

**Φαινοτυπική ανάλυση  
των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων  
σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές  
ανοσιακής αιτιολογίας**

**ΣΚΟΠΟΣ** Σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές ανοσιακής αιτιολογίας ο αριθμός των φυσικών κυτταροκτόνων (natural killer, NK) κυττάρων είναι αυξημένος. Η NK-κυτταροτοξικότητα ρυθμίζεται από υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των NK-κυττάρων. Σκοπός της μελέτης ήταν ο έλεγχος της φαινοτυπικής κατάστασης των NK-κυττάρων του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Στη μελέτη έλαβαν μέρος 11 γυναίκες με 3 ή περισσότερες καθ' έξιν αποβολές και 16 γυναίκες-μάρτυρες. Ελέγχθηκαν τα NK-κύτταρα του περιφερικού τους αίματος, με τη χρήση των δεικτών CD56 και CD16, για την έκφραση των υποδοχέων CD69, CD25, HLA-DR, CD161, CD95, CD94 και CD158a, χρησιμοποιώντας κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα. Οι μετρήσεις έγιναν με κυτταρομετρία ροής. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης του δείκτη CD69 στα NK-κύτταρα γυναικών με καθ' έξιν αποβολές σε σχέση με τις φυσιολογικές μάρτυρες (38,8% έναντι 17,5%, αντίστοιχα,  $P=0,0001$ ). Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της έκφρασης του δείκτη CD61 στα CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> κύτταρα (41,5% σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές έναντι 32,9% στις φυσιολογικές μάρτυρες,  $P=0,05$ ). Σε ό,τι αφορούσε την έκφραση των άλλων υποδοχέων στα NK-κύτταρα, δεν διαπιστώθηκε διαφορά. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα NK-κύτταρα γυναικών με καθ' έξιν αποβολές παρουσιάζονται ενεργοποιημένα, όπως διαπιστώνεται από την αυξημένη έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης CD69 και CD161. Η φαινοτυπική ανάλυση των NK-κυττάρων, με κυτταρομετρία ροής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική μέθοδος ελέγχου, για να καταδείξει την πιθανή ανοσιακή συμμετοχή των NK-κυττάρων σε γυναίκες που διερευνώνται για καθ' έξιν αποβολές.

Έχουν περάσει σχεδόν σαράντα χρόνια από την εποχή που ο Medawar θεώρησε το έμβryo ως αλλομόσχευμα.<sup>1</sup> Αυτή η πρώτη παρατήρηση και οι μετέπειτα σημαντικές ανακαλύψεις βοήθησαν στη δημιουργία της επιστήμης της Ανοσολογίας της Αναπαραγωγής. Η επιστήμη αυτή ασχολείται με τους μηχανισμούς της ανοσιακής προστασίας του κυήματος ή και της απόρριψης αυτού και έχει δώσει ικανοποιητικές απαντήσεις στο ερώτημα «πώς ένας ημιαλλογενής οργανισμός, όπως εί-

ναι το κύημα, γίνεται δεκτός από το μητρικό ανοσιακό σύστημα και δεν απορρίπτεται;».

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όταν ένα ημιαλλογενές έμβryo εμφυτεύεται στην κοιλότητα της μήτρας, υφίσταται την επίδραση του ανοσιακού συστήματος της μητέρας με στόχο την προστασία και ομαλή συμβίωσή του. Μερικοί από τους πλέον αποδεκτούς μηχανισμούς ανοσοπροστασίας του εμβρύου είναι (α) η τοπική καταστολή του μητρικού ανοσιακού συστήματος, (β) η έκφραση

Ε. Ντριβαλής,<sup>1,2</sup>  
Γ. Πατεράκης,<sup>1</sup>  
Κ. Παπασαράντη,<sup>1</sup>  
Ε. Μαντουβάηου,<sup>2</sup>  
Χ. Μαντούβαηος,<sup>2</sup>  
Α. Σταυροπούηου-Γκιόκα<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ανοσοηολογικό Τμήμα και Εθνικό Κέντρο Ιστοσυμβατότητας, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ. Γεννηματάς»

<sup>2</sup>Ιατρείο Ελέγχου Καθ' έξιν Αποβολών, Αθήνα

Phenotypic analysis  
of natural killer (NK) cells in women  
with recurrent spontaneous abortions  
of immune etiology

*Abstract at the end of the article*

**Λέξεις ευρετηρίου**

Καθ' έξιν αποβολές  
Κυτταρομετρία ροής  
NK-κύτταρα  
CD69  
CD161

Υποβλήθηκε 5.9.2001  
Εγκρίθηκε 26.11.2001

των αντιγόνων HLA-G και HLA-E από την τροφοβλάστη, που οδηγούν σε αναστολή της NK-κυτταροτοξικότητας, και (γ) η δημιουργία ασύμμετρων προστατευτικών αντισωμάτων από το μητρικό ανοσιακό σύστημα, που αποσκοπούν στην προστασία του κυήματος.<sup>2</sup>

Σε πολλές όμως περιπτώσεις γυναικών με καθ' εξιν αποβολές (recurrent spontaneous abortions, RSA) η αναγνώριση του κυήματος από το ανοσιακό σύστημα της μητέρας πυροδοτεί μηχανισμούς απόρριψης. Αυτή η εκτροπή του ανοσιακού συστήματος μπορεί να οφείλεται σε πολλά αίτια, ένα από τα οποία είναι η καταστροφή της τροφοβλάστης από τα NK-κύτταρα της μητέρας.<sup>3</sup> Από ανοσιακή σκοπιά, επειδή η τροφοβλάστη δεν εκφράζει αντιγόνα του MHC τάξης I, πλην του HLA-G, δυνητικά μπορεί να γίνει στόχος για τα NK-κύτταρα, επειδή αυτά δεν απαιτείται να αναγνωρίσουν HLA μόρια στα κύτταρα-στόχους για να ασκήσουν την κυτταροτοξική τους δράση. Από την άλλη μεριά, ο μεγαλύτερος αριθμός λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στο φθαρτό κατά τη στιγμή της εμφύτευσης του εμβρυϊκού σάκου είναι τα NK-κύτταρα. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να ελέγχουν αφενός την υπέρμετρη διείσδυση της τροφοβλάστης στο μνομήτριο και αφετέρου τις τοπικές λοιμώξεις. Επιπλέον, τα NK-κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν  $T_H2$  κυτταροκίνες, όπως IL-4, IL-6 και IL-10, και  $T_H3$  κυτταροκίνες, όπως ο TGF- $\beta$ , που συμβάλλουν στη σωστή ανάπτυξη της τροφοβλάστης.<sup>4</sup> Όταν όμως τα NK-κύτταρα βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στο φθαρτό και κυρίως όταν είναι ενεργοποιημένα, επιφέρουν το αντίθετο αποτέλεσμα, που είναι ο θάνατος των κυττάρων της τροφοβλάστης.<sup>5</sup>

Από δομικής πλευράς, τα NK-κύτταρα του περιφερικού αίματος χαρακτηρίζονται από την έκφραση των δεικτών CD56 και CD16 ( $CD56^+/CD16^+$ ) στην επιφάνειά τους. Όταν κύτταρα με αυτή τη δομή εγκαθίστανται στο φθαρτό, χάνουν το δείκτη CD16 ( $CD56^{bright}/CD16^-$ ).<sup>6</sup> Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα NK-κύτταρα εκφράζουν το δείκτη CD69, ο οποίος είναι ένας δείκτης πρώιμης ενεργοποίησης των κυττάρων και δεν εμφανίζεται στα εν ηρεμία NK-κύτταρα.<sup>7</sup>

Τα NK-κύτταρα ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση μέσω υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνειά τους. Υπάρχουν δύο ειδών υποδοχείς, οι ενεργοποιητικοί και οι ανασταλτικοί. Στους υποδοχείς ενεργοποίησης ανήκουν οι CD69 και CD161, των οποίων οι φυσιολογικοί συνδέτες δεν έχουν προς το παρόν βρεθεί. Άλλοι υποδοχείς ενεργοποίησης είναι ο CD25 (που είναι ο υποδοχέας για την α αλυσίδα της IL-2) και το HLA-DR. Στους ανασταλτικούς υποδοχείς ανήκουν δύο μεγάλες ομάδες, η οικογένεια των KIR υποδοχέων (killer inhibitory receptors), με κύριους εκπροσώπους τους

CD158a και CD158b, και η οικογένεια των C-τύπου λεκτινών, με κύριο εκπρόσωπο το ετεροδιμερές CD94/NKG2A. Η ισορροπία μεταξύ των ενεργοποιητικών και ανασταλτικών υποδοχέων καθορίζει τη λειτουργία του NK-κυττάρου (κυτταροτοξικότητα ή αναστολή αυτής).

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε με κυτταρομετρία ροής τους NK-υποδοχείς γυναικών με ιστορικό RSA, με στόχο να καθορίσουμε τη λειτουργική κατάσταση των NK-κυττάρων σ' αυτή την ομάδα γυναικών.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Υλικό

Έντεκα γυναίκες με ιστορικό 3 ή περισσότερων RSA, χωρίς ιστορικό γέννησης ζωντανού νεογνού, συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Στις γυναίκες αυτές αποκλείστηκαν ανατομικά, ενδοκρινικά, γενετικά και λοιμώδη αίτια των αποβολών τους, ενώ, παράλληλα, δεν υπήρχε ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος. 16 γυναίκες της ίδιας ηλικίας, με τουλάχιστον ένα παιδί, χρησιμοποιήθηκαν ως φυσιολογική ομάδα ελέγχου. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων φαίνονται στον πίνακα 1.

### Μέθοδος

Η συλλογή του περιφερικού αίματος από τις ασθενείς και την ομάδα ελέγχου γινόταν σε φιαλίδια με EDTA. Κατόπιν, γινόταν επώαση 100  $\mu$ L περιφερικού αίματος με τα ανάλογα μονοκλωνικά αντισώματα (τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2). Ακολουθούσε λύση των ερυθροκυττάρων και φυγοκέντρηση. Τέλος, γινόταν ανασύσταση του εναιωρήματος σε 400 mL PBS και ανάλυση αυτού σε κυτταρόμετρο Ortho Cytoron Absolute<sup>TM</sup>. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο κυτταρομετρίας τριών χρωμάτων με σταθερό συνδυασμό CD56-FITC/CD16-PeCy5, ώστε να αναδεικνύονται (α) τα ολικά  $CD56^+/CD16^+$  κύτταρα του περιφερικού αίματος και (β) τα  $CD56^{bright}/CD16^-$ , που είναι φαινοτυπικά παρόμοιοι με τους υποπληθυσμούς των NK-κυττάρων που κυκλοφορούν στο φθαρτό την ώρα της εμφύτευσης (εικ. 1). Οι ανωτέρω πληθυσμοί αναλύθηκαν για την έκφραση των υποδοχέων CD69, CD25, HLA-DR, CD161, CD95, CD94 και CD158a, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στις PE συνδεδεμένες μορφές τους.

**Πίνακας 1.** Δημογραφικά χαρακτηριστικά των γυναικών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.\*

	Γυναίκες με RSA (n=11)	Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=16)
Ηλικία	32,3±3,12	33,6±1,29
Κύηση	4,12±3,09	2,12±1,11
Αριθμός αποβολών	4,41±2,87	0,00±0,00

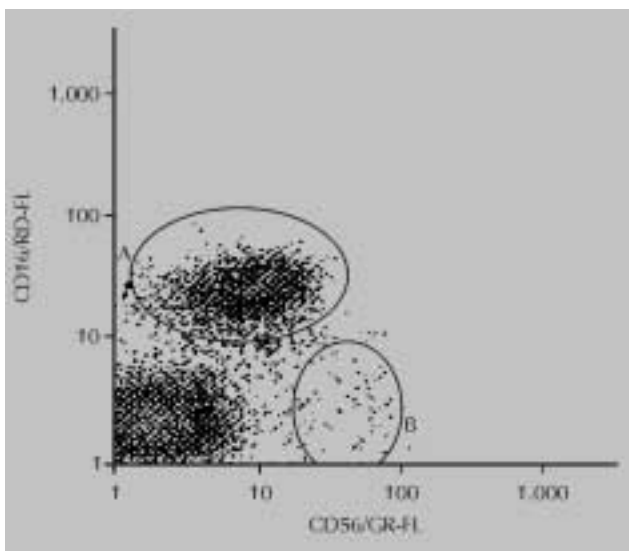
\* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσο όρο  $\pm$ SD

RSA: Καθ' εξιν αποβολές

**Πίνακας 2.** Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

CD	Κλώνος	Φθοριόχρωμα	Πηγή
CD56	C5.9	FITC	Serotec
CD16	3G8	PC5	Immunotech
CD69	TP1.55.3	PE	Immunotech
CD25	ACT-1	PE	DAKO
HLA-DR	BRA30	PE	IQ
CD161	DX12	PE	Pharmingen
CD95	DX-2	PE	DAKO
CD94	HP-3D9	PE	Pharmingen
CD158a	HP-3E4	PE	Pharmingen
Mouse IgG1	N/A	FITC+PE	DAKO
Mouse IgG1	679.1Mc7	PC5	Immunotech

PC5: Phycoerythrin-Cyanine 5, FITC: Fluorescein isothiocyanate, PE: R-phycoerythrin, Ig: Immunoglobulin, N/A: Non available



**Εικόνα 1.** Στο στικτόγραμμα φαίνονται δύο NK-υποπληθυσμοί στο περιφερικό αίμα (A: CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>, B: CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup>).

### Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το t-test. Οποιαδήποτε διαφορά μικρότερη του 0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Υποδοχείς ενεργοποίησης

Στις γυναίκες με RSA διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του δείκτη CD69 στα NK-κύτταρα και στους υποπληθυσμούς τους, σε σχέση με τις φυ-

σιολογικές γυναίκες που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (πίν. 3). Πιο συγκεκριμένα, σε γυναίκες με ιστορικό RSA, 36,8% των ολικών CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> κυττάρων εξέφραζε στην επιφάνειά τους το δείκτη CD69, έναντι 17,5% των φυσιολογικών μαρτύρων (P=0,0001). Επιπλέον, 20,6% των CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> κυττάρων εξέφρασε το CD69, έναντι 10,7% των φυσιολογικών μαρτύρων (P=0,007) (στην εικόνα 2 φαίνεται η διαφορά στην έκφραση του CD69 στα NK-κύτταρα γυναικών με RSA και φυσιολογικών μαρτύρων, όπως απεικονίζεται στην κυτταρομετρία ροής).

Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση στην έκφραση του CD161 στις γυναίκες με RSA έναντι των φυσιολογικών στα CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> κύτταρα (41,5% έναντι 32,9%, αντίστοιχα, P=0,05).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των άλλων υποδοχέων ενεργοποίησης των NK-κυττάρων.

#### Ανασταλτικοί υποδοχείς

Όσον αφορά τους ανασταλτικούς υποδοχείς CD158a και CD94 που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή τους στις διάφορες υποομάδες των NK-κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο υποδοχέας CD94 φαίνεται ότι εκφράζεται πιο έντονα στα CD<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> κύτταρα, ενώ ο υποδοχέας CD158a εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στα CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> κύτταρα. Αυτή η κατανομή των ανασταλτικών υποδοχέων ήταν ίδια στις γυναίκες με RSA και στις μάρτυρες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 4.

#### Δείκτες απόπτωσης

Μελετήθηκε η έκφραση του αποπτωτικού δείκτη CD95 στα NK-κύτταρα και δεν διαπιστώθηκαν διαφορές με-

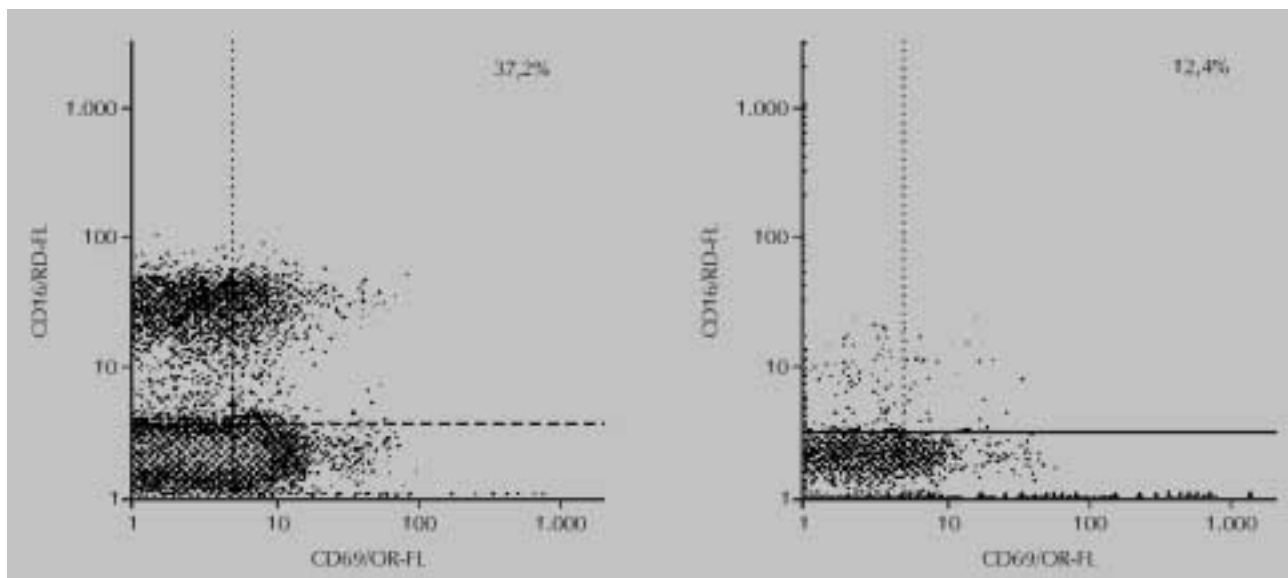
**Πίνακας 3.** Υποδοχείς ενεργοποίησης στα NK-κύτταρα.\*

	Γυναίκες με RSA (n=11)	Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=16)	P
CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup>	36,8±15,5	17,5±6,39	0,0001
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> /CD69 <sup>+</sup>	20,6±9,77	10,7±7,41	0,007
CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	0,70±0,43	1,36±0,96	NS
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> /CD25 <sup>+</sup>	8,52±6,22	7,19±5,91	NS
CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	2,36±1,51	4,91±5,76	NS
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	4,90±3,74	2,91±2,25	NS
CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD161 <sup>+</sup>	70,7±12,0	66,3±9,69	NS
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> /CD161 <sup>+</sup>	41,5±6,13	32,9±13,5	0,05

\* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσο όρο ±SD

NS: Μη στατιστικά σημαντική διαφορά

RSA: Καθ' εξιν αποβολές



**Εικόνα 2.** Αντιπροσωπευτικά σικτογράμματα, όπου φαίνεται η αυξημένη έκφραση του CD69 στα NK-κύτταρα γυναίκας με ιστορικό καθ' εξίν αποβολών (αριστερά), σε σύγκριση με φυσιολογική μάρτυρα (δεξιά).

**Πίνακας 4.** Κατανομή των ανασταλτικών υποδοχέων στα NK-κύτταρα.\*

	CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD94 <sup>+</sup>	CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> /CD94 <sup>+</sup>	P
Γυναίκες με RSA (n=11)	76,3±9,38	93,5±7,36	0,0001
Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=15)	66,9±15,1	88,0±12,0	0,0001

	CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD158a <sup>+</sup>	CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> /CD158a <sup>+</sup>	P
Γυναίκες με RSA (n=11)	27,7±14,6	5,85±5,56	<0,0001
Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=15)	37,2±18,2	7,44±11,9	<0,0001

\* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσο όρο ±SD

RSA: Καθ' εξίν αποβολές

ταξύ γυναικών με RSA και φυσιολογικών μαρτύρων (πίν. 5).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα NK-κύτταρα βρίσκονται σε αφθονία στο φθαρτό την ώρα της εμφύτευσης του κυήματος και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι ο έλεγχος της τροφοβλαστικής διείσδυσης και η ρύθμιση της καλής ανάπτυξης του πλακούντα.<sup>8</sup> Σε γυναίκες όμως με καθ' εξίν αποβολές τα NK-κύτταρα δρουν κυτταροτοξικά έναντι της τροφοβλάστης.<sup>9</sup> Στο παρελθόν είχε συσχετιστεί η αύξηση του αριθμού των

**Πίνακας 5.** Υποδοχείς απόπτωσης στα NK-κύτταρα.\*

	Γυναίκες με RSA (n=11)	Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=16)	P
CD56 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	5,67±4,13	6,60±6,29	NS
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> /CD95 <sup>+</sup>	1,55±1,33	3,18±3,07	NS

\* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσο όρο ±SD

NS: Μη στατιστικά σημαντική διαφορά

RSA: Καθ' εξίν αποβολές

NK-κυττάρων του περιφερικού αίματος και ιδίως η αυξημένη κυτταροτοξικότητά τους έναντι κυττάρων-στόχων, με τις καθ' εξίν αποβολές.<sup>10</sup>

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι τα NK-κύτταρα του περιφερικού αίματος των γυναικών με RSA στον ελληνικό χώρο εμφανίζουν στην επιφάνειά τους αυξημένη έκφραση του δείκτη ενεργοποίησης CD69, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη μας, που αφορούσε γυναίκες της αμερικανικής ηπείρου (στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος L78 της Becton Dickinson, ως αντι-CD69 μονοκλωνικό αντίσωμα.<sup>11</sup> Όταν τα NK-κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του CD69 έχουν τη δυνατότητα, εκτός των άλλων, να εκκρίνουν και σημαντικές ποσότητες TNF-α,<sup>12</sup> ο οποίος έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση βλάβης στην τροφοβλάστη.

Ο υποδοχέας CD69 ανήκει στην οικογένεια των λεκτινών τύπου C και θεωρείται δείκτης πρώιμης ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, ενώ ο φυσιολογικός συνδέτης του δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί.<sup>13</sup> Δεν είναι γνω-

στό το πώς εισάγεται αυτός ο δείκτης στα NK-κύτταρα *in vivo*. Εντούτοις, *in vivo* μελέτες έχουν δείξει αυξημένη έκφρασή του όταν τα NK-κύτταρα διεγείρονται από IL-2 ή καλλιεργούνται μαζί με κύτταρα της σειράς K562.<sup>7</sup>

Ένας άλλος δείκτης ενεργοποίησης, που βρήκαμε ότι ήταν αυξημένος στον υποπληθυσμό CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup>, είναι ο CD161. Ο δείκτης αυτός ανήκει στους υποδοχείς τύπου C-λεκτινών και έχει περιγραφεί στον άνθρωπο και στα τρωκτικά ως NKRP1.<sup>14</sup> Τα γονίδια των CD69 και CD161 κωδικοποιούνται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 12, μέσα στην περιοχή του συμπλέγματος του φυσικού κυτταροκτόνου γονιδίου (natural killer cell complex, NKC). Οι φυσιολογικοί συνδέτες αυτών των μορίων είναι προς το παρόν άγνωστοι, πιθανόν όμως να είναι υδατάνθρακες. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι συγκεκριμένες υδατανθρακικές δομές της τροφοβλάστης, για άγνωστους μέχρι στιγμής λόγους, ενεργοποιούν τα μπητρικά NK-κύτταρα και τα εκτρέπουν προς την οδό της κυτταροτοξικότητας. Σε άλλη μελέτη δείξαμε ότι υφίσταται αυξημένη έκφραση του δείκτη CD69, όταν NK-κύτταρα γυναικών με RSA καλλιεργούνταν ταυτόχρονα *in vitro* με ED<sub>27</sub>, μια κυτταρική σειρά φυσιολογικής ανθρώπινης τροφοβλάστης 1ου τριμήνου.<sup>11</sup> Αυτό μπορεί να μας οδηγήσει στην υπόθεση ότι πράγματι κάποια ουσία, μη γνωστή μέχρι σήμερα, που εκκρίνεται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης, είναι ικανή να οδηγήσει στην ενεργοποίηση των NK-κυττάρων και στην επακόλουθη βλάβη της τροφοβλάστης.

Μια άλλη ερμηνεία του φαινομένου της επιλεκτικής ενεργοποίησης των NK-κυττάρων μπορεί να δοθεί στο επίπεδο των κυτταροκινών. Είναι παραδεκτό ότι στις γυναίκες που έχουν μια φυσιολογική κύηση, κυρίαρχη ανοσιακή απάντηση στο επίπεδο της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας είναι η T<sub>H</sub>2 τύπου ανοσία, με προέχουσα την έκκριση των κυτταροκινών IL-4, IL-5 και IL-10. Αντίθετα, στις γυναίκες με RSA επικρατεί η T<sub>H</sub>1 τύπου ανοσία.<sup>15</sup> Αυτό σημαίνει ότι κυρίαρχες κυτταροκίνες είναι, μεταξύ άλλων, (α) η IL-2, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει τα NK-κύτταρα και να τα μετατρέψει σε LAK-κύτταρα, (β) η INF-γ, η οποία εκκρίνεται από τα μακροφάγα και μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει τα NK-κύτταρα, και (γ) ο TNF-α, ο οποίος δρα είτε αυτοκρινώς στα NK-κύτταρα και τα ενεργοποιεί, είτε απευθείας στα κύτταρα της τροφοβλάστης κυτταροτοξικά.<sup>16</sup>

Το γεγονός ότι τα NK-κύτταρα εκφράζουν τον πρώιμο δείκτη ενεργοποίησης CD96 και όχι τους CD25 και HLA-DR (που εμφανίζονται αργότερα κατά την ανοσιακή απάντηση στην ενεργοποίηση),<sup>17</sup> δείχνει ότι αυτή η ενεργοποίηση είναι παροδική.

Μελετήσαμε επίσης την κατανομή των ανασταλτικών υποδοχέων CD94 και CD158a. Ο CD94 σχηματίζει ένα

ετεροδιμερές με το NKG2A και το σύμπλεγμα αυτό αναγνωρίζει το αντιγόνο HLA-E, που εκφράζεται στην τροφοβλάστη.<sup>18</sup> Ο υποδοχέας CD158a (KIR2DL1) ανήκει στην οικογένεια των KIR υποδοχέων και αναγνωρίζει τα HLA-Cw2, 4, 5 και 6.<sup>19</sup> Η σύνδεση των ανασταλτικών υποδοχέων με τους συνδέτες τους οδηγεί στην αναστολή της NK-κυτταροτοξικότητας έναντι της τροφοβλάστης. Θα ήταν λοιπόν χρήσιμο να γνωρίζαμε ποιους ανασταλτικούς υποδοχείς εκφράζει κάθε ομάδα NK-κυττάρων. Βρήκαμε ότι συγκεκριμένες ομάδες NK-κυττάρων εκφράζουν συγκεκριμένους υποδοχείς. Ενώ ο CD94 εκφράζεται στα CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup>, ο CD158a εκφράζεται κυρίως στα CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>, γεγονός που είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες.<sup>20</sup>

Ελέγξαμε επίσης την έκφραση του δείκτη CD95 στα NK-κύτταρα των γυναικών με RSA. Πρόκειται για έναν αποπτωτικό δείκτη (γνωστός και ως Fas) που εκφράζεται από μπητρικά λεμφοκύτταρα, τα οποία, αναγνωριζόμενα από τα κύτταρα της τροφοβλάστης που εκφράζουν το συνδετικό του μόριο CD95L (FasL), υφίστανται απόπτωση.<sup>21</sup> Εντούτοις, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση αυτού του δείκτη μεταξύ γυναικών με RSA και φυσιολογικών μαρτύρων.

Η ισορροπία μεταξύ των διαφόρων υποδοχέων που βρίσκονται στα NK-κύτταρα (ενεργοποιητικοί ή ανασταλτικοί) προδικάζει το αποτέλεσμα της NK-κυτταροτοξικότητας ή της αναστολής αυτής. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη δυναμική που έχει ένα NK-κύτταρο, δηλαδή ποιοι υποδοχείς είναι κυρίαρχοι σ' αυτό το κύτταρο. Αν τα NK-κύτταρα της μητέρας φέρουν ενεργοποιητικούς υποδοχείς έναντι πατρικών MHC αντιγόνων που εκφράζονται στην τροφοβλάστη, τότε ίσως να δρουν κυτταροτοξικά έναντι της τροφοβλάστης. Αντίθετα, αν οι κυρίαρχοι υποδοχείς στα NK-κύτταρα της μητέρας είναι ανασταλτικού τύπου, τότε η τροφοβλάστη μπορεί να διαφεύγει της NK-κυτταροτοξικότητας. Άρα, η φαινοτυπική ανάλυση των υποδοχέων των NK-κυττάρων με κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τον κλινικό ανοσολόγο της αναπαραγωγής, που του επιτρέπει να γνωρίζει τη λειτουργική κατάσταση των NK-κυττάρων της γυναίκας με ιστορικό RSA, ώστε να επέμβει θεραπευτικά όπου ενδείκνυται.

Η γνώση των NK-υποδοχέων βοηθάει στην καλύτερη αποσαφήνιση του ρόλου των NK-κυττάρων στην αναπαραγωγή. Περαιτέρω μελέτες θα ρίξουν φως στους ακριβείς μηχανισμούς που διέπουν αυτή τη θαυμαστή συσχέτιση της επιτυχούς αλλομεταμόσχευσης που λαμβάνει χώρα σε μια ανοσιακά προνομιούχα θέση, όπως είναι η μήτρα, και ενός στοιχείου της φυσικής μας ανοσίας, όπως είναι τα NK-κύτταρα.

## ABSTRACT

**Phenotypic analysis of natural killer (NK) cells in women with recurrent spontaneous abortions of immune etiology**

E. NTRIVALAS,<sup>1,2</sup> G. PATERAKIS,<sup>1</sup> C. PAPASARANTI,<sup>1</sup> E. MANTOUVALOU,<sup>2</sup> H. MANTOUVALOS,<sup>2</sup> C. STAVROPOULOS-GIOKAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and National Tissue Typing Center, "G. Gennimatas" General Hospital,

<sup>2</sup>Center for the Immunological Evaluation of Recurrent Spontaneous Abortions, Athens, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2002, 19(1):64–70*

**OBJECTIVE** Peripheral blood natural killer (NK) cells are elevated in women who suffer recurrent spontaneous abortions (RSA). NK cytotoxicity is controlled by several receptors found on the NK surface. This study investigated the functional status of peripheral blood NK cells in women with RSA by detecting the expression of surface receptors. **METHOD** Eleven women with three RSA and 16 healthy age-matched female controls were included in this study. NK cells of whole peripheral blood were stained using anti-CD56 and anti-CD16 monoclonal antibodies, and tested for the expression of CD69, CD25, HLA-DR, CD161, CD95, CD94 and CD158a. The results were analyzed by a three-color flow cytometric protocol. **RESULTS** There was a statistically significant increase in the expression of CD69 on NK cells of women with RSA as compared to controls. There was also an increase in the expression of CD161 on the subpopulation of CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> cells. There was no difference in the expression of the other surface markers. **CONCLUSIONS** This study demonstrates that NK cells of women with RSA are activated, showing increased expression of the early activation marker CD69. In addition, cells which circulate in the human decidua around the time of implantation (CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup>) show an elevated expression of the activation marker CD161. Finally, NK cells of these women do not express Fas. The analysis of receptors on NK cells by flow cytometry may be an additional diagnostic method for the detection of the functional status of NK cells in women with RSA.

**Key words:** CD69, CD161, Flow cytometry, NK cells, Recurrent spontaneous abortions

## Βιβλιογραφία

- MEDAWAR PB. Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953, 7:320
- BEER AE, KWAK-KIM J. Immunology of normal pregnancy. *Immunol Clin North Am* 1998, 18:249–270
- CLARK DA, ARCK PC, CHAOUAT G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* 1999, 41:5–22
- CLARK DA. Signaling at the fetomaternal interface. *Am J Reprod Immunol* 1996, 41:169–173
- YOKOYAMA WM. The mother-child union: The case of missing-self and protection of the fetus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:5998–6000
- MOLLER MJ, KAMMERER R, KLEIST SV. A distinct distribution of natural killer cell subgroups in human tissues and blood. *Int J Cancer* 1998, 78:535–538
- BORREGO F, PENA J, SOLANA R. Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol* 1993, 23:1039–1043
- KWAK JYH, BEER AE, KIM SH, MANTOUVALOS HP. Immunopathology of the implantation site utilizing monoclonal antibodies to natural killer cells in women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1999, 41:91–98
- KING A, BURROWS T, LOKE YM. Human uterine natural killer cells. *Nat Immun* 1996, 15:41
- GILMAN-SACHS A, DU CHATEAU BK, ASLAKSON CJ, WOELGEMUTH G, KWAK JYH, BEER AE ET AL. Natural killer (NK) cell subsets and NK cell cytotoxicity in women with histories of recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1999, 41:99–105
- NTRIVALAS EI, KWAK-KIM JYH, GILMAN-SACKS A, CHUNG-BANG H, NG S, BEAMAN KD ET AL. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown etiology. *Hum Reprod* 2001, 16:855–861
- BORREGO F, ROBERTSON MJ, RITZ J, PENA J, SOLANA R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 1999, 97:159–165
- MARZIO R, MAUEL J, BETZ-CORRADIN S. CD69 and regulation of immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999, 21: 565–582

14. AZZONI L, ZATSEPINA O, ABELE B, BENNETT IM, KANAKARAJ P, PERUSSIA B. Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T-cells. *J Immunol* 1998, 161:3493–3500
15. WEGMANN TG, LIN H, GUILBERT L, MOSMANN TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993, 14:353–356
16. NAUME B, ESPEVIK T. Immunoregulatory effects of cytokines on natural killer cells. *Scand J Immunol* 1994, 40:128–134
17. DAVID D, BANI L, MOREAU K-L, DEMAISON C, SUN K, SALVUCCI O ET AL. Further analysis of interleukin-2 receptor subunit expression on the different human peripheral blood mononuclear cell subsets. *Blood* 1998, 91:165–172
18. SODERSTROM K, CORLISS B, LANIER LL, PHILLIPS JH. CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* 1997, 159:1072–1075
19. MORETTA L, BIASSONI R, BOTTINO C, MINGARI M, MORETTA A. Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 2000, 21:21–23
20. COOPER MA, FEHRINGER TA, TUMER SC, CLEN KS, GHAHERI BA, GHAYUR T ET AL. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood* 2001, 97:3146–3151
21. KAUMA SW, HUFF TF, HAYES N, NILKAEAO A. Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:2188–2194

Corresponding author:

E. Ntrivalas, 30 Eufroniou street, GR-161 21 Athens, Greece  
e-mail: entrivalas@repro-med.net