη 96%, αιθανόλη 50%), οι τομές επωάσθηκαν στο σκοτάδι για 30 min σε διάλυμα (υπεροξειδάσης) (μεθανόλης/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%), ώστε να αδρανοποιηθεί η ενδογενής υπεροξειδάση, και εκπλύνθηκαν με νερό βρύσης και στη συνέχεια με απεσταγμένο νερό. Για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων, οι τομές τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (800W) σε διάλυμα κιτρικού οξέος 0,001M για τρία τετράλεπτα. Στη συνέχεια, οι τομές εκπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό, μετά σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0.25M (PBS, pH=7.4) και επωάσθηκαν για 20 min με διάλυμα 20% φυσιολογικού ορού κουνελιού (NRS, DAKO, Denmark) ή σε διάλυμα 20% φυσιολογικό ορό χοίρου (NSS, DAKO, Denmark) σε PBS. Ακολούθησε επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αραιώσεις των αντισωμάτων έγιναν σε διάλυμα PBS 0,25M με 0,5% NRS. Στη συνέχεια οι τομές εκπλύθηκαν σε PBS και ακολούθησε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για μισή ώρα περίπου σε δωμάτιο με κανονική θερμοκρασία. Ακολούθησε η έκπλυση με PBS και στη συνέχεια οι τομές επωάσθηκαν για μισή ώρα με το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης - βιοτίνης - υπεροξειδάσης (DAKO, Denmark) (αραίωση 1:100). Μετά από νέα έκπλυση σε PBS, οι τομές εμβαπτίσθηκαν αρχικά για 10 δευτερόλεπτα σε διάλυμα 3,3 τετραυδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης, 2,5gr/100ml σε PBS, που περιείχε 50μl (H<sub>2</sub>O). Ακολούθησε μικροσκοπική εκτίμηση της ανοσοχρώσης και επιπλέον επωάσεις των 10 δευτερολέπτων, όταν κρίθηκαν αναγκαίες. Τελικά, μετά την

έκπλυση με νερό βρύσης, οι τομές εμβαπτίσθηκαν σε αιματοξυλίνη Mayer's για 15 δευτερόλεπτα, αφυδατώθηκαν σε σειρά ανιόντων διαλυμάτων αιθανόλης, εμβαπτίσθηκαν σε ξυλόλη και επιστρώθηκαν με κόλλα DPX. Ακολούθησε η επικάλυψη των ανοσοιστοχημικών τομών με καλυπτρίδα. Θετικά για την έκφραση των κυττάρων της αιμοποίησης και λεμφοκυττάρων θεωρήθηκαν τα δείγματα που η χρώση εμφανιζόταν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Θετικά για την έκφραση των πρωτεϊνών CD44, σελεκτίνης και ιντεγκρίνης θεωρήθηκαν τα δείγματα που η χρώση εμφανιζόταν με κυτταροπλασματική ή μεμβρανική εντόπιση. Για κάθε ανοσοχρώση χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι εσωτερικοί και εξωτερικοί θετικοί μάρτυρες.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση για κάθε δείκτη αξιολογήθηκε από δύο έμπειρους ειδικούς παθολογοανατόμου, χωρίς να έχουν γνώση των κλινικοργαστηριακών πληροφοριών, σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα. Οποιαδήποτε διαφωνία επιλύθηκε με συμπαρατήρηση στο πολυκέφαλο μικροσκόπιο και τελική συναίνεση. Κάθε χρωματισμένο κύτταρο βαθμολογήθηκε ως θετικό, ανεξάρτητα από την ένταση βαφής του. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση ενός ειδικού προσοφθάλμιου φακού X10 που έφερε τετράγωνο πλέγμα κατάλληλο για τη μέτρηση κυττάρων. Καταμετρήθηκε ο αριθμός των θετικών κυττάρων για κάθε ανοσοιστοχημική χρώση σε οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης (ΟΠΜΜ) σε περιοχές με εμφανή θετικότητα (hot spots) χωρίς παρουσία νεκρώσεων ή αλλοιώσεων τέχνης (artefacts). Το σύνολο των καταμετρημένων θετικών κυττάρων προστέθηκε και διαιρέθηκε δια του δέκα, ώστε να παραχθεί ο μέσος όρος θετικών κυττάρων για την κάθε αντίσωμα.

Για όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο Olympus-BX51 με προσοφθάλμιο φακό X10 και αντικειμενικό φακό X40. Η φωτογράφιση των περιστατικών έγινε με τη χρήση φωτογραφικής μηχανής Olympus-DP70 συνδεδεμένης στο εν λόγω μικροσκόπιο.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**





Τα αποτελέσματα του ανοσοιστοχημικού ελέγχου των δειγμάτων ήπατος, σπλήνα και θύμου από 90 ανθρώπινα έμβρυα με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας και 30 δειγμάτων ήπατος, σπλήνα και θύμου από 30 ανθρώπινα έμβρυα χωρίς αντίστοιχες αλλοιώσεις (μάρτυρες), παρατίθενται παρακάτω σύμφωνα με την ηλικία της κύησης. Η ηλικία κύησης υπολογίστηκε με βάση την ημερομηνία της τελευταίας εμμήνου ρύσεως της μητέρας. Ως αρχή του 2<sup>ου</sup> τριμήνου της εγκυμοσύνης θεωρήθηκε το διάστημα μεταξύ 13<sup>ης</sup> και 16<sup>ης</sup> εβδομάδας, ως μέσο το διάστημα 17<sup>ης</sup> και 20<sup>ης</sup> εβδομάδας και ως τέλος το διάστημα μεταξύ 21<sup>ης</sup> και 24<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης.

Για τη μελέτη των κυτταρικών σειρών της αιμοποίησης στο ηπατικό παρέγχυμα, εστίασαμε για μεν τα κύτταρα της λευκής σειράς στο χαλαρό συνδετικό υπόστρωμα στα πυλαία διαστήματα του οργάνου, για δε την μελέτη των κυττάρων της ερυθράς σειράς, μακροφάγων, μεγακαρυοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στα κολποειδή τριχοειδή που διατρέχουν τις ηπατικές δοκίδες.

Για τη μελέτη των κυτταρικών σειρών της αιμοποίησης στο σπλήνα, εστίασαμε για μεν τα κύτταρα της ερυθράς σειράς στους κόλπους του ερυθρού πολφού του οργάνου, για δε την μελέτη των λεμφοκυττάρων στο συνδετικό υπόστρωμα γύρω από τα αγγεία για τον πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων και τον ενδιάμεσο ιστό του σπληνικού παρεγχύματος για τα B-λεμφοκύτταρα.

Για τη μελέτη των προϊόντων των κυτταρικών σειρών της αιμοποίησης στο θύμο αδένα, εστίασαμε για μεν τα κύτταρα της αιμοποίησης στις λωρίδες του χαλαρού υποστρώματος του συνδετικού ιστού που εντοπίζεται μεταξύ των λοβίων και κάψας που περιβάλλει το όργανο, για δε την μελέτη των λεμφοκυττάρων στο φλοιό και στο μυελό των λοβίων του αδένα.

**Ποσοτική αξιολόγηση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των κυττάρων της αιμοποίησης, λεμφοκυττάρων και μορίων προσκόλλησης με τη μέθοδο καταμέτρησης θετικά κεχρωσμένων κυττάρων στο ήπαρ στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της εμβρυικής ανάπτυξης (αρχή 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα, μέσο 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα, τέλος 21<sup>η</sup> - 24<sup>η</sup> εβδομάδα)**

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων σε δείγματα ηπατικού ιστού φυσιολογικών εμβρύων (ομάδα ελέγχου) και εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας (ΧΑ), αναγράφονται στον **Πίνακα 1**.

Αναλυτικότερα, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των κυτταρικών σειρών της αιμοποίησης και στις τρεις περιόδους μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των εμβρύων με αλλοιώσεις ΧΑ, ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **Glycophorin C** που εκφράζει τα κύτταρα της ερυθράς σειράς, βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου στην 1<sup>η</sup> περίοδο (13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα) (**Εικόνα 16A & 16B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται. Στη 2<sup>η</sup> περίοδο (17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα) ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα Glycophorin C βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας εμβρύων με ΧΑ. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται. Στη 3<sup>η</sup> περίοδο (21<sup>η</sup>- 24<sup>η</sup> εβδομάδα) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ επικαλύπτονται (**Γράφημα 1**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **Μυελουπεροξειδάση (MPO)** που εκφράζει τα κύτταρα της κοκκιοκυτταρικής σειράς βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου (**Εικόνα 17A & 17B**). Η

στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 2**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD34** που εκφράζει τα αρχέγονα (πρόδρομα) βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου (**Εικόνα 18A & 18B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 3**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD61** που εκφράζει τα μεγακαρυοκύτταρα, βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου στη 1<sup>η</sup> περίοδο (13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα) (**Εικόνα 19A & 19B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται. Στη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> περίοδο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ επικαλύπτονται (**Γράφημα 4**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD68** που εκφράζει τα μακροφάγα, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 20A & 20B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 5**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD8** που εκφράζει τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, βρέθηκε υψηλότερος και στις δυο περιόδους (δεύτερη και τρίτη) στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 21A & 21B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 6**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD44** που εκφράζει αιμοποιητικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 22A & 22B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 7**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **E-Καντερίνη (E-Cadherin)** που εκφράζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 23A & 23B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 8**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **E-Σελεκτίνη (E-Selectin)** που εκφράζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ στην 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> περίοδο (13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> και 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα αντίστοιχα) (**Εικόνα 24A & 24B**). Στη 3<sup>η</sup> περίοδο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ επικαλύπτονται (**Γράφημα 9**).

**Ποσοτική αξιολόγηση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των κυττάρων της αιμοποίησης, λεμφοκυττάρων και μορίων προσκόλλησης με τη μέθοδο καταμέτρησης θετικά κεχρωσμένων κυττάρων στο σπλήνα στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της εμβρυικής ανάπτυξης (αρχή 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα, μέσο 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα, τέλος 21<sup>η</sup> - 24<sup>η</sup> εβδομάδα)**

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων σε δείγματα ιστού από το σπλήνα φυσιολογικών εμβρύων (ομάδα ελέγχου) και εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας (ΧΑ), αναγράφονται στον **Πίνακα 2**.

Αναλυτικότερα, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των κυττάρων της αιμοποίησης την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> περίοδο μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των εμβρύων με αλλοιώσεις ΧΑ, ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **Glycophorin C** που εκφράζει τα κύτταρα της ερυθράς σειράς, βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου και στις δυο περιόδους (**Εικόνα 25A & 25B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 10**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **Μυελουπεροξειδάση (MPO)** που εκφράζει τα κύτταρα της κοκκιοκυτταρικής σειράς βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου και στις δυο περιόδους (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup>) (**Εικόνα 26A & 26B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 11**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD34** που εκφράζει τα αρχέγονα (πρόδρομα) βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα, βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου και στις δυο περιόδους (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup>) (**Εικόνα 27A & 27B**).

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 12**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD61** που εκφράζει τα μεγακαρυοκύτταρα, στην 1<sup>η</sup> περίοδο βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 28A & 28B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται. Στη 2<sup>η</sup> περίοδο δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ επικαλύπτονται (**Γράφημα 13**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD68** που εκφράζει τα μακροφάγα, στη 1<sup>η</sup> περίοδο δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ επικαλύπτονται. Στη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> περίοδο ο αριθμός των θετικών κυττάρων βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 29A & 29B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 14**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD3** που εκφράζει το σύνολο του Τ-λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, βρέθηκε υψηλότερος και στις δυο περιόδους (δεύτερη και τρίτη) στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 30 A & 30 B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 17**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD20** που εκφράζει το σύνολο του Β-λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, βρέθηκε υψηλότερος και στις δυο περιόδους (δεύτερη και τρίτη) στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 31A & 31B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 16**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD8** που εκφράζει τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, βρέθηκε υψηλότερος και στις δυο περιόδους (δεύτερη και τρίτη) στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 32A & 32B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται.

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **LCA** που εκφράζει το σύνολο του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, βρέθηκε υψηλότερος και στις δυο περιόδους (δεύτερη και τρίτη) στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 15**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD44** που εκφράζει αιμοποιητικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 33A & 33B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 18**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **E-Καντερίνη (E-Cadherin)** που εκφράζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, βρέθηκε



υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 34A & 34B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 19**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **E-Σελεκτίνη (E-Selectin)** που εκφράζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, έδειξε στατιστικά μη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στην πρώτη και δεύτερη περίοδο (**Εικόνα 35A & 35B**). Στη τρίτη περίοδο, ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο παραπάνω αντίσωμα βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 20**).



**Ποσοτική αξιολόγηση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των κυττάρων της αιμοποίησης, λεμφοκυττάρων και μορίων προσκόλλησης με τη μέθοδο καταμέτρησης θετικά κεχρωσμένων κυττάρων στο θύμο αδένα στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της εμβρυικής ανάπτυξης (αρχή 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα, μέσο 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα, τέλος 21<sup>η</sup> - 24<sup>η</sup> εβδομάδα)**

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της καταμέτρησης των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων σε δείγματα ηπατικού ιστού φυσιολογικών εμβρύων (ομάδα ελέγχου) και εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας (ΧΑ), αναγράφονται στον **Πίνακα 3**.

Αναλυτικότερα, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των κυττάρων της αιμοποίησης μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των εμβρύων με αλλοιώσεις ΧΑ, ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **Glycophorin C** που εκφράζει τα κύτταρα της ερυθράς σειράς, βρέθηκε στην πρώτη περίοδο, υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου (**Εικόνα 36A & 36B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται. Στη δεύτερη περίοδο, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων (**Γράφημα 21**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **Μυελουπεροξειδάση (MPO)** που εκφράζει τα κύτταρα της κοκκιοκυτταρικής σειράς, βρέθηκε στην πρώτη και δεύτερη περίοδο υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται, (**Γράφημα 22**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD34** που εκφράζει τα αρχέγονα (πρόδρομα) βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα, βρέθηκε στην πρώτη περίοδο υψηλότερος στην ομάδα με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών

κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Εικόνα 37A & 37B**). Στη δεύτερη περίοδο, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων (**Γράφημα 23**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD68** που εκφράζει τα μακροφάγα, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 38A & 38B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 24**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD61** που εκφράζει τα μεγακαρυοκύτταρα, βρέθηκε η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων και στις δυο περιόδους (πρώτη και δεύτερη) στατιστικά μη σημαντική, επειδή τα 95ΔΕ διαστήματα εμπιστοσύνης μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ επικαλύπτονται.

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD3** που εκφράζει το σύνολο του Τ-λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 39A & 39B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 25**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD8** που εκφράζει το σύνολο των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων, βρέθηκε υψηλότερος και στις τρεις περιόδους στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 40A & 40B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά

σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 26**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD44** που εκφράζει τα αιμοποιητικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα, βρέθηκε και στις τρεις περιόδους υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 41A & 41B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 27**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **E-Καντερίνη (E-Cadherin)** που εκφράζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, βρέθηκε στην πρώτη και δεύτερη περίοδο, υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Εικόνα 42A & 42B**). Στη τρίτη περίοδο, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να μη είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με ΧΑ επικαλύπτονται (**Γράφημα 28**).

Ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **E-Σελεκτίνη (E-Selectin)** που εκφράζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, βρέθηκε και στις τρεις περιόδους υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων της ομάδας με ΧΑ (**Εικόνα 43A & 43B**). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική, επειδή τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95ΔΕ) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με ΧΑ δεν επικαλύπτονται (**Γράφημα 29**).



## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



Οι διάφορες λοιμώξεις που εμφανίζονται στη διάρκεια της κύησης και οφείλονται σε ποικίλα λοιμογόνα αίτια, προκαλούν συχνά επικίνδυνες επιπλοκές για την υγεία και την ζωή της μητέρας και του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις στους εμβρυικούς υμένες χόριο και άμνιο - αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας - στη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου και ιδιαίτερα στο τέλος του 2<sup>ου</sup> τριμήνου, αποτελούν έναν από τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες πρόωρης ρήξης υμένων, πρόωρου τοκετού (preterm labour) και ενδομήτριου θανάτου.

Η λοίμωξη ξεκινάει συνήθως από τη μητέρα, η συχνότητα όμως της νοσηρότητας στην έγκυο και η επέκταση της λοίμωξης στο έμβρυο δεν έχουν ακόμη διευκρινισθεί. Παραμένουν άγνωστοι διάφοροι μηχανισμοί (μητρικοί, πλακουντικοί, εμβρυικοί) που σε συνδυασμό με τη λοιμογόνο δράση του αιτίου της λοίμωξης καθορίζουν το βαθμό, την έκταση και την εξέλιξη της φλεγμονής στους εμβρυικούς υμένες και κατ' επέκταση στα διάφορα όργανα του εμβρύου.

Έχει αποδειχθεί ότι οι αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας επάγουν δευτεροπαθώς διαταραχές στη ανάπτυξη οι οποίες συνδυάζονται με την εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών και συγγενών διαμαρτιών σε διάφορα όργανα του εμβρύου μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και η εξωμυελική αιμοποίηση (ήπαρ, σπλήνας, θύμος αδένας) και λεμφοποίηση στα πρωτογενή (μυελός των οστών και θύμος αδένας) και περιφερικά λεμφικά όργανα (σπλήνας, λεμφαδένες και λεμφικός ιστός των βλεννογόνων MALT).

Κατά την εμβρυική ζωή, τα έμμορφα στοιχεία του αίματος σχηματίζονται σε διάφορα όργανα, κυρίως στο ήπαρ, σπλήνα, θύμο αδένα και λιγότερο σε άλλες θέσεις όπως λεμφαδένες, νεφροί, διεγκέφαλο, πριν τη διαφοροποίηση του ερυθρού μυελού των οστών, διεργασία η οποία ξεκινά στο τέλος του 2<sup>ου</sup> τριμήνου της ανάπτυξης και παραμένει ως έχει εφ' όρου ζωής.

Οι ερευνητικές μελέτες και οι αποκτηθείσες εξ' αυτών γνώσεις καθιστούν πρόδηλο ότι το αγγειακό ενδοθήλιο (μονήρης στοιβάδα αποπλατυσμένων κυττάρων που επαλείφει το έσω τοίχωμα των αγγείων) συνιστά ένα φραγμό, ο οποίος ρυθμίζει την κίνηση των μορίων της αιματικής

κυκλοφορίας προς τους ιστούς. Για να εισέλθουν τα μόρια της αιματικής κυκλοφορίας και ιδιαίτερα τα λευκοκύτταρα (πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα και λεμφοκύτταρα), σε ένα φυσιολογικό ιστό ή σε ένα ιστό που φλεγμαίνει θα πρέπει να προσκολληθούν και να περάσουν ανάμεσα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων, με μια διαδικασία που ονομάζεται εξαγγείωση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων εκφράζουν στην επιφάνεια τους τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης E-Καντερίνη (E-Cadherin) και E-Σελεκτίνη (E-Selectin), πρωτεΐνες που έχουν σημαίνοντα ρόλο στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον εξωαγγειακό ιστό καθώς και στις διεργασίες της φλεγμονώδους επεξεργασίας.

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας ήταν:

1<sup>ο</sup> Να αξιολογήσουμε με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας, στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης (αρχή, μέσο και τέλος), την αιμοποίηση σε δείγματα ήπατος, σπλήνα και θύμου αδένων ανθρώπινων εμβρύων, η ιστολογική εικόνα των οποίων έδειξε στους εμβρυικούς υμένες, στην εξέταση ρουτίνας που πραγματοποιήθηκε, σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας. Να αξιολογήσουμε με την ίδια μέθοδο την αιμοποίηση αντίστοιχων δειγμάτων και αντίστοιχης χρονικής περιόδου, ανθρώπινα έμβρυα η ιστολογική εικόνα των οποίων δεν έδειξε φλεγμονώδη επεξεργασία στους εμβρυικούς υμένες.

2<sup>ο</sup> Να αξιολογήσουμε με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας, τόσο στις περιπτώσεις εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, όσο και στις περιπτώσεις εμβρύων χωρίς φλεγμονώδη αντίδραση στους εμβρυικούς υμένες, τυχόν μεταβολές έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, CD44, E-Καντερίνης (E-Cadherin) και E-Σελεκτίνης (E-Selectin). Πρωτεΐνες που έχουν κυρίαρχη θέση στην εμβρυογένεση, ιδιαίτερα στην εξαγγείωση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων στην εμβρυική εξωμυελική αιμοποίηση και κατ' επέκταση στη λεμφοποίηση, στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα έμβρυα έδειξαν ότι η πλειονότητα των εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας αναπτύσσουν μία συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση γνωστή ως Σύνδρομο Εμβρυϊκής Φλεγμονώδους Αντίδρασης



(Fetal Inflammatory Response Syndrome - FIRS) (**169, 170**), που ουσιαστικά αποτελεί την εμβρυική ανοσοαπόκριση στη λοίμωξη που προκαλείται από την απελευθέρωση των προιόντων της φλεγμονής (κυτοκινών και χημειοκινών). Αντίδραση, η οποία αντανακλά σε διάφορα όργανα του αναπτυσσόμενου εμβρύου προκαλώντας συχνά διαταραχές της φυσιολογικής λειτουργίας ή της ανάπτυξης των. Χαρακτηριστικά, στον εργαστηριακό - αιματολογικό έλεγχο, στο πλάσμα εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας και εικόνα με Σύνδρομο Εμβρυϊκής Φλεγμονώδους Αντίδρασης, παρατηρείται αύξηση της τιμής της Ιντερλευκίνης - 6 ( $>11$  pg/MI) (**169**).

Συγκεκριμένα, μελέτες δειγμάτων καρδιακού ιστού εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας έδειξαν, ότι η απελευθέρωση των προιόντων της φλεγμονώδους επεξεργασίας επηρεάζει τόσο τη καρδιακή λειτουργία του εμβρύου (αυξημένη διάταση της αριστερής κοιλίας – αντιρροπιστικός μηχανισμός), όσο και στην ανάπτυξη του καρδιακού τοιχώματος (μείωση του μυικών κυττάρων του μυοκαρδίου) (**171 - 176**).

Μελέτες δειγμάτων νευρικού ιστού (εγκέφαλο) εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας έδειξαν, σημαντική μείωση των κυττάρων του νευροεπιθηλίου (νευροβλάστες), καθυστέρηση της ωρίμανσης των νευρικών κυττάρων (νευρώνων) καθώς και των κυττάρων της νευρογλοίας (γλιοβλάστες), επηρεάζοντας τελικά, εφ' όσον το έμβρυο επιβιώσει, την φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου προκαλώντας νευρολογικές διαταραχές εφ' όρου ζωής. Διαταραχές που έχουν συνδυασθεί με εγκεφαλική παράλυση, αυτισμό, σχιζοφρένεια και πολλαπλή σκλήρυνση (**177 - 189**). Είναι αρκετά πιθανό, ο μηχανισμός των αλλοιώσεων του νευρικού ιστού, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης που πραγματοποιήθηκαν, να οφείλεται στο φαινόμενο της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης προ-αποπτωτικών παραγόντων. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύει το γεγονός ότι ο επιπολασμός της έκφρασης αποπτωτικών δεικτών σε πλακούντες που συνδυάζονται με αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας είναι πολύ υψηλότερος (94,4%) σε σχέση με πλακούντες χωρίς φλεγμονώδη αντίδραση στους εμβρυικούς υμένες χόριο και άμνιο (**190-191**).

Μελέτες δειγμάτων από το αναπνευστικό σύστημα εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας έδειξαν ότι, η απελευθέρωση των προϊόντων της φλεγμονώδους επεξεργασίας επηρεάζει την φυσιολογική ανάπτυξη των πνευμόνων προκαλώντας καθυστέρηση της ωρίμανσης του πνευμονικού παρεγχύματος (κυψελίδες), αυξημένη συχνότητα εμφάνισης Συνδρόμου Αναπνευστικής Δυσχέρειας των νεογνών (Respiratory Distress Syndrome - RDS), καθώς και εμφάνιση Βρογχοπνευμονικής Δυσπλασίας (Bronchopulmonary Syndrome - BPD) **(192-203)**.

Μελέτες δειγμάτων από τους νεφρούς εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας έδειξαν, ότι η απελευθέρωση των προϊόντων της φλεγμονώδους επεξεργασίας προκαλεί ολιγάμνιο (μείωση της ποσότητας του αμνιακού υγρού στην αμνιακή κοιλότητα) που οδηγεί τελικά στην έκπτωση της λειτουργίας των νεφρών **(204)**. Ο Galinsky R και οι συνεργάτες του **(205)** έδειξαν ότι, πρόωρα εμβρυϊκά πρόβια τα οποία εκτέθηκαν σε ενδομήτρια φλεγμονή, παρουσίασαν μία μείωση περίπου 20% του αριθμού των νεφρών τους. Αυτή είναι ουσιαστικά και η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά στην οποία η χοριοαμνιονίτιδα συνδυάζεται, εκτός των άλλων επιπλοκών που αναφέρθηκαν παραπάνω, με μείωση της ανάπτυξης ιστού σε όργανα.

Μελέτες δειγμάτων από το γαστρεντερικό σωλήνα εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας έδειξαν, ότι η απελευθέρωση των προϊόντων της φλεγμονώδους επεξεργασίας προκαλεί αλλοιώσεις νεκρωτικής εντεροκολίτιδας (πολυπαραγοντική νόσος, συχνά θανατηφόρα, που προκαλεί οξεία διατοιχωματική νεκρωτική ισχαιμία και μπορεί να προσβάλλει τόσο το λεπτό όσο και το παχύ έντερο στα πρόωρα νεογνά, αλλά και στα τελειόμηνα **(206-207)**).

Τέλος, μελέτες στην ανάπτυξη των οφθαλμών εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας έδειξαν, ότι η απελευθέρωση των προϊόντων της φλεγμονώδους επεξεργασίας προκαλεί αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας (Retinopathy of Prematurity - ROP). Νόσος που οφείλεται σε μεταβολές του μικροπεριβάλλοντος οξυγόνωσης του αναπτυσσόμενου οφθαλμού προκαλώντας την ανάπτυξη παθολογικών αιμοφόρων αγγείων στον αμφιβληστροειδή χιτώνα **(208-214)**.

Αναλύοντας και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των προϊόντων της αιμοποίησης μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας εμβρύων με αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας (ΧΑ), ο αριθμός των θετικών κυττάρων για το αντίσωμα Glycophorin C που εκφράζει τα κύτταρα της ερυθράς σειράς, βρέθηκε υψηλότερος στην ομάδα εμβρύων με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων των εμβρύων της ομάδας ελέγχου και στα τρία δείγματα ιστού που εξετάσθηκαν (ήπαρ, σπλήνας, θύμος αδένας). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιόδους (αρχή, μέσο και τέλος) του 2<sup>ου</sup> τριμήνου. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τα αντίσωμα Μυελοπεροξειδάση (MPO) που εκφράζει τα κύτταρα της λευκής σειράς, CD34 που εκφράζει τα αρχέγονα (βλαστικά) αιμοποιητικά κύτταρα, και τέλος CD61 που εκφράζει τα κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία διαταραχές της εξωμυελικής αιμοποίησης, που ουσιαστικά αντανakλούν τη φυσιολογική αντίδραση του εμβρύου στη λοίμωξη, έχουν αναφερθεί από αρκετούς ερευνητές. Ο Gantert και οι συνεργάτες του (139) χαρακτήρισαν την χοριοαμνιονίτιδα, λόγω των σοβαρών επιπλοκών που προκαλεί, ως πολυοργανική νόσο του εμβρύου. Σε εξέταση δειγμάτων από ανθρώπινα έμβρυα, οι Stallmach και Karolyi (108) παρατήρησαν διαταραχές της εξωεμβρυϊκής αιμοποίησης σε δείγματα ήπατος και σπλήνα στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης, αναλύοντας και συγκρίνοντας αποτελέσματα δειγμάτων από όργανα αιμοποίησης εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας και έμβρυα χωρίς φλεγμονώδη αντίδραση στους εμβρυϊκούς υμένες. Οι παραπάνω ερευνητές εισήγαγαν επίσης ότι η διάγνωση και η βαρύτητα της λοίμωξης των εμβρυϊκών υμένων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με τη λήψη ιστού δια βελόνης από το ήπαρ του εμβρύου. Ομοίως αργότερα, ο Pfisterer και συνεργάτες (109), παρατήρησαν διαταραχές στην εξωεμβρυϊκή αιμοποίηση εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, διαταραχές τις οποίες και συνδύασαν με την μη φυσιολογική ανάπτυξη - ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος και ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου. Ο Chaiworarongsa και συνεργάτες (215), παρατήρησαν μια ουδετεροφιλία, σε αιματολογικό έλεγχο ανθρώπινων

εμβρύων, στο σύνολο περίπου των δειγμάτων που εξέτασαν, την οποία και κατωνόμασαν εμβρυική ουδετεροφιλία (fetal neutrophilia). Οι παραπάνω ερευνητές απέδωσαν την αύξηση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων στο αίμα των εμβρύων, στην αυξημένη τιμή του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF) και συνδύασαν τα ευρήματα με τα κλινικά και ιστολογικά ευρήματα της φλεγμονής των εμβρυικών υμένων. Ο Martinez-Portilla και συνεργάτες (216) παρατήρησαν σε αιματολογική εξέταση εμβρύων με κλινικά και ιστολογικά ευρήματα χοριοαμνιονίτιδας, μια λευχαιμοειδή αντίδραση την οποία και συνδύασαν με την αύξηση της Ιντερλευκίνης-6 (Interleukin-6, IL-6) στον ορό του αίματος του εμβρύου. Τέλος, ο Nakamura και συνεργάτες (217) παρατήρησαν, σε αιματολογική εξέταση εμβρύων με κλινικά στοιχεία χοριοαμνιονίτιδας, μια λευχαιμοειδή αντίδραση του αίματος η οποία συνδυάστηκε με αύξηση του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF) και της Ιντερλευκίνης-6 (Interleukin-6, IL-6). Μελέτες που προηγήθηκαν για τα μακροφάγα, έχουν αναδείξει το σημαντικό ρόλο που έχουν στη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, όπως στη ρύθμιση των δραστηριοτήτων των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, στη αγγειογένεση και στην ιστική μορφογένεση (218). Επίσης, έχει αναφερθεί η ενεργός συμμετοχή των μακροφάγων στις φλεγμονώδεις επεξεργασίες διαφόρου βαρύτητας των εμβρυικών υμένων και του πλακούντα (218 - 222). Στη μελέτη μας, ο αριθμός των θετικών κυττάρων στο αντίσωμα **CD68** που εκφράζει τα μακροφάγα στα όργανα που εξετάστηκαν, βρέθηκε χαμηλότερος στην ομάδα εμβρύων με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων των εμβρύων της ομάδας ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιόδους (αρχή, μέσο και τέλος) του 2<sup>ου</sup> τριμήνου. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν απόλυτα με τα ευρήματα των Levy και Wilson και συνεργατών (223, 224), οι οποίοι υποστήριξαν ότι στις σοβαρού βαθμού φλεγμονώδεις αντιδράσεις των εμβρυικών υμένων, παρατηρείται περιορισμένη αντίδραση των μακροφάγων. Ανάλογα αποτελέσματα έδειξε και η έρευνα του Vinnars και συνεργατών (225), οι οποίοι σε μελέτη δειγμάτων πλακούντα με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, παρατήρησαν μείωση των μακροφάγων

(Hofbauer cells), σε σύγκριση με ιστολογική εξέταση δειγμάτων πλακούντα χωρίς φλεγμονώδεις διηθήσεις.

Είναι γνωστό, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και μελέτες που προηγήθηκαν, ότι στον υπερηχογραφικό έλεγχο του εμβρύου, μείωση του μεγέθους του θύμου αδένος έχει συνδυασθεί με το Σύνδρομο Φλεγμονώδους Αντίδρασης του Εμβρύου (Fetal Inflammatory Response Syndrome, FIRS) (226-230). Στη μελέτη μας δεν είχαμε κλινικές πληροφορίες υπερηχογραφικού ελέγχου του μεγέθους του θύμου αδένος, όμως, η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δυο ομάδων έδειξε μείωση γενικά της έκφρασης των λεμφοκυττάρων στην ομάδα εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας. Μείωση η οποία εκφράστηκε και στις τρεις περιόδους (αρχή, μέσο και τέλος) του 2<sup>ου</sup> τριμήνου που εξετάστηκαν, τα δε αποτελέσματά μας συμφωνούν απόλυτα με μελέτες που προηγήθηκαν και υποστηρίζουν τις επιπτώσεις της ενδομήτριας φλεγμονής στη διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένος των εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, στη σύνθεση των κυτταροτοξικών CD8 T-λεμφοκυττάρων καθώς και στην ανάπτυξη και ενεργοποίηση των βοηθητικών CD4 T-λεμφοκυττάρων (231, 232).

Μείωση της έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης παρατηρήθηκαν και στα τρία όργανα εξωεμβρυϊκής αιμοποίησης που εξετάσαμε. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης CD44, E-Cadherin και E-Selectin έδειξε για μεν το αντίσωμα CD44 που εκράζει λεμφοκύτταρα και αιμοποιητικά κύτταρα, ο αριθμός των θετικών κυττάρων βρέθηκε μειωμένος στην ομάδα εμβρύων με ΧΑ από τον αντίστοιχο αριθμό θετικών κυττάρων των εμβρύων της ομάδας ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική και στις τρεις περιόδους (αρχή, μέσο και τέλος) του 2<sup>ου</sup> τριμήνου. Όσο αφορά το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης CD44 είναι γεγονός ότι, αυτή η πρωτεΐνη που εκφράζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα, αποτελεί ένα σημαντικό υποδοχέα που μεσολαβεί στην απόσπαση των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων από τα αγγεία και την είσοδό τους στο λεμφικό ιστό. Επίσης, μελέτες σε καλλιέργειες έδειξαν ότι, όταν τα λευκοκύτταρα διεγερθούν,

αποβάλλουν τους υποδοχείς του μορίου κυτταρικής προσκόλλησης CD44 (144). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τα αντίσωματα E-καντερίνη και E-σελεκτίνη που εκφράζουν τα ενδοθηλιακά κύττατα των αγγείων. Οι E-καντερίνες αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων. Διεργασία η οποία επιτυγχάνεται με την παρουσία ιόντων ασβεστίου. In vivo μελέτες σε επίμυες έδειξαν ότι η E-καντερίνη εκφράζεται πολύ νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη, ενώ έμβρυα που στερούνται του αντίστοιχου γονιδίου δεν αναπτύσσονται (144). Φαίνεται ότι, τοξικοί παράγοντες που απελευθερώνονται στη διεργασία της φλεγμονής, προκαλούν διαταραχή της προσκολλητικής λειτουργίας της E-καντερίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, προφανώς λόγω απομάκρυνσης του εξωκυτταρικού ασβεστίου, που σημαίνει απώλεια της σύνδεσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, διεύρυνση των μεσοενδοθηλιακών διακυτταρικών διαστημάτων, αυξημένη διαπερατότητα και τελικά έξοδος λευκοκυττάρων στον εξωαγγειακό μεσοκυττάριο ιστό. Παρενθετικά, πρόσφατες εργαστηριακές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε νεοπλασματικούς ιστούς έδειξε ότι, απώλεια ή μειωμένη έκφραση της E-καντερίνης (προφανώς λόγω απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου) στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του όγκου, συνδυάστηκε με χειρότερη πρόγνωση και αυξημένο ποσοστό μεταστάσεων. Απώλεια ή μειωμένη ανοσοιστοχημική έκφραση της E-καντερίνης έχει παρατηρηθεί σε κακοήγη νεοπλασμάτα χαμηλής διαφοροποίησης, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη αδένα, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος, του οισοφάγου, του στομάχου, της κεφαλής και του αυχένα, του λάρυγγα καθώς και του τραχήλου της μήτρας (144). Μεταβολές στην έκφραση της E-καντερίνης έχουν παρατηρηθεί επίσης σε αρκετές προκαρκινωμάτωδεις - διηθητικές καταστάσεις, όπως α) σε σωληνώδη, λαχνωτά και σωληνο-λαχνωτά αδενώματα του παχέος εντέρου, β) σε οισοφάγο Barrett που συνδυάζεται με ακαθόριστη δυσπλασία, χαμηλού ή υψηλού βαθμού δυσπλαστικές αλλοιώσεις του αδενικού και επιφανειακού επιθηλίου καθώς επίσης και στις περιπτώσεις ενδοβλεννογικού αδενοκαρκινώματος και γ) σε ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας (CIN) (144). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις της παθολογικής έκφρασης (απώλειας ή μειωμένης έκφρασης) της E-καντερίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων στο



νεοπλασματικό ιστό, *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι, αποκατάσταση της φυσιολογικής έκφρασης της πρωτεΐνης οδήγησε σε βελτίωση της βιολογικής συμπεριφοράς των νεοπλασματικών κυττάρων (144). Η E-σελεκτίνη μεσολαβεί στις αντιδράσεις προσκόλλησης μεταξύ των λευκοκυττάρων του αίματος και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων στη διεργασία της λευκοκυτταρικής εγκατοίκησης στον εξωαγγειακό μεσοκυττάριο ιστό ή στα δευτερογενή (περιφερικά) λεμφικά όργανα (σπλήνας, λεμφαδένες, λεμφικός ιστός των βλεννογόνων MALT). Ο μεσολαβητικός τους ρόλος εκδηλώνεται κατά την αρχική προσκόλληση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα που παρακολουθεί το κύλισμα τους κατά μήκος των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων και προς την κατεύθυνση της αιματικής ροής. Τα ευρήματά μας έδειξαν μειωμένη έκφραση της E-σελεκτίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και στα τρία όργανα της εξωμυελικής εμβρυϊκής αιμοποίησης που εξετάσαμε, που σημαίνει απώλεια ή μειωμένη προσκόλληση των λευκοκυττάρων που κυκλοφορούν στον αυλό των αγγείων, με αποτέλεσμα την μειωμένη έξοδο των λευκοκυττάρων στον εξωαγγειακό μεσοκυττάριο ιστό, καθώς μειωμένη εγκατοίκηση των λεμφοκυττάρων στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Παρενθετικά, στο Σύνδρομο Ανεπάρκειας Προσκόλλησης των Λευκοκυττάρων τύπου II (Leykocyte Adhesion Deficiency II, LAD), όπου οι προσδέτες των σελεκτινών απουσιάζουν, παρατηρείται αδυναμία συσσώρευσης των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων σε θέσεις φλεγμονής, με αποτέλεσμα την εμφάνιση λοιμώξεων που πολλές φορές μπορεί να αποβούν θανατηφόρες και αρχίζουν ακόμη και από τη χρονική στιγμή της γέννησης με την αποκοπή του ομφαλίου λώρου (144).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ερευνητικής μας εργασίας και τις μελέτες που προηγήθηκαν, οι αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας κατά τη διάρκεια της κύησης, φαίνεται να αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα του Συνδρόμου Φλεγμονώδους Αντίδρασης του Εμβρύου (Fetal Inflammatory Response Syndrome - FIRS) (169, 170), με σοβαρές επιπλοκές στην ανάπτυξη σε διάφορα όργανα, καθιστώντας τελικά αυτή τη φλεγμονώδη επεξεργασία ως πολυοργανική νόσο του εμβρύου (139).





## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία επικεντρώθηκε στη μελέτη της συνέχειας της ανοσοιστοχημικής έκφρασης της εξωμυελικής αιμοποίησης και των προϊόντων της CD44, E- Καντερίνης και E- Σελεκτίνης, στο ανθρώπινο ήπαρ, σπλήνα και θύμο αδένες στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τόσο σε φυσιολογικές περιπτώσεις (ομάδες μαρτύρων) όσο και σε παθολογικές περιπτώσεις (σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας).

Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι, τα προϊόντα της εξωμυελικής αιμοποίησης καθώς και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, εκφράζονται έντονα στα εξωμυελικά όργανα του εμβρύου στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης. Στις περιπτώσεις εμβρύων με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, παρατηρήσαμε διαφοροποίηση των κυττάρων-προϊόντων της αιμοποίησης, για δε τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης παρατηρήθηκε μείωση αυτών των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα στο θύμο αδένες και σπλήνα. Τα ευρήματά μας έδειξαν επίσης ότι, τοξικοί παράγοντες - κυττοκίνες - που απελευθερώνονται κατά τη διεργασία της φλεγμονής (Ιντελκευκίνες: IL-6, IL-17 και IL-22), αποτελούν τον καταλυτικό παράγοντα αύξησης των κυττάρων της ερυθράς σειράς, κοκκιοκυτταρικής σειράς, αρχέγονων (βλαστικών) αιμοποιητικών κυττάρων, μεγακαρυοκυττάρων. Ένδειξη ότι, η αύξηση της εξωμυελικής αιμοποίησης στο ήπαρ, σπλήνα και θύμο αδένες, αποτελεί το μοναδικό μηχανισμό άμυνας των εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας. Μηχανισμός που τελικά αποδεικνύεται, λόγω της βαρύτητας της λοίμωξης και των τοξικών παραγόντων που απελευθερώνονται στους ιστούς αυτών των οργάνων, ανεπαρκής.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας φαίνεται ότι, οι παραπάνω τοξικοί παράγοντες προκαλούν στα όργανα της εξωμυελικής αιμοποίησης των εμβρύων:

Απώλεια της ικανότητας επικοινωνίας, συντονισμού και μετακίνησης των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος προκειμένου να επιτευχθεί η προστασία από ξένους εισβολείς. Διεργασία η οποία επιτυγχάνεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, από τις κυτοκίνες.

Απώλεια της δυναμικής στην οργάνωση και αναδιοργάνωση στις διακυτταρικές διασυνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων

(προφανώς λόγω της διαταραχής της διαδικασίας αγωγής του σήματος που μεταφέρει διεγερτικά ή ανασταλτικά μηνύματα στους υποδοχείς προσκόλλησης και οι σχετιζόμενες με αυτούς πρωτεΐνες - προσδέτες του κυτταροσκελετού).

Μεταβολές ποσοτικού χαρακτήρα στα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης  
**α)** στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (**μειωμένη έκφραση E-Καντερίνης** → διαταραχή της προσκολλητικής λειτουργίας της E-Καντερίνης λόγω μείωσης του μεσοκυτταρικού ασβεστίου → άνοιγμα των μεσοενδοθηλιακών διακυτταρικών διασυνδέσεων → αυξημένη διαπερατότητα, **μειωμένη έκφραση E- Σελεκτίνης** → διαταραχή της σχέσης μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και λευκοκυττάρων που κυκλοφορούν στα αγγεία → διαταραχή της λεμφοκυτταρικής εγκατοίκησης), **β)** στα αιματικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα (**μειωμένη έκφραση του CD44 στα λεμφοκύτταρα** → μείωση στον αποικισμό των λεμφοκυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα). Η μείωση αυτή των πρωτεϊνών, φαίνεται να αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα απώλειας της αυστηράς ελεγχόμενης μετανάστευσης των λευκοκυττάρων από το αίμα στους ιστούς, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη εξαγγείωση των λευκοκυττάρων στο μεσοκυττάριο ιστό. Ταυτόχρονα, φαίνεται να επηρεάζει τη διεργασία διαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα, αλλά και την εγκατάσταση ώριμων και λειτουργικών λεμφοκυττάρων στο σπλήνα, καθώς και στα άλλα δευτερογενή (περιφερικά) λεμφικά όργανα όπως, λεμφαδένες και λεμφικό ιστό των βλεννογόνων (MALT).

Διαταραχή στη διεργασία της αιμοποίησης, προφανώς λόγω διαταραχής της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα αιμοποιητικά κύτταρα και στρωματικά κύτταρα.

Περιορισμό της δραστηριότητας των μακροφάγων και κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων.

Επίσης, παρατηρήσαμε στη μελέτη μας ότι, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη τα κύτταρα του λεμφο-αιμοποιητικού συστήματος παρουσιάζουν γραμμική αύξηση ή μείωση αντίστοιχα με την ηλικία του εμβρύου, η ανάπτυξη και η ωρίμανση του οποίου είναι μια ευαίσθητη διαδικασία που δύναται να

επηρεαστεί σημαντικά, όπως αποδείχθηκε στην έρευνα μας, από τυχόν λοιμώξεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το λεμφο-αιμοποιητικό σύστημα του εμβρύου να αντιδρά περιορισμένα σε συγκεκριμένες λοιμώξεις. Διαταραχή της ανάπτυξης-ωρίμανσης της αιμοποίησης και κατ' επέκταση του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως αυτή παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις εμβρύων που συνδυάστηκαν με σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, φαίνεται να αποτελεί και την πιθανότερη αιτία αυτόματων αποβολών, όπως αυτές συχνότερα παρατηρούνται στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης, περίοδο που συνδυάζεται με την έναρξη λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος του εμβρύου.

Συμπερασματικά, η διατήρηση της ομοιόστασης του αιμοποιητικού ιστού και κατ' επέκταση της αιμοποίησης και λεμφοποίησης, προϋποθέτει την ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου των αιμοποιητικών κυττάρων και λεμφοκυττάρων καθώς και της αλληλεπίδρασης τους με το μικροπεριβάλλον των οργάνων της εμβρυικής εξωμυελικής αιμοποίησης. Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής, οδηγεί σε παθολογικές διαταραχές, όπως αυτές που παρατηρήσαμε στις περιπτώσεις των εμβρύων που εξετάσαμε και συνδυάστηκαν με σοβαρού βαθμού φλεγμονώδη αντίδραση στους εμβρυικούς υμένες.

Η έρευνα μας είναι μια σημαντική προσθήκη στην υφιστάμενη γνώση ότι η χοριοαμνιονίτιδα αποτελεί πολυοργανική νόσο του εμβρύου.

Τα αποτελέσματα αυτά, αποτελούν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες με υλικό νεότερης εμβρυικής ηλικίας (μέσο και τέλος πρώτου τριμήνου της ανάπτυξης) και ηπιότερων αλλοιώσεων χοριοαμνιονίτιδας, ώστε να οδηγηθούμε με διασαφήνιση στα τελικά συμπεράσματα της σχέσης φλεγμονώδους αντίδρασης των εμβρυικών υμένων και αλλοιώσεων που προκαλεί στα διάφορα όργανα κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, με σκοπό την πρόληψη και την κατάλληλη αντιμετώπιση.



## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

**(ΠΙΝΑΚΕΣ - ΕΙΚΟΝΕΣ - ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ)**





## ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΗΠΑΡ

chorioamnionitis	week	Glycophorin-C	MPO	CD34	CD61	CD68	CD8	CD44	E-cadherin	E-selectin
0	13-16	334,9	196,2	65,1	18,2	68,8	NA	40,4	35,5	35,4
1	13-16	453,93	365,83	93,17	26,3	34,4	NA	24,67	19,47	27,47
0	17-20	650,3	265,7	57,9	21,9	85,2	38,4	42	41,1	38,4
1	17-20	485	438,5	89,77	22,2	56,37	30,65	22,77	20,67	30,1
0	21-24	498,5	234,5	29,1	12,8	90,4	45	54,7	36,4	35,7
1	21-24	460,67	416,93	60,33	11,9	63,7	32	21,03	19,97	28,7

CI

0	13-16	23,31	6,98	4,55	1,89	4,87	NA	1,94	3,66	3,48
1	13-16	11,35	9,79	2,82	1,25	1,1	NA	1,78	1,24	2,58
0	17-20	19,05	19,45	5,59	2,35	1,89	4,4	2,15	3,35	4,16
1	17-20	6,37	15,65	3,48	1,23	2,53	1,55	1,25	0,91	1,32
0	21-24	30,44	18,68	4,99	1,46	2,7	3,48	5,19	4,4	5,57
1	21-24	26,53	23,5	4,05	1,38	2,74	2,48	1,89	1,36	2,59

CI

Range

0	13-16	311.59 - 358.21	189.22 - 203.18	60.55- 69.65	16.31- 20.09	63.93- 73.67	NA- NA	38.46- 42.34	31.84- 39.16	31.92- 38.88
1	13-16	442.58 - 465.28	356.04 - 375.62	90.35- 95.99	25.05- 27.55	33.3- 35.5	NA- NA	22.89- 26.45	18.23- 20.71	24.89- 30.05
0	17-20	631.25 - 669.35	246.25 - 285.15	52.31- 63.49	19.55- 24.25	83.31- 87.09	34- 42.8	39.85- 44.15	37.75- 44.45	34.24- 42.56
1	17-20	478.63 - 491.37	422.85 - 454.15	86.29- 93.25	20.97- 23.43	53.84- 58.9	29.1- 32.2	21.52- 24.02	19.76- 21.58	28.78- 31.42
0	21-24	468.06 - 528.94	215.82 - 253.18	24.11- 34.09	11.34- 14.26	87.7- 93.1	41.52- 48.48	49.51- 59.89	32- 40.8	30.13- 41.27
1	21-24	434.14 -487.2	393.43 - 440.43	56.28- 64.38	10.52- 13.28	60.96- 66.44	29.52- 34.48	19.14- 22.92	18.61- 21.33	26.11- 31.29

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΣΠΛΗΝΑΣ

chorioamnionitis	week	glycophorinC	MP O	CD34	CD61	CD68	LCA	CD8	CD20	CD3	CD44	E-cadherin	E-selectin
0	13-16	375,00	20,10	349,00	17,00	173,50	NA	NA	NA	NA	129,00	27,80	31,20
0	17-20	383,50	33,60	362,00	17,60	279,00	358,00	348,00	455,50	201,50	127,80	34,60	34,80
0	21-24	NA	NA	NA	NA	366,00	507,10	399,00	547,00	303,50	125,00	34,90	40,40
1	13-16	455,83	48,77	461,00	14,57	140,50	NA	NA	NA	NA	96,30	18,73	25,63
1	17-20	434,00	54,63	519,17	19,87	223,00	208,17	268,67	350,00	129,43	77,83	20,83	30,00
1	21-24	NA	NA	NA	NA	305,83	325,50	347,17	424,17	195,83	72,33	24,03	34,47

## CI

0	13-16	29,97	2,20	29,54	0,65	21,87	NA	NA	NA	NA	15,65	1,16	4,68
0	17-20	25,22	3,85	27,49	1,71	19,48	42,72	43,51	18,73	21,82	8,56	3,09	3,68
0	21-24	NA	NA	NA	NA	22,29	41,25	32,33	21,08	27,06	12,65	3,44	3,07
1	13-16	28,08	3,37	24,60	1,48	11,38	NA	NA	NA	NA	6,61	1,49	1,89
1	17-20	22,97	3,38	30,82	0,98	12,18	6,10	19,82	13,96	12,01	3,67	1,00	1,39
1	21-24	NA	NA	NA	NA	15,30	25,56	14,35	23,40	10,20	2,22	1,61	1,77

## CI Range

0	13-16	345.03-404.97	17.9-22.3	319.46-378.54	16.35-17.65	151.63-195.37	NA	NA	NA	NA	113.35-144.65	26.64-28.96	26.52-35.88
1	13-16	358.28-408.72	29.75-37.45	334.51-389.49	15.89-19.31	259.52-298.48	NA	NA	NA	NA	119.24-136.36	31.51-37.69	31.12-38.48
0	17-20	NA-NA	NA-NA	NA-NA	NA-NA	343.71-388.29	465.85-548.35	366.67-431.33	525.92-568.08	276.44-330.56	112.35-137.65	31.46-38.34	37.33-43.47
1	17-20	427.75-483.91	45.4-52.14	436.4-485.6	13.09-16.05	129.12-151.88	188.18-208.36	NA-NA	108.26-116.54	100.46-120.8	89.69-102.91	17.24-20.22	23.74-27.52
0	21-24	411.03-456.97	51.25-58.01	488.35-549.99	18.89-20.85	210.82-235.18	202.07-214.27	248.85-288.49	336.04-363.96	117.42-141.44	74.16-81.5	19.83-21.83	28.61-31.39
1	21-24	NA-NA	NA-NA	NA-NA	NA-NA	290.53-321.13	299.94-351.06	332.82-361.52	400.77-447.57	185.63-206.03	70.11-74.55	22.42-25.64	32.7-36.24

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΘΥΜΟΣ ΑΔΕΝΑΣ

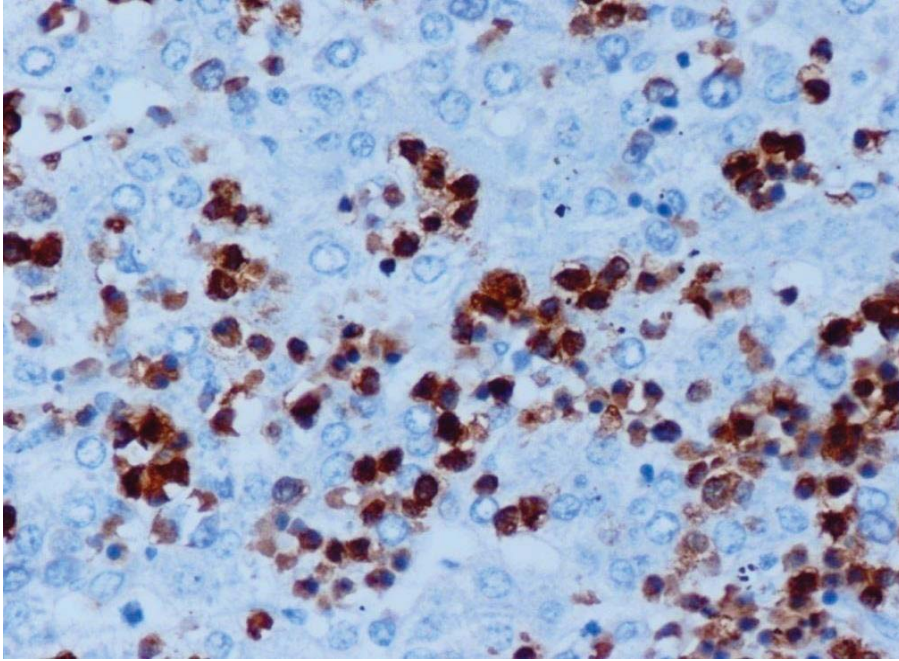
chorioamnionitis	week	glycophorinC	MPO	CD34	CD61	CD68	CD3	CD8	CD44	E-cadherin	E-selectin
0	13-16	76,10	45,50	50,00	4,20	38,00	943,50	410,00	604,50	58,50	25,30
0	17-20	77,00	45,00	61,80	3,10	44,40	1250,00	539,00	634,50	54,50	40,80
0	21-24	NA	NA	NA	NA	56,60	1565,00	684,00	644,00	52,50	58,20
1	13-16	45,67	27,60	30,10	3,77	29,57	564,33	317,83	341,33	35,63	19,63
1	17-20	66,00	28,00	53,37	2,90	39,50	667,33	365,67	298,67	38,30	31,13
1	21-24	NA	NA	NA	NA	45,43	835,33	562,50	309,33	39,63	47,70

#### CI

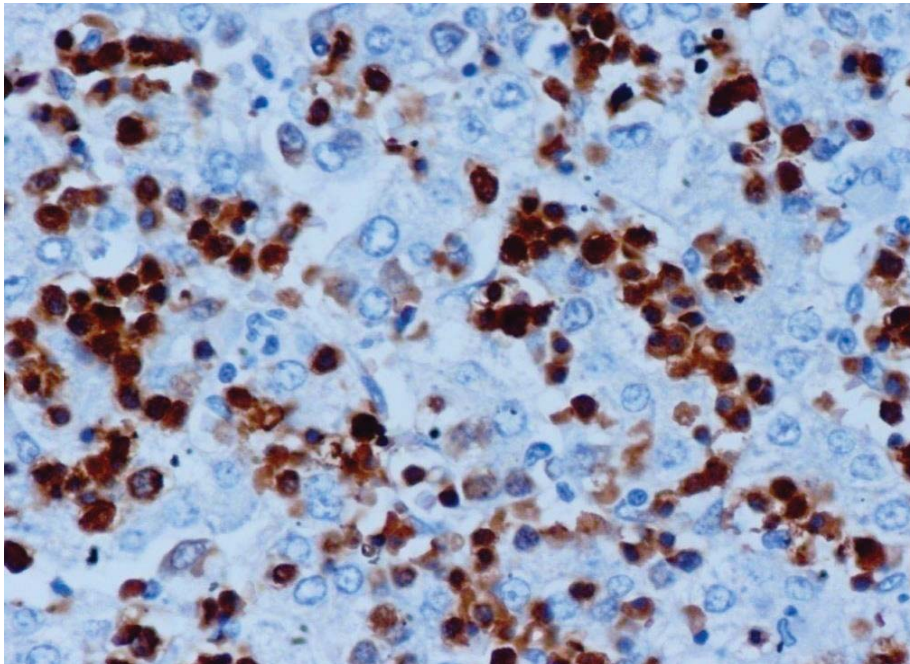
0	13-16	5,35	13,89	10,33	1,46	1,17	85,86	18,48	84,86	13,94	2,50
0	17-20	7,62	11,60	10,02	1,07	1,88	194,36	31,66	88,24	10,27	2,10
0	21-24					3,38	240,96	36,52	74,84	10,46	2,18
1	13-16	3,55	3,04	3,49	0,62	1,08	39,18	10,02	31,42	3,29	1,53
1	17-20	7,62	3,25	5,83	0,58	1,19	42,04	15,97	21,99	3,73	1,17
1	21-24	NA	NA	NA	NA	2,03	92,70	22,34	28,44	4,40	1,52

#### CI Range

0	13-16	70.75-81.45	31.61-59.39	39.67-60.33	2.74-5.66	36.83-39.17	857.64-1029.36	391.52-428.48	519.64-689.36	44.56-72.44	22.8-27.8
1	13-16	69.38-84.62	33.4-56.6	51.78-71.82	2.03-4.17	42.52-46.28	1055.64-1444.36	507.34-570.66	546.26-722.74	44.23-64.77	38.7-42.9
0	17-20	43.31-56.69	28.77-39.23	27.09-32.71	2.36-4.64	53.22-59.98	1324.04-1805.96	647.48-720.52	569.16-718.84	42.04-62.96	56.02-60.38
1	17-20	42.12-49.22	24.56-30.64	26.61-33.59	3.15-4.39	28.49-30.65	525.15-603.51	307.81-327.85	309.91-372.75	32.34-38.92	18.1-21.16
0	21-24					38.31-40.69	625.29-709.37	349.7-381.64	276.68-320.66	34.57-42.03	29.96-32.3
1	21-24					43.4-47.46	742.63-928.03	540.16-584.84	280.89-337.77	35.23-44.03	46.18-49.22

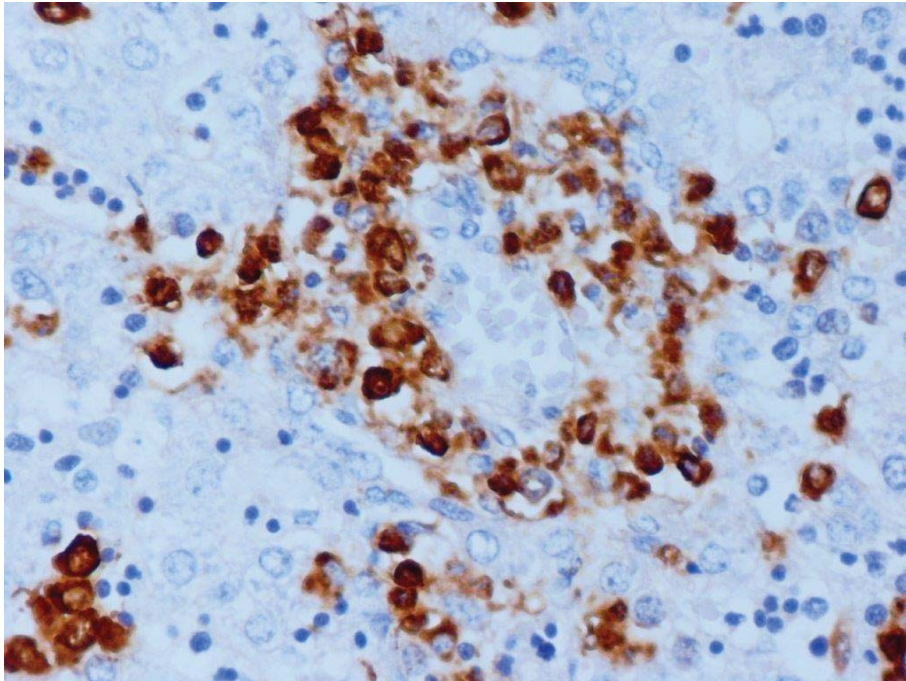


**Εικόνα 16A. Glycophorin C X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την GlycophorinC σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (αρχή 1<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

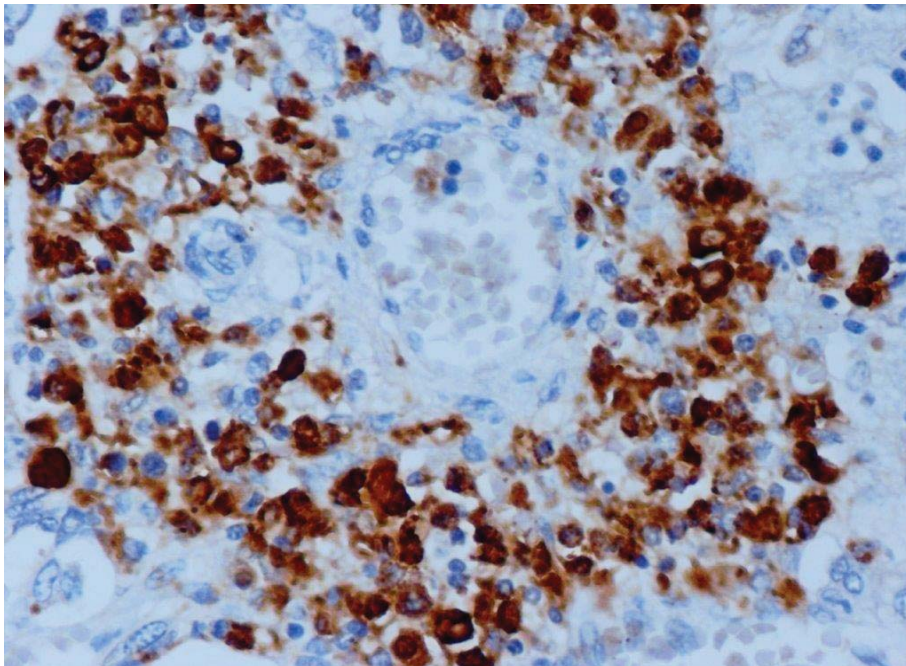


**Εικόνα 16B. Glycophorin C X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την GlycophorinC σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (αρχή 1<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

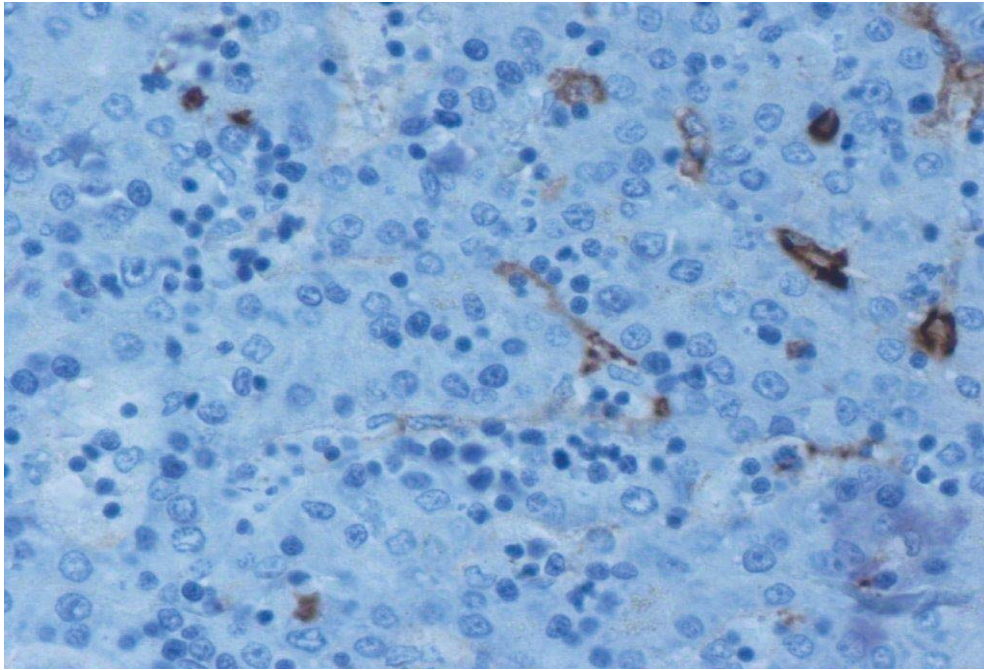




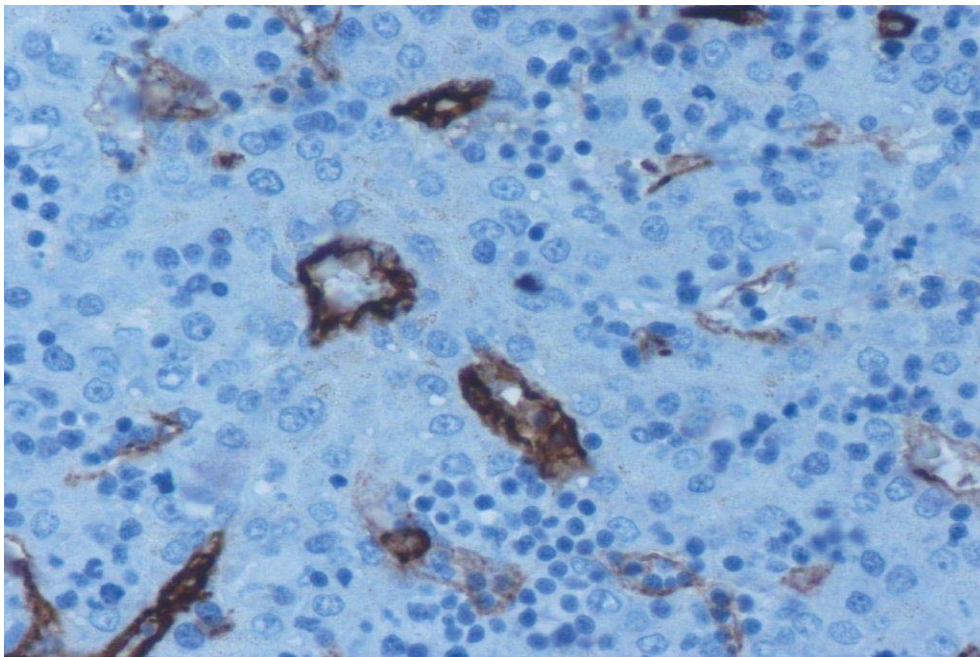
**Εικόνα 17Α. ΜΡΟ Χ400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την ΜΡΟσε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).



**Εικόνα 17Β. ΜΡΟ Χ400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την ΜΡΟσε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

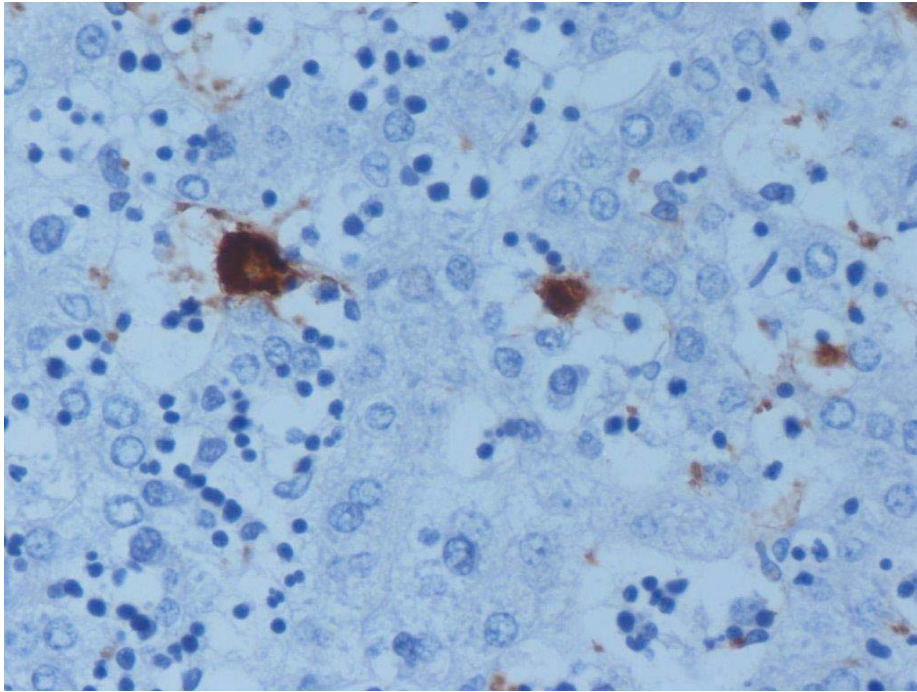


**Εικόνα 18Α. CD34 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για τοCD34σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

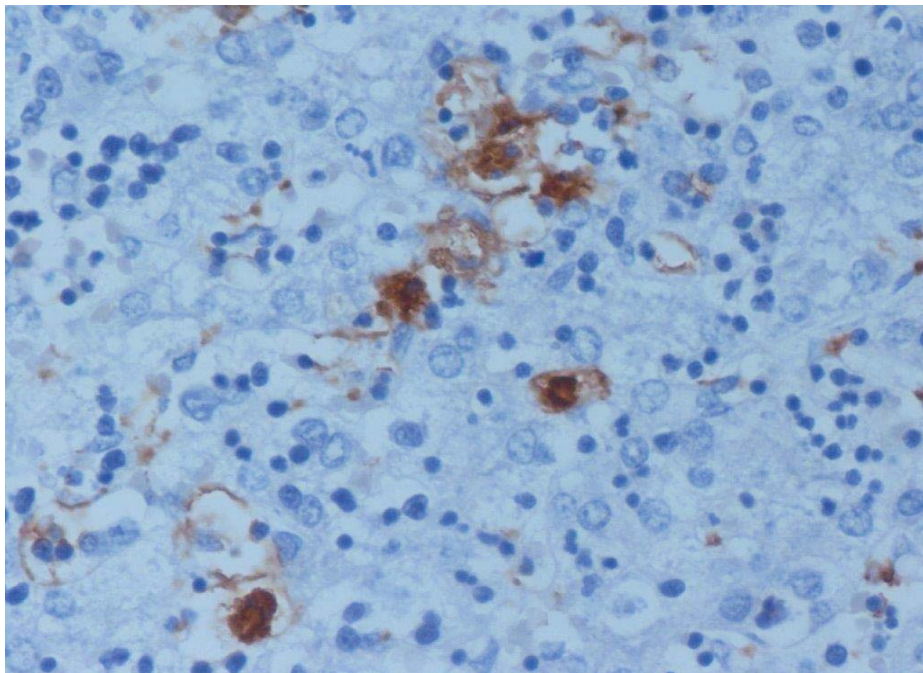


**Εικόνα 18Β. CD34 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για τοCD34 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

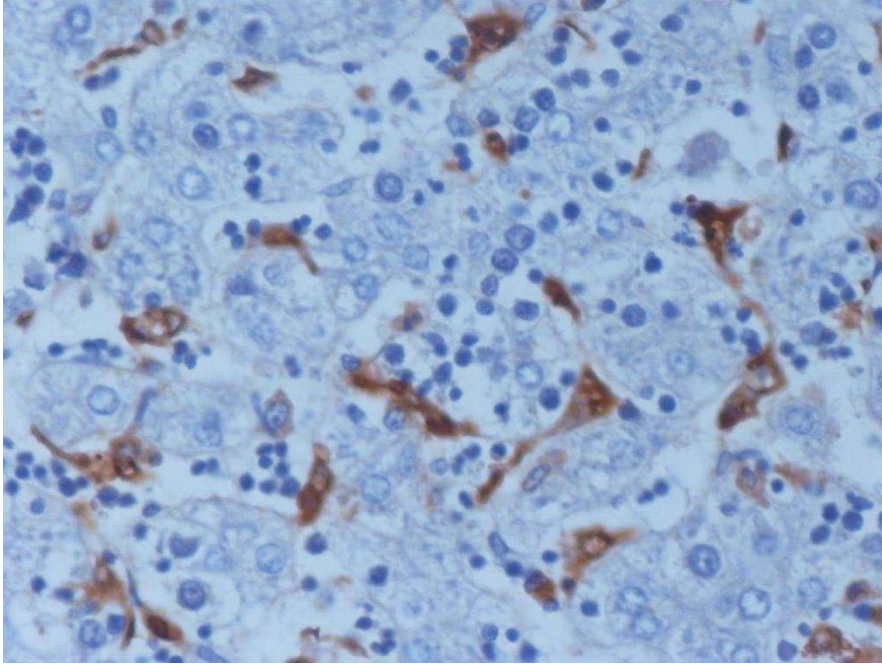




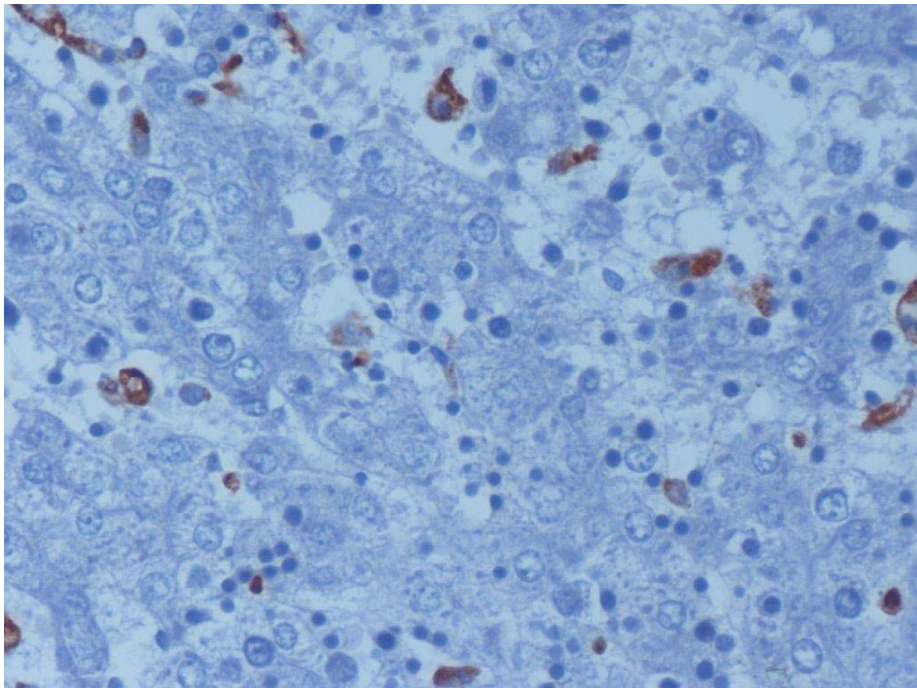
**Εικόνα 19Α. CD61 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD61 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (αρχή 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).



**Εικόνα 19Β. CD61 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD61 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (αρχή 1<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

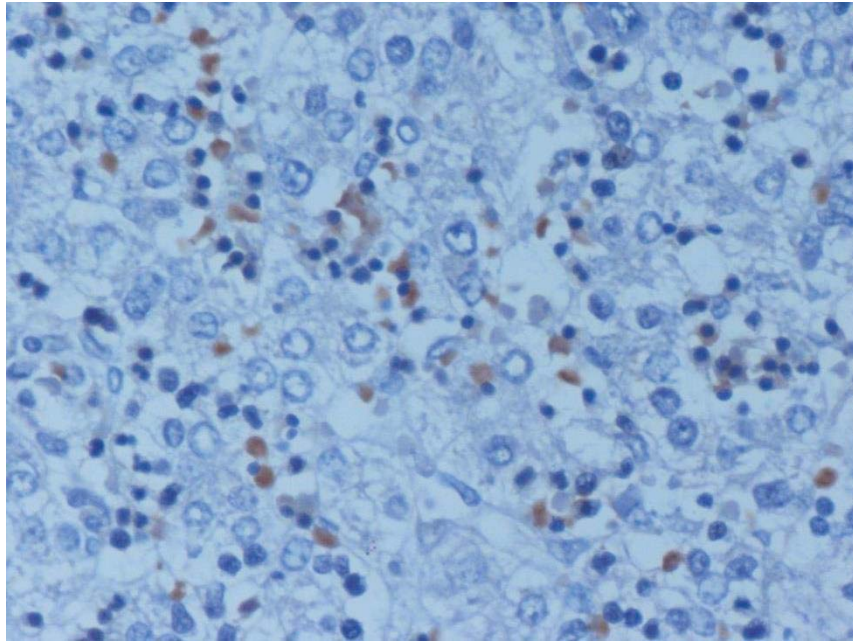


**Εικόνα 20Α. CD68 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD68 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

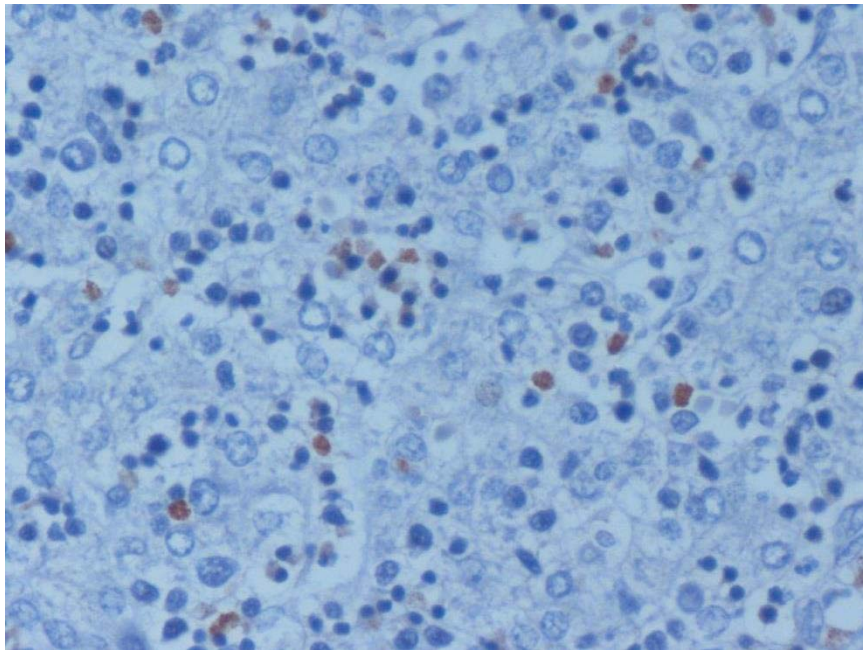


**Εικόνα 20Β. CD68 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD68 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

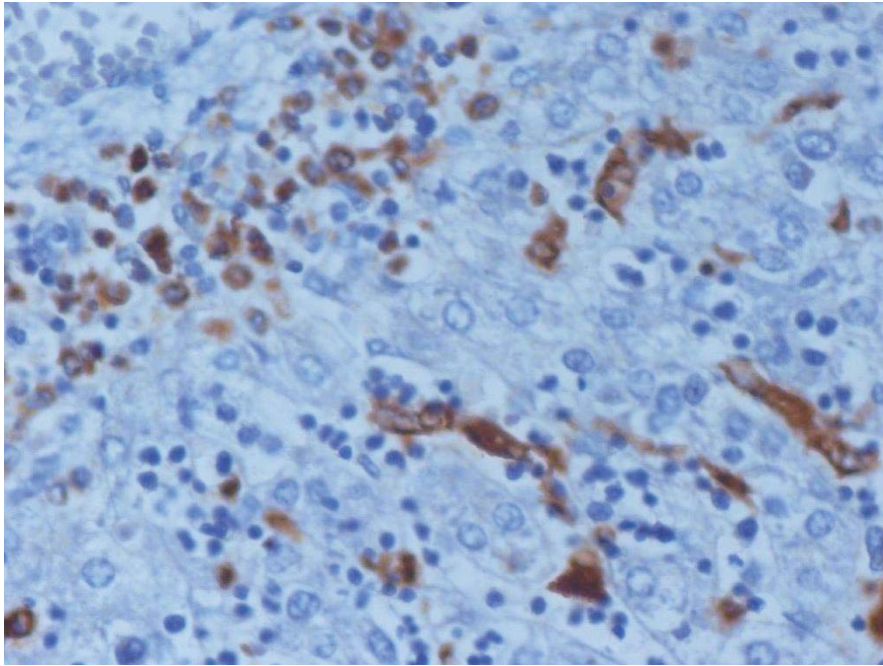




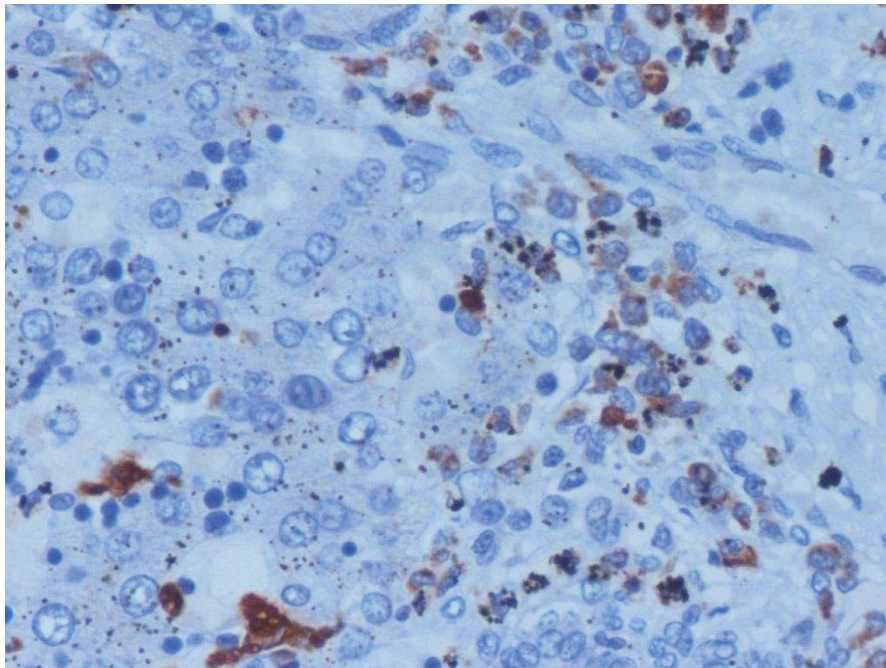
**Εικόνα 21Α. CD8 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD8 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (τέλος 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 21<sup>η</sup> - 24<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).



**Εικόνα 21Β. CD8 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD8 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (τέλος 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 21<sup>η</sup> - 24<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

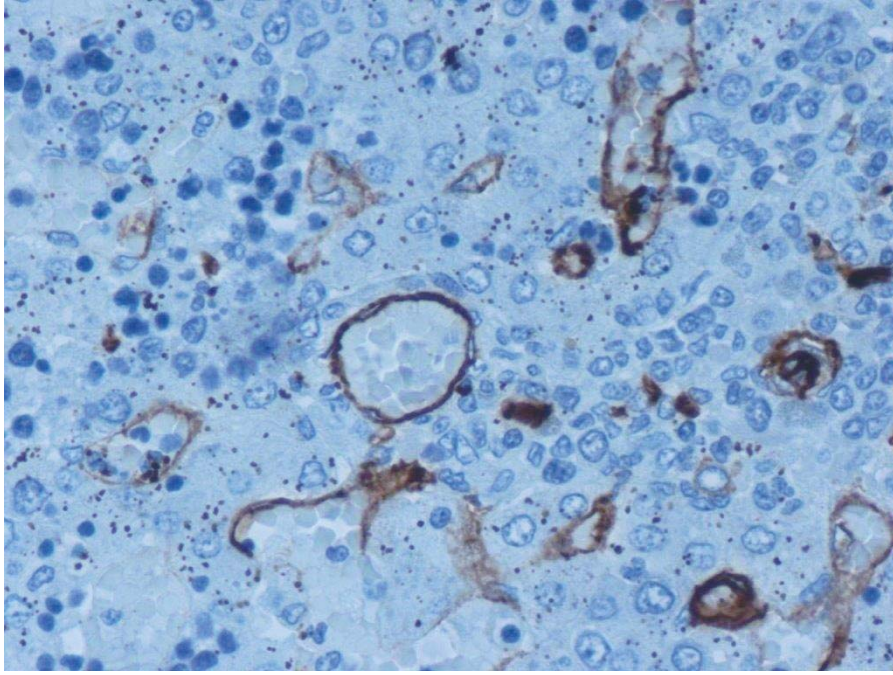


**Εικόνα 22Α. CD44 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD44 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

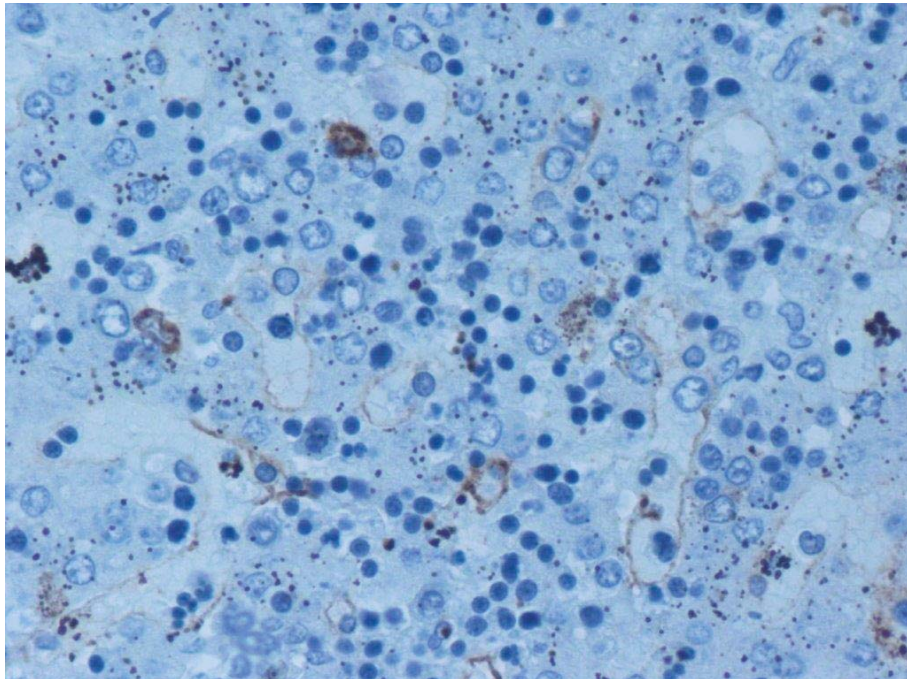


**Εικόνα 22Β. CD44 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD44 σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

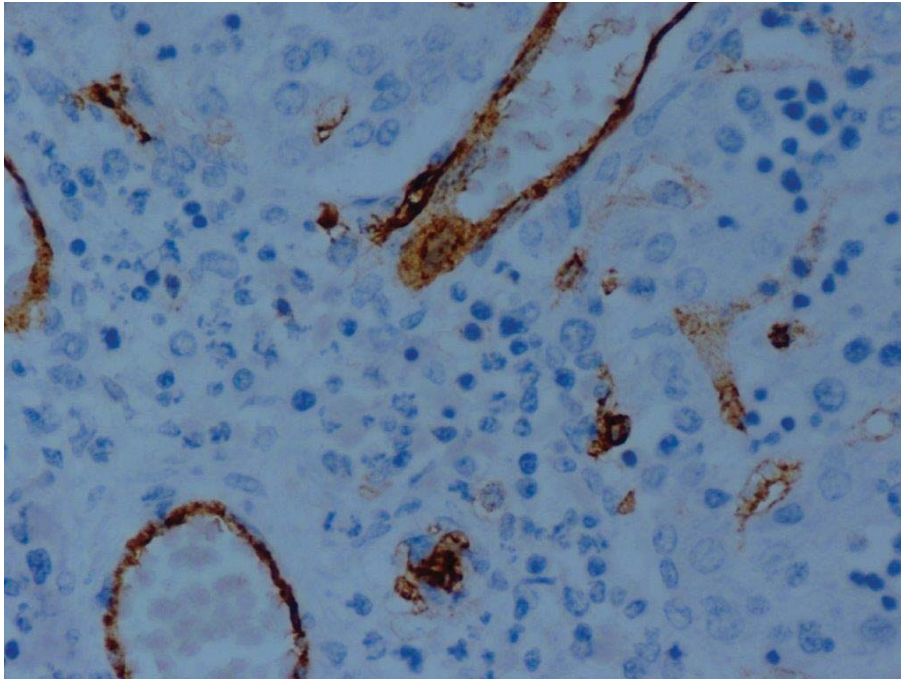




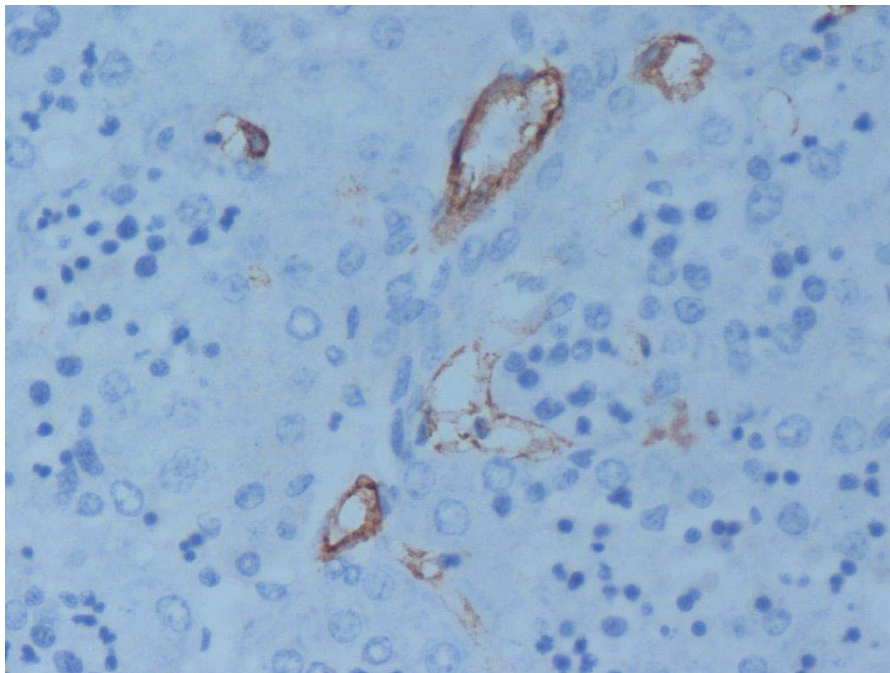
**Εικόνα 23Α. E-Cadherin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Cadherin σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).



**Εικόνα 23Β. E-Cadherin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Cadherin σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

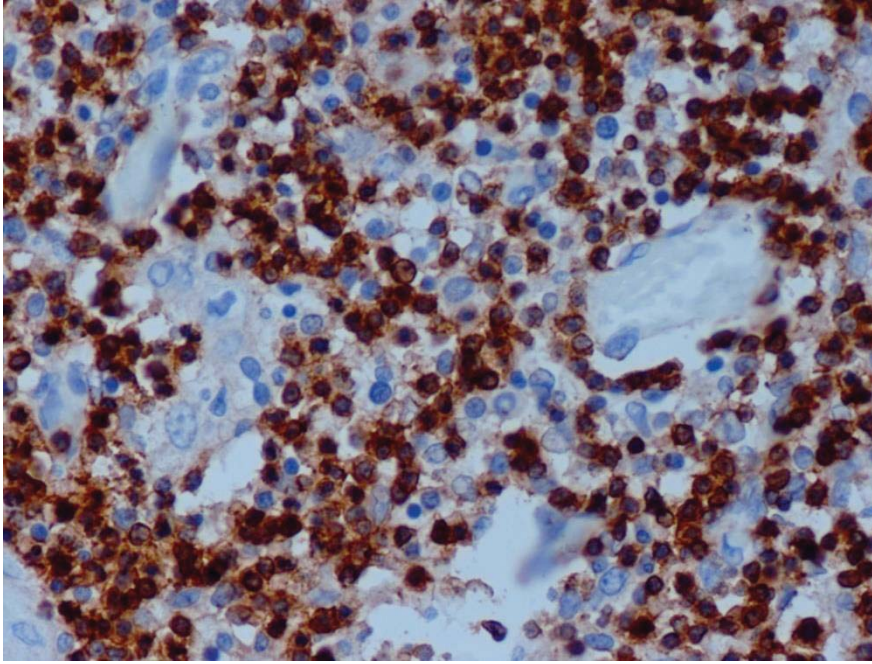


**Εικόνα 24Α. E-Selectin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Selectin σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

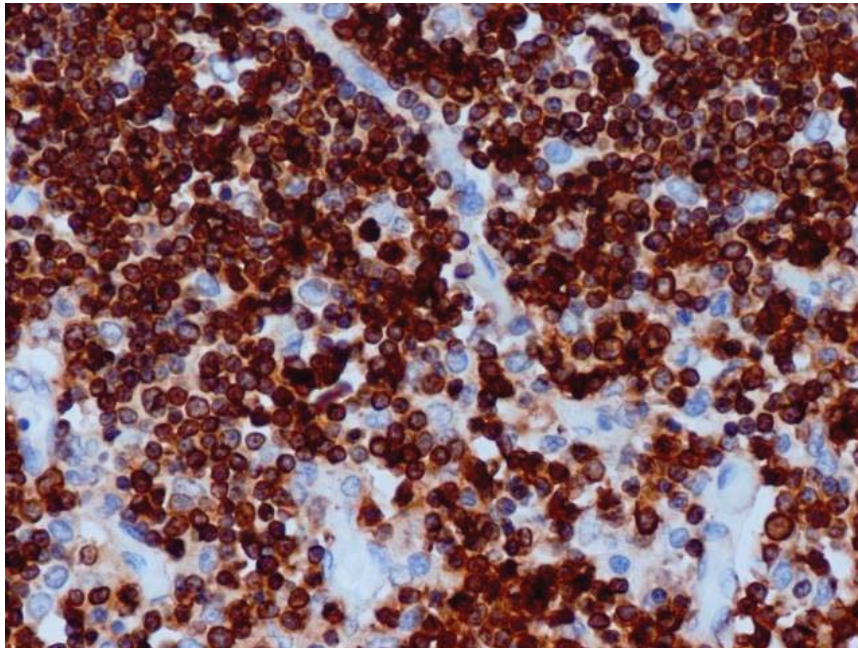


**Εικόνα 24Β. E-Selectin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Selectin σε ήπαρ ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

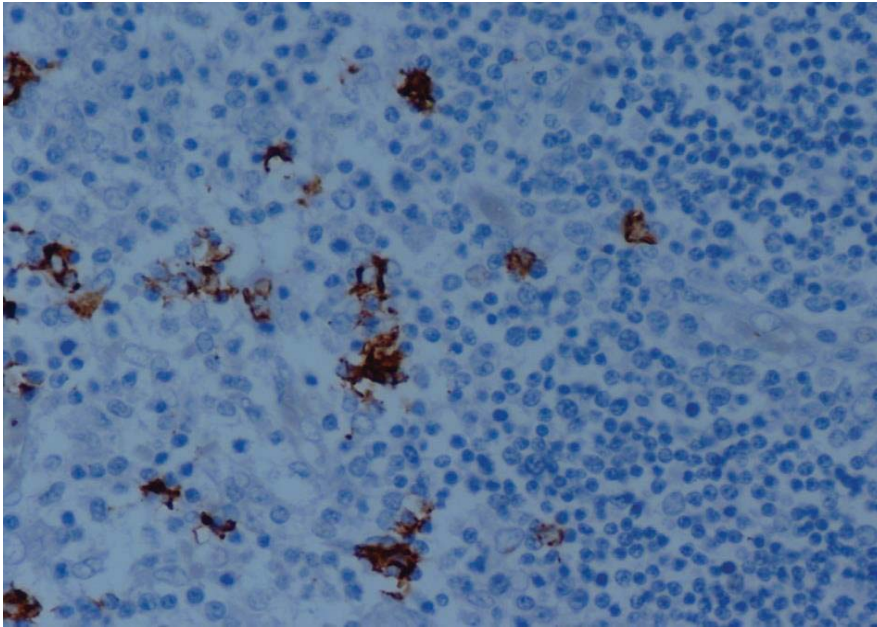




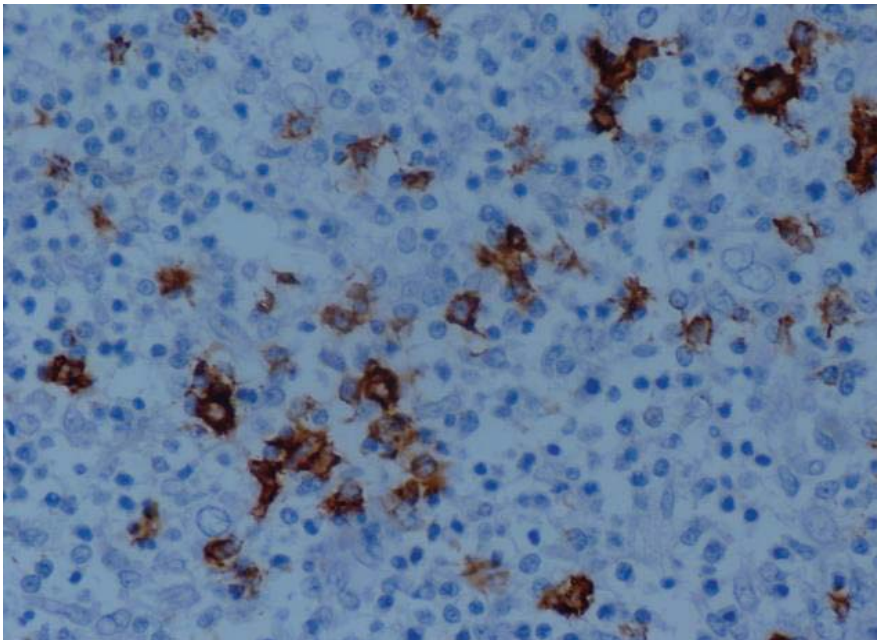
**Εικόνα 25A. Glycophorin C X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την Glycophorin C σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).



**Εικόνα 25B. Glycophorin C X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την Glycophorin C σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

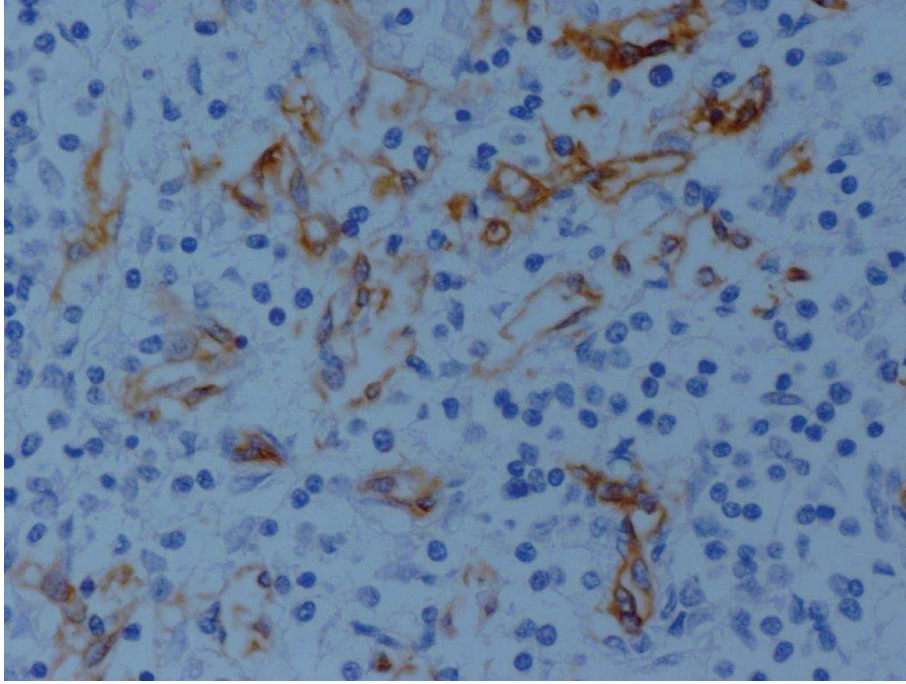


**Εικόνα 26Α. MPO X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την MPO σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

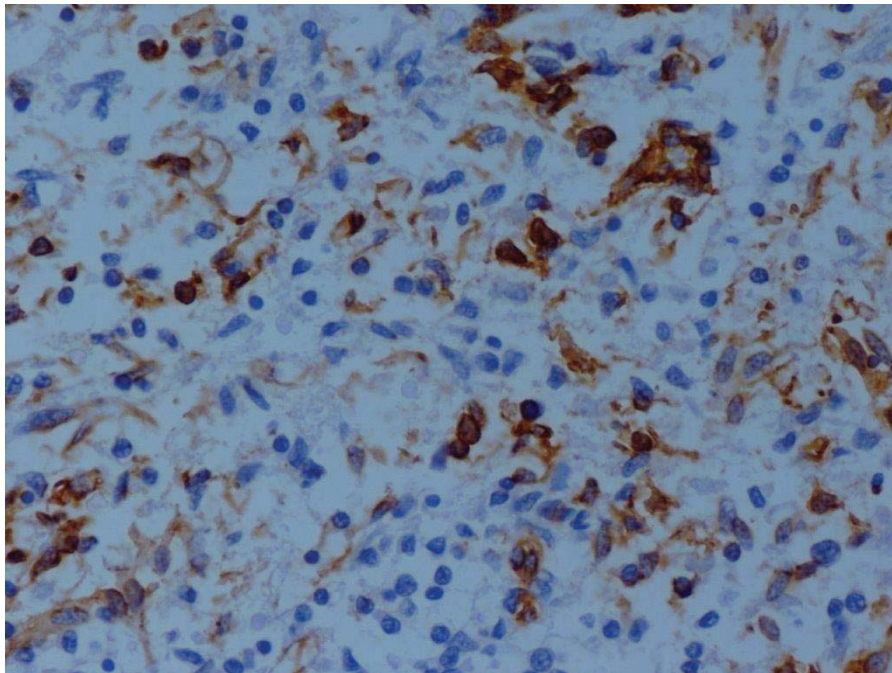


**Εικόνα 26Β. MPO X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την MPO σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

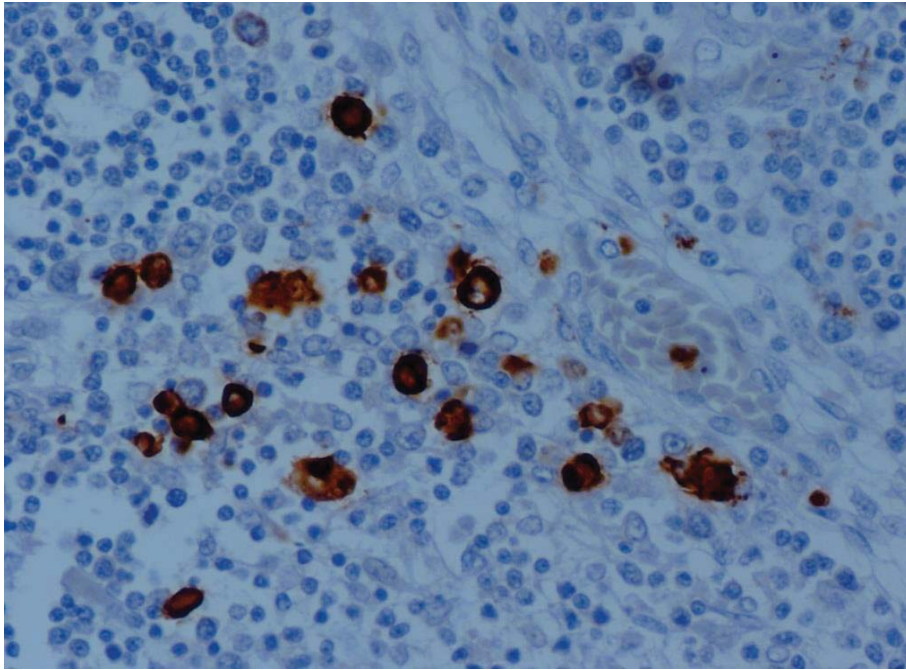




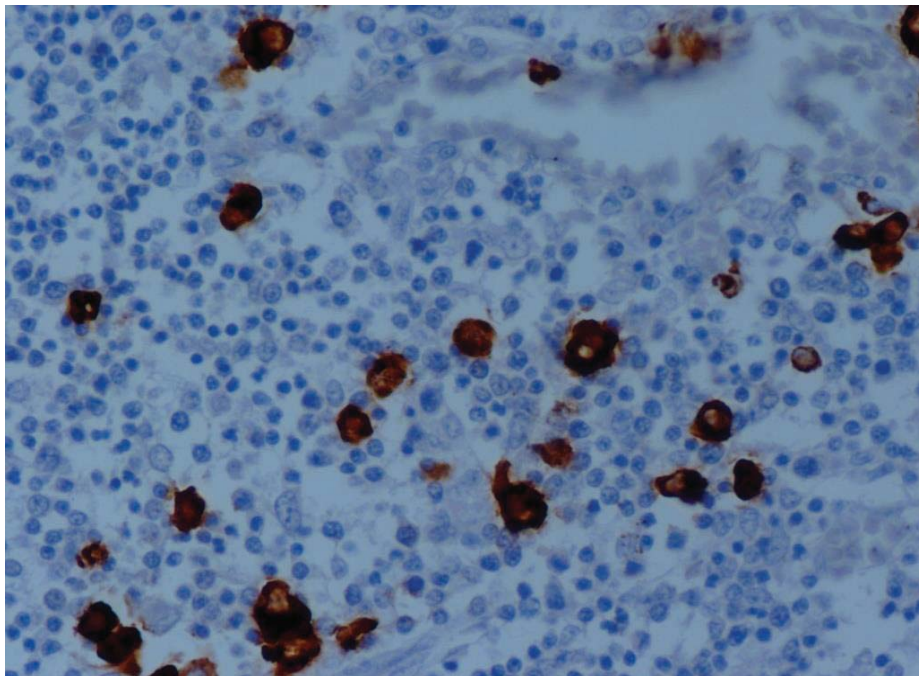
**Εικόνα 27Α. CD34 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD34 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).



**Εικόνα 27Β. CD34 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD34 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

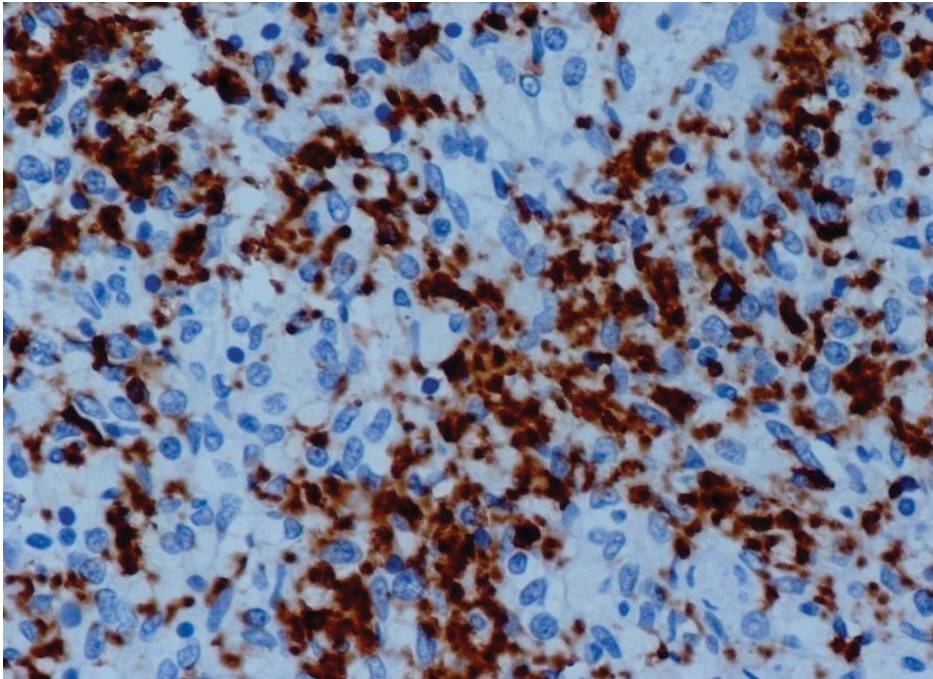


**Εικόνα 28Α. CD61 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD61 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

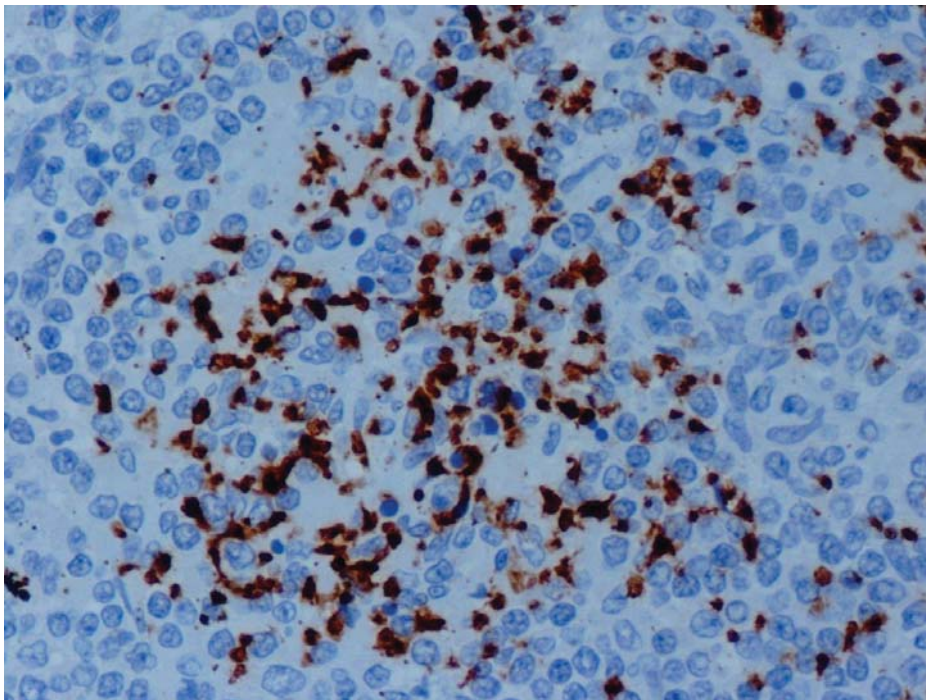


**Εικόνα 28Β. CD61 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD61 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.



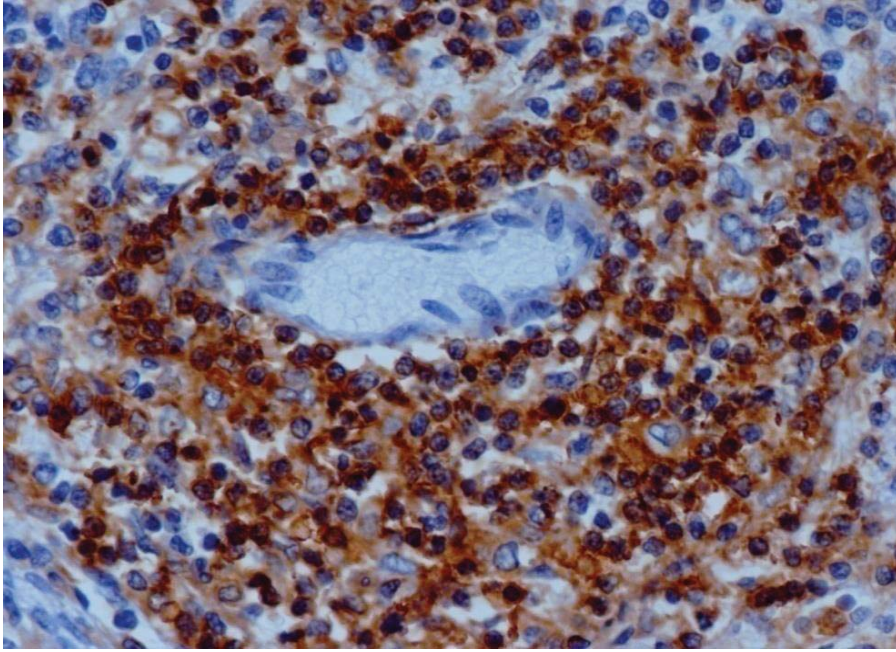


**Εικόνα 29Α. CD68 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD68 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

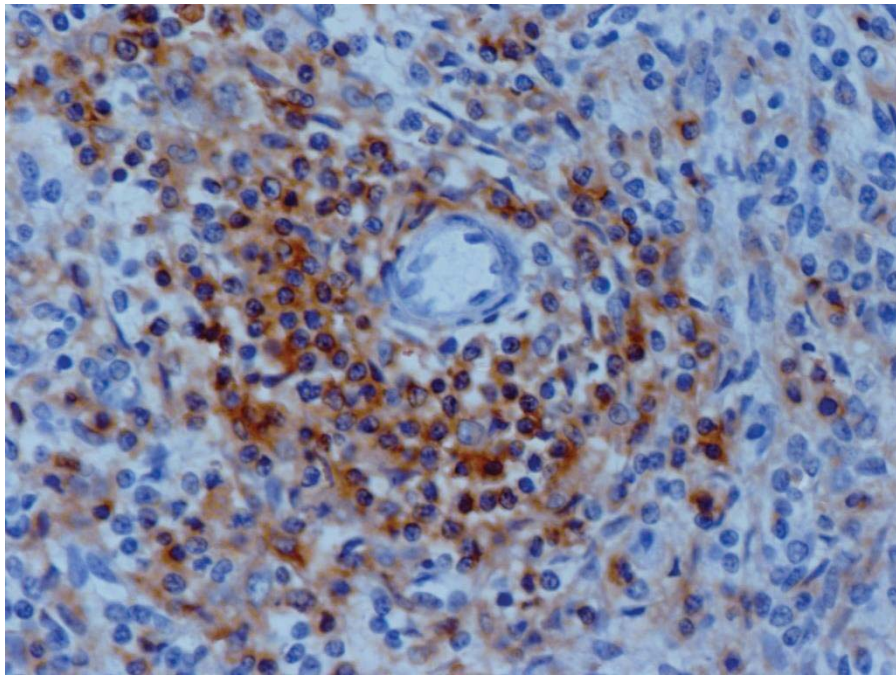


**Εικόνα 29Β. CD68 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD68 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

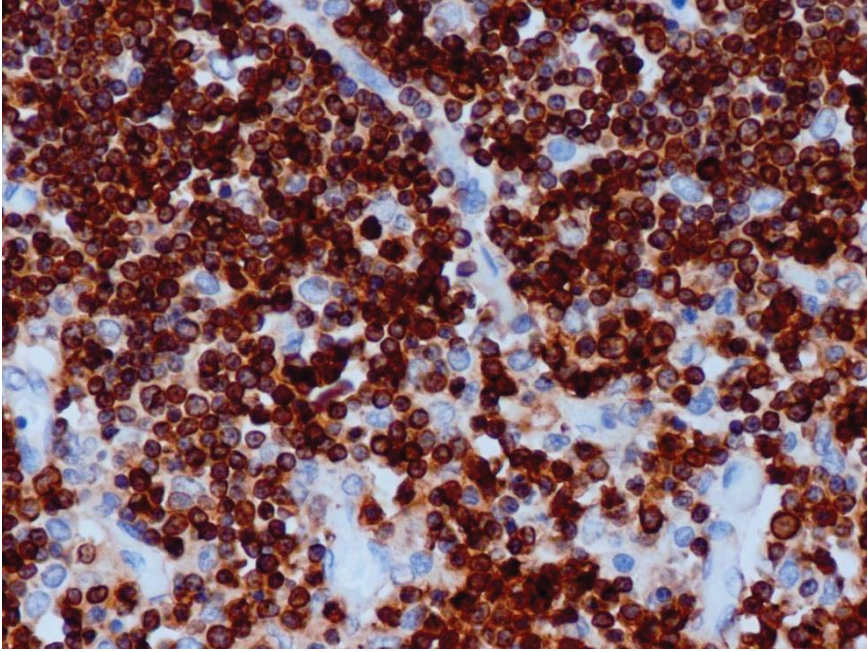




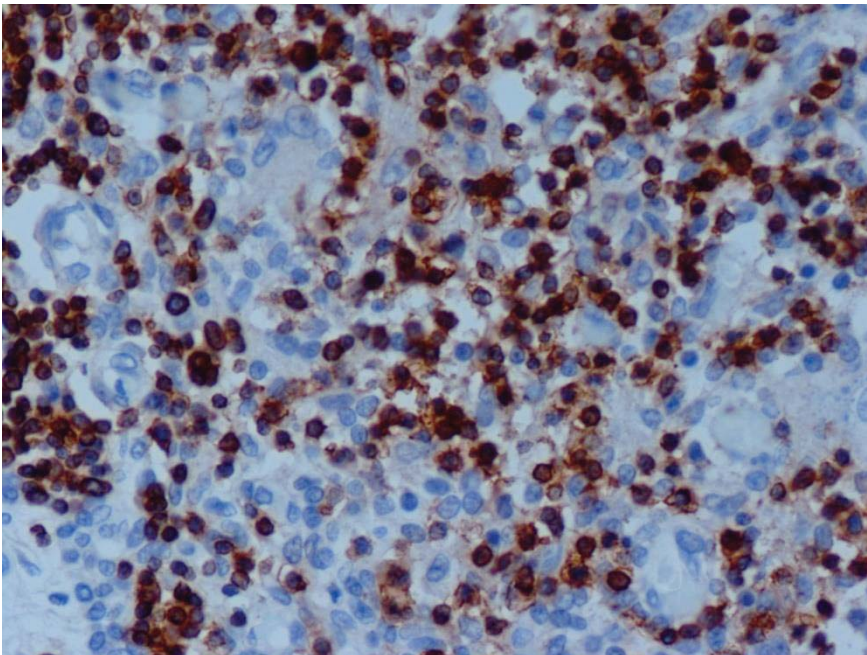
**Εικόνα 30Α. CD3 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD3 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).



**Εικόνα 30Β. CD3 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD3 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

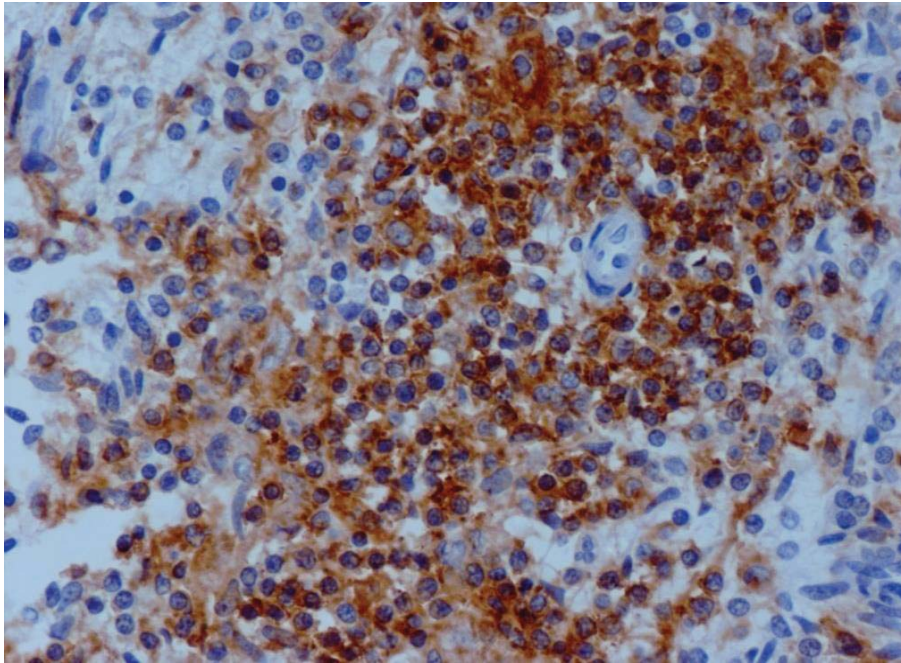


**Εικόνα 31Α. CD20 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD20 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

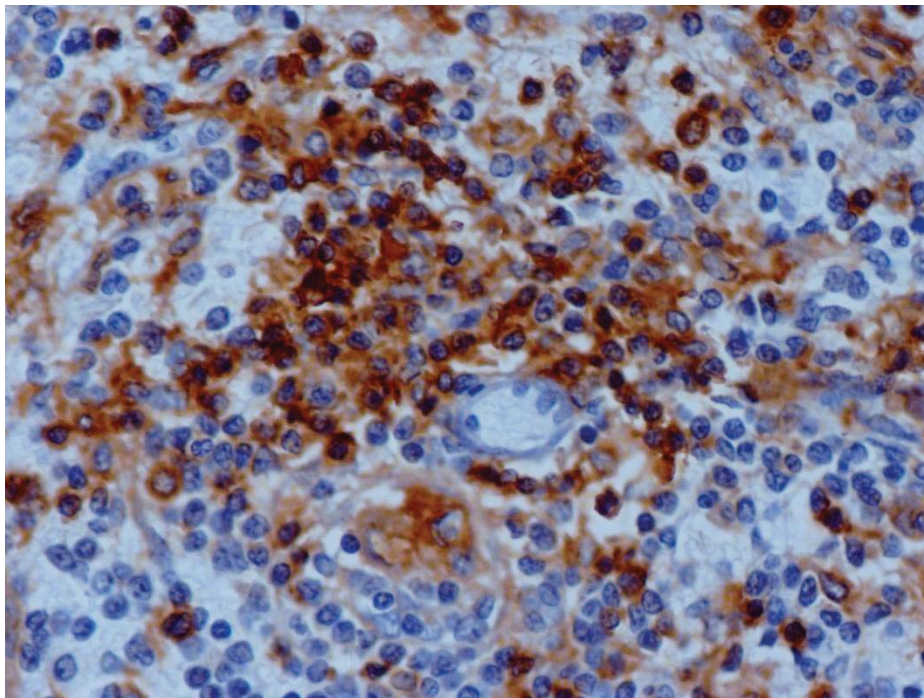


**Εικόνα 31Β. CD20 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD20 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

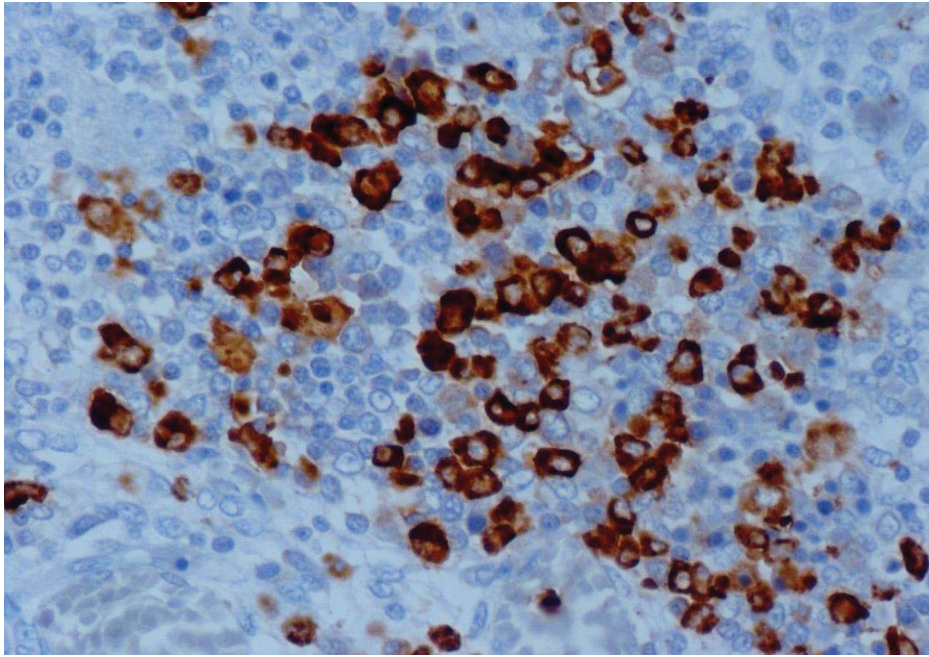




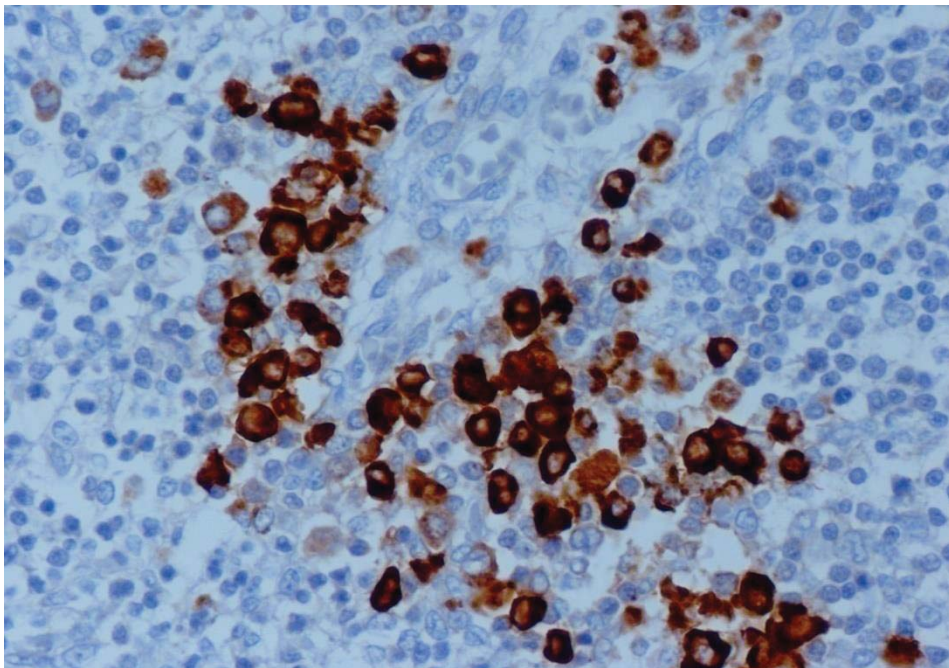
**Εικόνα 32Α. CD8 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD8 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).



**Εικόνα 32Β. CD8 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD8 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

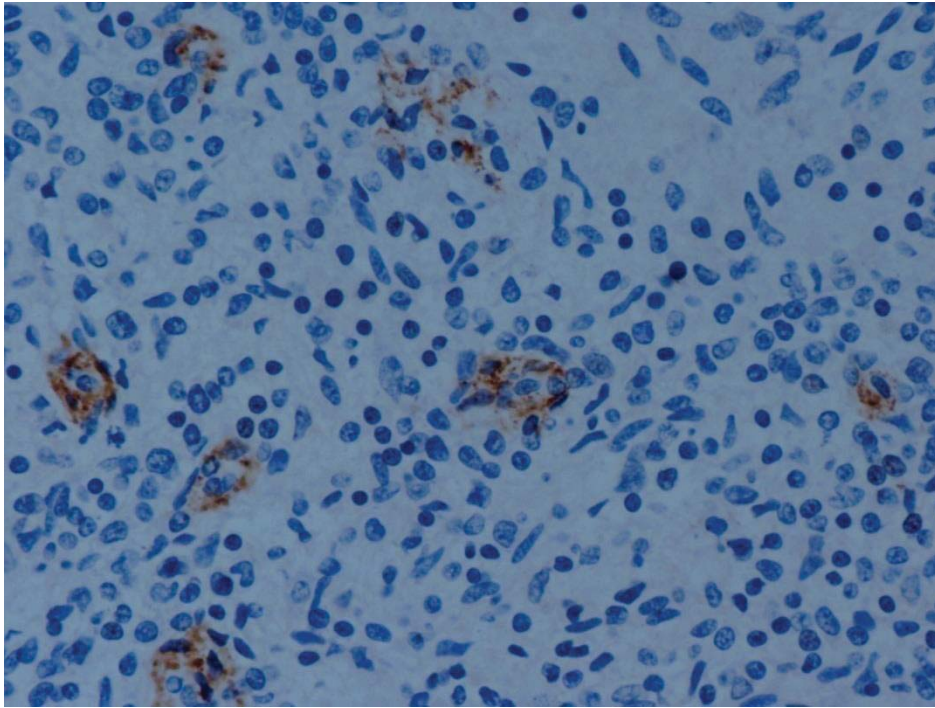


**Εικόνα 33Α. CD44 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD44 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

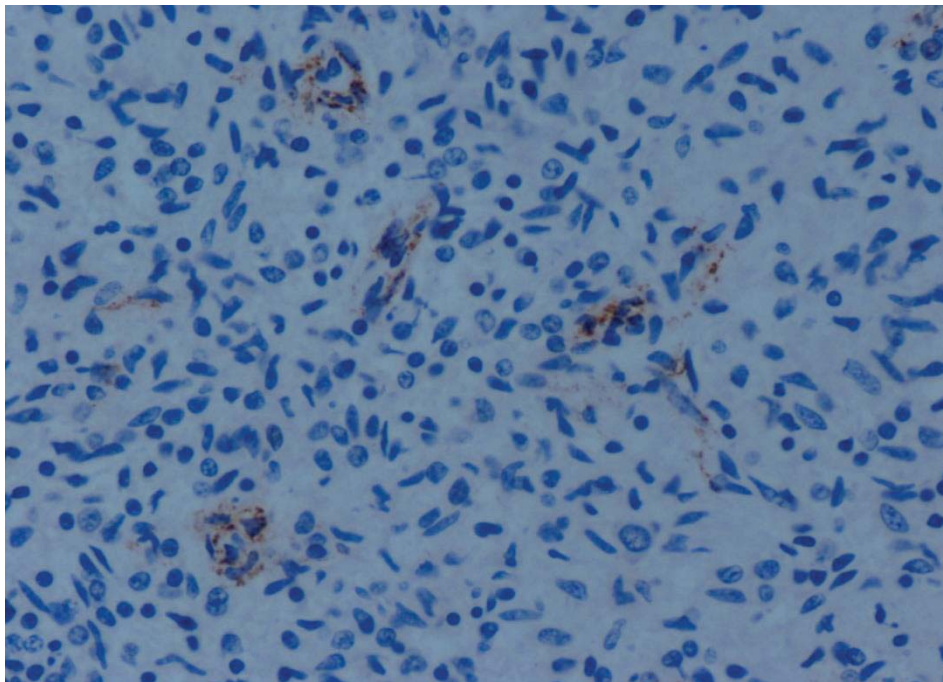


**Εικόνα 33Β. CD44 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD44 σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.



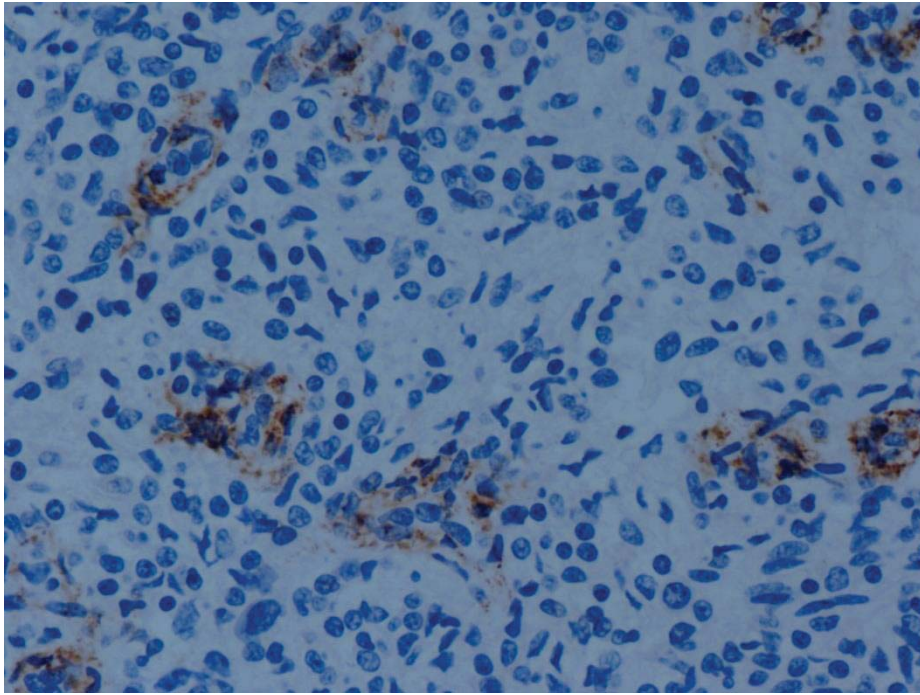


**Εικόνα 34Α. E-Cadherin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Cadherin σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

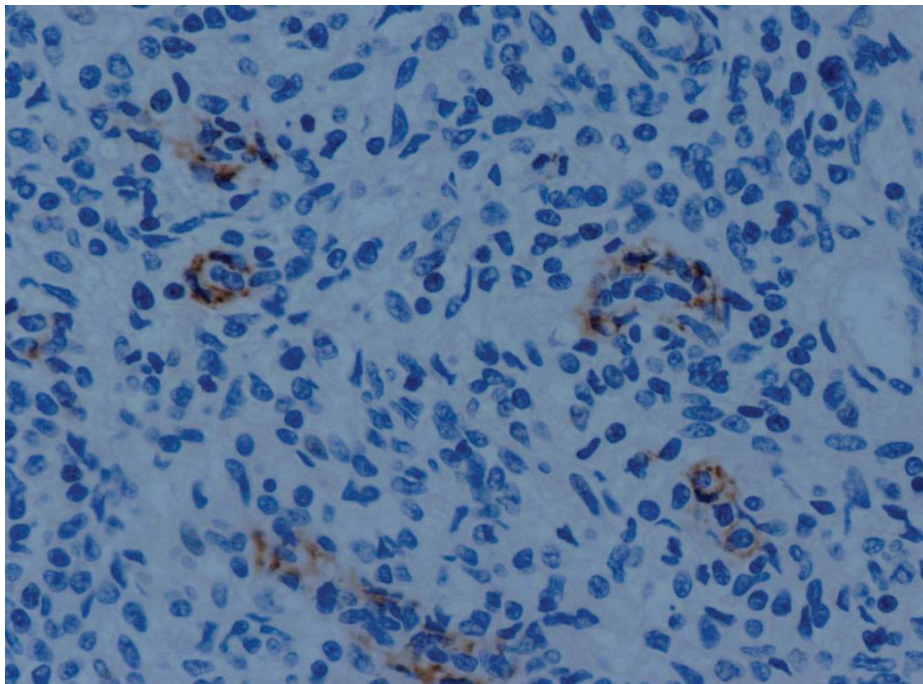


**Εικόνα 34Β. E-Cadherin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Cadherin σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

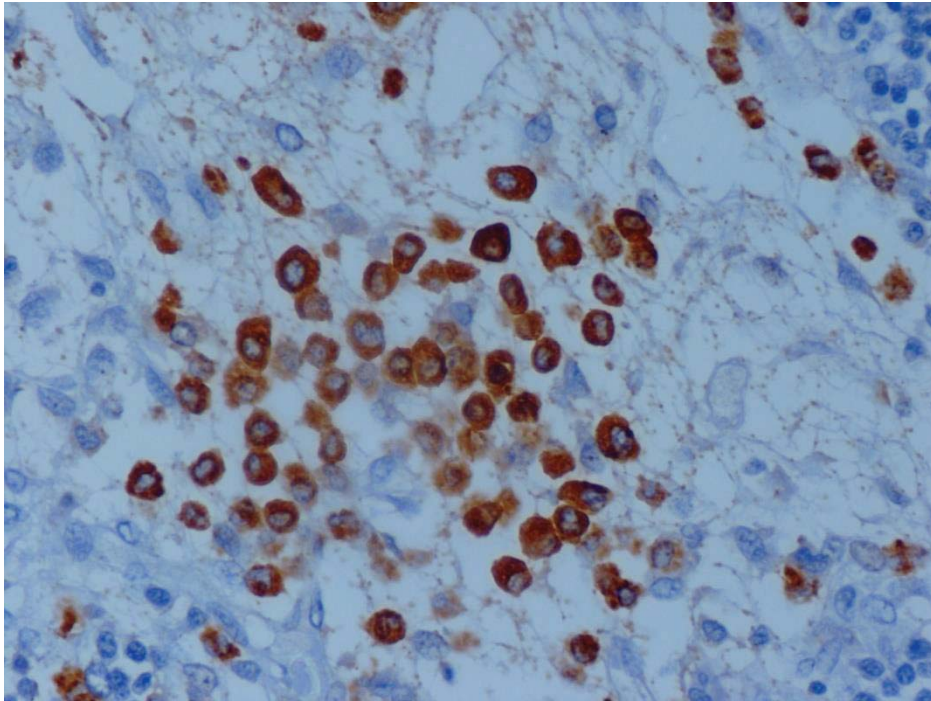




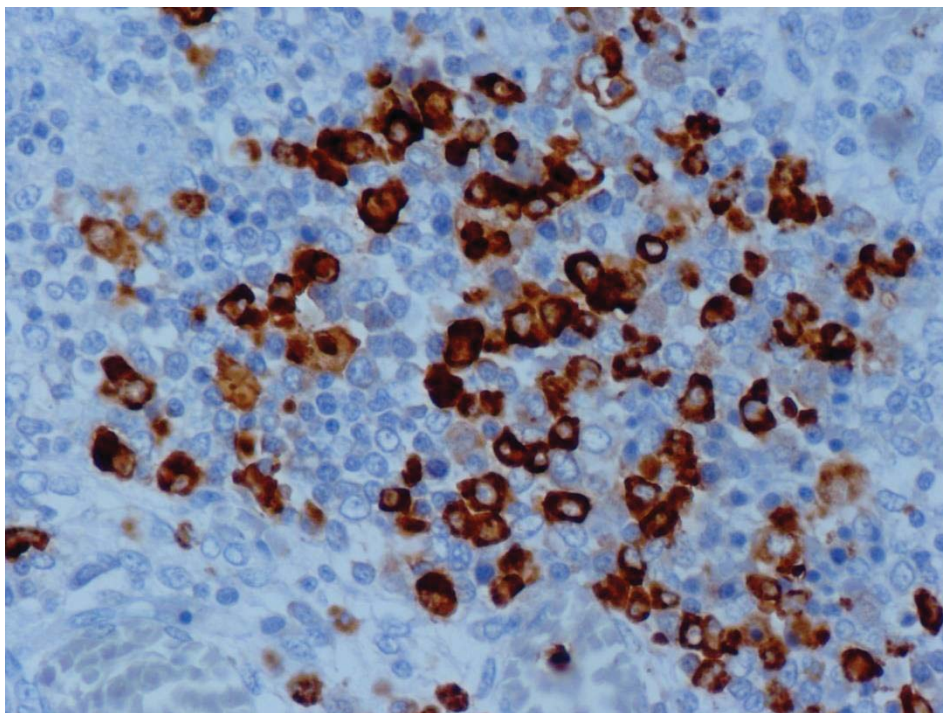
**Εικόνα 35Α. E-Selectin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Selectin σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).



**Εικόνα 35Β. E-Selectin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Selectin σε σπλήνα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

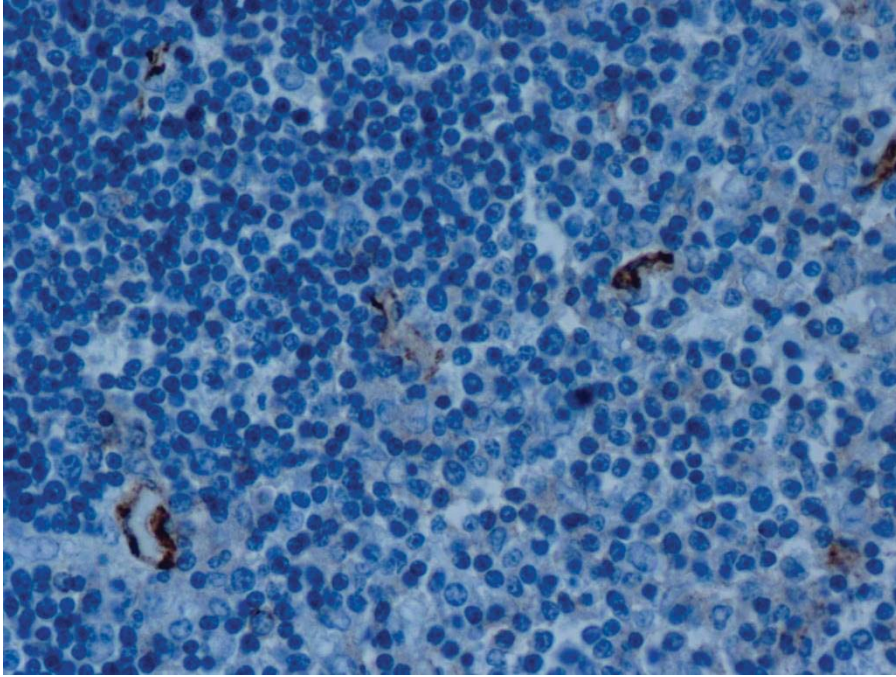


**Εικόνα 36A. Glycophorin C X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την Glycophorin C σε θύμο αδένα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (αρχή 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

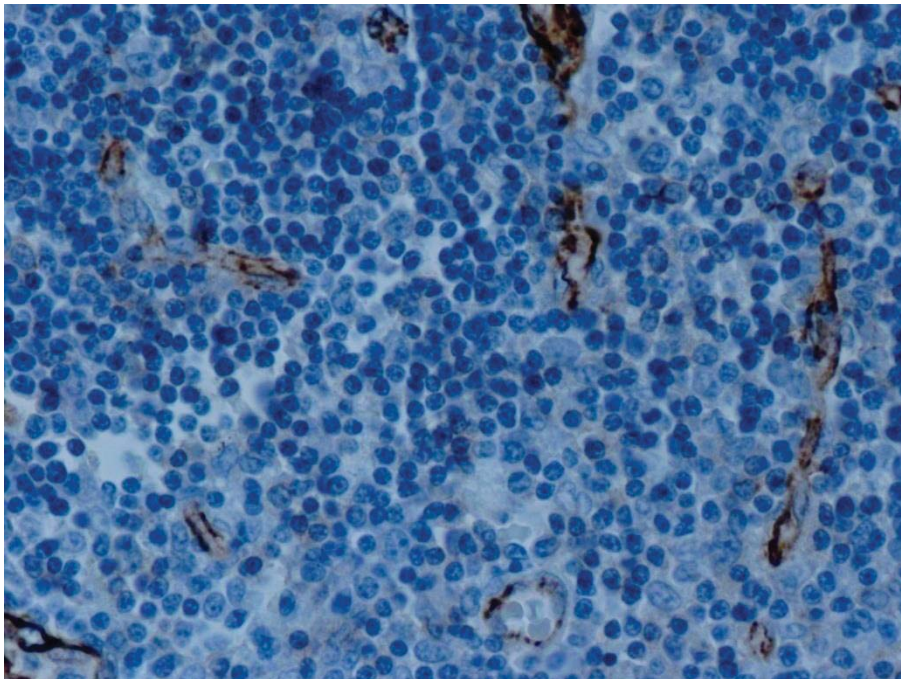


**Εικόνα 36B. Glycophorin C X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την Glycophorin C σε θύμο αδένα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

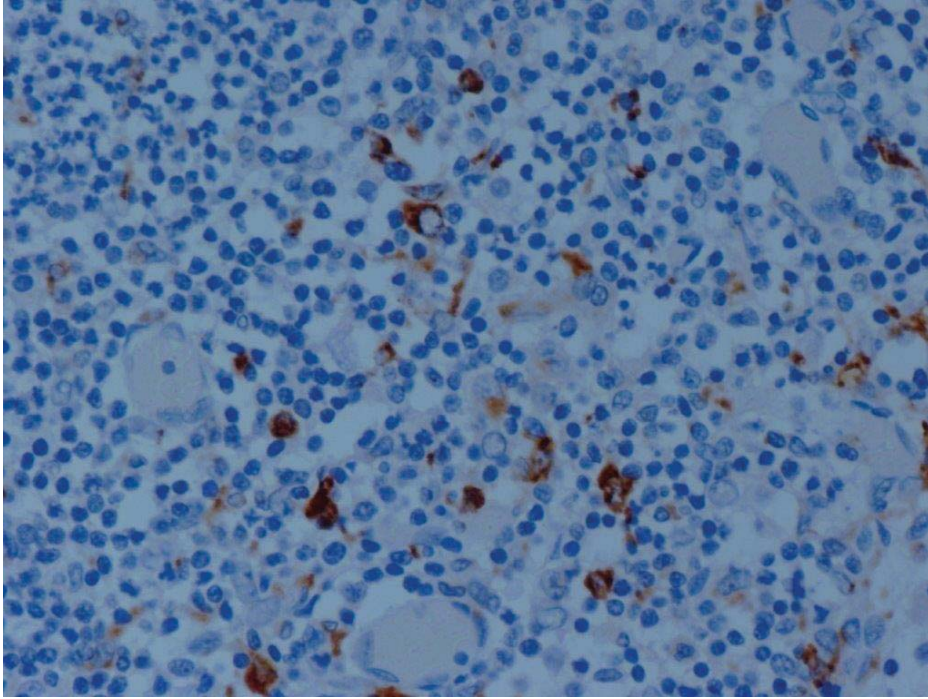




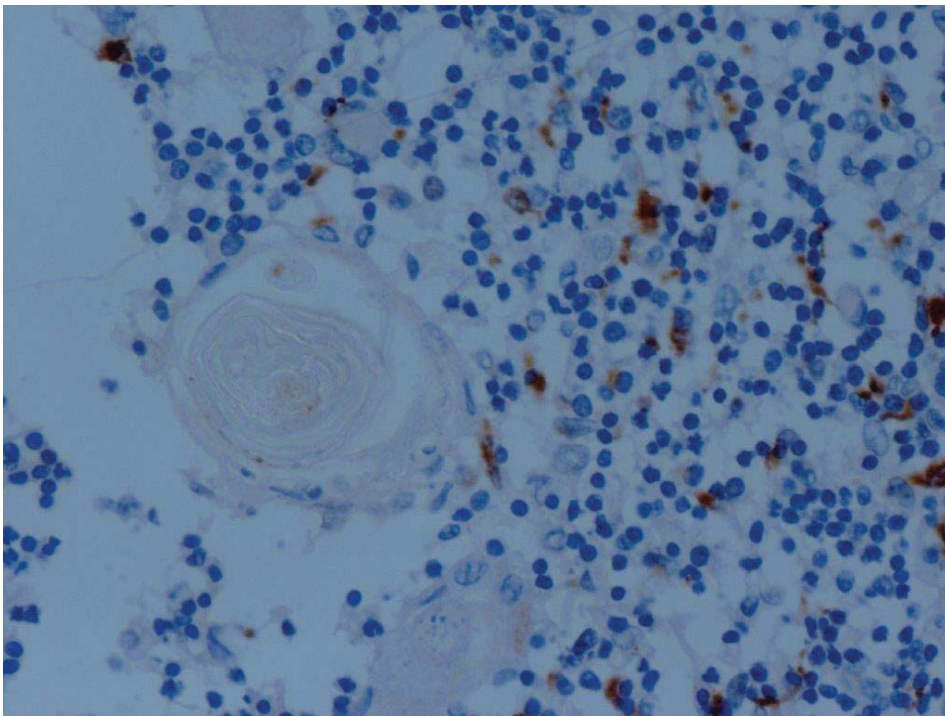
**Εικόνα 37Α. CD34 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD34 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (αρχή 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).



**Εικόνα 37Β. CD34 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD34 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου (αρχή 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 13<sup>η</sup> - 16<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

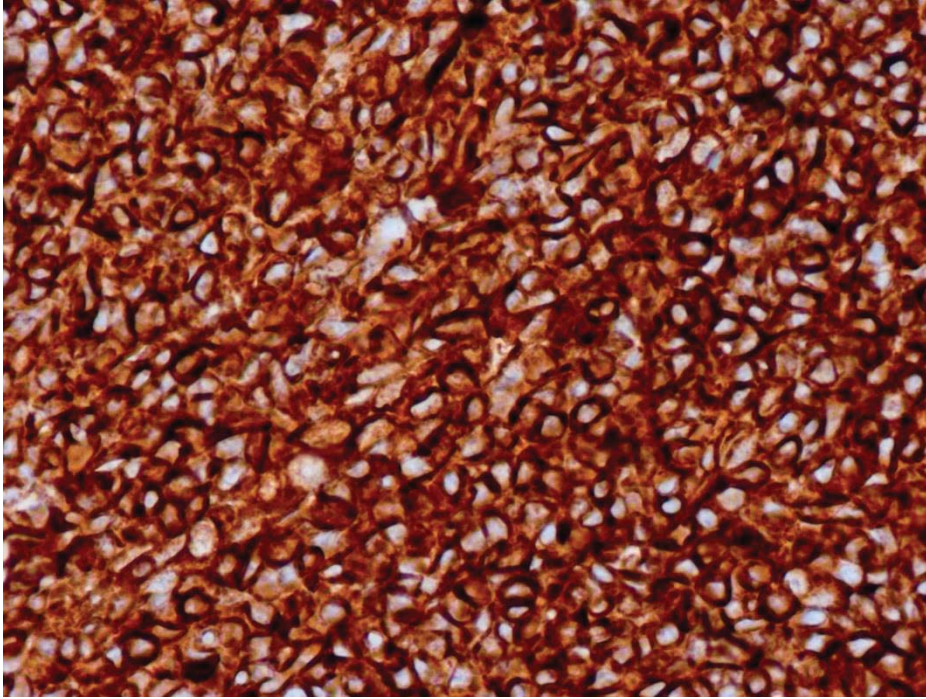


**Εικόνα 38Α. CD68 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD68 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

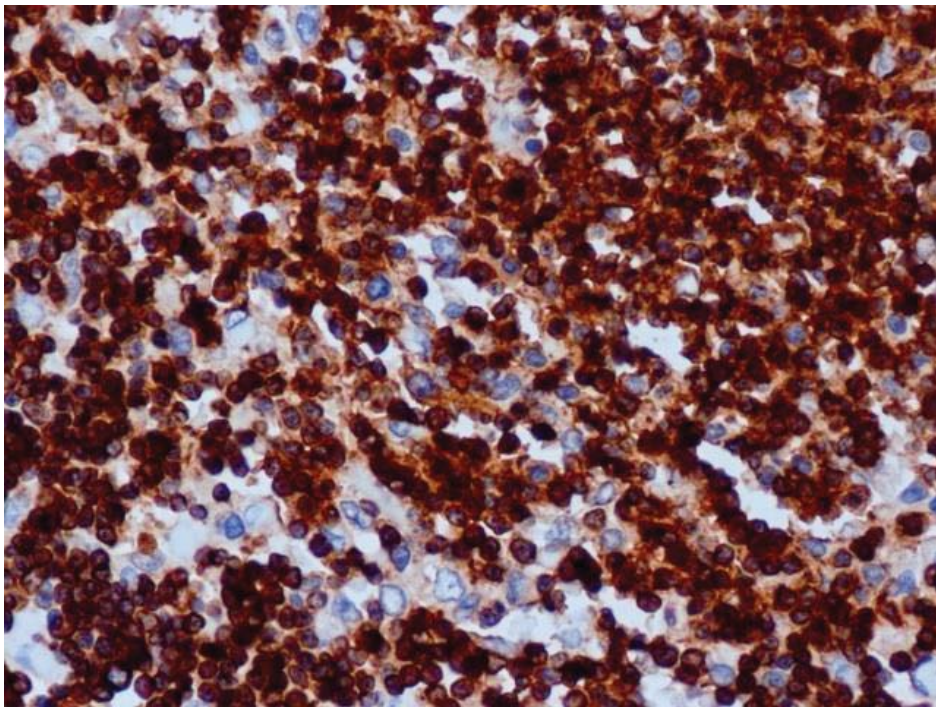


**Εικόνα 38Β. CD68 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD68 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.



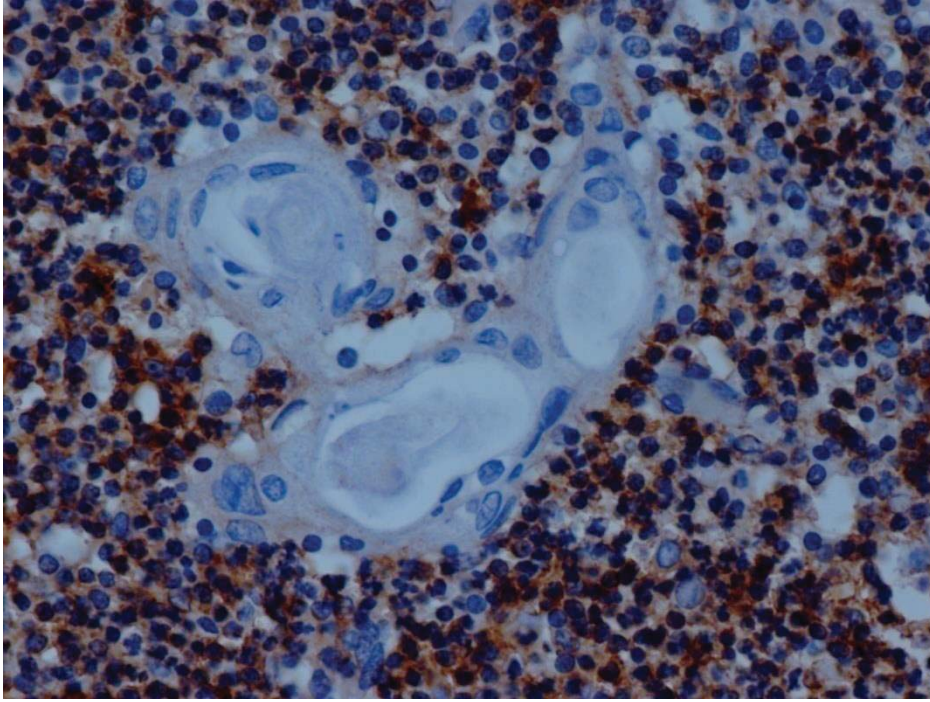


**Εικόνα 39Α. CD3 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD3 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

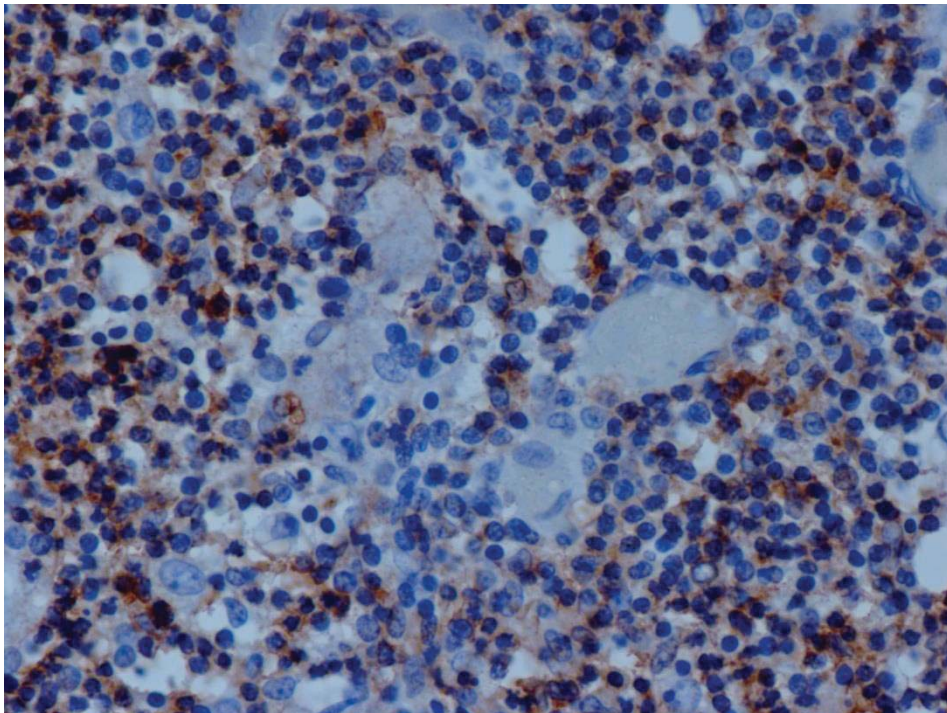


**Εικόνα 39Β. CD3 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD3 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.



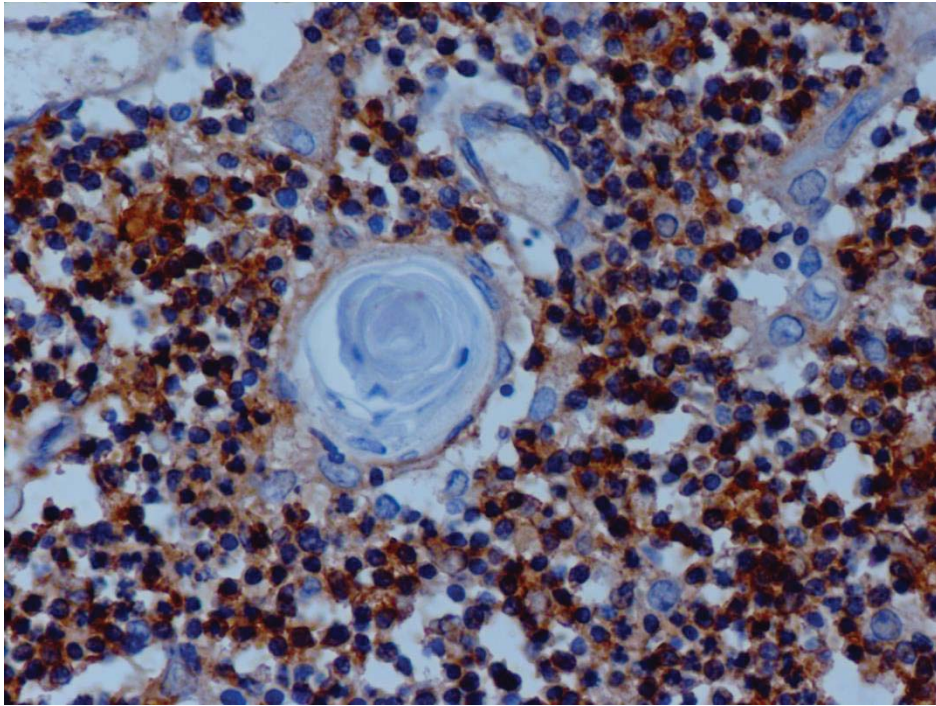


**Εικόνα 40Α. CD8 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD8 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

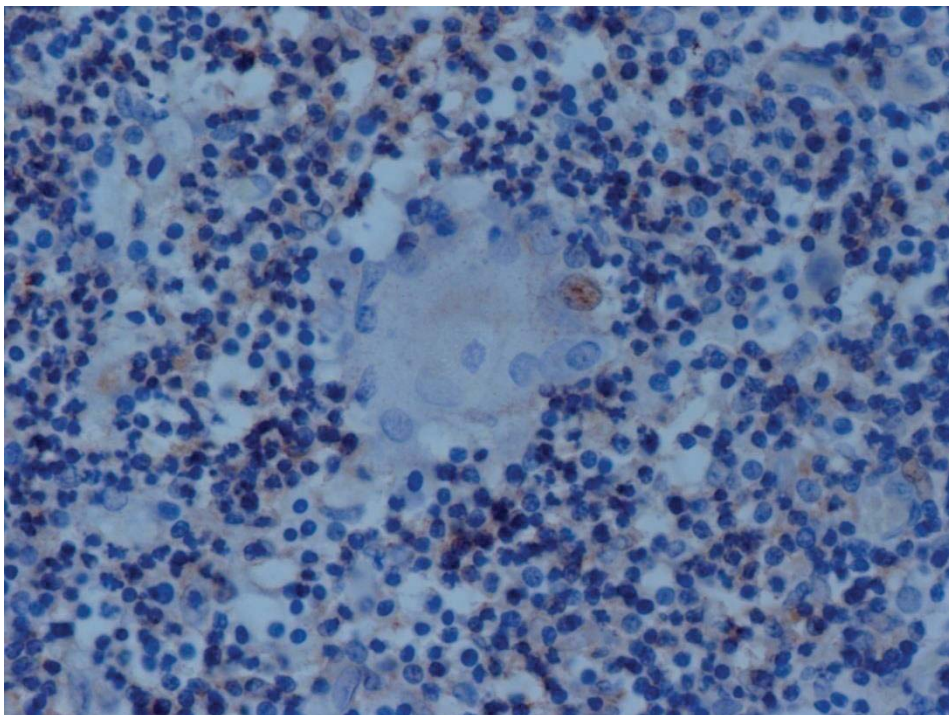


**Εικόνα 40Β. CD8 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD8 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.



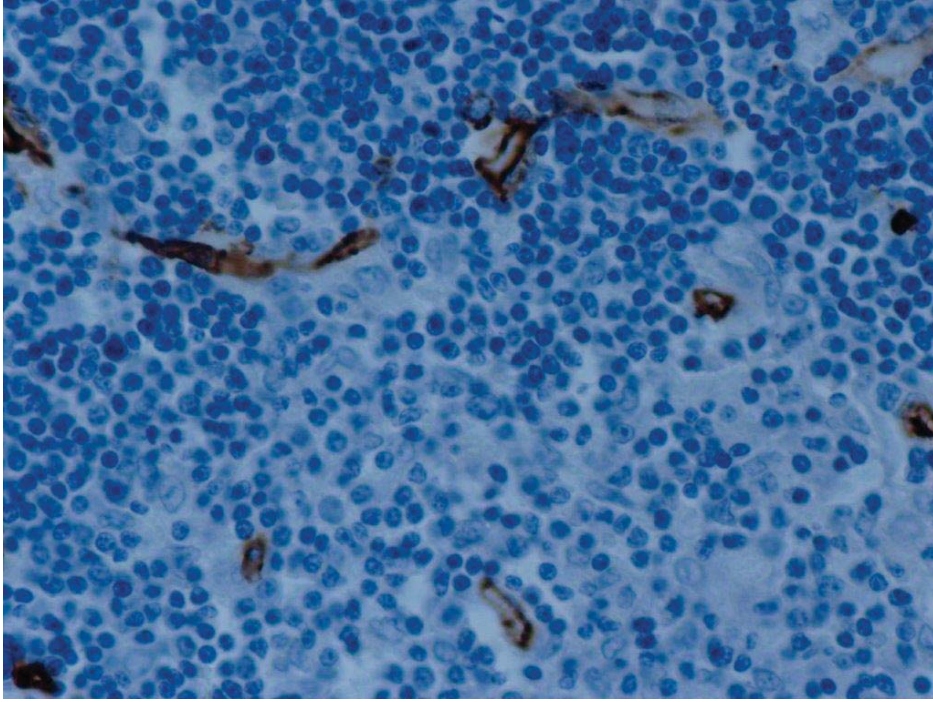


**Εικόνα 41Α. CD44 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD44 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

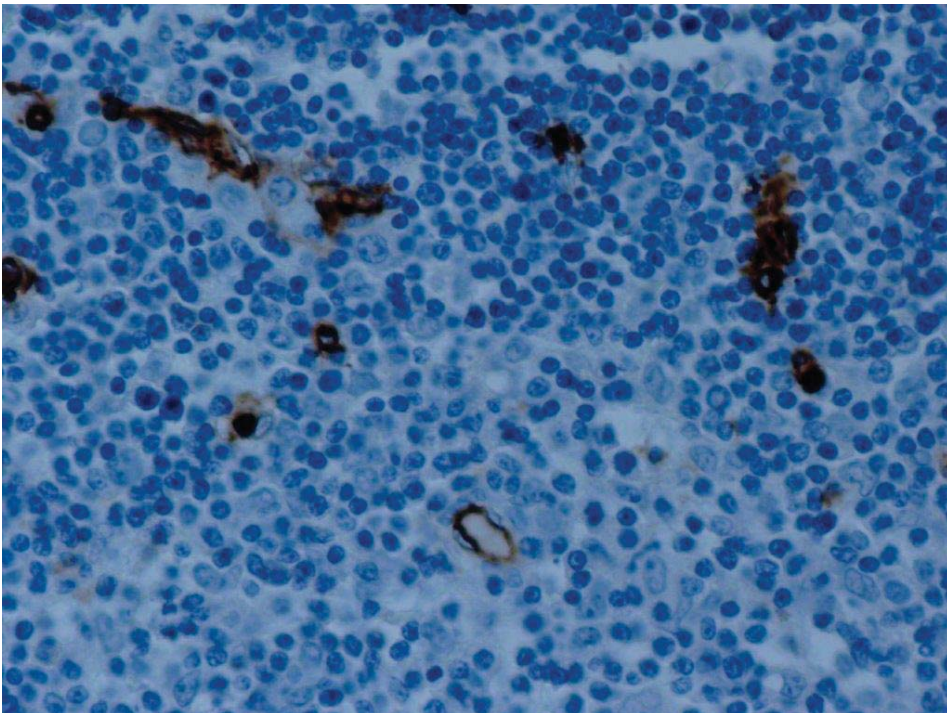


**Εικόνα 41Β. CD44 X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για το CD44 σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.



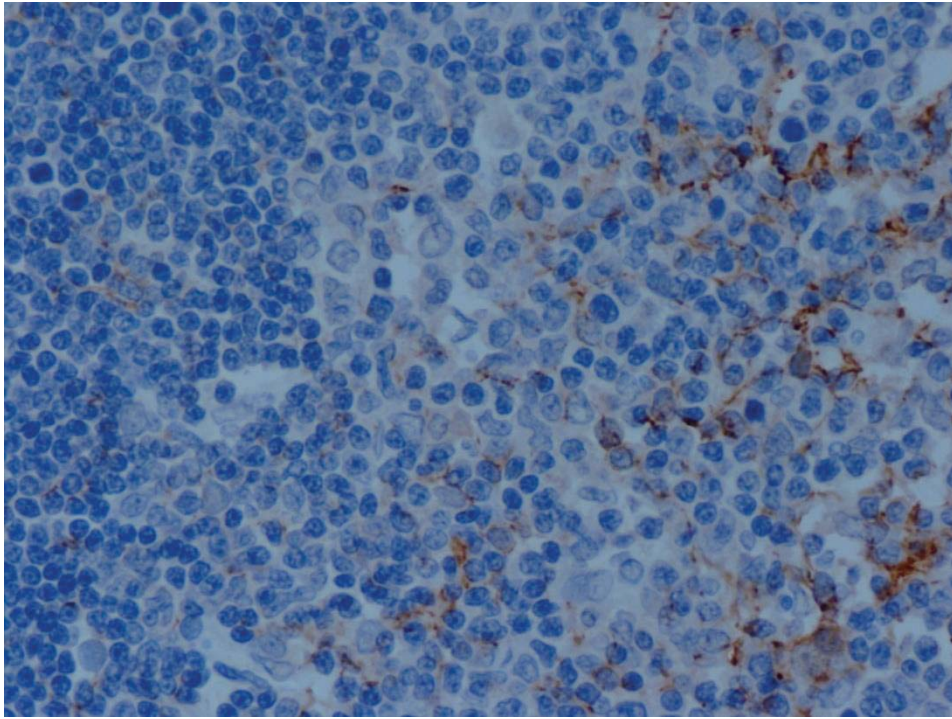


**Εικόνα 42Α. E-Cadherin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Cadherin σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης).

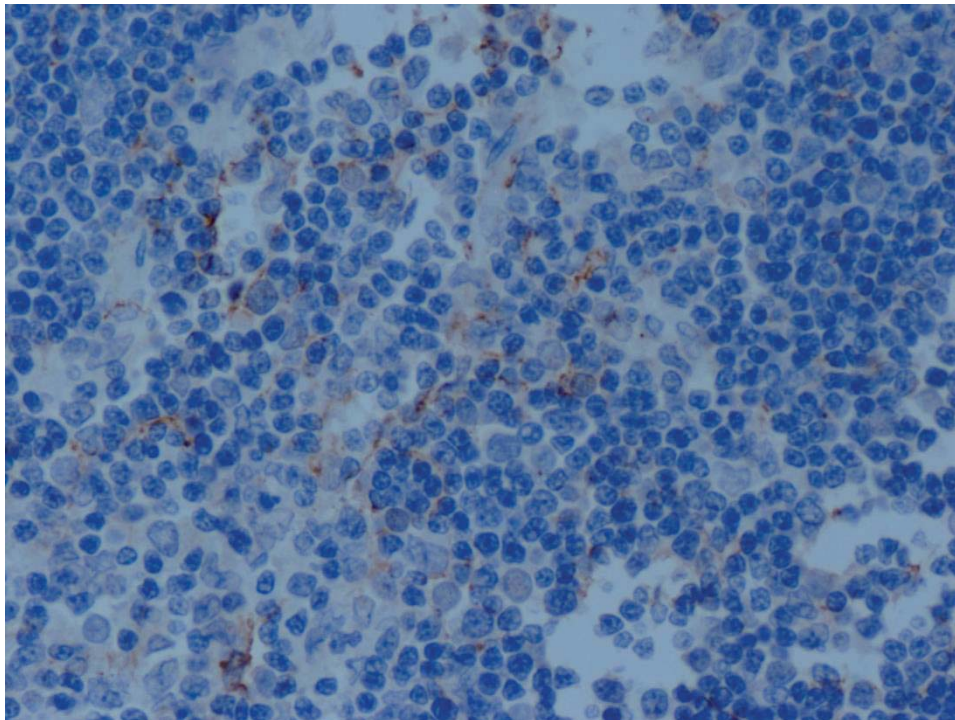


**Εικόνα 42Β. E-Cadherin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Cadherin σε θύμο αδένι ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.



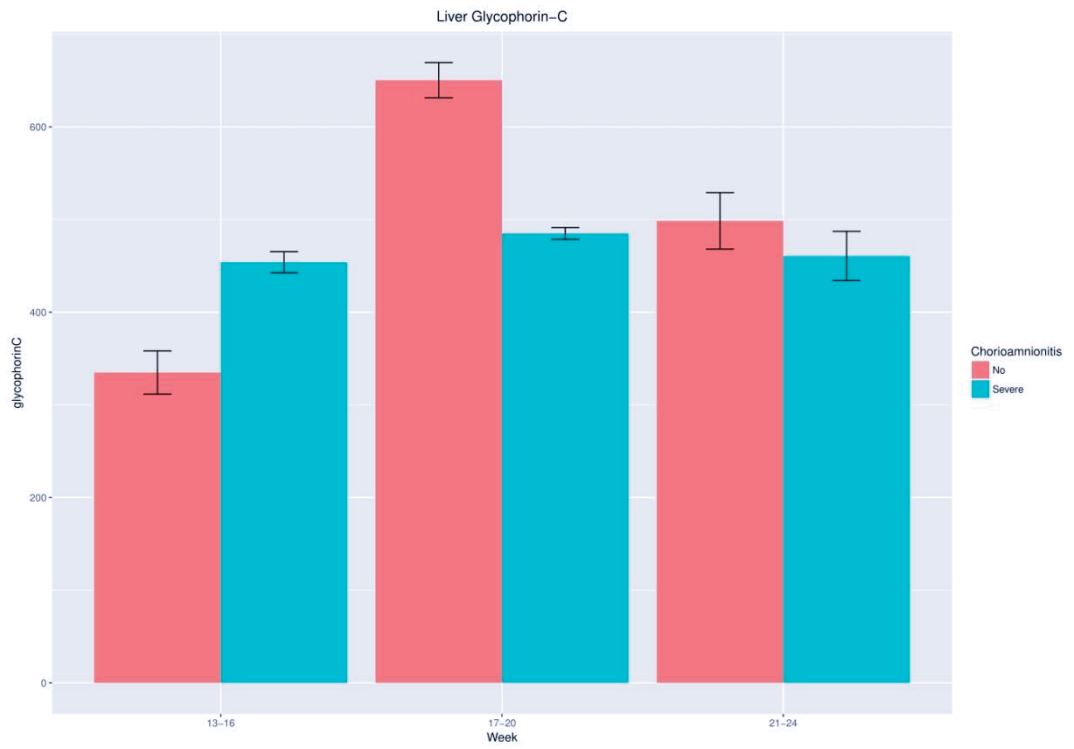


**Εικόνα 43Α. E-Selectin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Selectin σε θύμο αδένα ανθρώπινου εμβρύου της ομάδας μαρτύρων (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης).

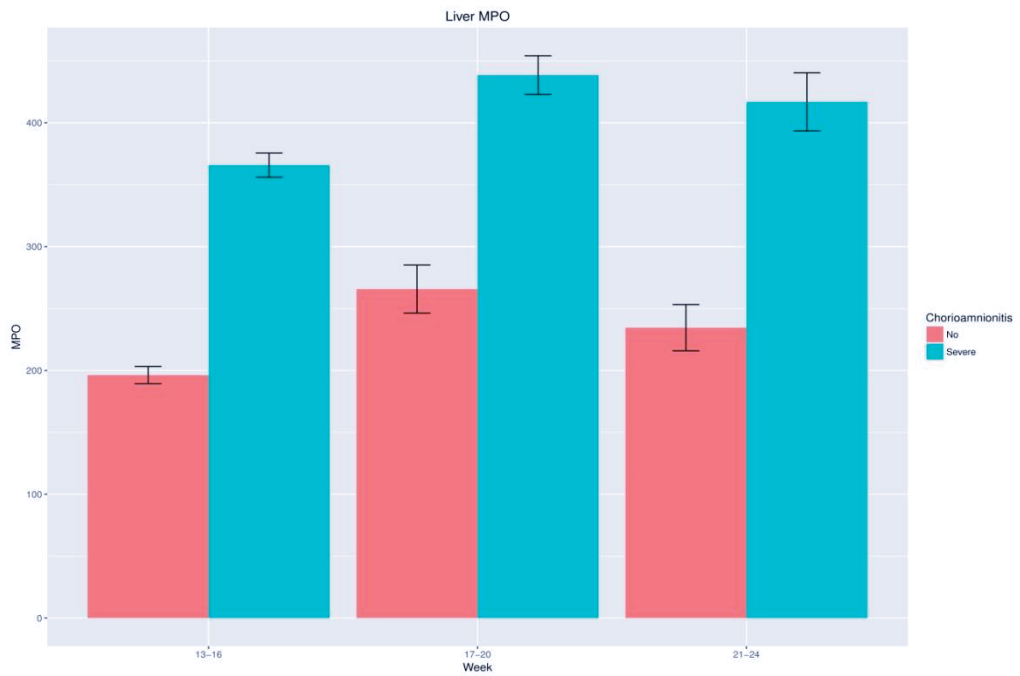


**Εικόνα 43Β. E-Selectin X400.** Αντιπροσωπευτική ανοσοιστοχημική χρώση για την E-Selectin σε θύμο αδένα ανθρώπινου εμβρύου (μέσο 2<sup>ου</sup> τριμήνου, 17<sup>η</sup> - 20<sup>η</sup> εβδομάδα εμβρυϊκής ανάπτυξης) με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας.

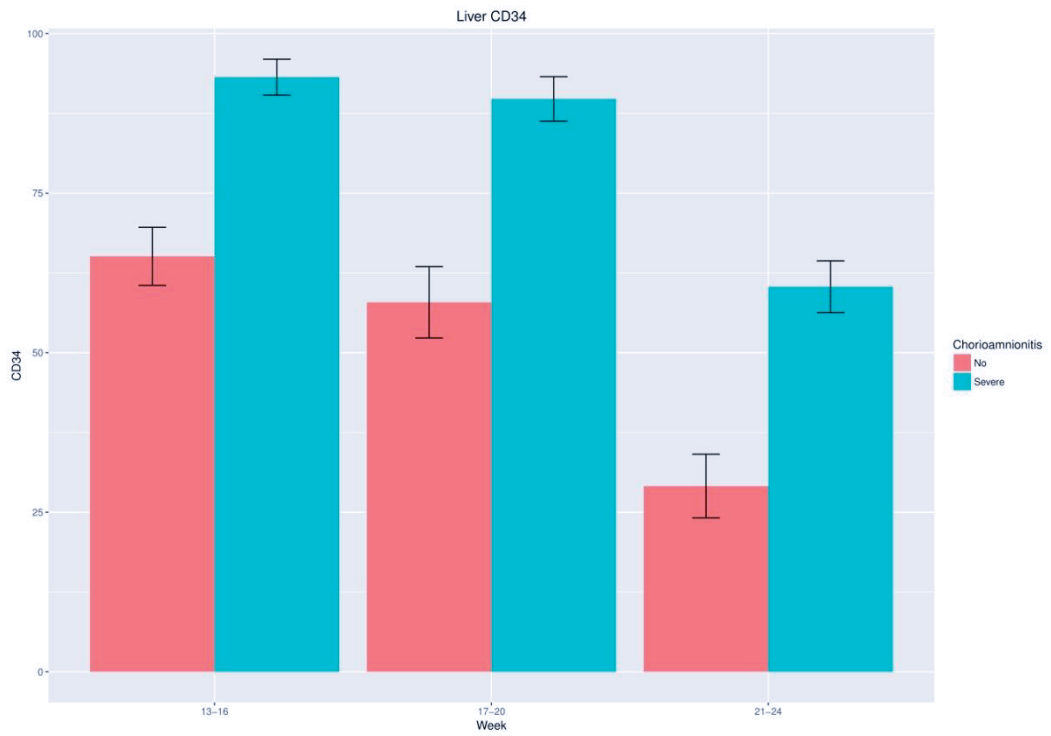
## ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ



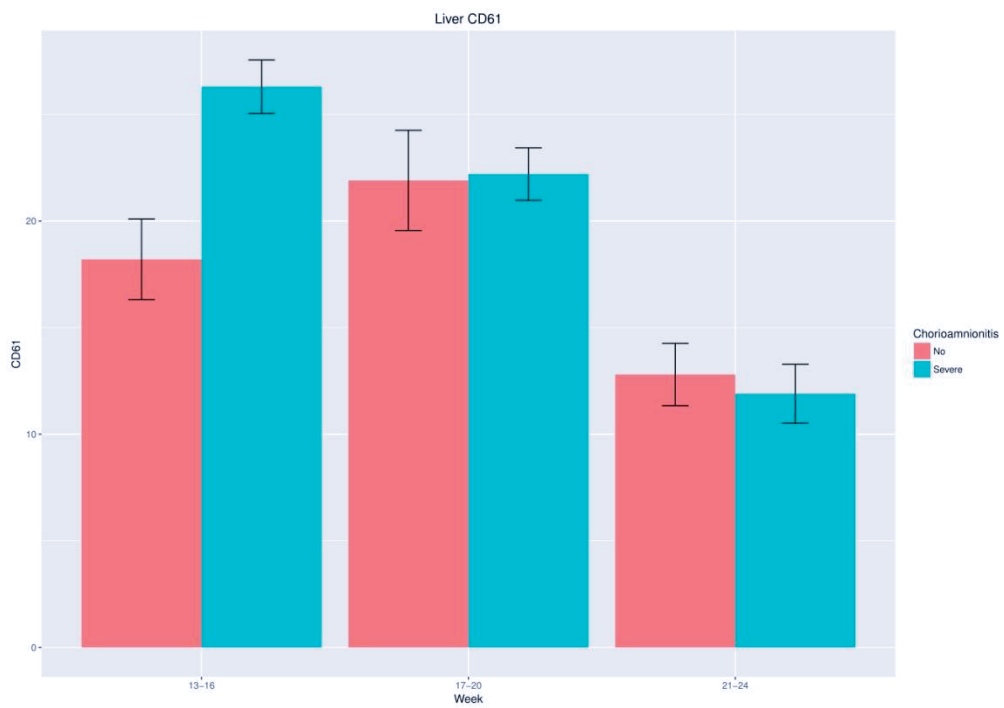
## ΓΡΑΦΗΜΑ 1.



## ΓΡΑΦΗΜΑ 2

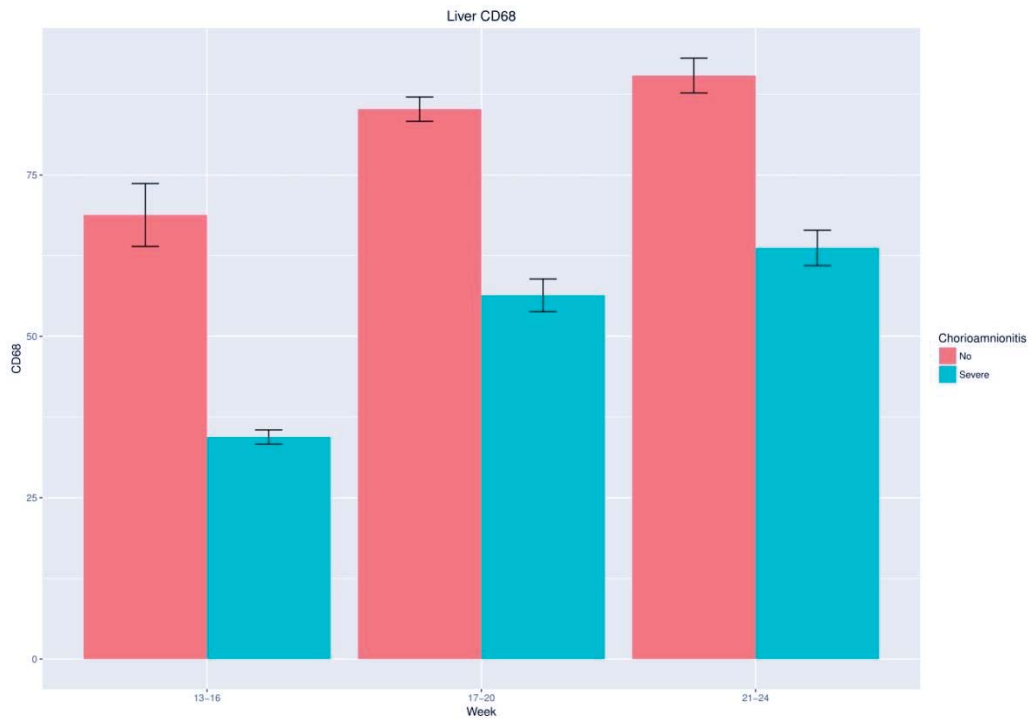


ΓΡΑΦΗΜΑ 3

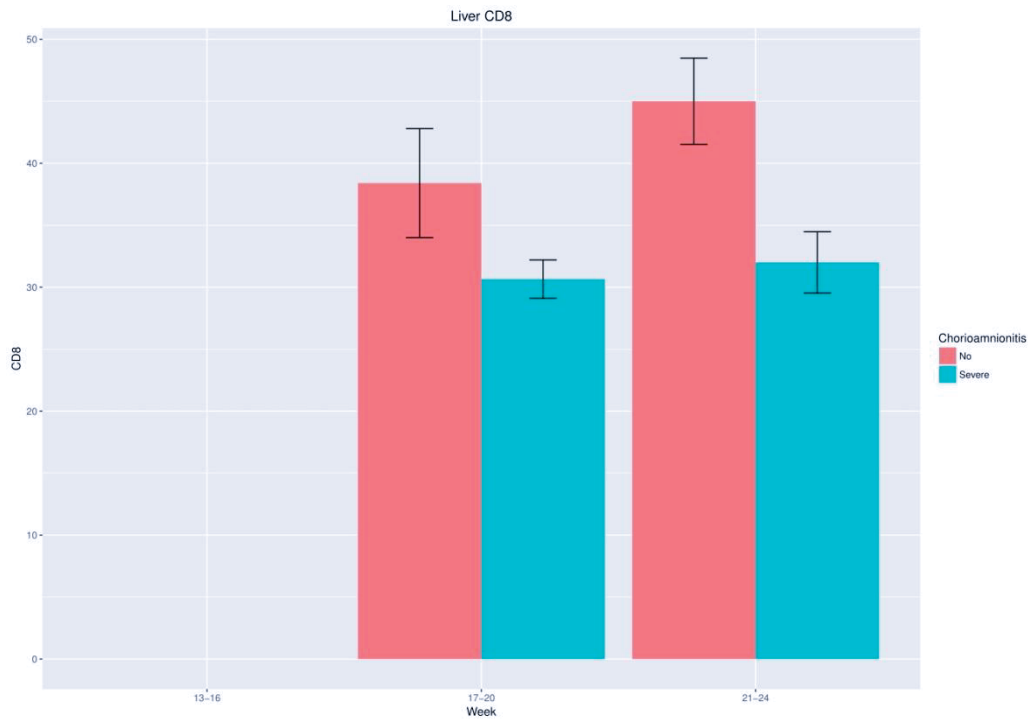


ΓΡΑΦΗΜΑ 4

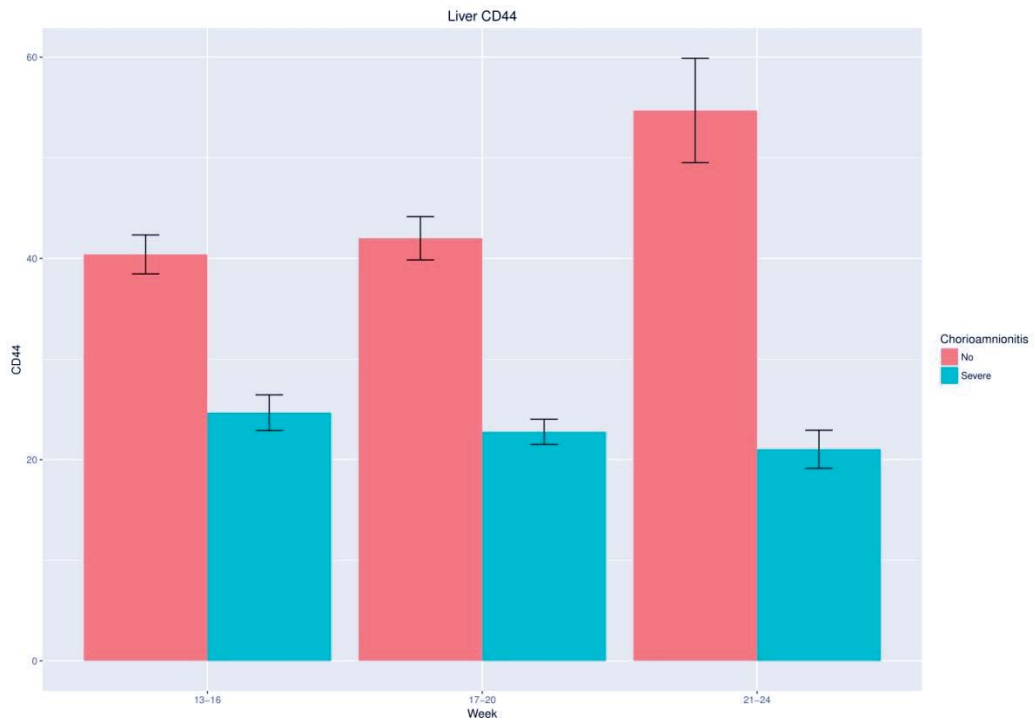




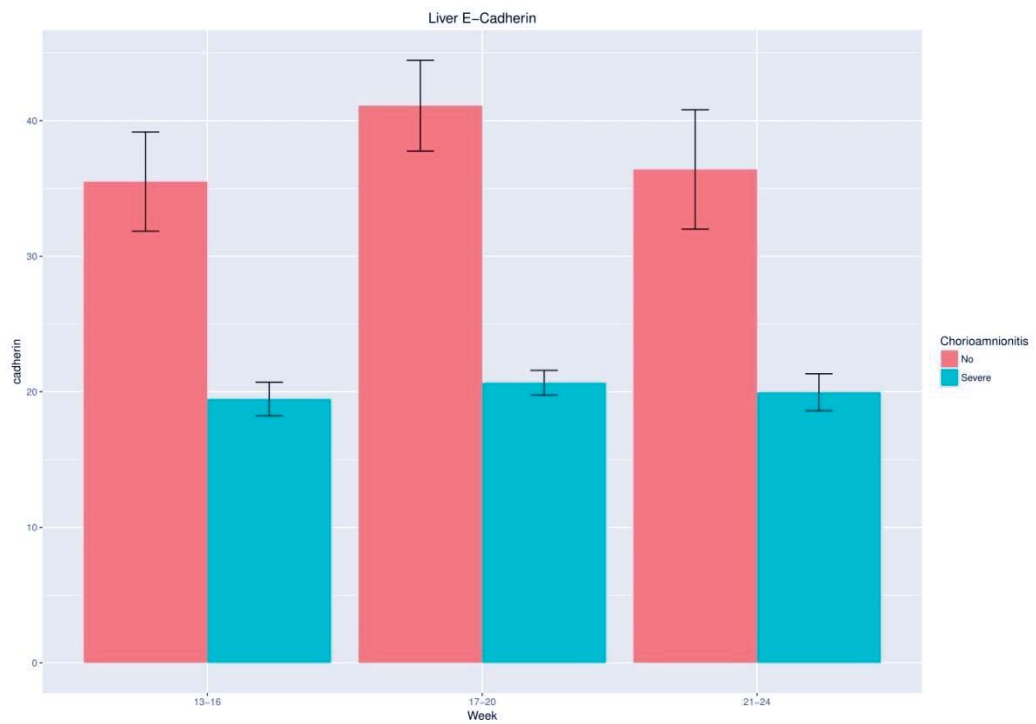
ГРАФΗΜΑ 5



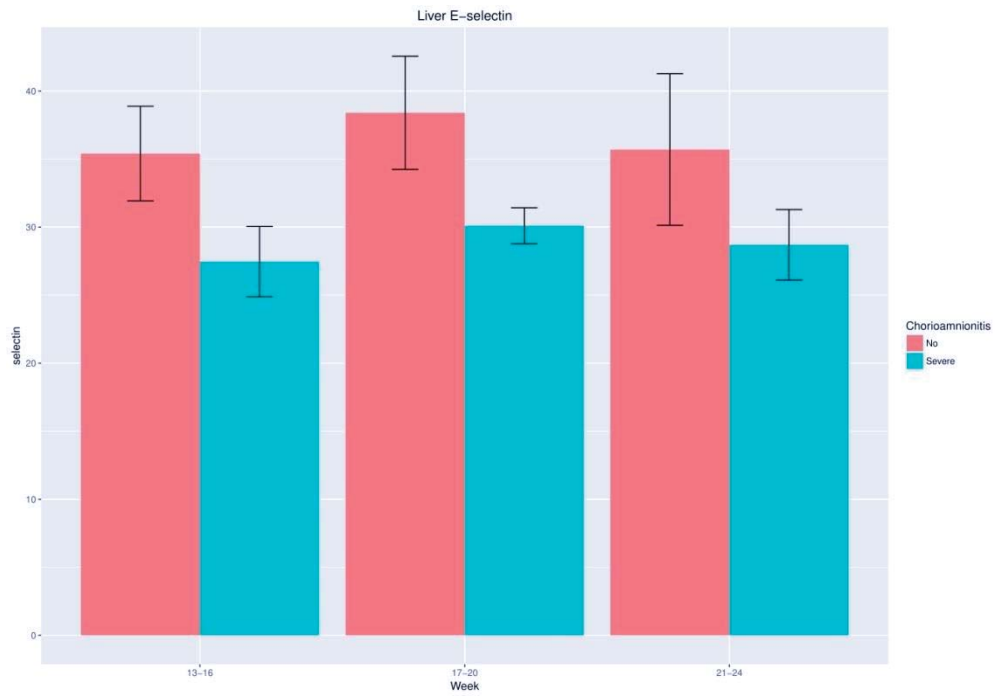
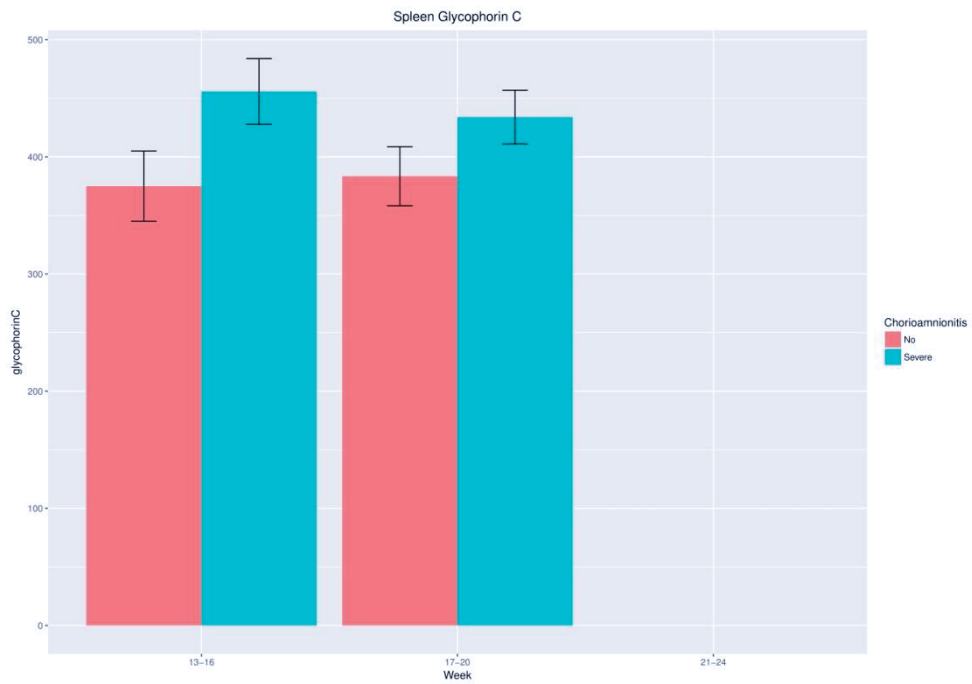
ГРАФΗΜΑ 6

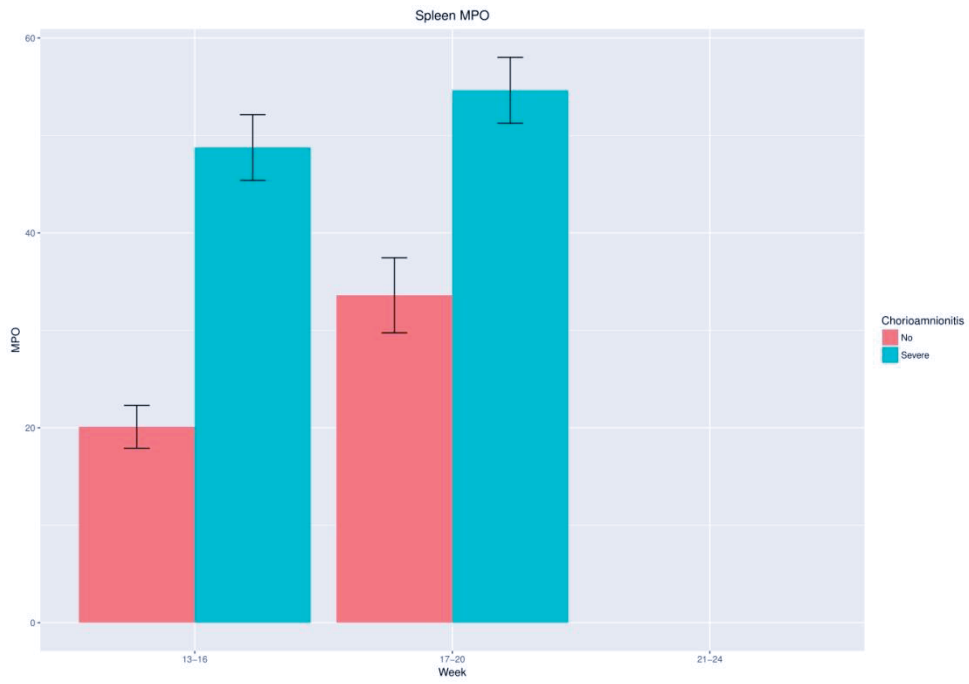


ΓΡΑΦΗΜΑ 7

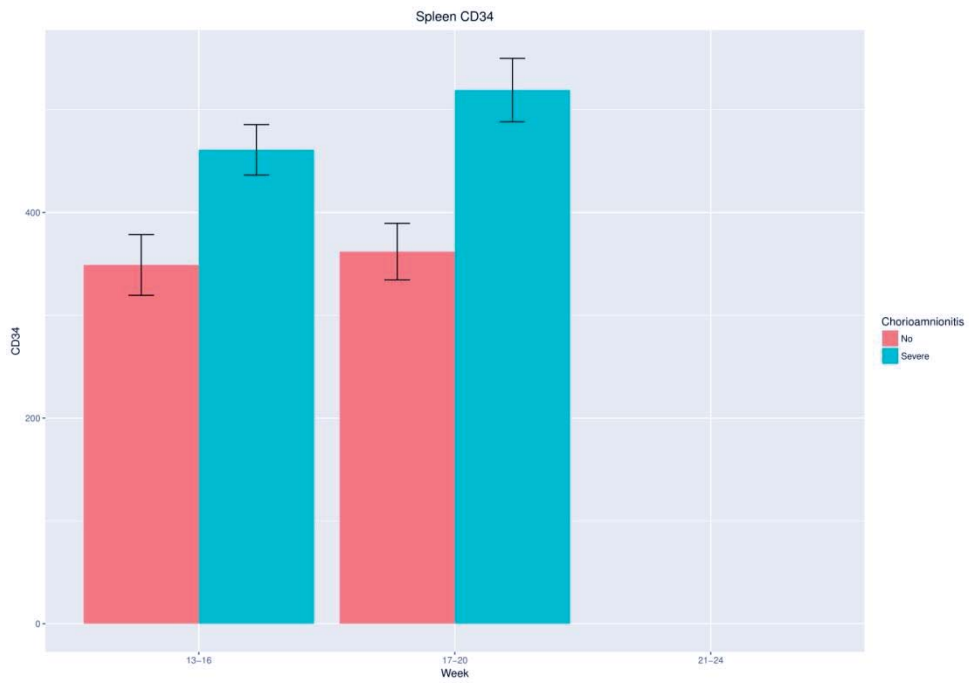


ΓΡΑΦΗΜΑ 8

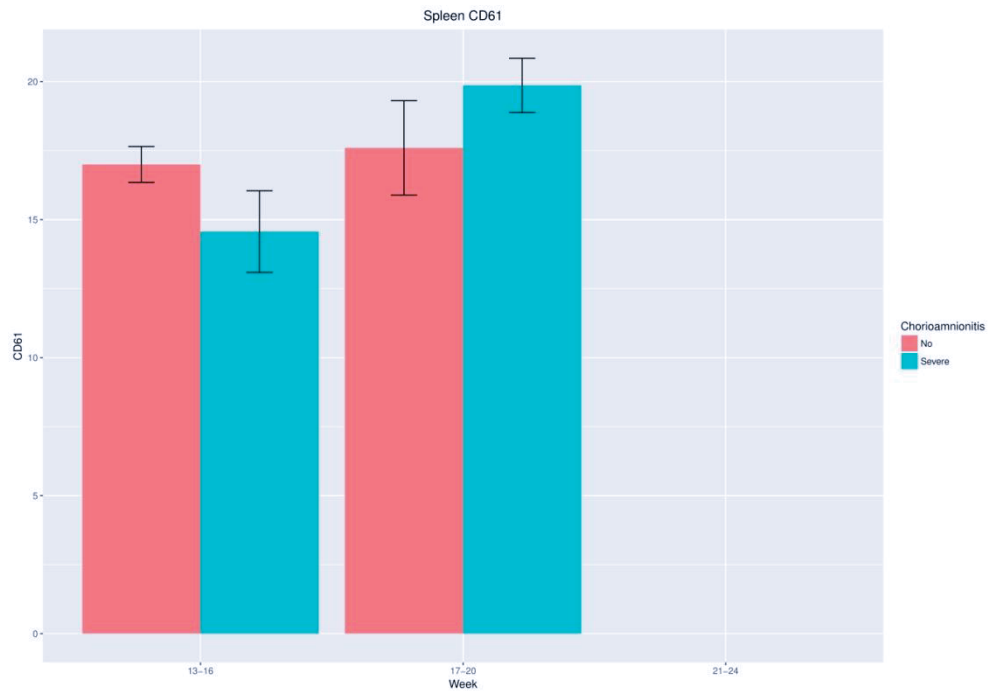
**ГРАФНМА 9****ГРАФНМА 10**



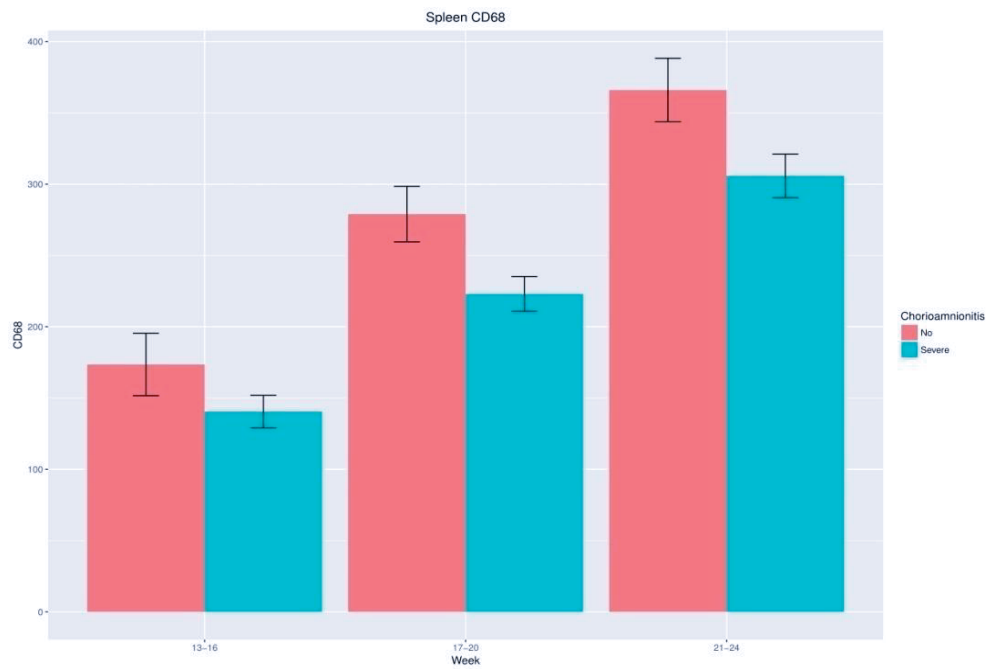
ΓΡΑΦΗΜΑ 11



ΓΡΑΦΗΜΑ 12

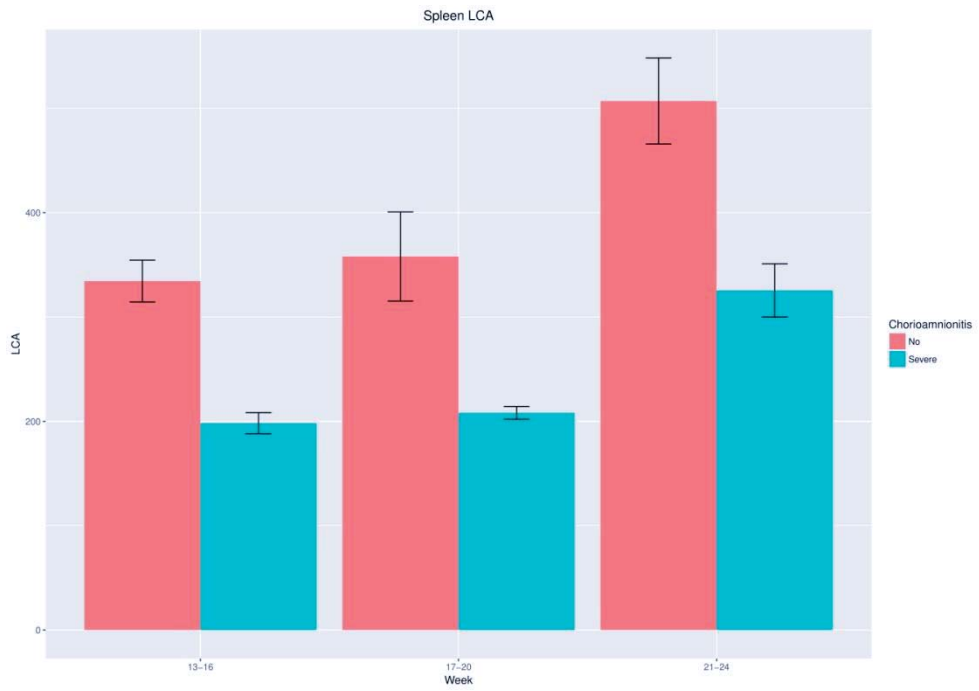


ΓΡΑΦΗΜΑ 13

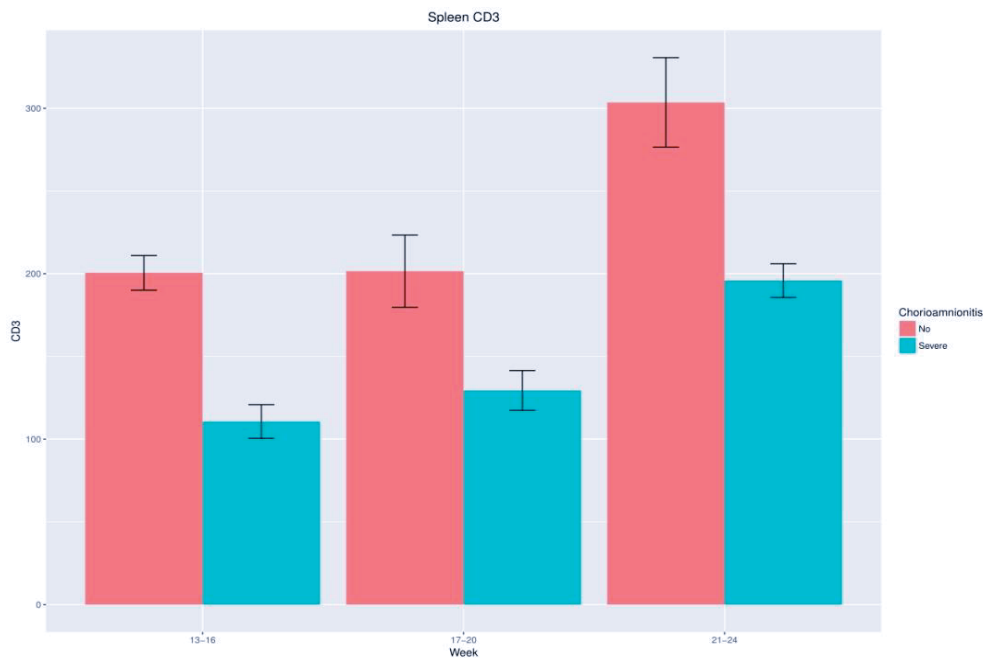


ΓΡΑΦΗΜΑ 14

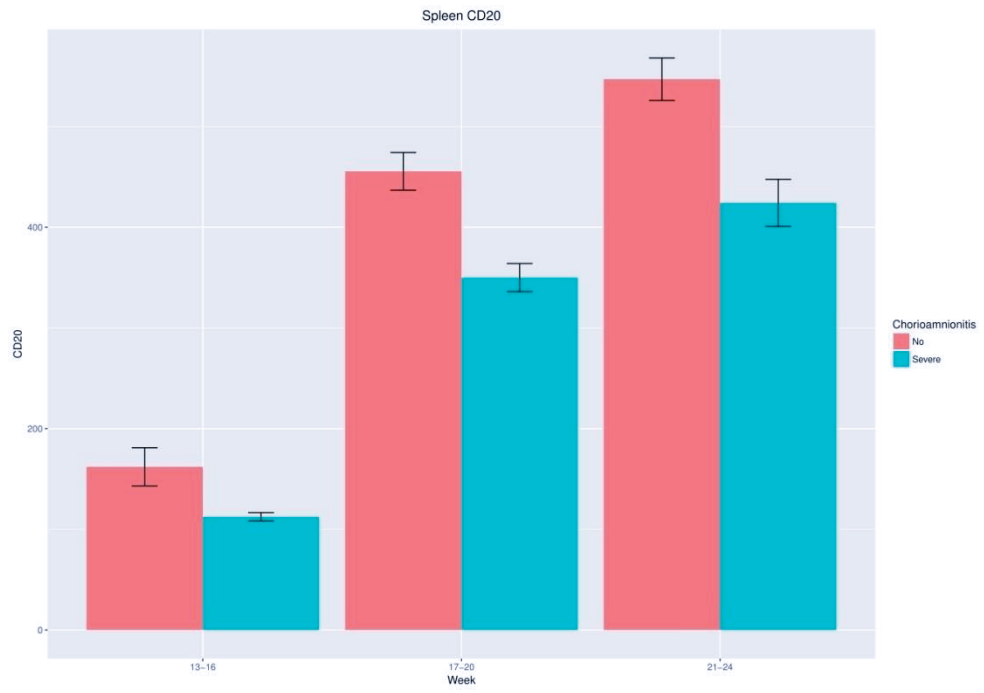




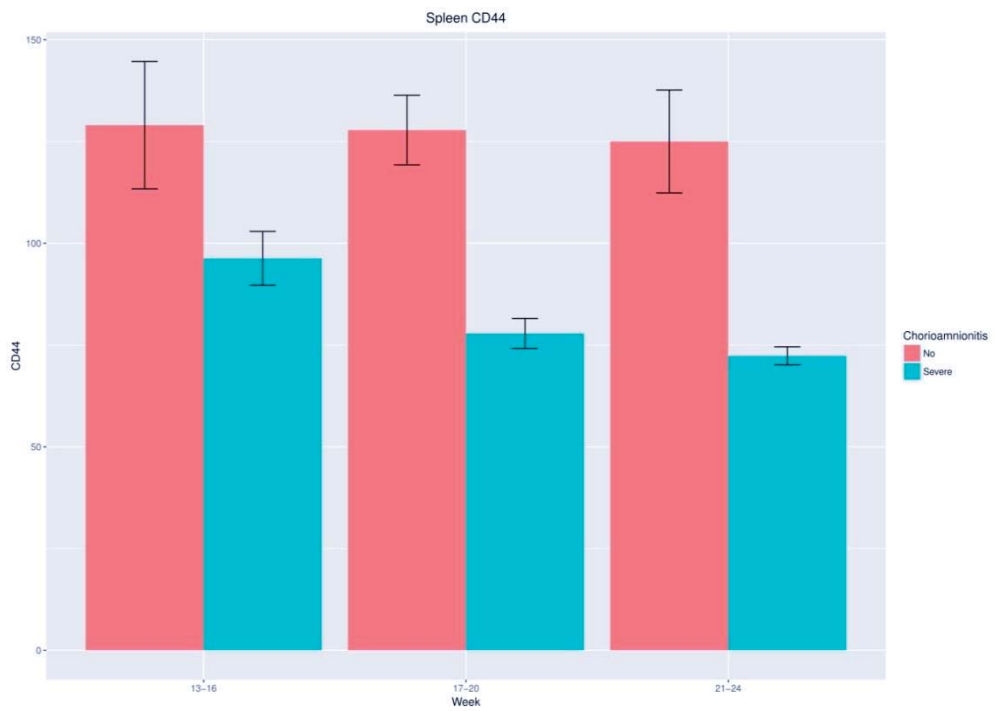
ΓΡΑΦΗΜΑ 15



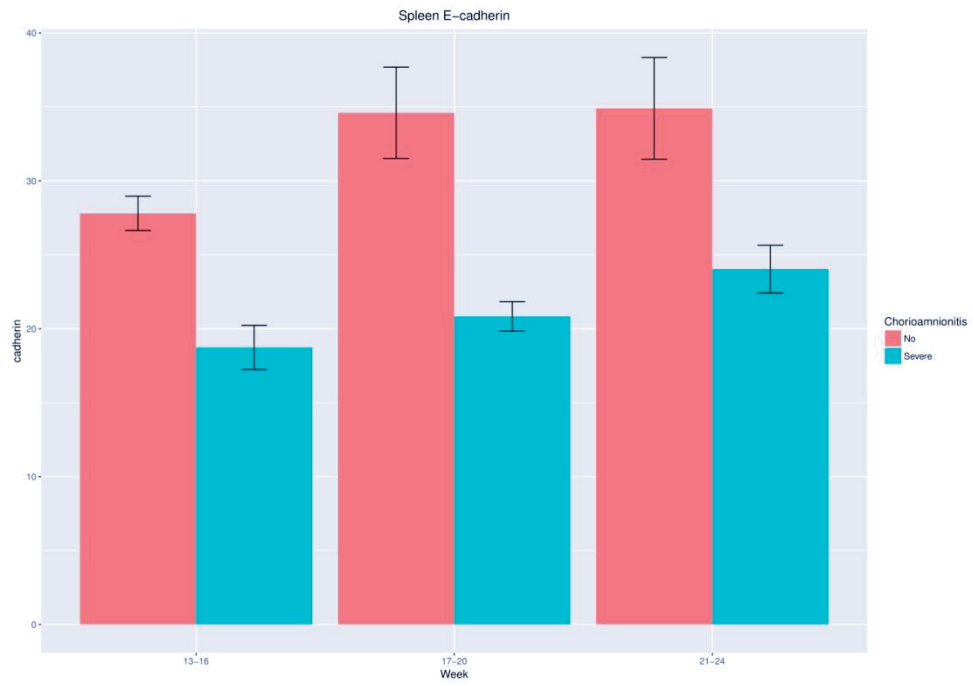
ΓΡΑΦΗΜΑ 16



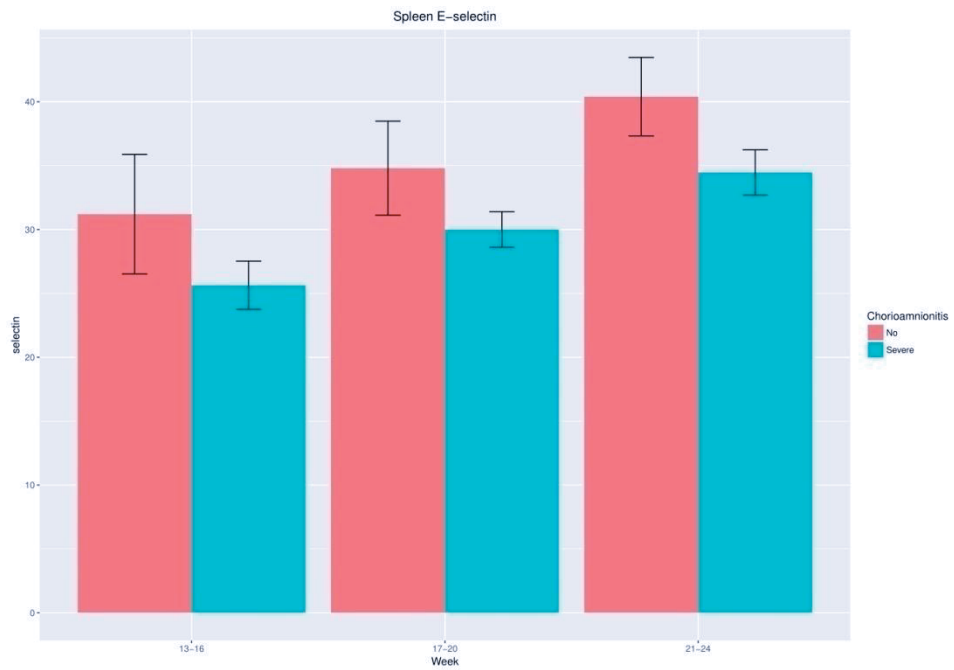
ΓΡΑΦΗΜΑ 17



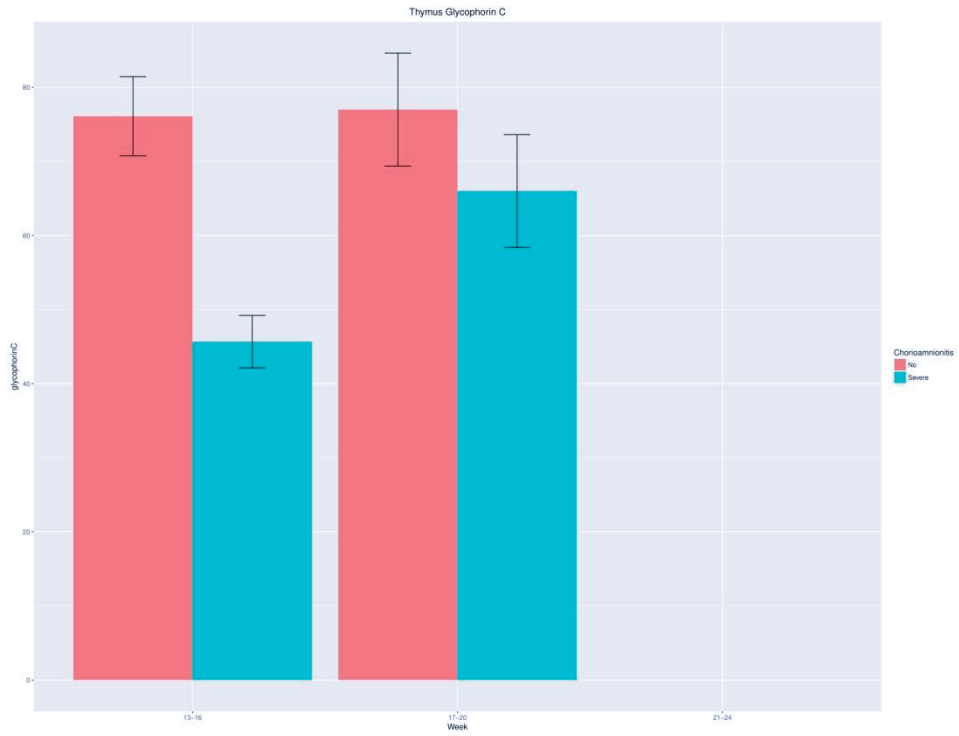
ΓΡΑΦΗΜΑ 18



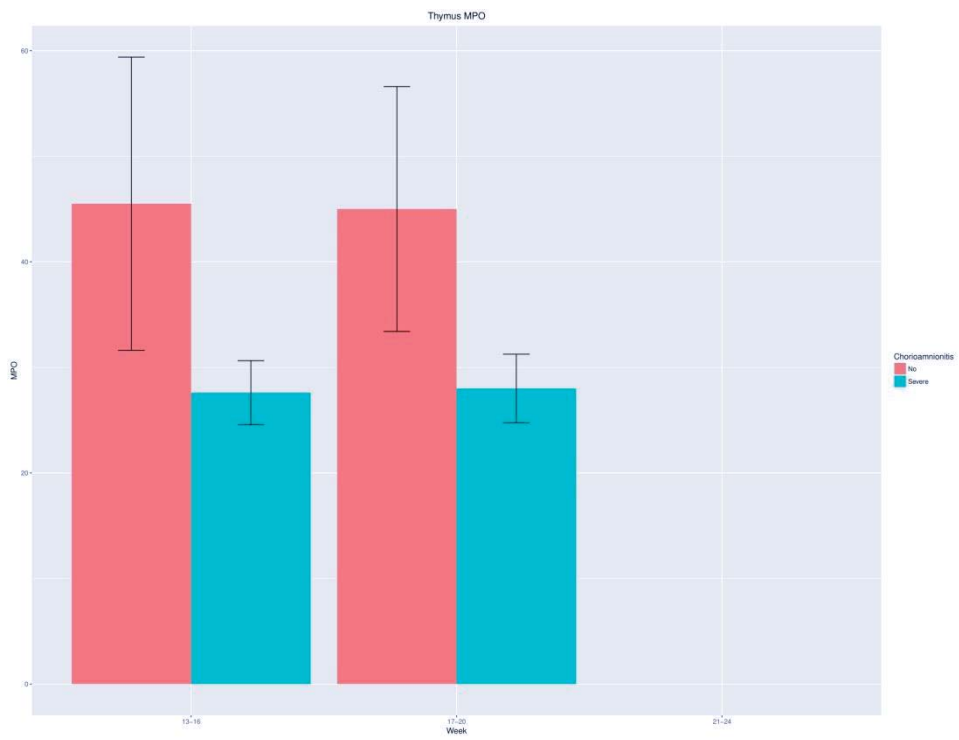
ΓΡΑΦΗΜΑ 19



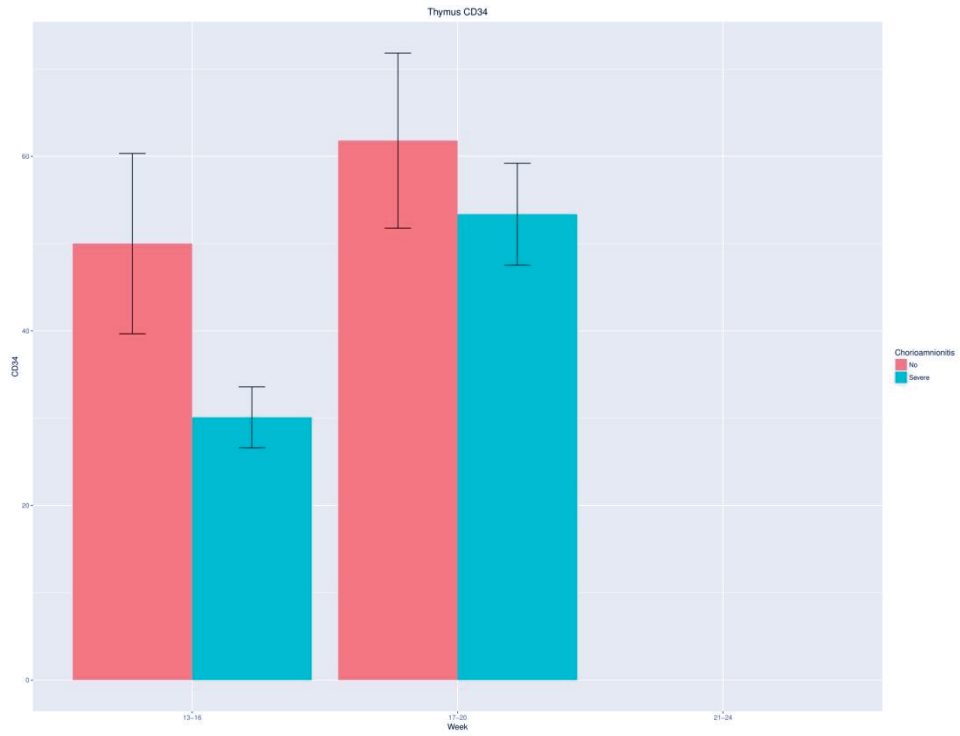
ΓΡΑΦΗΜΑ 20



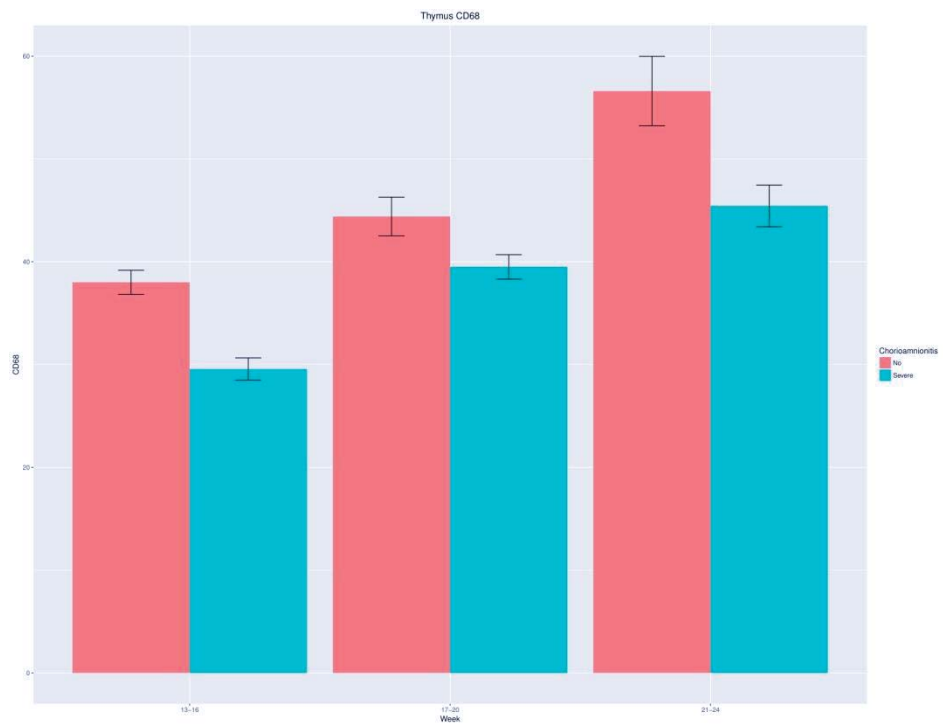
ΓΡΑΦΗΜΑ 21



ΓΡΑΦΗΜΑ 22

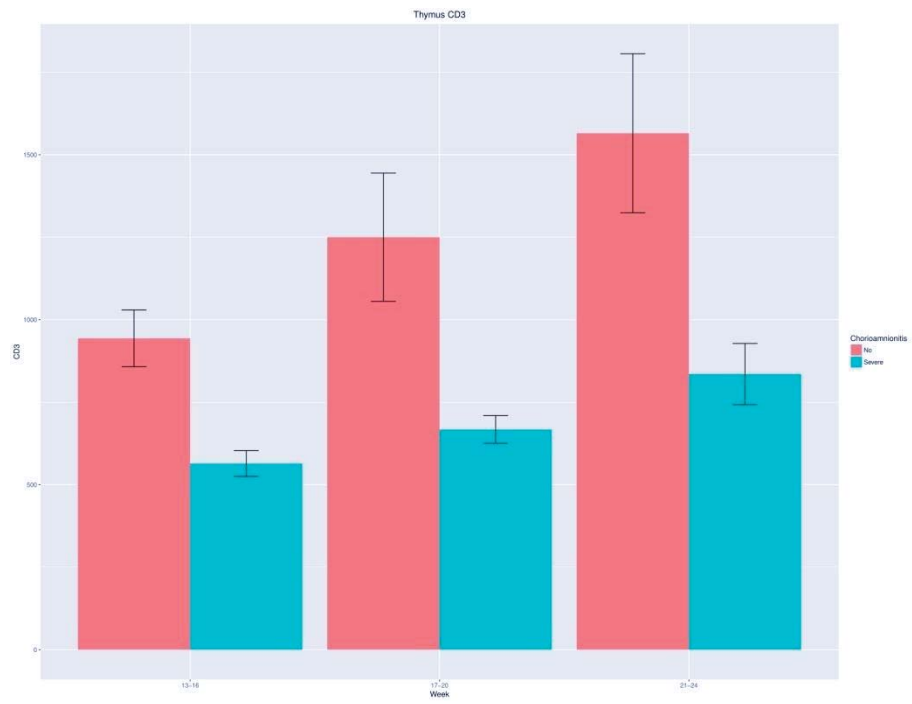


ΓΡΑΦΗΜΑ 23

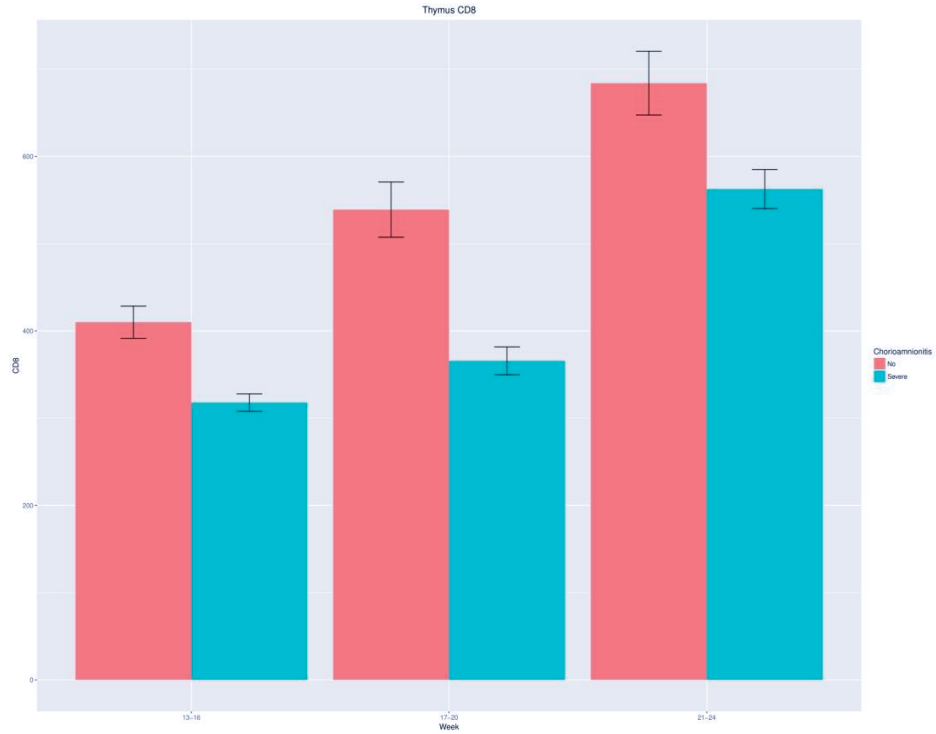


ΓΡΑΦΗΜΑ 24

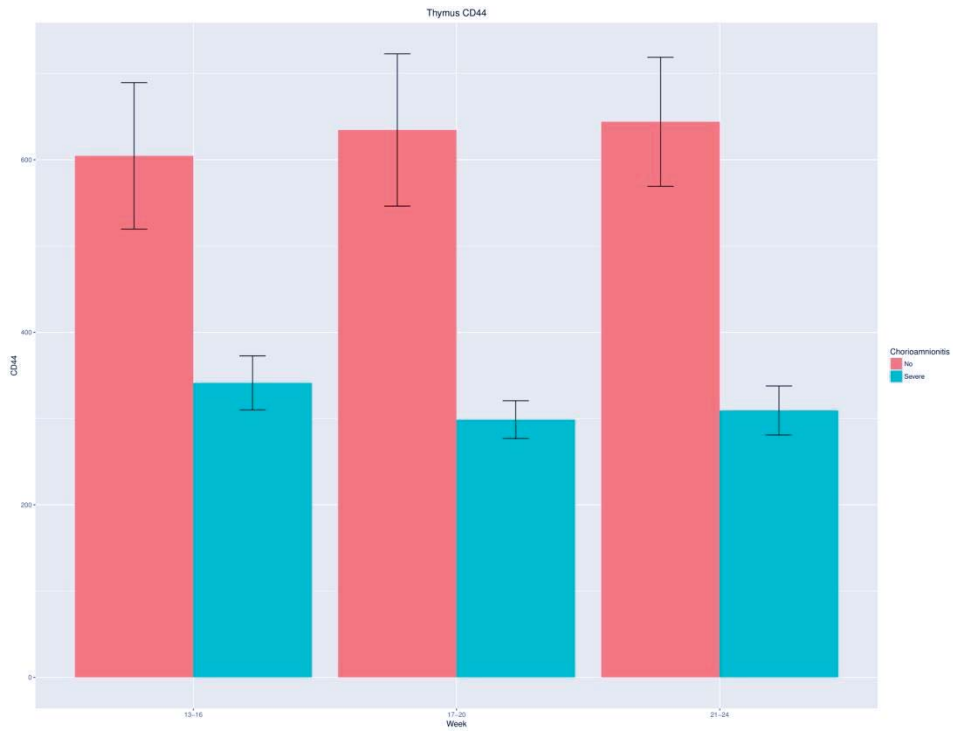




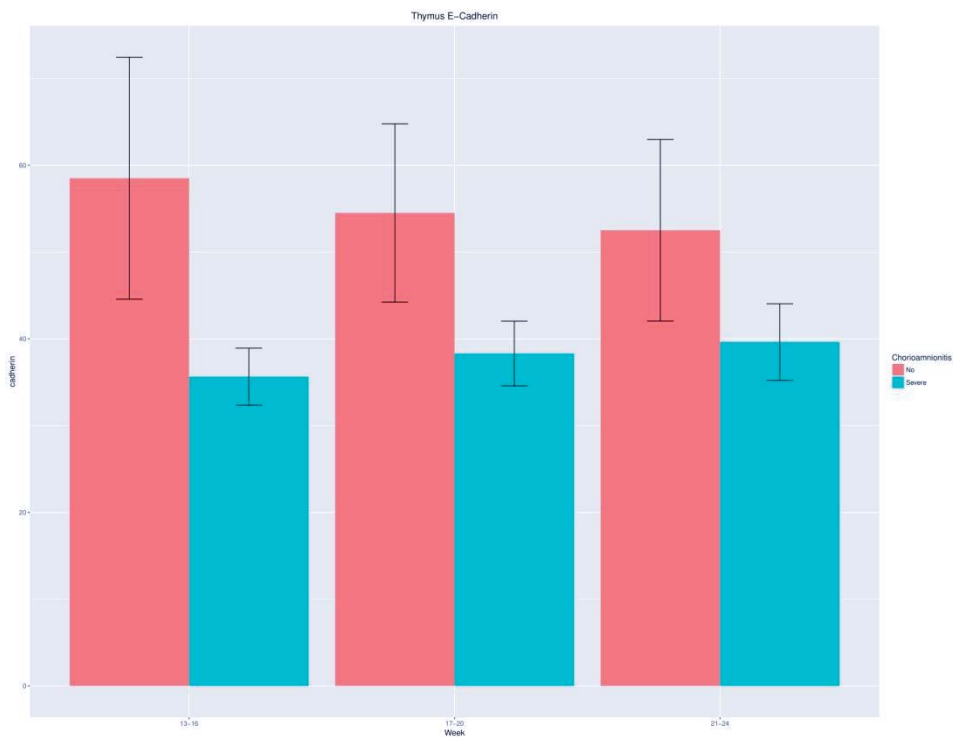
ГРАФΗΜΑ 25



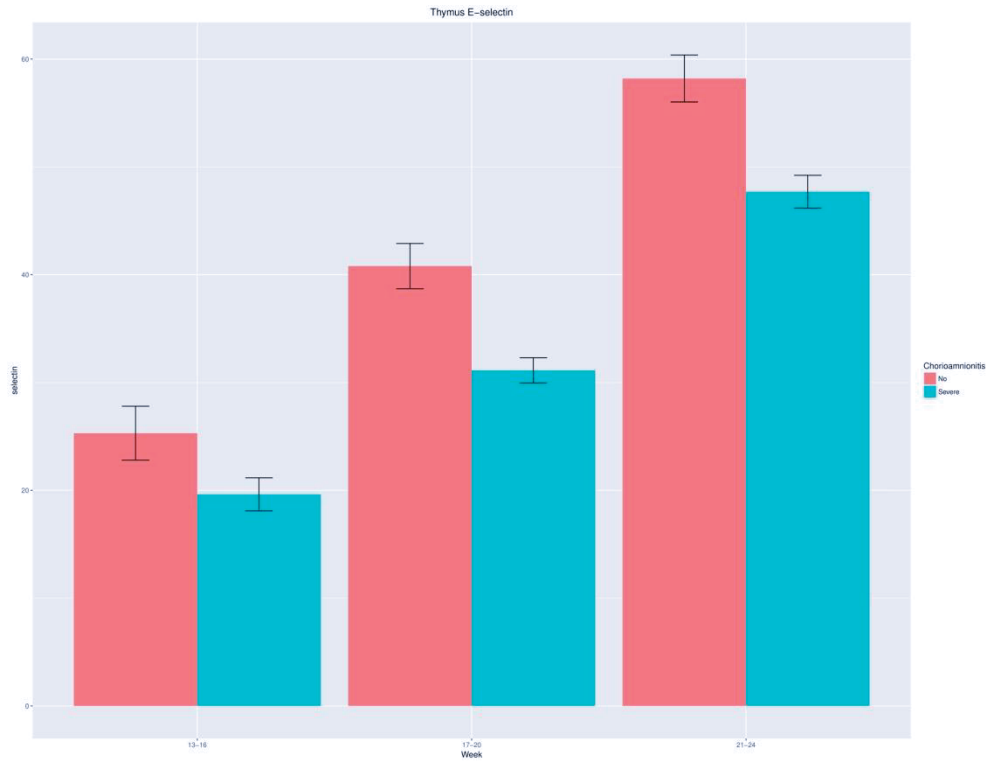
ГРАФΗΜΑ 26



ΓΡΑΦΗΜΑ 27



ΓΡΑΦΗΜΑ 28

**ΓΡΑΦΗΜΑ 29**

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**





Η χοριοαμνιονίτιδα είναι μια σοβαρή επιπλοκή της εγκυμοσύνης, που εντοπίζεται στους εμβρυικούς υμένες, χόριο και άμνιο και συνδυάζεται με υψηλό ποσοστό εμβρυϊκής νοσηρότητας και θνητότητας που ανέρχεται σε ποσοστό 43 - 45.5% κατά το δεύτερο τρίμηνο της ανάπτυξης, χρονική περίοδο που συμπίπτει με την έντονη εξωμυελική αιμοποίηση στο έμβρυο και την έναρξη λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχει αποδειχθεί ότι, η φλεγμονώδη αντίδραση των εμβρυικών υμένων επάγει δευτεροπαθώς διαταραχές στη ανάπτυξη οι οποίες έχουν συνδυασθεί με την εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών και συγγενών διαμαρτιών σε διάφορα όργανα του εμβρύου. Διαταραχές οι οποίες έχουν καταγραφεί στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, των αισθητηρίων οργάνων όρασης και ακοής, στο αναπνευστικό, γαστρεντερικό και ουροποιητικό σύστημα και τέλος διαταραχές στη διεργασία της εμβρυϊκής εξωμυελικής αιμοποίησης.

Η θέση της αιμοποίησης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Εστίες αιμοποίησης εμφανίζονται για πρώτη φορά την 3<sup>η</sup> εβδομάδα στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού, την 5<sup>η</sup> εβδομάδα στο τοίχωμα της ραχιαίας αορτής στην περιοχή γνωστή ως αορτή - γονάδες - μεσόνεφρος και στη συνέχεια διαδοχικά στο ήπαρ, σπλήνα, θύμο αδέν, νεφρούς, επινεφρίδια, πρωτογενείς καταβολές λεμφαδένων, διεγκέφαλο / υπόφυση και τέλος στο ερυθρό μυελό των οστών. Η μέγιστη δραστηριότητα της εμβρυϊκής εξωμυελικής αιμοποίησης παρατηρείται μεταξύ 12<sup>ης</sup> και 24<sup>ης</sup> εβδομάδας στο ήπαρ πρωτίστως και λιγότερο στο σπλήνα και θύμο αδέν, χρονική περίοδο που συνδυάζεται επίσης με την αρχή της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος του εμβρύου.

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας ήταν:

1<sup>ο</sup> Να αξιολογήσουμε ανοσοιστοχημικά, στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της ανάπτυξης (αρχή, μέσο και τέλος), την αιμοποίηση σε δείγματα ήπατος, σπλήνα και θύμου αδέν, ανθρώπινων εμβρύων, η ιστολογική εικόνα των οποίων έδειξε, σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας. Να αξιολογήσουμε με την ίδια μέθοδο την αιμοποίηση αντίστοιχων δειγμάτων και αντίστοιχης χρονικής περιόδου, ανθρώπινα έμβρυα χωρίς αλλοιώσεις (φυσιολογικοί μάρτυρες).

2<sup>ο</sup> Να αξιολογήσουμε με την ίδια μέθοδο, τόσο στις περιπτώσεις εμβρύων με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας, όσο και στις περιπτώσεις εμβρύων χωρίς φλεγμονώδη αντίδραση, για τυχόν μεταβολές έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, CD44, E-Καντερίνης (E-Cadherin) και E-Σελεκτίνης (E-Selectin). Ακολούθησε στατιστική ανάλυση, συγκριτική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και εξαγωγή συμπερασμάτων για τις επιπτώσεις της οξείας χοριοαμνιονίτιδας στην ανάπτυξη του λεμφοαιμοποιητικού συστήματος.

Η μελέτη περιελάμβανε εκατόν είκοσι έμβρυα, (τριάντα έμβρυα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και ενενήντα έμβρυα με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας) που ανήκουν στο Αρχαικό Υλικό του Εργαστηρίου Ιστολογίας - Εμβρυολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης στην Αλεξανδρούπολη.

Η βασική τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της απλής ιστοχημείας (χρώσεις Εωσίνης - Αιματοξυλίνης) και της ανοσοϊστοχημείας.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης έδειξαν και στα τρία όργανα που εξετάσαμε, αυξημένη έκφραση για τις κυτταρικές σειρές της αιμοποίησης στα έμβρυα με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας χοριοαμνιονίτιδας. Εξαίρεση αποτέλεσε η μειωμένη έκφραση για τα μακροφάγα. Αντίθετα, τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης των κυττάρων της λεμφοποίησης έδειξαν σημαντική μείωση της έκφρασης των T-κυτταροτοξικών CD8+ T-λεμφοκυττάρων και CD3+ T-λεμφοκυττάρων, τόσο στο θύμο αδένα που λειτουργεί την συγκεκριμένη χρονική περίοδο ως πρωτογενές λεμφικό όργανο, όσο και στο σπλήνα στα έμβρυα με συνοδές αλλοιώσεις χοριοαμνιονίτιδας. Ανάλογα αποτελέσματα έδειξε και η ανάλυση των ευρημάτων για τα μόρια της κυτταρικής προσκόλλησης CD44, E-Καντερίνης (E-Cadherin) και E-Σελεκτίνης (E-Selectin), που εκφράζονται αντίστοιχα στα αιμοποιητικά / λεμφοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων.

Οι μεταβολές στην ανοσοϊστοχημική έκφραση των προϊόντων αιμοποίησης, λεμφοποίησης και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στις περιπτώσεις των εμβρύων με συνοδές σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις οξείας

χοριοαμνιονίτιδας στα όργανα εξωμυελικής αιμοποίησης (ήπαρ, σπλήνα και θύμο αδένες), αντανακλούν στις διαταραχές που προκαλεί η φλεγμονώδη επεξεργασία αυτή, τόσο στην ανατομική / δομική ανάπτυξη των παραπάνω οργάνων, όσο και στις αιμοποιητικές και ανοσολογικές λειτουργίες που επιτελούν τα όργανα αυτά στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της εμβρυικής ανάπτυξης.

Συμπερασματικά, η διατήρηση της ομοιόστασης του αιμοποιητικού ιστού και κατ' επέκταση της αιμοποίησης και λεμφοποίησης, προϋποθέτει την ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου των αιμοποιητικών κυττάρων και λεμφοκυττάρων καθώς και της αλληλεπίδρασης τους με το μικροπεριβάλλον στα όργανα της εμβρυικής εξωμυελικής αιμοποίησης, διατάραξη της οποίας οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αυτή παρατηρείται στις περιπτώσεις εμβρύων με σοβαρού βαθμού φλεγμονώδη αντίδραση στους εμβρυικούς υμένες χόριο και άμνιο.

Τα αποτελέσματα αυτά, αποτελούν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες, ώστε να οδηγηθούμε με διασαφήνιση στα τελικά συμπεράσματα της σχέσης φλεγμονώδους αντίδρασης των εμβρυικών υμένων, χόριο και άμνιο, και αλλοιώσεων που προκαλεί στα διάφορα όργανα, κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, με σκοπό την πρόληψη και την κατάλληλη αντιμετώπιση.



**Diagnostic approach and study of potential haematological disorders in  
miscarried embryos with established chorioamnionitis in the second  
trimester of development**

**THESIS**

**Dr. Emmanouel Papadopoulos**





## ABSTRACT

Acute chorioamnionitis is a serious complication of pregnancy, found in fetal membranes, and is associated with a high rate of fetal morbidity and mortality of 43-45.5% in the second trimester of development. This period coincides with intense haematopoietic activity in the liver, spleen and thymus gland of the fetus, and immune system initiation. It has been shown that the inflammatory response of fetal membranes induces secondary growth disorders, which have been associated with the occurrence of serious complications and congenital malformations in various organs of the fetus. Disturbances have been recorded in the development of the brain, sensory organs of vision and hearing, in the respiratory, gastrointestinal and urinary tracts, and finally disorders in the process of embryonic haematopoiesis in the liver, spleen and thymus gland.

The haematopoietic site changes during fetal development. Sites of haemopoiesis appear for the first time in the third week on the wall of the yolk sac, the fifth week on the dorsal aorta wall in the area known as aorta - gonads - mesonephros, and then successively in the liver, spleen, thymus, kidneys, adrenal glands, lymph nodes, diencephalon / pituitary gland and finally the red bone marrow. The maximal activity of embryonic haematopoiesis is observed between 12 and 24 weeks, primarily in the liver and less in the spleen and thymus gland, a time period that is also associated with the formation and activation of the fetus' immune system. The objective of this study was:

1) To evaluate immunohistochemically, in the 2nd trimester of growth (beginning, middle and end), the haematopoietic activity in liver, spleen and thymus gland of human embryos. Embryos with severe acute chorioamnionitis and embryos without inflammatory changes in the fetal membranes were evaluated.

2) To evaluate embryos with concomitant chorioamnionitis and embryos without inflammatory response, changes in the expression of the cell adhesion molecules CD44, E-Cadherin and E-Selectin.

The study consisted of one hundred and twenty embryos (thirty embryos were used as controls and ninety embryos associated with severe changes of acute chorioamnionitis) belonging to the collection of the Laboratory of Histology and Embryology of the Democritus University of Thrace in Alexandroupolis.

A statistical analysis, a comparative study of our results, and conclusions on the side effects of acute chorioamnionitis on the haematopoiesis and lymphopoiesis of the embryos were performed. The basic technique applied was that of histochemistry (Hematoxylin & Eosin staining) and immunohistochemistry. The results of immunohistochemical analysis showed, in all three organs examined, increased expression for the haematopoietic cell lines in embryos associated with severe changes of acute chorioamnionitis. An exception was the reduced expression for macrophages. In contrast, the results of immunohistochemical analysis for lymphocytes showed a significant decrease in the expression of T-cytotoxic CD8+ lymphocytes and CD3+ T-lymphocytes, both in the thymus gland and in the spleen, in embryos with concomitant changes of acute chorioamnionitis. Analogous results were also found in the analysis of the findings for CD44, E-Cadherin and E-Selectin cell adhesion molecules, expressed in haematopoietic cells, lymphocytes and vascular endothelial cells.

The pathogenetic mechanism responsible for the changes in haematopoiesis and lymphopoiesis in the cases of acute chorioamnionitis, seems to be related to the release of toxic molecules and cytokines that damage and alter the physiological anatomical and functional activities of the liver, spleen and thymus.

We believe that further studies are required to specify the relationship between the inflammatory changes of fetal membranes and disorders caused in different organs of the embryos during development.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



1. Golub R, Cumano A. Embryonic Hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis.* 2013; 51(4):226-31.
2. Buravkova LB, Andreeva ER, Lobanova MV, et al. The Differential Expression of Adhesion Molecule and Extracellular Matrix Genes in Mesenchymal Stromal Cells after Interaction with Cord Blood Hematopoietic Progenitors. *Dokl Biochem Biophys.* 2018; 479(1):69-71.
3. McIver SC, Hewitt KJ, Gao X, et al. Dissecting Regulatory Mechanisms Using Mouse Fetal Liver-Derived Erythroid Cells. *Methods Mol Biol.* 2018; 1698:67-89.
4. Smith AS, Nowak RB, Fowler VM. High-Resolution Fluorescence Microscope Imaging of Erythroblast Structure. *Methods Mol Biol.* 2018; 1698:205-228.
5. Han ZC, Du WJ, Han ZB, et al. New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* 2017; 28(s1):S29-S45.
6. Lau SX, Leong YY, Ng WH, et al. Human mesenchymal stem cells promote CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cell proliferation with preserved red blood cell differentiation capacity. *Cell Biol Int.* 2017; 41(6):697-704.
7. Edmonds RH: Electron microscopy of erythropoiesis in the avian yolk sac. *Anat Rec.*1996;154:785.
8. Godin I, Dieterlen-Lievren F, Cumano A. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Pro Natl Acad Sci USA.*1995; 92:773-7.
9. Moore M.A, Metcalf, D. Ontogeny of the haemopoietic system: Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British Journal of Haematology.*1970; 18:279-96.
10. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell.* 1996; 86:897-906.



11. Godin IE, Garcia-Porrerot JA, Coutinho A et al. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature*. 1993; 364: 67-70.
12. Timens W, Kamps WA. Hemopoiesis in human fetal and embryonic liver. *Microsc Res Tech*. 1997; 1;39(5):387-97.
13. Seitz V, Hummel M, Stein H et al. Evidence of Haematopoiesis within the Developing Human Diencephalon. *Pathobiology*. 2006; 73:55-62.
14. Timens W, Kamps WA, Rozeboom-Uiterwijk T, et al. Haemopoiesis in human fetal and embryonic liver. Immunohistochemical determination in B5-fixed paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1990; 416(5):429-36.
15. Kamps W.A, Timens W, Boer GJ, et al. In situ study of haemopoiesis in human fetal liver. *Scand. J. Immunol*. 1989; 30: 399-408.
16. Vallery-Radot P. In J.B. Maiale (ed.) *Laboratory medicine, Hematology*, 6<sup>th</sup> edn, Missouri: Mosby C.V. 1982; p 1.
17. Sharma S, Pati HP, Ahuja RK, et al. Haemopoietic cell composition of fetal liver, spleen and thymus. *Medical Oncology*. 1997;14, 99-101.
18. Medvinsky AL, Samoulina NL, Muller AM, et al. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature*. 1993; 364: 64-7.
19. Charbord P, Tavian M, Humeau L, et al. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood*. 1996; 87:4109-19.
20. Wilpshaar J, Joekes EC, Lim FT, et al. Magnetic resonance imaging of fetal bone marrow for quantitative definition of the human fetal stem cell compartment. *Blood*. 2002; 100:451-7.
21. Cañete A, Comaills V, Prados I, et al. Characterization of a Fetal Liver Cell Population Endowed with Long-Term Multiorgan Endothelial Reconstitution Potential. *Stem Cells*. 2017; 35(2):507-521
22. Yu W, Zhang F, Wang S, et al. Depletion of polycomb repressive complex 2 core component EED impairs fetal hematopoiesis. *Cell Death Dis*. 2017; 138(4):e2744.

23. Michael H. Ross and Wojciech Pawlina. Ιστολογία με έγχρωμο άτλαντα. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 2013, σελ:264 - 6.
24. Mazzarello P, Calligaro A, Vannini V, et al. A brief biographical sketch. *Med Secoli*. 2005;17(3):747-67.
25. Kierszenbaum A, Tres L. Ιστολογία με στοιχεία κυτταρικής βιολογίας. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2013; σελ:242-244
26. Pahal GS, Jauniaux E, Kinnon C, et al. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(4):1029-34.
27. Lim FT, Kanhai HH, Falkenburg JH. Characterization of the human CD34+ hematopoietic progenitor cell compartment during the second trimester of pregnancy. *Haematologica*. 2005; 90(2):173-9.
28. Gori JL, Butler JM, Chan YY, et al. Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2015; 125(3):1243-54.
29. Cordeiro Gomes A, Hara T, Lim VY, et al. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity*. 2016; 20;45(6): 1219-1231.
30. Kajikhina K, Tsuneto M, Melchers F. Environments of haematopoiesis and B - lymphopoiesis in foetal liver. *Clin Exp Rheumatol*. 2015; 33(4 Suppl 92): S91-3.
31. Kajikhina K, Melchers F, Tsuneto M. Chemokine polyreactivity of IL7Rα+CSF-1R+ lymph-myeloid progenitors in the developing fetal liver. *Sci Rep*. 2015; 3;5:12817.
32. Suzuki M, Shimizu R, Yamamoto M. Transcriptional regulation by GATA-1 and GATA-2 during erythropoiesis. *Int J Hematol*. 2001; 93(2):150-155.
33. Ohmori S, Takai J, Ishijima M et al. Regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages. *Mol Cell Biol*. 2012; 32(23):4742-55.
34. Hasgava S, Fujiwara T, Okitsu Y et al. Effects of in vivo deletion of GATA-2 in bone marrow stromal cells. *Exp Hematol*. 2017; 56:31-45.

35. Nandakumar SK, Johnson K, Throm SL, et al. Low-level GATA-2 overexpression promotes myeloid progenitor self-renewal and blocks lymphoid differentiation in mice. *Exp Hematol*. 2015; 43(7):565-77.
36. Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, et al. GATA-2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood*. 2016; 28;128(4):508-18.
37. Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata-1 and Gata-2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol*. 2014; 100(5):417-24.
38. Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S. GATA factor switching from GATA-2 to GATA-1 contributes to erythroid differentiation. 2013; 18(11):921-33.
39. Georgopoulos K, Winandy S, Avitahl N. The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:155-76.
40. Heizman B, Kastner P, Chan S. The Ikaros family in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol*. 2018; 51:14-23.
41. Seng A, Yankee TM. The role of the Ikaros of Transcription Factors in Regulation T cell Development and Function. *J Clin Cell Immunol*. 2017; 8(2):495.
42. Coutinho A, Caramalho I, Seixas E, et al. Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 293:43-71.
43. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, et al. Thymic regulatory T cells. *Autoimmune Rev*. 2005; 4(8):579-86.
44. Michell JL, Seng A, Yankee TM. Expression and splicing of Ikaros family members in murine and human thymocytes. *Mol Immunol*. 2017; 87:1-11.
45. Michell JL, Seng A, Yankee TM. Expression patterns of Ikaros family members during positive selection and lineage commitment of human thymocytes. *Immunology*. 2016; 149(4):400-412.

46. Hun M, Barsanti M, Wong K, et al. Native thymic extracellular matrix improves in vivo thymic organoid T cell output, and drives in vitro thymic epithelial cell differentiation. *Biomaterials*. 2017; 118:1-15.
47. Ruddle NH. High Endothelial Venules and Lymphatic Vessels in Tertiary Lymphoid Organs: Characteristics, Functions, and Regulation. *Front Immunol*. 2016; 9:7:491.
48. Nataf S. Clonal selection versus clonal cooperation: the integrated perception of immune objects. *F 1000 Res*. 2016; (5) 5:2226.
49. Gronke K, Kofoed-Nielsen M, Diefenbach A. Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunol Lett*. 2016; 179:9-18.
50. Abbas A, Lichtman A. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the immune system*. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. 2004, Αθήνα.
51. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Immunology*. Fifth Edition. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. 2004, Αθήνα.
52. Guo H, Barberi T, Suresh R, et al. Progression from the Common Lymphoid Progenitor to B/Myeloid PreproB and ProB Precursors during B Lymphopoiesis Requires C/EBP $\alpha$ . *J Immunol*. 2018; 30. pii: ji1800244.
53. Jensen CT, Åhsberg J, Sommarin MNE, et al. Dissection of progenitor compartments resolves developmental trajectories in B-lymphopoiesis. *J Exp Med*. 2018; 2;215(7):1947-1963.
54. Krishnamoorthy M, Buhari FHM, Zhao T, et al. The ion channel TRPM7 is required for B cell lymphopoiesis. *Sci Signal*. 2018; 5;11(533). pii: eaan2693.
55. Zeng H, Yu M, Tan H, et al. Discrete roles and bifurcation of PTEN signaling and mTORC1-mediated anabolic metabolism underlie IL-7-driven B lymphopoiesis. *Sci Adv*. 2018; 31;4(1):eaar5701.
56. Aliyari Z, Alami F, Mostafavi T, et al. The roles of IL-2, IL-7, and IL-15 Ligands in B Cells Development from Cord Blood Mononuclear Cells. *Iran J Ped Hematol Oncol*. 2015; 5(3):155-60.
57. Ρωξάνη Αγγελοπούλου. Ανάπτυξη Ήπατος Εμβρυολογία. 2<sup>η</sup> Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2013; σελ: 461 - 75.

58. Calmont A, Wandzioch E, Tremblay KD, et al. An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell*.2006; 11:339-348.
59. Desmet VJ, Van Eyken P, Sciote R. Cytokeratins for probing cell lineage relationships in developing liver. *Hepatology*.1990; 12:1249-1251.
60. Duncan SA. Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev*. 2003; 120:19-33.
61. Hata S, Namae M, Nishina H. Liver development and regeneration: From laboratory study to clinical therapy *Develop Growth Differ*. 2007; 49:163-170.
62. Le Douarin NM. An experimental analysis of liver development. *Med Biol*. 1975; 53:427-455.
63. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BLM, et al. Distinct mesodermal signals, including BMP's from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*. 2001; 15:1998-2009.
64. Severn CB. A morphological study of the development of the human liver. II. Establishment of liver parenchyma, extrahepatic ducts and associated venous channels. *Am J Anat*.1972; 133:85-108.
65. Shiojiri N. Enzyme - and immunocytochemical analyses of the differentiation of liver cells in the prenatal mouse. *J Embryol ExpMorphol*.1981; 62:139-152.
66. Tremblay KD, Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol*. 2005; 280:87-99.
67. Westmacott A, Burke ZD, Oliver G, et al. C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  are markers of early liver development. *Int J Dev Biol*. 2006; 50:653-657.
68. Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology*. 2005; 41: 956 - 967.
69. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic Pathology*. 2006; 34(5):455-65.

70. Han J, Van Krieken JM, Jante Velde. Chapter 29, Spleen, Histology for Pathologists, second edition, Edited by Stephen S. Sternberg, Lippincott-Raven Publishers, 1997, Philadelphia, pp 676.
71. Endo A, Uemo S, Yamada S, et al. Morphogenesis of the Spleen During the Human Embryonic Period. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014; 18 doi: 10.1002/ar.23099.
72. Taviani M, Coulombel L, Luton D, et al. Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*. 1996; 87:67-72.
73. Golub R, Cumano A. Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis*. 2013; 51(4):226-31.
74. Timens W, Rozeboom-Uiterwijk T, Poppema S. Fetal and neonatal development of human spleen: an immunohistochemical study. *Immunology*. 1987; 60:603-609.
75. Jones JF. Development of the spleen. *Lymphology*. 1983; 16:83-89.
76. Namikawa R, Mizuno T, Matsuoka H, et al. Ontogenic development of T and B cells in the white pulp of human spleen. *Immunology*. 1986; 57:61-69.
77. Calhoun DA, Li Y, Braylan RC, Christensen RD. Assessment of the contribution of the spleen to granulopoiesis and erythropoiesis of the mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev*. 1996;21; 46(3):217-27.
78. Yoder MC. Embryonic hematopoiesis in mice and humans. *Acta Paediatr Suppl*. 2002; 91(438):5-8.
79. Wolf BC, Neiman RS. Disorders of the spleen. Philadelphia: 1989WB Saunders.
80. Κεραμέως – Φόρογλου Χρυσή. Ιστολογία - Εμβρυολογία του Ανθρώπου, Τόμος II Ειδικό Μέρος. Εκδοτικός Οίκος “Παρατηρητής”, Θεσσαλονίκη. 1987; σελ. 88 - 95.
81. Huang Y, Cui Y, Yu S, et al. Comparison of histological characteristics and expression of CD3 and CD79a among the hemal nodes, lymph nodes and spleens of yaks (*Bos grunniens*). *Histol Histopathol*. 2018; 19:18030.



82. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. Ιστολογία με έγχρωμο άτλαντα. Γενική Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Ε. Πέτρου. Εκδοτικός Οίκος "Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας" Αθήνα 2013, σελ. 424 - 429.
83. Wang T, Hu Y, Wangkahart E, et al. Interleukin (IL)-2 Is a Key Regulator of T Helper 1 and T Helper 2 Cytokine Expression in Fish: Functional Characterization of Two Divergent *IL2* Paralogs in Salmonids. *Front Immunol.* 2018; 26;9:1683.
84. Della Torre S, Rando G, Meda C, et al. Transcriptional activity of oestrogen receptors in the course of embryo development. *J Endocrinol.* 2018; 238(3):165-176.
85. Vanhanen R, Tuulasvaara A, Mattila J, et al. Common gamma chain cytokines promote regulatory T cell development and survival at the CD4+CD8+ stage in the human thymus. *Scand J Immunol.* 2018; 15:E12681.
86. Fiorini F, Isted A, Hezelgrave NL, et al. Quantitative fetal fibronectin predicts preterm birth in women with bulging fetal membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016; 203:127-31.
87. Κοκοβίδης Αναστάσιος. Εμβρυικοί υμένες - Εμβρυομητρική Ιατρική. 2016, Αθήνα.
88. Palmsten K, Nelson KK, Laurent LC, et al. Subclinical and clinical chorioamnionitis, fetal vasculitis, and risk for preterm birth: A cohort study. *Placenta.* 2018; 67:54-60.
89. Cataño Sabogal CP, Fonseca J, García-Perdomo HA. Validation of diagnostic tests for histologic chorioamnionitis: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018; 9;228:13-26.
90. Zackler A, Flood P, Dajao R, et al. Suspected Chorioamnionitis and Myometrial Contractility: Mechanisms for Increased Risk of Cesarean Delivery and Post partum Hemorrhage. *Reprod Sci.* 2018; 1:1933719118778819.
91. Randis TM, Rice MM, Myatt L, et al. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Maternal-Fetal Medicine Units (MFMU) Network J Incidence of early-onset sepsis in infants born to women with clinical chorioamnionitis. *Perinat*

- Med. 2018; 23. pii: /j/jpme.ahead-of-print/jpm-2017-0192/jpm-2017-0192.xml.
92. Ykema JMA, D'Haens EJ, Havenith M, et al. Pilot study demonstrates that placental histology can provide an additional tool for diagnosing early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr.* 2018; 22.
  93. Gussenhoven R, Westerlaken RJJ, Ophelders DRMG, et al. Chorioamnionitis, neuroinflammation, and injury: timing is key in the preterm ovine fetus. *J Neuroinflammation.* 2018; 19;15(1):113.
  94. Ronzoni S, D'Souza R, Shynlova O. Maternal blood endotoxin activity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018; 26:1-7.
  95. Πρεβεδουράκης Κ, Ξυγκάκης. «Επίκαιρα Θέματα Μαιευτικής και Γυναικολογίας», Τόμος V, Α. Επιστημονικές εκδόσεις «Γρ. Παρισιάνος», Αθήνα, 1999; σελ. 227-247.
  96. Καρπάθιος Σ.Ε. Βασική Μαιευτική και Περιγεννητική Ιατρική. Β΄ Έκδοση, Β΄ Τόμος. Επιστημονικές Εκδόσεις "ΒΗΤΑ", 1999. σελ. 551.
  97. Blanc W. A. Amniotic infection syndrome. *Clin. Obst. Gyn.* 1959; 2: 705.
  98. Tita AT, Andrews WW. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *ClinPerinatol.* 2010; 37(2):339-54.
  99. Stefanoskal, Tadić J, Vilotić A, et al. Histological chorioamnionitis in preterm prelabor rupture of the membranes is associated with increased expression of galectin-3 by amniotic epithelium. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017; 30(18):2232-2236.
  100. Lal CV, Xu X, Jackson P, et al. Ureaplasma infection-mediated release of matrix metalloproteinase-9 and PGP: a novel mechanism of preterm rupture of membranes and chorioamnionitis. *Pediatr Res.* 2017; 81(1-1):75-79.
  101. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164(5 Pt 1):1317-26.

102. Soper DE, Mayhall CG, Dalton HP. Risk factors for intraamniotic infection: a prospective epidemiologic study. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(3):562-6; discussion 566-8.
103. Newton E.R., Prihoda T.J., Gibbs R.S. Logistic regression analysis of risk factors for intraamniotic infection. *Obstet Gynec.* 1989; 73:571.
104. Newton E.R. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obst Gynec.* 1993; 36: 795.
105. Piper JM, Newton ER, Berkus MD, et al. Meconium: a marker for peripartum infection. *Obstet Gynecol.* 1998; 91(5 Pt 1):741-5.
106. Tran SH, Caughey AB, Musci TJ. Meconium-stained amniotic fluid is associated with puerperal infections. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189(3):746-50.
107. Smulian JC, Shen-Schwarz S, Vintzileos AM, et al. Clinical chorioamnionitis and histologic placental inflammation. *Obstet Gynecol.* 1999; 94(6):1000-5.
108. Stallmach T, Karolyi L. Augmentation of fetal granulopoiesis with chorioamnionitis during the second trimester of gestation. *Hum Pathol.* 1994; 25(3):244-7.
109. Pfisterer C, Faber R, Horn LC. Chorioamnionitis-induced changes of fetal extramedullar hematopoiesis in the second trimester of gestation. Is diagnosis from fetal autopsy possible? *Virchows Arch.* 2004; 446(2):150-6.
110. Gaillard DA, Paradis P, Lallemand AV, et al. Spontaneous abortions during the second trimester of gestation. *Arch Pathol Lab Med.* 1993; 117(10):1022-6.
111. Rudbeck Røge H, Henriques U. Fetal and perinatal infections. A consecutive study. *Pathol Res Pract.* 1992; 188(1-2):135-40.
112. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342(20):1500-7.
113. Sebire NJ, Goldin RD, Regan L. Histological chorioamnionitis in relation to clinical presentation at 14-40 weeks of gestation. *J Obstet Gynaecol.* 2001; 21(3):242-5.

114. Hoskins IA. Chorioamnionitis. *Postgr Obst Gynec.* 1989; 9:17, 1.
115. Seaward PG, Hannah ME, Myhr TL, et al. International Multicentre Term Prelabor Rupture of Membranes Study: evaluation of predictors of clinical chorioamnionitis and postpartum fever in patients with prelabor rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177(5):1024-9.
116. Rickert VI, Wiemann CM, Hankins GD, et al. Prevalence and risk factors of chorioamnionitis among adolescents. *Obstet Gynecol.* 1998; 92(2):254-7.
117. Yancey MK, Duff P, Clark P, et al. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. *Obstet Gynecol.* 1994; 84(5):816-9.
118. Newton ER, Piper J, Peairs W. Bacterial vaginosis and intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 176(3):672-7.
119. Abele-Horn M, Peters J, Genzel-Boroviczény O, et al. Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity. *Infection.* 1997; 25(5):286-91.
120. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, et al. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371(9606):75-84.
121. Sweeney EL, Dando SJ, Kallapur SG, et al. The Human *Ureaplasma* Species as Causative Agents of Chorioamnionitis. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 14;30(1):349-379.
122. Sweeney EL, Kallapur SG, Meawad S, et al. *Ureaplasma* Species Multiple Banded Antigen (MBA) Variation Is Associated with the Severity of Inflammation *In vivo* and *In vitro* in Human Placentae. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 13;7:123.
123. Dando SJ, Nitsosl, Kallapur SG. The role of the multiple banded antigen of *Ureaplasma parvum* in intra-amniotic infection: major virulence factor or decoy? 2012; 7(1):e29856.
124. Kokkayil P, Dhawan B. *Ureaplasma*: current perspectives. *Indian J Med Microbiol.* 2015; 33(2):205-14.

125. Bergeron J, Gerges N, Guiraut C, et al. Activation of the IL-1 $\beta$ /CXCL1/MMP-10 axis in chorioamnionitis induced by inactivated Group B Streptococcus. *Placenta*. 2016; 47:116-123.
126. Kim CJ, Romero R, Chaemsaihong P, et al. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015; 213(4 Suppl):S53-6.
127. Garcia-Flores J, Cruceyra M, Cañamares M, et al. Candida chorioamnionitis: Report of two cases and review of literature. *J Obstet Gynaecol*. 2016; 36(7):843-844.
128. Chan GJ, Silverman M, Zaman M, et al. Prevalence and risk factors of chorioamnionitis in Dhaka, Bangladesh. *J Perinatol*. 2016; 36(12):1039-1044.
129. Πρεβεδουράκης Κ. Χοριοαμνιονίτιδα. *Ιατρική*, 1978; 34, 193.
130. Romero R, Ghidini A, Mazor M, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity in premature rupture of membranes. *Clin Obstet Gynecol*. 1991; 34(4):769-78.
131. Bennett P, Fisk N. Chorioamnionitis and pre-term delivery. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1993; 7(1):25-43.
132. Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Womens Health*. 2008; 53(3):227-35.
133. Lavery JP, Cook LN, Queenan JT. Erythroblastosis in a twin gestation: a case report. *J Ky Med Assoc*. 1977; 75(1):11-5.
134. Okubo M, Maeda H, Suzuki M. Blood group incompatible pregnancy. *Nihon Rinsho*. 2005; 63 Suppl 7:727-30.
135. Pomerance W. Chorioamnionitis and maternal sepsis. In: R. Monif *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. Harper and Row publishers. 1974, N. York.
136. Coultrip LL, Grossman JH. Evaluation of rapid diagnostic tests in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1992; 167(5):1231-42.

137. Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, et al. CXCL10 and IL-6: Markers of two different forms of intra-amniotic inflammation in preterm labor. *Am J Reprod Immunol.* 2017; 78(1).
138. Chaemsaitong P, Romero R, Korzeniewski SJ, et al. A point of care test for the determination of amniotic fluid interleukin-6 and the chemokine CXCL-10/IP-10. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015; 28(13):1510-9.
139. Gantert M, Been JV, Gavillanes AW, et al. Chorioamnionitis: A multiorgan disease of the fetus? *J Perinatol.* 2010; 30 Suppl: s21-30.
140. Galinsky R, Polglase GR, Hooper SB, et al. The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development. *J Pregnancy.* 2013; 412831.
141. Chapman E, Reveiz L, Illanes E, et al. Antibiotic regimens for management of intra-amniotic infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 24; (8):CD011622.
142. Hofmeyr GJ, Kiiza JA. Amnioin fusion for chorioamnionitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 24; (8):CD011622.
143. Νικολαΐδου Χριστίνα. Διδακτορική Διατριβή: Συνεκτίμηση της συνέχειας της ανοσοιστοχημικής έκφρασης του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGF) και των Εξωκυττάριων Δομικών Γλυκοπρωτεϊνών κατά την εμβρυική ανάπτυξη του ανθρώπινου σπλήνα. 2017, Αλεξανδρούπολη.
144. Χαραλαμπίδης Κ. Μόρια προσκόλλησης. Νέα εργαλεία στο γρίφο του καρκίνου. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής.* 2008; 25(Συμπλ 2):7-35.
145. Edelman GM, Crossin KL. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60:155-90.
146. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991; 22;251(5000):1451-5.
147. Yamagata M, Duan X, Sanes JR. Cadherins Interact With Synaptic Organizers to Promote Synaptic Differentiation. *Front Mol Neurosci.* 2018; 30;11:142.



148. Guo S, Yan X, Shi F, et al. Expression and distribution of the zinc finger protein, SNAI3, in mouse ovaries and pre-implantation embryos. *J Reprod Dev.* 2018; 64(2):179-186.
149. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993; 5(5):806-11.
150. Pignatelli M. Integrins, cadherins, and catenins: molecular cross-talk in cancer cells. *J Pathol.* 1998; 186(1):1-2.
151. Levenberg S, Sadot E, Goichberg P, et al. Cadherin-mediated transmembrane interactions. *Cell Adhes Commun.* 1998; 6(2-3):161-70.
152. D'Antoni ML, Mitchell BI, McCurdy S, et al. Cenicriviroc inhibits trans-endothelial passage of monocytes and is associated with impaired E-selectin expression. *J Leukoc Biol.* 2018 Aug 8.
153. Bajaj HS, Ye C, Hanley AJ, Sermer M, Zinman B, et al. Biomarkers of vascular injury and endothelial dysfunction after recent glucose intolerance in pregnancy. *Diab Vasc Dis Res.* 2018 Jun 1:1479164118779924.
154. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, et al. Selectins: A family of adhesion receptors. *Cell.* 67:233-241, 1991.
155. Feng Y, Ma X, Deng L, et al. Role of selectins and their ligands in human implantation stage. *Glycobiology.* 2017; 1;27(5):385-391.
156. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science.* 2003; 17; 299(5605):405-8.
157. Esain V, Kwan W, Carroll KJ, et al. Cannabinoid Receptor-2 Regulates Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development via Prostaglandin E2 and P-Selectin Activity. *StemCells.* 2015; 33(8):2596-612.
158. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, et al. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995; 9(10):866-73.
159. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, et al. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(24):9238-42.

160. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990; 61:1303-1313.
161. Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): Multiple functions, multiple forms. *Cancer Res*. 1991; 3:347-353.
162. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(1):33-45.
163. Sackstein R. The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the 'step 2-bypass pathway' and other emerging perspectives. *Curr Opin Hematol*. 2011; 18(4):239-48.
164. Cao H, Heazlewood SY, Williams B, et al. The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. *Haematologica*. 2016;101(1):26-37.
165. Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009; 8(3):208-20.
166. Terpe HJ, Stark H, Prehm P, et al. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry*. 1994; 101(2):79-89.
167. Liu R, Jia W, Zou H. Expression of CD44 and CD29 by PEComa cells suggests their possible origin of mesenchymal stem cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(10):13023-33. eCollection 2015.
168. Fu C, Yan Z, Xu H. Isolation, identification and differentiation of human embryonic cartilage stem cells. *Cell Biol Int*. 2015; 39(7):777-87.
169. Andrews WW, Goldenberg RL, Faye-Petersen O, et al. The Alabama Preterm Birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 195(3):803-8.

170. Gotsch F, Romero R, KusanovicJP, et al. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50(3):652-83.
171. Espinoza J, Kalache K, Gonçalves LF, et al. Prenatal diagnosis of membranous ventricular septal aneurysms and their association with absence of atrioventricular valve 'offsetting'. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004; 24(7):787-92.
172. Yanowitz TD, JordanJA, GilmourCH, et al. Hemodynamic disturbances in premature infants born after chorioamnionitis: association with cord blood cytokine concentrations. *Pediatr Res.* 2002; 51(3):310-6.
173. Rounioja S, Räsänen J, Glumoff V, et al. Intra-amniotic lipopolysaccharide leads to fetal cardiac dysfunction. A mouse model for fetal inflammatory response. *Cardiovasc Res.* 2003; 15;60(1):156-64.
174. Panaro MA, Acquafredda A, Cavallo P. Inflammatory responses in embryonal cardiomyocytes exposed to LPS challenge: an in vitro model of deciphering the effects of LPS on the heart. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(7):754-65.
175. Park HW, Choi YS, Kim KS, et al. Chorioamnionitis and patent ductus arteriosus: A systematic review and meta-analysis. *PlosOne.* 2015; 16;10(9):e0138114.
176. Romero R, Espinaza J, Goncalves F, et al. Fetal cardiac dysfunction in preterm premature rupture of membranes. *JMaternFetal NeonatalMed.* 2004; 16(3):146-57
177. Lawrence SM, Wynn JL. Chorioamnionitis, IL-17A, and fetal origins of neurologic disease. *Am J Reprod Immunol.* 2018; 79(5):e12803.
178. Stojanovska V, Miller SL, Hooper SB, et al. The Consequences of Preterm Birth and Chorioamnionitis on Brainstem Respiratory Centers: Implications for Neurochemical Development and Altered Functions by Inflammation and Prostaglandins. *Front Cell Neurosci.* 2018; 1;12:26.
179. Wu YW, Colford JM. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA.* 2000; 20; 284(11):1417-24.

180. De Felice C, Toti P, Laurini RN, et al. Early neonatal brain injury in histologic chorioamnionitis. *J Pediatr*. 2001;138(1):101-4.
181. Barrera-Reyes RH, Ruiz-Macías H, Segura-Cervantes E. Neurodevelopment at one year of age [corrected] in preterm newborns with history of maternal chorioamnionitis. *Ginecol Obstet Mex*. 2011; 79(1):31-7.
182. Botet F, Figueras J, Carbonell-Estrany X, et al. The impact of clinical maternal chorioamnionitis on neurological and psychological sequelae in very-low-birth weight infants: a case-control study. *J Perinat Med*. 2011; 39(2):203-8.
183. Schlapbach LJ, Ersch J, Adams M, et al. Impact of chorioamnionitis and preeclampsia on neurodevelopmental outcome in preterm infants below 32 weeks gestational age. *ACTA Paediatr*. 2010; 99(10):1504-9.
184. Huleihel M, Golan H, Hallak M. Intrauterine infection /inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004; 22;2:17.
185. Berger R, Garnier Y, Jensen A. Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig*. 2002; 9(6):319-28.
186. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Effects of lipopolysaccharide on oligodendrocyte progenitor cells are mediated by astrocytes and microglia. *J Neurosci Res*. 2000; 15; 62(4):510-20.
187. Kaukola T, Herva R, Perhoman M, et al. Population cohort associating chorioamnionitis, cord inflammatory cytokines and neurologic outcome in very preterm, extremely low birth weight infants. *Paediatr Res*. 2006; 59(3):478-83.
188. Redline RW, Minich N, Taylor G, et al. Placental lesions as predictors of cerebral palsy and abnormal neurocognitive function at school age in extremely low birth weight infants (<1kg). *Pediatr Dev Pathol*. 2007; 10(4):282-92.

189. Suppiej A, Franzoi M, Vedovato S, et al. Neurodevelopmental outcome in preterm histological chorioamnionitis. *Early Hum Dev.* 2009; 85(3):187-89.
190. Deftereou TE, Lambropoulou M, Chatzaki E, et al. Increased apoptotic activity on inflammatory human placentas in spontaneous abortions during the first and second trimester of gestation: a histochemical and immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012; 24;50(1):118-24.
191. Χουρίδου Ε. Μελέτη της έκφρασης του συστήματος του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης σε εμβρυικούς ιστούς. Διδακτορική Διατριβή, 2013. ΔΠΘ.
192. Wang LW, Lin YC, Wang ST, et al. Identifying Risk Factors Shared by Bronchopulmonary Dysplasia, Severe Retinopathy, and Cystic Periventricular Leukomalacia in Very Preterm Infants for Targeted Intervention. *Neonatology.* 2018; 114(1):17-24.
193. Nakanishi H, Suenaga H, Uchiyama A, et al. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in extremely preterm infants: a Japanese cohort study. Neonatal Research Network, Japan. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2018 Jan 3. pii: fetalneonatal-2017-313778.
194. Yum SK, Kim MS, Kwun Y, et al. Impact of histologic chorioamnionitis on pulmonary hypertension and respiratory outcomes in preterm infants. *Pulm Circ.* 2018; 8(2):2045894018760166.
195. Katz N, Bar-Or Y, Raucher-Sternfeld A, et al. Persistent Pulmonary Hypertension and Histologic Chorioamnionitis in Preterm Infants: Controlled Study. *Pediatr Cardiol.* 2018; 39(4):705-708.
196. Hartling L, Liang Y, Lacaze-Masmonteil T. Chorioamnionitis as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2012; 97(1):F8-F17.
197. Lacaze-Masmonteil T. That chorioamnionitis is a risk factor for bronchopulmonary dysplasia--the case against. *Paediatr Respir Rev.* 2014; 15(1):53-5.

198. Plakkal N, Soraisham AS, Trevenen C, et al. Histological chorioamnionitis and bronchopulmonary dysplasia: a retrospective cohort study. *J Perinatol*. 2013; 33(6):441-5.
199. Prendergast M, May C, Broughton S, et al. Chorioamnionitis, lung function and bronchopulmonary dysplasia in prematurely born infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2011; 96(4):F270-4.
200. Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics*. 2009; 123(5):1314-9.
201. Jobe AH. Effects of chorioamnionitis on the fetal lung. *Clin Perinatol*. 2012; 39(3):441-57.
202. Anblagan D, Pataky R, Evans MJ, et al. Association between preterm brain injury and exposure to chorioamnionitis during fetal life. *SciRep*. 2016; 1;6:37932.
203. Stimac M, Juretić E, Vukelić V, et al. Effect of chorioamnionitis on mortality, early onset neonatal sepsis and bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates with birth weight of < 1,500 grams. *Coll. Antropol*. 2014; 38(1):167-71.
204. Yoon BH, Kim YA, Romero R, et al. Association of oligohydramnios in women with preterm premature rupture of membranes with an inflammatory response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 181(4):784-8.
205. Galinsky R, Moss TJ, Gubhaju L, et al. Effect of intra-amniotic lipopolysaccharide on nephron number in preterm fetal sheep. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301(2):F280-5.
206. Been JV, Lievens S, Zimmermann LJ, et al. Chorioamnionitis as a risk factor for necrotizing enterocolitis: A systematic review and meta-analysis. *J Pediatr*. 2013; 162(2):236-42.e2.
207. Bry KJ, Jacobsson B, Nilsson S, et al. Gastric fluid cytokines are associated with chorioamnionitis and white blood cell counts in preterm infants. *Acta Paediatr*. 2015; 104(6):575-80.
208. Moscuza F, Belcari F, Nardini V, et al. Correlation between placental histopathology and fetal/neonatal outcome: chorioamnionitis and funisitis are associated to intraventricular haemorrhage and



- retinopathy of prematurity in preterm newborns. *Gynecol Endocrinol.* 2011; 27(5):319-23.
209. Polam S, Koons A, Anwar M, et al. Effect of chorioamnionitis on neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005; 159(11):1032-5.
210. Lee JW, VanderVeen D, Allred EN, et al. Prethreshold retinopathy in premature infants with intrauterine growth restriction. *Acta Paediatr.* 2015; 104(1):27-31.
211. Lee JW, McElrath T, Chen M, et al. Pregnancy disorders appear to modify the risk for retinopathy of prematurity associated with neonatal hyperoxemia and bacteremia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013; 26(8):811-8.
212. Lee J, Dammann O. Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012; 17(1):26-9.
213. Di Fiore JM, Bloom JN, Orge F, et al. A higher incidence of intermittent hypoxemic episodes is associated with severe retinopathy of prematurity. *J Pediatr.* 2010; 157(1):69-73.
214. Mitra S, Aune D, Speer CP, et al. Chorioamnionitis as a risk factor for retinopathy of prematurity: A systematic review and meta-analysis. *Neonatology.* 2014; 105(3):189-99.
215. Chaiworapongsa T, Romero R, Berry SM, et al. The role of granulocyte colony-stimulating factor in the neutrophilia observed in the fetal inflammatory response syndrome. *J Perinat Med.* 2011; 39(6):653-66.
216. Martinez-Portilla RJ, Hawkins-Villarreal A, Alvarez-Ponce P, et al. Maternal Serum Interleukin-6: A Non-Invasive Predictor of Histological Chorioamnionitis in Women with Preterm-Prelabor Rupture of Membranes. *Fetal Diagn Ther.* 2018; 10.
217. Nakamura T, Hatanaka D, Kusakari M, et al. Neonatal Leukemoid Reaction with Fetal Inflammatory Response Syndrome Is Associated with Elevated Serum Granulocyte Colony Stimulating Factor and Interleukin-6. *Tohoku J Exp Med.* 2018; 244(2):145-149.

218. Brown MB, von Chamier M, Allam AB, et al. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Front Immunol.* 2014; 24;5:606.
219. Bae GE, Hong JS, Kim JS, et al. Differential immunophenotype of macrophages in acute and chronic chorioamnionitis. *J Perinat Med.* 2017; 24;45(4):483-491.
220. Rogers LM, Anders AP, Doster RS, et al. Decidual stromal cell-derived PGE<sub>2</sub> regulates macrophage responses to microbial threat. *Am J Reprod Immunol.* 2018;:e13032.
221. Ben Amara A, Gorvel L, Baulan K, et al. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta. *J Immunol.* 2013; 1;191(11):5501-14.
222. Yang SW, Cho EH, Choi SY, et al. DC-SIGN expression in Hofbauer cells may play an important role in immune tolerance in fetal chorionic villi during the development of preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2017; 124:30-37.
223. Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, et al. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J Immunol* 2006; 177: 1956–66.
224. Wilson CB. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. *JPediatr* 1986; 108: 1–12.
225. Vinnars MT, Rindsjö E, Ghazi S, et al. The number of CD68(+) (Hofbauer) cells is decreased in placentas with chorioamnionitis and with advancing gestational age. *Pediatr Dev Pathol.* 2010; 13(4):300-4.
226. Caissutti C, Familiari A, Khalil A, et al. Small fetal thymus and adverse obstetrical outcome: a systematic review and a meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2018; 97(2):111-121.
227. Yinon Y, Zalel Y, Weisz B, et al. Fetal thymus size as a predictor of chorioamnionitis in women with preterm premature rupture of membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007; 29(6):639-43.
228. El-Haieg DO, Zidan AA, El-Nemr MM. The relationship between sonographic fetal thymus size and the components of the systemic fetal inflammatory response syndrome in women with preterm prelabour rupture of membranes. *BJOG.* 2008; 115(7):836-41.

229. Sciaky-Tamir Y, Hershkovitz R, Mazor M, et al. The use of imaging technology in the assessment of the fetal inflammatory response syndrome-imaging of the fetal thymus. *Prenat Diagn.* 2015; 35(5):413-9.
230. Di Naro E, Cromi A, Ghezzi F, et al. Fetal thymic involution: a sonographic marker of the fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194(1):153-9.
231. Melville JM, Bischof RJ, Meeusen EN, et al. Changes in fetal thymic immune cell populations in a sheep model of intrauterine inflammation. *Reprod Sci.* 2012; 19(7):740-7.
232. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(5):379-90.

