

NK ląstelių reikšmė moterų vaisingumui ir reprodukcinėms baigtims

Jogaile Gudaitė¹, Gabija Didžiokaitė¹, Violeta Kvedarienė^{2,3}

¹Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Faculty of Medicine, Vilnius University

²Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

Vilnius University Hospital Santaros Klinikos

³Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų institutas

Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University

El. paštas: jogailei.g@gmail.com

Santrauka

Darbo tikslas. Siekiame aptarti naujausią informaciją apie natūraliųjų žudikių (NK) ląstelių veiklos ir moterų vaisingumo bei kitų reprodukcinių baigčių sąsajas, taip pat apžvelgti galimas laboratorinės diagnostikos galimybes šioje srityje.

Medžiaga ir metodai. Tinkamos literatūros paieška pagal reikšminius žodžius atlikta *Pubmed* ir *Web of Science* duomenų bazėse bei specializuotoje paieškos sistemoje *Google Scholar*. Tolesnė publikacijų atranka vykdyta pagal PRISMA rekomendacijas.

Literatūros apžvalga. Gimdos NK (uNK) ląstelės išskirdamos citokinus, matriksų metaloproteinazes ir angiogeninius

faktorių yra itin svarbios ankstyvuosiuose nėštumo etapuose vykstantiems angiogenezei, decidualizacijai, placentos formavimuisi, trofoblasto invazijai ir embriono imuninės apsaugos procesams, o nenormalūs uNK ląstelių skaičiaus pokyčiai bei sutrikusi jų funkcija gali nulemti įvairias akušerines komplikacijas, pavyzdžiui, kartotinius persileidimus arba nevaisingumą. Reikia ieškoti ir taikyti pažangesnius NK ląstelių tyrimus, kad būtų galima įvertinti imunomoduliacinio gydymo galimybes siekiant pagerinti šių moterų reprodukcines baigtis.

Išvada. Nepaisant išaugusio susidomėjimo imunologinėmis nevaisingumo hipotezėmis, iki šiol tyrėjų gauti duomenys apie NK ląstelių reikšmę reprodukcinėje sistemoje išlieka dvejopi. Reikalingi tolesni tyrimai siekiant iki galo išsiaiškinti NK ląstelių ir jų potipių veikimo mechanizmus reprodukcinėje sistemoje, galimą šių ląstelių tyrimų naudą neaiškios kilmės nevaisingumo bei kartotinių persileidimų diagnostikai bei imunomoduliacinio gydymo taikymo galimybes atliekant pagalbinio apvaisinimo procedūras.

Reikšminiai žodžiai: NK ląstelės, neaiškios kilmės nevaisingumas, neaiškios kilmės kartotiniai persileidimai, pbNK tyrimai, uNK ląstelės.

ĮVADAS

Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) teigimu, nevaisingumas yra apibrėžiamas kaip negalėjimas pastoti per vienerių metų laikotarpį (ir/ar daugiau), kai reguliarių lytinių santykių metu nenaudojamos jokios barjerinės bei kitos kontraceptinės priemonės, kurios padėtų apsisaugoti nuo nėštumo [1]. Mokslinių tyrimų duomenimis, 12,6–17,5 % vaisingo amžiaus porų susiduria su nevaisingumu [2], kurio priežastimis dažnai laikomi metaboliniai sutrikimai, lytiškai plintančios infekcijos, kiaušintakių pralaidumo ar ovuliacijos sutrikimai bei oligozoospermija [3]. Visgi, nuo 8 % iki 28 % nevaisingumo diagnozę turinčių porų nevaisingumą sukėlusios priežastys lieka nenustatytos ir jų būklė toliau įvardijama kaip neaiškios kilmės nevaisingumas [4, 5].

Iš visų numanomų neaiškios kilmės nevaisingumo priežasčių su galimomis imunologinėmis nevaisingumo kilmės priežastimis susijusiais moksliniais tyrimais domimasi jau ne vieną dešimtmetį. Nors tradiciškai imunologinė nevaisingumo kilmė yra siejama su antikūnų prieš spermą antigenus

arba ovocitus susidarymu [6], pastaraisiais metais daugėja duomenų apie imuninių ląstelių skaičiaus ir funkcijos pokyčius reprodukcinėje sistemoje, galimai lemiančius nevaisingumą. Vienomis iš tokių ląstelių jau du dešimtmečius yra laikomos natūralios ląstelės žudikės (angl. *natural killer cells*, NK), kurių tyrimai atskleidžia dvilypį šių ląstelių pradą. Nors NK ląstelių tyrimai rodo panašų ląstelių veikimą tiek nevaisingumo, tiek kartotinių persileidimų patogenezėje [3, 7], tačiau nauji moksliniai duomenys atskleidžia ir itin reikšmingą NK ląstelių veiklą implantacijos, kraujagyslių remodeliacijos ir decidualizacijos procesuose bei tolesniu vaisiaus vystymosi laikotarpiu [8]. Šios apžvalgos tikslas – aptarti naujausią informaciją apie NK ląstelių veiklos ir moterų vaisingumo bei kitų reprodukcinių baigčių sąsajas, taip pat apžvelgti galimas laboratorinės diagnostikos galimybes šioje srityje.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Mokslinių literatūros šaltinių paieška vykdyta *Pubmed* ir *Web of Science* duomenų bazėse bei specializuotoje paieškos

sistemoje *Google Scholar*. Apžvalgai buvo naudoti ne senesni nei dešimties metų straipsniai (išskyrus istoriškai reikšmingas senesnes publikacijas), publikuoti anglų ir lietuvių kalbomis. Pasirinkti apžvalgos temą atitinkantys šie reikšminiai žodžiai: *altered cell immunity in female infertility, biomarkers of female infertility, immunological infertility, NK cells, uterine NK cells*, jų deriniai ir lietuviški atitikmenys.

Mokslinės literatūros analizei tinkamos publikacijos buvo atrinktos pagal šiuos pasirinktus kriterijus:

- Pirminiai kriterijai:
 - straipsniai, publikuoti per pastaruosius dešimt metų (nuo 2012 iki 2022 m.), išskyrus istorinės reikšmės tekstus;
 - publikacijos anglų ir lietuvių kalbomis.
- Antriniai kriterijai (straipsnių atmetimo kriterijai):
 - publikacijos laikytos netinkamomis, jeigu jose nagrinėjamos kitos, su tema nesusijusios ligos, operacijos, procedūros ar gydymo metodai;
 - jeigu pasirinkta tema nenagrinėjami NK ląstelių tipai, funkcijos, jų reikšmė reprodukcinė ligų patogenezėje ar šių ląstelių ištirimo metodai;
 - nerasta prieigos prie viso teksto publikacijos, matoma tik santrauka.

Mokslinės literatūros atranka vykdyta keliais etapais: pirmame etape ieškota visų straipsnių, kurių pavadinimai ar santraukos atitinka nurodytus pirminius kriterijus; antrame etape atrinkti straipsniai, kuriuose yra suteikta prieiga prie viso straipsnio teksto; trečiame – įvertintas visas publikacijos tekstas ir, remiantis straipsnių atmetimo kriterijais, atsakyta netinkamų publikacijų. Galutiniame etape atrinktos publikacijos įtrauktos į literatūros apžvalgą. Straipsnių atmetimas vykdytas tiek rankiniu būdu, tiek pasitelkus *Microsoft Excel* paieškos ir atmetimo įrankius.

LITERATŪROS APŽVALGA

Trumpa imuninių ląstelių moterų reprodukcinėje sistemoje apžvalga

Sėkmingas pastojimas ir nėštumo išnešiojimas iki gimdymo bei apsauga nuo mikroorganizmų yra vienos iš svarbiausių moters reprodukcinės sistemos funkcijų. Viršutinę moters reprodukcinės sistemos dalį sudaro kiaušintakiai ir gimda, apimant ir vidinę gimdos kaklelio dalį (*endocervix*), kuri yra padengta vienasluoksniu stulpiniu epiteliumi, o apatinę sudaro išorinė gimdos kaklelio dalis (*ectocervix*) bei makštis, atitinkamai išklotos sunkiau pažeidžiamu vienasluoksniu plokščialąstelinio epiteliumi [9].

Reprodukcinės organų sistemos veiklai svarbios įvairios imuninės ląstelės. B limfocitai moters reprodukcinuose takuose aptinkami rečiau, o T limfocitai, makrofagai, NK ląstelės, neutrofilai ir putliosios ląstelės yra pagrindiniai reprodukcinės sistemos imuniniai komponentai [9]. Veikdami kartu minėti leukocitai atlieka svarbias funkcijas, pavyzdžiui, apatinėje sistemos dalyje sudaro imunitetą prieš makšties patogenus, o viršutinėje palaiko imuninę toleranciją spermatozoidams bei embrionui ir vaisiui [9]. Sutrikusi imuninių procesų veikla yra siejama su nevaisingumu, persileidimais bei kitomis akušerinėmis komplikacijomis [9].

NK ląstelių ypatumai

Pusiau alogeninio vaisiaus nešiojimas motinos organizme imunologiniu aspektu yra laikomas unikaliu fenomenu [3]. Kad tėvo aloantigenai būtų priimti nėštumo metu, imuninės ląstelės susidarant motinos ir vaisiaus jungčiai (angl. *maternal-fetal interface*, MVJ) turi persitvarkyti ir įgyti laikiną tolerancijos būklę. Formuojantis MVJ vienu iš svarbiausių procesų yra laikomas atkrintamosios gimdos gleivinės plėvės (lot. *decidua*) susidarymas – decidualizacija – o jos metu vykstančiuose implantacijos, placentos formavimosi, apsaugos nuo infekcinių ligų ir kituose procesuose svarbų vaidmenį atlieka gimdos gleivinės imuninės ląstelės [10, 11].

Didžiausią (25–40 %) atkrintamojoje gimdos gleivinės plėvėje randamą leukocitų populiaciją sudaro natūralios gimdos žudikės ląstelės (angl. *uterine natural killer cells*, uNK), kurios didžiausią koncentraciją menstruacinio ciklo metu pasiekia trečią–penktą dieną po ovuliacijos, pirmąjį nėštumo trečdį sudaro net iki 70 % visų atkrintamosios plėvės leukocitų [10], o vėlesniuose nėštumo etapuose užima tik nedidelę leukocitų dalį [12]. uNK ląstelės pasižymi išskirtinėmis fenotipinėmis bei funkcinėmis savybėmis, kuriomis skiriasi nuo periferiniame kraujyje aptinkamų NK ląstelių, o priklausomai nuo savo lokalizacijos dar yra išskiriamos į endometro (eNK) arba *decidua* (dNK) NK ląsteles [13]. Fenotipiškai uNK ląstelėms būdinga didelė CD56 NK ląstelių žymens bei maža CD16 žymens koncentracija (CD56^{bright} CD16[–]), o periferinės NK ląstelės (pbNK) pasižymi priešingomis savybėmis (CD56^{dim} CD16⁺) [14]. Periferinėms NK ląstelėms būdingas ir ryškus citotoksinis poveikis, kuris nebūdingas uNK ląstelėms [14]. Paminėtina ir tai, jog uNK ląstelių veikla yra reguliuojama per inhibicinius receptorius, pvz. NKG2a, bei aktyvuojančius receptorius, pvz. NKp30 ir NKp46 (angl. *natural cytotoxicity receptor*) [7].

uNK ląstelių svarba nėštumui

Fu ir bendraautorų atlikto tyrimo duomenimis, vieno iš uNK potipių (CD49a+Eomes+ uNK) gaminami ir išskiriami augimo veiksniai daro įtaką sėkmingam vaisiaus vystymuisi nėštumo laikotarpiu, o šių veiksnių trūkumas lemia vaisiaus augimo atsilikimą [15]. Visgi, pagrindinė uNK ląstelių funkcija yra laikoma augimo ir angiogeninių faktorių gamyba moters reprodukcinėje sistemoje ankstyvuoju nėštumo laikotarpiu. Žinoma, jog uNK ląstelės gamina ir išskiria placentos augimo faktorių (PIGF), kraujagyslių endotelio augimo faktorių C (VEGF-C), matriksinio metaloproteinazės (MMPs), angiopoetino-1, makrofagų ir granulocitų kolonijas stimuliuojančius faktorius (GM-CSF), makrofagų kolonijas stimuliuojančius faktorius (M-CSF), įvairius citokinus, iš kurių IL-10, IL-1β, IFN-γ, TNF-α, TGF-β, LIF, IL-2, 1 ir kt. [7, 11]. Nors tikslūs visų NK išskiriamų faktorių veikimo mechanizmai reprodukcinėje sistemoje dar nėra iki galo ištirti, žinoma, jog IL-10 yra svarbus imuninės tolerancijos tarp motinos ir vaisiaus palaikymo veiksnys, o šio citokino trūkumas skatina kitų ląstelių vykdomą uždegiminių citokininų gamybą bei jos nulemtas nepalankias akušerines baigtis, pavyzdžiui, nėštumo nutraukimą [16]. Be svarbaus vaidmens

sūžadinant gimdymą, ankstyvuojų nėštumo etapu IL-1 β dalyvauja trofoblasto invazijoje, audinių regeneracijoje bei reguliuoja citotrofoblasto aktyvumą MVJ [17]. Pastebėta ir uNK ląstelių išskiriamo VEGF sudarančio komponento C (VEGF-C) svarba – būdamas mitogenu VEGF skatina placentinės kraujotakos vystymąsi bei motininių ir embrioninių endotelio ląstelių proliferaciją, o šio faktoriaus trūkumas siejamas su kartotiniaus persileidimais [14]. Kitas *Fu* ir bendraautorijų tyrimas atskleidė, jog CD56^{bright} CD27⁺ tipo uNK ląstelės sekretuodamos IFN- γ slopina Th17 ląstelių diferenciaciją ir uždegimui palankių veiksnių išsiskyrimą iš jų, tokiu būdu skatina imuninę toleranciją ir lemia sėkmingą nėštumą [11, 18]. Autorių duomenimis, kartotinius persileidimus patyrusioms pacientėms ši, nuo NK ląstelių priklausoma reguliacinė veikla yra sutrikusi ir lemia didelį Th17 ląstelių aktyvumą bei jo sukeltą vietinį uždegimą, dėl kurio sutrikdomos ir kitos NK ląstelių funkcijos bei prarandama imuninė tolerancija tarp motinos ir vaisiaus [18].

Paminėtina ir tai, kad periimplantaciniu laikotarpiu uNK ląstelės infiltruojasi ir kaupiasi šalia spiralinių arterijų [8], o jų paviršiuje ekspresuojami receptoriai KIR (angl. *killer-immunoglobulin-like receptor*) ir ILT2 (angl. *immunoglobulin-like transcript-2*) tiesiogiai kontaktuoja su trofoblasto antigenais [7], dėl to išskiria citokinais, leidžiantys toliau reguliuoti trofoblasto migraciją ir invaziją į atkrintamąją gimdos gleivinės plėvę [7]. Tad uNK ląstelės yra tiesiogiai susijusios su implantacijos sėkme, o vykdydamos kraujagyslių remodeliaciją lemia sėkmingą placentos formavimąsi ankstyvuojų nėštumo laikotarpiu [8]. Kartu dėl išskiriamų veiksnių uNK ląstelės dalyvauja decidualizacijos ir embriono vystymosi procesuose bei saugo nuo žalingo motinos imuninės sistemos poveikio embrionui ir vaisiui [8].

uNK veiklos ir neaiškios kilmės nevaisingumo bei kitų reprodukcinų ligų sąsaja

uNK ląstelės ne tik atlieka svarbų vaidmenį implantacijos ir nėštumo vystymosi procesuose, bet ir numanomas galimas neigiamas jų poveikis, dažniausiai siejamas su nedidele citotoksinę poveikį ekstraviliozinėms trofoblasto ir autologinėms endometrio ląstelėms turinčių CD16⁺ uNK ląstelių populiacija [7, 14]. Nors didžioji iki šiol atliktų uNK ląstelių tyrimų dalis yra susijusi su kartotinius persileidimus arba implantacinę nesėkmę sukeliančių priežasčių paieška, gautieji tyrimų rezultatai rodo galimai tapatų kartotinių persileidimų ir nevaisingumo mechanizmą, nulemtą sutrikusio imuninio atsako implantacijos vietoje [3, 7].

Dar 2013 m. *Yokota* ir bendraatoriai nustatė, jog didesnė receptoriaus NKp46 gamyba lemia aktyvesnę citokinų (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10) gamybą tiek periferinio kraujo, tiek gimdos CD56⁺ NK ląstelėse [19]. Šis atradimas ne tik pagrindė NK ląsteles aktyvuojantį NKp46 pobūdį, tačiau ir pabrėžė aktyvėjančią citotoksinių CD16⁺ NK ląstelių veiklą receptoriaus sužadinimo atveju. *Giuliani* ir bendraatoriai, tirdami moterų, kurioms diagnozuotas neaiškios kilmės nevaisingumas (NKN) arba buvę neaiškios kilmės kartotiniai persileidimai (NKKP), endometre ekspresuojamus žymenis

(CD56, CD16 ir NKp46) pastebėjo, jog didesnė citotoksinių CD16⁺ ir/arba CD56⁺NKp46⁺ uNK ląstelių populiacijos koncentracija endometre galimai yra susijusi su didesne NKN ir NKKP rizika [7]. Autorių teigimu, NKp46 receptoriaus reguliuoja NK ląstelių išskiriamų citokinų gamybą, o reaguodamos į autologines endometrio ląsteles bei vaisiaus trofoblasto ląsteles CD16⁺uNK ląstelės gamina uždegiminius citokinus ir išskiria citotoksinius faktorius, tokiu būdu lemdamos implantacijai nepalankią aplinką gimdoje bei dalyvaudamos nevaisingumo ir savaiminių persileidimų patogenezėje [7, 19].

Kang ir bendraatoriai, tyrę IL-6 poveikį pilvaplėvės NK (pNK) ląstelėms endometrioze sergančių moterų populiacijoje, pastebėjo, jog didelė IL-6 koncentracija pilvaplėvės skystyje lemia mažesnę citotoksinę pNK ląstelių poveikį [20, 21]. Su šiuo atradimu susijęs ir *Junovich* bei kolegų atliktas tyrimas, nustatęs, jog nemazai daliai nevaisingų tiriamųjų didesnis CD16⁺uNK ląstelių skaičius yra susijęs su IL-6 ir VEGF trūkumu [14]. Autorių teigimu, sumažėjusi IL-6 gamyba gali skatinti didelio CD16⁺uNK ląstelių skaičiaus medijuojamą citotoksinę atsaką, o nepakankama VEGF gamyba šioms pacientėms gali lemti neadekvačią endometrio vaskuliarizaciją ir dėl to nesėkmingą implantaciją [11, 14]. Tad svarstoma apie galimą minėtų žymenų (CD16⁺uNK, IL-6, VEGF) tyrimo naudą neaiškios kilmės nevaisingumo diagnostikos tikslais [11, 14].

Tyrimai, atliekami siekiant nustatyti, ar periferinio kraujo NK ląstelių ir jų žymenų tyrimai galėtų būti naudojami gimdoje esančių NK ląstelių būklės ypatumams įvertinti, vis dažniau parodo pbNK ląstelių veiklos ir skaičiaus koncordantiškumą uNK ląstelių atžvilgiu [22, 23]. Remdamiesi šiais atradimais, 2019 m. *Azargoon* ir kolegų tyrė NKN ar KP diagnozes turinčių moterų periferiniame kraujyje cirkuliuojančių CD56⁺ NK ląstelių, taip pat jose ekspresuojamų CD69 ir perforino žymenis [24]. Tyrėjai nustatė, jog padidėjusi CD56⁺ pbNK ląstelių koncentracija, taip pat ir padidėjusi CD69 žymens gamyba šiose ląstelėse moterimis, kurioms buvę kartotiniai persileidimai arba diagnozuotas neaiškios kilmės nevaisingumas, gali būti laikomos imunologiniais šių ligų rizikos veiksniais [24, 25].

NK ir pagalbinis apvaisinimas

Svarbūs rezultatai gauti ir tiriant NK ląstelių ypatumus, susijusius su tokiomis pagalbinio apvaisinimo (PA) procedūromis, kaip pagalbinis apvaisinimas ne moters kūne (angl. *in vitro-fertilization*, IVF) ir embrionų perkėlimas (angl. *embryo transfer*, ET). Terminas „implantacinė nesėkmė“ gali būti vartojamas siekiant apibūdinti pacientės, kurioms po lytinio akto arba PA procedūrų nedidėja žmogaus chorioninio gonadotropinio (hCG) hormono koncentracija kraujyje (t. y. nepastebimi kiekybiniai implantacijos požymiai), bei tas pacientės, kurioms hCG koncentracijos augimas pastebimas, tačiau tiriant ultragarsu nematoma gestacinė pūslelė [22, 26]. Implantacinė nesėkmė būdinga bandančioms pastoti tiek natūraliai, tiek pagalbinio apvaisinimo procedūromis. Kartotinė implantacinė nesėkmė (KIN) (angl. *recurrent implantation failure*) yra terminas, kuriuo apibūdinama tik nepavykusi implantacija po PA procedūros. Nors šiuo metu

nėra formalus KIN apibūdinimo, siūloma KIN laikyti būkle po trijų nepavykusių IVF-ET ciklų, kai buvo perkelti bent keturi aukštos kokybės embrionai ir moteris yra ne vyresnė nei 40 metų amžiaus [22, 26].

Dar 1999 m. *Fukui* ir bendraautoriai pastebėjo reikšmingą CD56+ ir CD56+/16+ pbNK ląstelių skaičiaus skirtumą tarp sėkmingas ir nesėkmingas PA procedūrų baigtis patyrusių moterų [26]. Autorių duomenimis, implantacinę nesėkmę patyrusioms moterims periferiniame kraujyje nustatytas gerokai didesnis CD56+ ir CD56+/16+ pbNK ląstelių skaičius, nei moterims, kurioms implantacija buvo sėkminga [26]. Kaip vėliau nustatė *Giuliani* ir kolegės, šiuos rezultatus lemia minėtų ląstelių citotoksiinių faktorių gamyba bei jų nulemta implantacijai nepalanki aplinka gimdoje [7].

Sacks ir bendraautorių duomenimis, moterims, patyrusioms KIN, išmatuotas reikšmingai didesnis NK ląstelių skaičius periferiniame kraujyje, palyginti su sveikomis moterimis [27]. Reikšmingai mažesnis NK ląstelių sukeltas citotoksiškumas (NKC) sveikoms moterims, palyginti su KIN ar KP patyrusiomis moterimis, pastebėtas ir 2022 m. publikuotame *Salazar* ir kolegų tyrime [28]. Autorių teigimu, reikšmingi NK ląstelių citotoksiškumo skirtumai būdingi reprodukcinei nesėkmę patiriančioms moterims ir sveikų nėščiųjų ar vaisingų moterų populiacijai [28]. KIN ar KP pacientėms, kurioms PA procedūrų metu taikomas personalizuotas imunomoduliacinis gydymas, pavyzdžiui, peroraliniais gliukokortikoidais arba intraveniniu imunoglobulinu, ir tokiu būdu kontroliuojamas NKC bei Th1/Th2 ląstelių santykis periferiniame kraujyje, pastebėtas reikšmingai padidėjęs sėkmingų IVF-ET ir paskesnių sėkmingų nėštumų bei gyvų gimusių naujagimių skaičius [29]. Taigi, visi minėti tyrimai patvirtina, kad NK nulemtas citotoksiškumas daro įtaką reprodukciniams PA procedūrų baigtims ir gali būti vienas iš terapinių taikinių siekiant pagerinti IVF-ET baigtis.

uNK tyrimai

Junovich ir bendraautorių teigimu, negebėjimas nustatyti tikslios diagnozės reprodukcinės medicinos srityje dažnai lemia ir parinktą neveiksmingą gydymą [14], todėl nauji citokinų, imuninių veiksnių ir biocheminių žymenų tyrimai yra svarbūs neaiškios kilmės nevaisingumo diferencinės diagnostikos plėtojimo tikslais.

Mokslinėje literatūroje uNK ląstelių tyrimai vertinami prieštaringai. Anot *Sacks* ir kt., NK ląstelių tyrimai buvo pradėti dar 1990-aisiais ir yra vieni iš prieinamiausių imunologinių testų klinikinėje praktikoje [27]. *Bashiri* ir bendraautorių teigimu, svarbu tai, kad uNK ląstelių koncentracija menstruacinio ciklo metu kinta dėl besikeičiančių progesterono bei stromos ląstelių išskiriamo IL-15 lygmens [21]. Didžiausias uNK ląstelių skaičius nustatomas sekrecinės menstruacinio ciklo fazės metu, o neįvykus apvaisinimui ir suirus geltonkūniui bei sumažėjus IL-15 koncentracijai pastebimas ir uNK ląstelių koncentracijos mažėjimas gimdoje [21]. Dėl to hormoniniai pokyčiai sveikų ir vaisingų moterų organizme gali paveikti uNK ląstelių koncentraciją, tačiau neturėti jokio reikšmingo poveikio nėštumo baigtims. Visgi, kraujyje esančių NK ląstelių tyrimai yra patrauklūs dėl

to, kad yra mažai invazyvūs. Šių ląstelių skaičiaus pokyčiai gali būti vertinami kaip imuninės disfunkcijos organizme žymenys ir klinikinėje praktikoje taikomi siekiant įvertinti galimą imunomoduliacinės terapijos naudą pacientėms, kurioms diagnozuotas NKN ar NKKP [27]. Iki šiol atlikti randomizuoti kontroliniai tyrimai, nagrinėję šios terapijos naudą bei pacientų atrankai naudoję pbNK tyrimus, nustatė imunomoduliacinio gydymo veiksmingumą [27]. Visgi, tiriant pbNK dažniausiai taikomas imunohistocheminis metodas, paremtas ląstelių žymens CD56 dažymu ir žymenį turinčių ląstelių skaičiavimu – technologija, kuri nėra pakankama NK ląstelių potipiams diferencijuoti, pavyzdžiui, nustatyti minėtoms citotoksiinį poveikį turinčioms CD16+ NK ląstelėms, sudarančioms vos 10 % visų uNK ląstelių, bei kartu neatskleidžia jokios informacijos apie šių ląstelių funkcijas [27]. Taigi, vyrauja nuomonė, jog paprastas pbNK imunohistocheminis ištyrimas nėra naudingas neaiškios kilmės nevaisingumo ar kartotinių persileidimų diferencinės diagnostikos tikslais.

Remiantis šiomis išvadomis pbNK tyrimai buvo pradėti taikant tėkmės citometrijos metodą, kuriuo tiriant gimdos biopsijos būdu paimto audinio ląsteles galima įvertinti jų potipius bei funkcijas. Nors vieni autoriai teigia, jog, nepaisant metodo sunkaus prieinamumo ir brangumo, siekiant gauti patikimus ir kliniškai reikšmingus rezultatus tyrimams vertėtų rinktis šį, o ne anksčiau minėtąjį kraujo ląstelių tyrimą, vis dėlto kiti mano, jog kokybiškai atliekamas ir tinkamai interpretuojamas pbNK tyrimas turėtų būti pasirinktinis dėl mažesnio invazyvumo ir rezultatų patikimumo [27]. Šiuos nesutarimus ateityje gali išsklaidyti genetinis NK ląstelių KIR/HLA-C sąveikos testas [27], pradėtas taikyti neaiškios kilmės nevaisingumo bei kartotinės implantacijos nesėkmės atvejais atliekant PA procedūras. Šiandien turimi KIR/HLA-C rezultatai leidžia teigti, jog KIR-A tipo moterims (turinčioms NK veiklą slopinančius receptorių) imunosupresinė terapija yra kontraindikuojama, tačiau KIR-B tipo moterims (turinčioms NK veiklą aktyvinančius receptorių) empirinis gydymas imunosupresantais galėtų būti naudingas [28, 31]. Poroms, kurioms būdingas KIR-A/HLA-C2 derinys, gydymo imuniniais aktyvatoriais, pvz. G-CSF, skyrimas galėtų būti efektyvesnis [27, 30]. Tad genetinis KIR/HLA-C testavimas atskleidžia, jog sėkmingo nėštumo siekiančioms poroms, priklausomai nuo jų genetinių derinių, gali būti parenkamas skirtingas imuninę sistemą veikiantis gydymas [30].

Lietuvoje NK ląstelių tyrimai atliekami retai. Šiuo metu periferinio kraujo NK ląstelės tiriamos tretinio lygio ligoninių bei privačias paslaugas teikiančių medicinos centrų laboratorijose, tačiau tyrimas dar nėra paplitęs reprodukcinių patologijų diagnostikai. Gimdos NK ląstelių tyrimai Lietuvoje kol kas atliekami tik moksliniais tikslais.

APIBENDRINIMAS

Nepaisant išaugusio susidomėjimo imunologinių nevaisingumo priežasčių hipotezėmis, iki šiol tyrėjų gauti duomenys apie NK ląstelių reikšmę reprodukcinėje sistemoje išlieka dvejopi. Istoriskai uNK ląstelės sietos vien tik su žalingu poveikiu reprodukcinei sistemai, galimai nulemtu nedidelės citotoksiiniu poveikiu prieš ekstravilozines trofoblasto ir autologines

endometro ląsteles pasižyminčių CD16+ uNK ląstelių populiacijos. Kita vertus, per pastarąjį dešimtmetį atliekamų mokslinių tyrimų duomenys įrodė, kad uNK ląstelės, išskirdamos augimo ir angiogeninius faktorius, atlieka svarbų vaidmenį ir implantacijos bei ankstyvuojų nėštumo laikotarpiu.

Kartotinius persileidimus arba implantacinę nesėkmę sukeliančių priežasčių paieška atskleidė galimą tapatų kartotinių persileidimų ir nevaisingumo mechanizmą, nulemtą sutrikusio imuninio atsako implantacijos vietoje, o pastebėję galimą konkordantiškumą tarp pbNK ir uNK ypatumų tyrai susidomėjo pbNK ląstelių tyrimais minėtų patologijų

diagnostikai. Visgi, dėl pbNK ląstelių tyrimų reikšmingumo diskutuojama iki šiol. Manoma, jog kokybiškas pbNK ištyrimas ir tinkama rezultatų analizė galėtų suteikti naudingos informacijos siekiant įvertinti PA procedūrų metu vis dažniau taikomo imunosupresinio gydymo (gliukokortikoidais ar intraveniniu imunoglobulinu) efektyvumą tikintis geresnių baigčių. Tikimasi, kad ateityje dar tikslesni rezultatai būtų gaunami plačiau taikant ląstelių tėkmės citometrijos bei genetinio KIR/HLA-C testavimo metodus.

Gauta: 2023 03 03

Priimta spaudai: 2023 04 21

Summary

THE ROLE OF NK CELLS FOR FEMALE FERTILITY AND REPRODUCTIVE OUTCOMES

Jogailė Gudaitė, Gabija Didžiokaitė, Violeta Kvedarienė

Objective. The aim of this review is to summarize current knowledge on the relationship between natural killer (NK) cells and female fertility along with other reproductive outcomes as well as to provide an overview of possibilities of laboratory diagnostics in the field.

Methods. The search of relevant literature was conducted in *Pubmed* and *Web of Science* medical databases as well as in the specialized search engine *Google Scholar*. Further selection of publications was done according to the recommendations of the PRISMA statement.

Literature review. By secreting cytokines, matrix metalloproteinases and angiogenic factors uterine NK (uNK) cells are a crucial part of the early embryo development.

While they are involved in multiple processes such as angiogenesis, decidualization, formation of the placenta, invasion of the trophoblast and immune defense mechanisms of the embryo, dysfunctional uNK cells as well as their quantitative abnormalities may be involved in the pathogenesis of various reproductive disorders such as recurrent miscarriages or infertility. Further research is required in order to evaluate the possibility of immunomodulatory treatment with the aim of improving reproductive outcomes.

Conclusion. Despite rising interest in the hypotheses of immunological infertility, research data regarding the role of NK cells in female reproduction remains multifaceted. Further research is required in order to assess the precise mechanisms by which NK cells and their subtypes act in the reproductive system. Evaluating the potential role of NK cell tests in females with unexplained infertility or recurrent miscarriages while also exploring the possibility of immunomodulatory treatment in assisted reproduction remains a topic for future research.

Keywords: NK cells, pbNK cell testing, uNK cells, unexplained infertility, unexplained recurrent miscarriage.

LITERATŪRA

1. Infertility [Internet]. [cited 2023 Jan 24]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
2. Cox CM, Thoma ME, Tchangalova N, Mburu G, Bornstein MJ, Johnson CL, et al. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open* 2022; 2022: hoac051.
3. Implications of uterine NK cells and regulatory T cells in the endometrium of infertile women - ScienceDirect [Internet]. [cited 2022 Dec 29]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019885918302453?via%3Dihub>
4. Gelbaya TA, Potdar N, Jev YB, Nardo LG. Definition and Epidemiology of Unexplained Infertility. *Obstet Gynecol Surv* 2014; 69: 109.
5. Didžiokaitė G, Biliūtė G, Bagdonaitė L, Kvedarienė V. Nevaisingumo diagnostinės galimybės ir galimas patofiziologinis ryšys su bronchine astma. *Laboratorinė medicina* 2021; 23: 39–43.
6. Shibahara H, Wakimoto Y, Fukui A, Hasegawa A. Anti-sperm antibodies and reproductive failures. *Am J Reprod Immunol* 2021; 85: e13337.
7. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Characterization of Uterine NK Cells in Women with Infertility or Recurrent Pregnancy Loss and Associated Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2014; 72: 262–9.
8. Díaz-Hernández I, Alecsandru D, García-Velasco JA, Domínguez F. Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction. *Hum Reprod Update* 2021; 27: 720–46.
9. Lee SK, Kim CJ, Kim D-J, Kang J. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. *Immune Netw* 2015; 15: 16–26.
10. Morelli SS, Mandal M, Goldsmith LT, Kashani BN, Ponzio NM. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. *Res Rep Biol Dove Press* 2015; 6: 171–89.
11. Shojaei Z, Jafarpour R, Mehdizadeh S, Bayatipoor H,

- Pashangzadeh S, Motalebnezhad M. Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update. *Pathol Res Pract* 2022; 238: 154062.
12. Whettlock EM, Woon EV, Cuff AO, Browne B, Johnson MR, Male V. Dynamic Changes in Uterine NK Cell Subset Frequency and Function Over the Menstrual Cycle and Pregnancy. *Front Immunol* 2022; 13: 880438.
 13. Xie M, Li Y, Meng Y-Z, Xu P, Yang Y-G, Dong S, et al. Uterine Natural Killer Cells: A Rising Star in Human Pregnancy Regulation. *Front Immunol* 2022; 13: 918550.
 14. Junovich G, Azpiroz A, Incera E, Ferrer C, Pasqualini A, Gutierrez G. Endometrial CD16+ and CD16- NK Cell Count in Fertility and Unexplained Infertility. *Am J Reprod Immunol* 2013; 70: 182-9.
 15. Fu B, Zhou Y, Ni X, Tong X, Xu X, Dong Z, et al. Natural Killer Cells Promote Fetal Development through the Secretion of Growth-Promoting Factors. *Immunity* 2017; 47: 1100-1113.e6.
 16. Cheng S-B, Sharma S. Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2015; 73(6): 487-500.
 17. Löb S, Amann N, Kuhn C, Schmoeckel E, Wöckel A, Zati zehni A, et al. Interleukin-1 beta is significantly upregulated in the decidua of spontaneous and recurrent miscarriage placentas. *J Reprod Immunol* 2021; 144: 103283.
 18. Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, Tian Z, et al. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E231-40.
 19. Yokota M, Fukui A, Funamizu A, Nakamura R, Kamoi M, Fuchinoue K, et al. Role of NKp46 expression in cytokine production by CD56-positive NK cells in the peripheral blood and the uterine endometrium. *Am J Reprod Immunol* 2013; 69(3): 202-11.
 20. Kang Y-J, Jeung IC, Park A, Park Y-J, Jung H, Kim T-D, et al. An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. *Hum Reprod* 2014; 29: 2176-89.
 21. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16: 121.
 22. Von Woon E, Greer O, Shah N, Nikolaou D, Johnson M, Male V. Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2022; 28: 548-82.
 23. El-Badawy O, Helmy AS, Abbas AM, Zahran AM, Afifi NA, Abdel-Rahim MH. Concordance between peripheral and decidual NK cell subsets and killer immunoglobulin-like receptors in women with recurrent spontaneous miscarriages. *J Reprod Immunol* 2020; 140: 103130.
 24. Azargoon A, Mirrasouli Y, Shokrollahi Barough M, Barati M, Kokhaei P. The State of Peripheral Blood Natural Killer Cells and Cytotoxicity in Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *Int J Fertil Steril* 2019; 13: 12-7.
 25. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirel A, Gurgan T, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 14-38.
 26. Fukui A, Fujii S, Yamaguchi E, Kimura H, Sato S, Saito Y. Natural Killer Cell Subpopulations and Cytotoxicity for Infertile Patients Undergoing *In Vitro* Fertilization. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 413-22.
 27. Sacks G, Finkelstein E. Natural killer cells and reproductive success. *Am J Reprod Immunol* 2021; 85: e13291.
 28. Salazar MD, Wang WJ, Skariah A, He Q, Field K, Nixon M, et al. Post-hoc evaluation of peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in predicting the risk of recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures. *J Reprod Immunol* 2022; 150: 103487.
 29. Sung N, Khan SA, Yiu ME, Jubiz G, Salazar MD, Skariah A, et al. Reproductive outcomes of women with recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures are significantly improved with immunomodulatory treatment. *J Reprod Immunol* 2021; 148: 103369.
 30. Achilli C, Duran-Retamal M, Saab W, Serhal P, Seshadri S. The role of immunotherapy in *in vitro* fertilization and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2018; 110: 1089-100.