

POROVNÁNÍ HUSTOTY NATURAL KILLER CELLS (NK BB) CD56+ A CD16+ V KRVI A V ENDOMETRIU ŽEN S OPAKOVANÝMI POTRATY

Z. Ulčová-Gallová^{1,2}, M. Pešek³, P. Chaloupka³, P. Mukešnábl⁴, M. Haschová⁵, P. Lošan¹, K. Bibková¹, Z. Mičanová¹, J. Cibulka^{1,3}

¹ Genetika – Plzeň, s.r.o., ² Gynekologicko-porodnická klinika LF UK Plzeň, ³ Mulačova nemocnice, Gynekologicko-porodnické oddělení, ⁴ Šiklův patologicko-anatomický ústav, LF UK a FN Plzeň,

⁵ MN Privamed a.s., OKB

Implantace časného embrya a dále průběh gravidity je velmi závislý na vybalancovaném neuro-endokrinně imunitním systému. Chybí-li rovnováha těchto částí, pak proces otěhotnění různě selhává. Zanořování embrya do sekrečního endometria je ovlivněn komplexním procesem, při kterém např. vysoká hustota lokálních „přirozených zabíječů“ – natural killer cells (NK bb) může ovlivnit nejen iniciální, ale i pozdější průběh gravidity. NK bb obecně patří mezi lymfocyty, základní heterogenní představitele buněčné imunity vůbec. Mají přirozenou cytotoxicitu především v antiinfekční imunitě, ničí viry, bakterie hlavně tím, že produkují cytotoxické cytokiny nebo jsou těmito cytokiny právě aktivovány, destruuji také tumorózní tkáň. Pro imunologii reprodukce jsou významné NK bb nesoucí znaky CD56+ a CD16+. Míra cytotoxicity závisí na expresi těchto znaků. NK bb mají další vlastnosti jako je regulační funkce za podpory regulačních T-lymfocytů a dendritických buněk. Víme, že NK bb jsou zvýšené v době implantace a jejich cytotoxický charakter může být vystupňován v případech převahy Th1 buněčné odpovědi (3, 4). Prosperující zdravá gravidita vyžaduje vybalancovaný poměr těchto buněk. NK bb disponují tedy regulačními i efektorovými funkcemi (např. rejekce transplantátu apod.). Dnes už se ví (1, 2, 4, 8, 9), že např. podle hustoty exprese znaků můžeme bezpečně určit NK bb s vysokou mírou cytotoxicity nebo naopak velmi malou. Jako diagnostický test se v současné době používají především údaje o hladinách celkového počtu NK bb v krvi. NK bb jsou nositeli celé řady povrchových znaků, my jsme si vybrali pro naši screeningovou studii NK buňky exprimující znaky CD56+ a CD16+ v krvi a v klidovém endometriu u žen opakovaně potrácejících, u kterých jsme jednoznačně vyloučili anatomickou, genetickou a hematologickou příčinu. Imunologická, v podobě antifosfolipidového syndromu primárního nebo sekundárního, je součástí vyšetřovacího panelu reprodukční imunologie. Psychogenní nadstavbu nelze nikdy spolehlivě vyloučit.

MATERIÁL A METODIKA

Z Poradny pro imunologii reprodukce při Genetice – Plzeň, s.r.o. jsme po podepsaném informovaném souhlasu pečlivě vybrali pacientky k vyšetření endometriálních NK bb. V této práci jsme se zaměřili na již kompletně vyšetřených 57 žen ve věku 25–41 (průměr 34) let, které měly 3–9 spontánních potratů nebo missed abortion. Zaměřujeme se také na dobu užívání hormonální antikoncepce před rozhodnutím otěhotnět. Sledujeme pečlivě i pracovní anamnézu a to především s ohledem na stres. U těchto už z poradny náhodně vybraných pacientek jsme provedli screeningové imunologické vyšetření k potvrzení nebo vyloučení antifosfolipidového syndromu, přítomnosti vrozených trombofilních stavů a dále jsme se zaměřili na analýzu buněčné imunity v krvi a endometriu cílené na identifikaci lymfocytů se znaky CD56+ a CD16+. Krev odebíráme v ten samý den těsně před uvedením pacientky do krátké anestezie s analgesií před časovanou hysteroskopií 22.–24. den cyklu.

Hysteroskopii provádíme diagnostickým 5 mm hysteroskopem v krátké celkové anestezii, vzhledem k časté nulliparitě s volně neprostupným děložním hrdlem a vzhledem k následné abrazi endometria. Dilatace děložního hrdla není většinou nutná. Výkon provádíme v ambulantním režimu, bez nutnosti hospitalizace. Nezaznamenali jsme žádnou komplikaci hysteroskopického výkonu v tomto souboru pacientek.

Počet leukocytů a lymfocytů vyšetřujeme metodou průtokové cytometrie na přístroji Cel-dyn Ruby (v laboratoři Privamed), subpopulace lymfocytů CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ a NK bb. CD16+56+ pak na přístroji Coulter Beckman.

Profil antifosfolipidových protilátek proti kyselině fosfatidové, fosfatidylserinu, fosfatidylinositolu, fosfatidylglycerolu, fosfatidyletanolaminu, proti beta-glykoproteinu 1, kardiolipinu, annexinu V v izotypech IgG a IgM vyšetřujeme pomocí konvenční ELISA metody.

Imunohistochemická vyšetření sliznice děložní připravované klasicky z parafinových řezů provádíme pomocí myši monoklonální protilátky CD16 a CD56 (Novocastra™ firmy Leica Microsystems GmbH, Velká Británie). Současně sledujeme v tkáních korporálního endometria i hormonální odezvu.

VÝSLEDKY

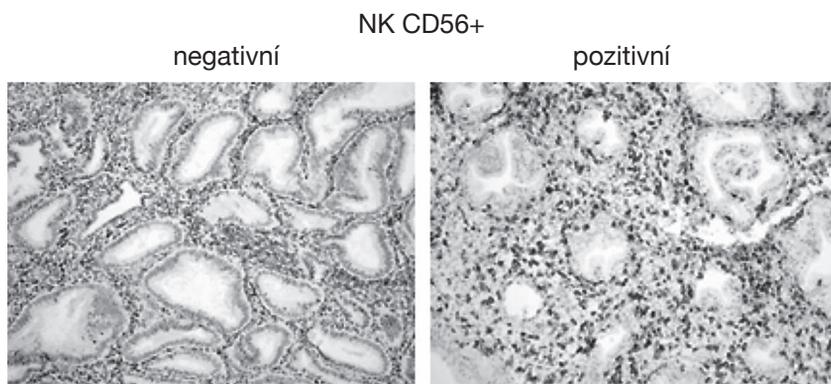
Hormonální antikoncepci (HAK) neužívalo nikdy pět žen, zbytek od 2–15 let, více než 10 let mělo hormonální antikoncepci 21 pacientek. Průměrná doba užívání HAKu je 6,9 let.

Pracovní zátěž: 15 pacientek má dělnickou profesi (dvě z nich pracují s chemikáliemi), 30 úřednickou dráhu, 12 žen jsou vysokoškolačky, 4 z nich lékařky s pravidelnými 4–12 nočními službami do měsíce. APA syndrom byl přítomný u 18/57. Leidenskou mutaci, homozygotní formu, jsme diagnostikovali celkem u tří pacientek. Buněčná imunita v krvi u všech sledovaných pacientek vykazovala zcela normální rozložení lymfocytů pro znaky CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+, CD56+.

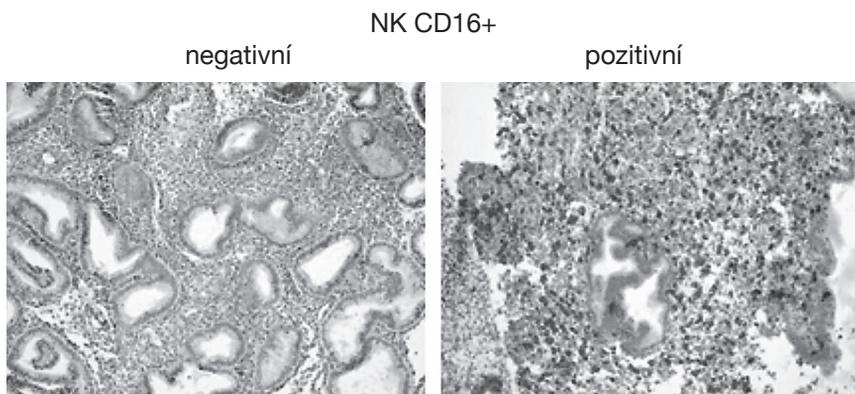
Tabulka č. 1 prezentuje nález endometriálních NK bb CD56+ a NK bb CD16+. Nalezli jsme vysokou densitu NK bb CD56+ u 41/57, a NK bb CD16+ u 40/57, oboje NK bb CD56+ a NK bb CD16+ pak u 36/56. U 13/57 jsme zvýšenou densitu sledovaných NK bb ve sliznici děložní nenalezli.

Tab. 1 Výsledky imunohistochemického vyšetření endometria na NK bb CD56+ a NK bb CD16+ u pacientek opakovaně potrácejících

Pozitivní nálezy		Negativní nálezy	
CD56+	CD16+	CD56+	CD16+
41/57	40/57	36/57	13/57



Obr. 1 Imunohistochemie endometria při sledování NK bb CD56+



Obr. 2 Imunohistochemie endometria při sledování NK bb CD16+

DISKUSE

Nadměrné množství, tedy patologický nález, periferních NK bb a endometriálních NK bb v animálním i lidském modelu je spojován se selháním reprodukce (8). Na druhou stranu ale víme, že NK bb obecně jsou velmi důležité v procesu implantace, v období decidualizace, participují na placentární invazi, usnadňují vaskularizaci za pomoci dalších imunologických faktorů, jako jsou makrofágy, dendritické buňky, které de facto modulují imunitní systém do odpovědi Th2/Treg. Je prokázáno (12), že nerovnováha v lokální buněčné imunitě může vést k porušení imunologické tolerance, k nastolení zvýšené fagocytární aktivity a přesmyku na Th1/Th17 (3) a tím i k nárůstu embryocytotoxických cytokinů, především TNF-alfa a INF-gama. Byla opakovaně prokazována zvýšená aktivita endometriálních NK bb právě u žen s opakovaným selháváním implantace, ale i ztráty časných plodů (15).

Někteří autoři (11) považují jen zvýšené hladiny periferních NK bb CD16+ za původce opakovaného implantačního selhávání s tím, že periferní NK indukují vznik endometriálních NK bb. Jiní autoři (13) informují o tom, že není významný rozdíl mezi počtem NK bb, B a T lymfocytů v porovnání s výsledkem léčby IVF a výsledkem prosperujících gravidit. Upozorňují i na to, že pacientky, které měly vysoké NK bb v krvi, neměly vyšší počet předchozích těhotenských ztrát po in vitro fertilizaci ve srovnání s pacientkami, které měly počty periferních NK bb zcela normální.

Je jasné, že zánětlivá imunitní reakce ovládaná právě buněčnou (NK bb) imunitou sehrává klíčovou úlohu při poruchách reprodukce (selhávání implantace, potraty). Je-li dysregulace mezi NK bb a T lymfocyty právě v endometriu, pak dochází ke vzniku cytotoxického prostředí přímo v děloze a tento stav pak vede ke zhoršené proliferaci a diferenciaci trofoblastu, porušení angiogeneze a zvýšenému oxidativnímu stresu v důsledku lokálních ischemických změn. U žen, které opakovaně potrácejí, jsou velmi časté abnormality T-buněk se zvýšenou odpovědí Th1 a Th17 a sníženou Th2 (3, 6). Lee et al. (7) prokázal, že u 76 % pacientek s prozatím idiopatickým opakovaným potráčením mělo v diferenciaci buněčné imunity velké odchylky právě směrem k nepříznivé, Th1 buněčné odpovědi.

V naší práci jsme ale jednoznačně prokázali, že endometriální NK buňky, jsou přítomné v různé hustotě i v „netěhotném“ endometriu. Tyto buňky proliferují v sekreční fázi během menstruačního cyklu (8, 9), během úspěšné implantace se ještě dál opakovaně množí, prakticky do konce prvního trimestru jako NK bb značené CD56^{bright} a CD16+. Jejich původ je zahalen několika hypotézami, které ale zasahují do vysoce podrobných imunologických úvah, prakticky nad rámec našeho praktického sdělení.

Jedna z posledních prací (5) podtrhuje tu skutečnost, že periferní i endometriální NK bb se mohou výrazně odlišovat podle jejich receptorové exprese, množství a aktivity. Studie se zaměřila na sledování periferních počtů buněk se znaky CD45+, CD3+, CD56+, CD16+ průtokovou cytometrií, a imunohistochemicky sledovala přítomnost NK bb CD56+ v endometriu luteální fáze u 268 žen po jednom, dvou a třech potratech. Studie porovnávala jednotlivé subsety s tím, že prokázala vyšší počty hodnoty periferních lymfocytů CD45 + CD3-DR + ($p < 0,01$) a CD45 + CD3 + CD8 + DR + ($p = 0,04$), které byly spojeny s vyššími počty endometriálních NK bb. Studie ale neprokázala jednoznačnou

spojitost mezi periferními a lokálními NK bb, ale domněnku, že by snad aktivované NK bb, B a T lymfocyty mohly poskytovat cytokiny pro diferenciaci endometriálních NK bb.

Také naše předběžné výsledky (studie ale dále pokračuje) svědčí o tom, že počet periferních NK bb pacientek opakovaně potrácejících je zcela normální, ale u některých žen jsou zcela výrazně vysoké NK bb endometriální. Podle Vassiliadou et al. (15) dochází u potrácivých k narušení imunologické tolerance mezi matkou a plodem právě ve prospěch cytotoxických NK bb CD56^{dim}. I když nemáme zatím možnost určit jemnou diferenciaci uterinních NK bb CD56^{bright} od CD56^{dim} (jedná se o zcela odlišné funkce), přeci jenom se domníváme, že nápadně zvýšená densita endometriálních obecně NK bb CD56+ a CD16+ informuje o vystupňované lokální buněčné imunitě právě v sekreční fázi endometria, která může sehrávat důležitou roli i v implantaci a v průběhu *časné* gravidity. Kdyby se jednalo o imunogenní aktivitu směřovanou k toleranci matka-plod a ne k proliferaci prozánětlivých buněk a jejich faktorů, pak by pacientka opakovaně nepotrácela z důvodu právě prokázaného imunologického selhávání.

Tang et al. (12) provedl analýzu 783 publikací z let 1950–2010 a zaměřil se cíleně na studie endometriálních a periferních NK bb, na jejich hustotu s ohledem na idiopatickou infertilitu. V rozboru prací vyčítá autorům, že laboratorní diagnostika abnormální hustoty NK bb, následný potrat nebo jeho rekurence směřovaná k léčbě, není správně dokumentovaná, nesměřuje k výsledku, tedy *úspěšné* graviditě. Tato kompilátní práce (12) přímo vyzývá k dalším studiím, které potvrdí nebo vyvrátí úlohu hodnocení NK bb, které jsou prediktivním screeningem pro cílenou imunoterapii u žen se sníženou plodností.

Jiné studie (10) vyzdvihují přednosti NK bb (sekrece i „hodných“ cytokinů, účast na angiogenezi apod.) v preimplantačním endometriu, především časné těhotenské deciduy. Upozorňuje však i na to, že zvýšená nadprodukce uterinních NK bb se snoubí se selháváním gravidity. Domnívá se, že tato patologická situace je dobře ovlivnitelná kortikoidní terapií. I tato studie vyzývá ke sledování endometriálních NK bb, kterými můžeme odhalit imunologický defekt v endometriu včas a který nás nasměruje k cílené budoucí imunomodulační léčbě.

V naší prezentované skupině infertilních pacientek téměř třetina z nich užívala hormonální antikoncepci více než 10 let, u většiny z nich jsme diagnostikovali ještě navíc anti-fosfolipidový syndrom, stres a jinou profesionální zátěž, která může narušit synchronizaci neuro-endokrinně imunitního systému. Multifaktoriální příčina snížené plodnosti v nastolení získané autoimunitní patologie ještě více prohlubuje problém buněčné a protilátkové imunity (14). V současné době jsme schopni vhodně stanovenou imunomodulační léčbou cílenou na NK bb a jiné např. protilátkové faktory sledované v reprodukční imunologii navodit stav imunotolerance matka-plod.

ZÁVĚR

V tomto průběžném zaměření na buněčnou imunitu jsme prokázali důležitou skutečnost, že počty periferních NK bb nekorelují s hustotou endometriálních NK bb u pacientek s opakovanými ztrátami těhotenství. Z našeho perspektivního sledování infertilních

pacientek vyplývá, že endometriální NK bb sehrávají důležitou úlohu nejen fyziologickou, ale při vysoké hustotě i patologickou v podobě nadprodukce embryocytotoxických cytokinů (1).

SOUHRN

Natural killer cells – NK bb patří mezi nejdůležitější buňky našeho imunitního obranného systému. Jsou přítomny v krvi, v decidue, ale i v sekrečním endometriu. Mají význam při implantaci, ale mohou svou zvýšenou buněčnou aktivitou i negativně ovlivnit reprodukční proces. Sledujeme vztah hustoty NK bb CD56+ a CD16+ v krvi a v sekrečním endometriu u pacientek s doposud nevysvětleným opakovaným potrácením. Současně se zaměřujeme na antifosfolipidový syndrom, vrozené trombofilní stavy, stres a délku hormonální antikoncepce před početím. Doposud jsme vyšetřili 57 žen ve věku 25–41 let (průměr 34) s anamnézou 3–9 potratů. Sledovali jsme jejich krevní buňky průtokovou cytometrií a imunohistologicky endometrium z hysteroskopie provedené 22.–24. den menstruačního cyklu. Soustředili jsme se především na analýzu buněčné imunity zaměřené na identifikaci lymfocytů se znaky CD56+ a CD16+. Antifosfolipidové protilátky jsme vyšetřovali pomocí ELISA metody. Studie pokračuje. Vysokou hustotu endometriálních NK bb CD56+ jsme našli u 41/57, NK bb CD16+ u 40/57, oboje, NK bb CD56+ a CD16+ pak u 36/57 pacientek. U 13 žen jsme tyto buňky v sekrečním endometriu našli jen sporadicky. NK bb CD56+ a CD16+ v krvi měly všechny pacientky zcela v normálních hodnotách. Tři z nich mají pozitivní Leidenskou mutaci v homozygotní formě, 18/57 pak prokázaný antifosfolipidový syndrom, 12 jsou vysokoškolačky, 4 z nich lékařky sloužící pravidelně noční služby v nemocnici. Zvýšený počet NK buněk v endometriu je spojen s nadměrnou aktivitou embryocytotoxických cytokinů, které mohou negativně ovlivnit těhotenství. Imunoterapie pacientek s patologickými imunologickými nálezy řešíme přísně individuálně.

Comparison of density of nature killer cells (NK bb) CD56+ and CD16+ in the blood and endometrium in women with repeated abortions

SUMMARY

Natural killer cells (NK cells) are among the most important cells of our immune defense system. They are present in the blood, decidua but also in secretory endometrium. We investigate an association between density of NK cells CD56+ and NK cells CD16+ into blood and secretory endometrium in patients with up to now unexplained recurrent miscarriage. At the same time, we focused on diagnosis of antiphospholipid syndrome, congenital thrombophilic factors, stress factor, and length of hormonal contraception before pregnancy. We studied 57 patients aged 25–41 (average 34) years with their history of 3–9 abortions. We monitored their blood cells by flow cytometry and immunohistology of endometrium obtained by hysteroscopy performed on the 22nd–24th day of the

menstrual cycle. We concentrated on the cellular immunity focused on the identification of lymphocytes CD56+ and CD16+. ELISA method was used for identification of antiphospholipid antibodies. Our study goes on. We found a high density of endometrial NK cells CD56+ in 41/57, NK cells CD16+ in 40/57, both NK cells CD56+ and CD16+ in 36/57 patients. In 13 women, we identified only sporadically these cells in the secretory endometrium. NK cells CD56+ and NK cells CD16+ in the blood were all normal number in all our patients. Three of them have a homozygot form of Leiden mutation, and 18/57 primary antiphospholipid syndrome, 12 women have university education, four of them, medical doctors, have regular night services in the hospital. Overproduction of endometrial NK cells is associated with increased local activity of embryocytotoxic cytokines that may negatively affect pregnancy. Immunotherapy in female patients with pathological immunological findings must be solved individually.

LITERATURA

1. De Maria A., Bozzano F., Cantoni C. et al.: Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56 CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2011: 728–32. – 2. Eshadri S., Sunkara S. K.: Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systemic review and meta-analysis. *Human Reprod. Update* 20, 2014: 429–38. – 3. Hanzlikova J., Ulcova-Galova Z., Malkusova I. et al.: Th1–Th2 Response and the Atopy Risk in Patients with Reproductive Failure. *Am. J. Reprod. Immunol.* 61, 2009: 213–20. – 4. Krejsek J., Kopecký O.: *Klinická Imunologie*, nakl. Nucleus, 2004: 1–939. – 5. Kuon R. J., Vomstein K., Weber M. et al.: The “killer cell story” in recurrent miscarriage: Association between activated peripheral lymphocytes and uterine natural killer cells. *J. Reprod. Immunol.* 119, 2017: 9–14. – 6. Kwak-Kim J., Bao S., Lee S. K. et al.: Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 2014: 129–40. – 7. Lee S. K., Na B. J., Kim J. Y. et al.: Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 70, 2013: 398–411. – 8. Leno-Duran E., Munoz-Fernandez R., Olivares E. G. et al.: Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation. *Cell Mol. Immunol.* 11, 2014: 449–55. – 9. Manaster I., Mandelboim O.: The unique properties of uterine NK cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 2010: 434–444. – 10. Quenby S., Farquharson R.: Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod. Biomed. Online* 13, 2006: 24–8. – 11. Seshadri S., Sunkara S. K.: Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and metaanalysis. *Human Reprod. Update* 20, 2014: 429–38. – 12. Tang A. W., Alfirevic Z., Quenby S.: Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriages and infertility: a systemic review. *Human Reprod.* 26, 2011: 1971–80. – 13. Thum M. Y., Bhaskaran S., Bansal A. S. et al.: Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Human Reprod.* 20, 2005: 1272–6. – 14. Ulcova-Galova Z., Bibkova K., Micanova Z. et al.: Possible Effect of Extended Use of Hormonal Contraception on Increased Levels of Antiphospholipid Antibodies in Infertile Women. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 75, 2015: 251–54. – 15. Vassiliadou N., Searle R. F., Bulmer J. N.: Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Human Reprod.* 10, 1999: 194–200.

Adresa autorky: Z. U.-G., Parková 1254/11A, 326 00 Plzeň