

# Problematika stanovení intrauterinních NK buněk

Štěpánka Luxová

4. ročník semináře reprodukční medicíny

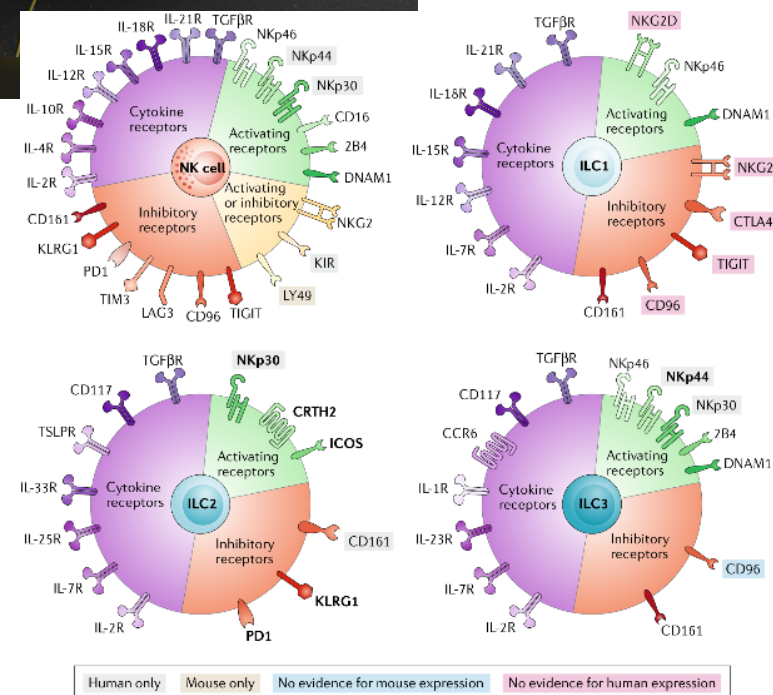
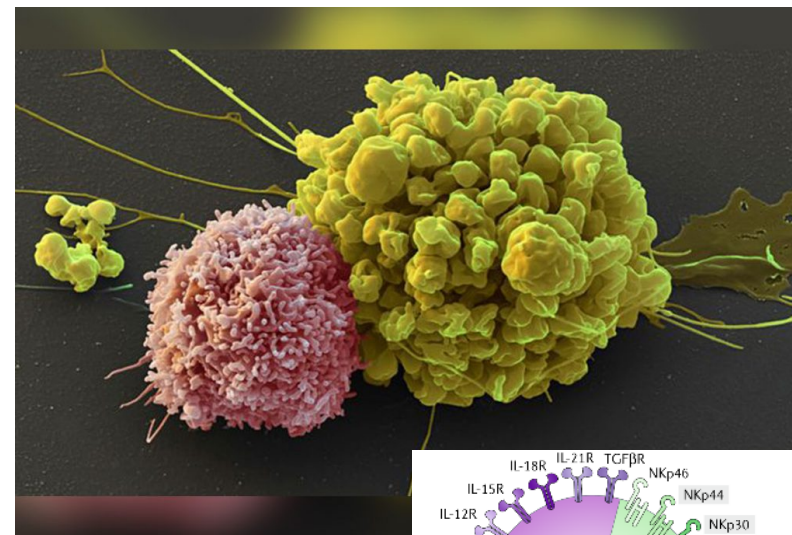
13.2.2020

 GENNET

člen skupiny  
FutureLife

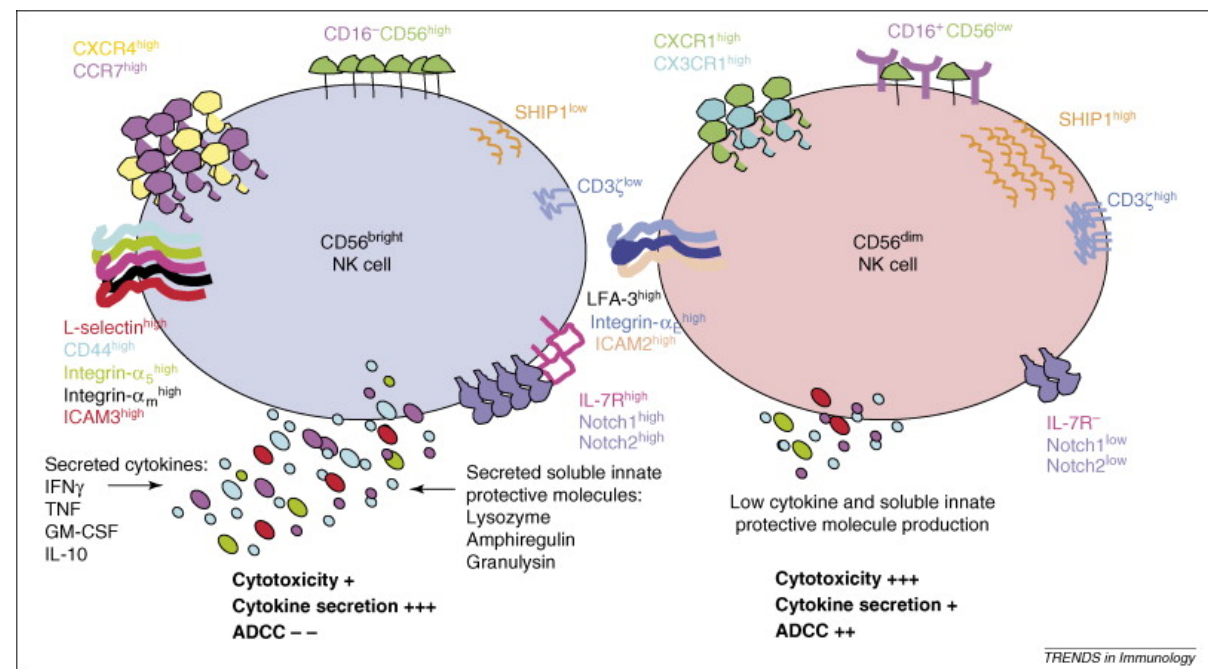
# Obsah

- Přirozeně toxické buňky (ILC, NKT)
- Receptory NK buněk
- Funkce NK buněk
- Možnosti detekce
- Naše zkušenosti



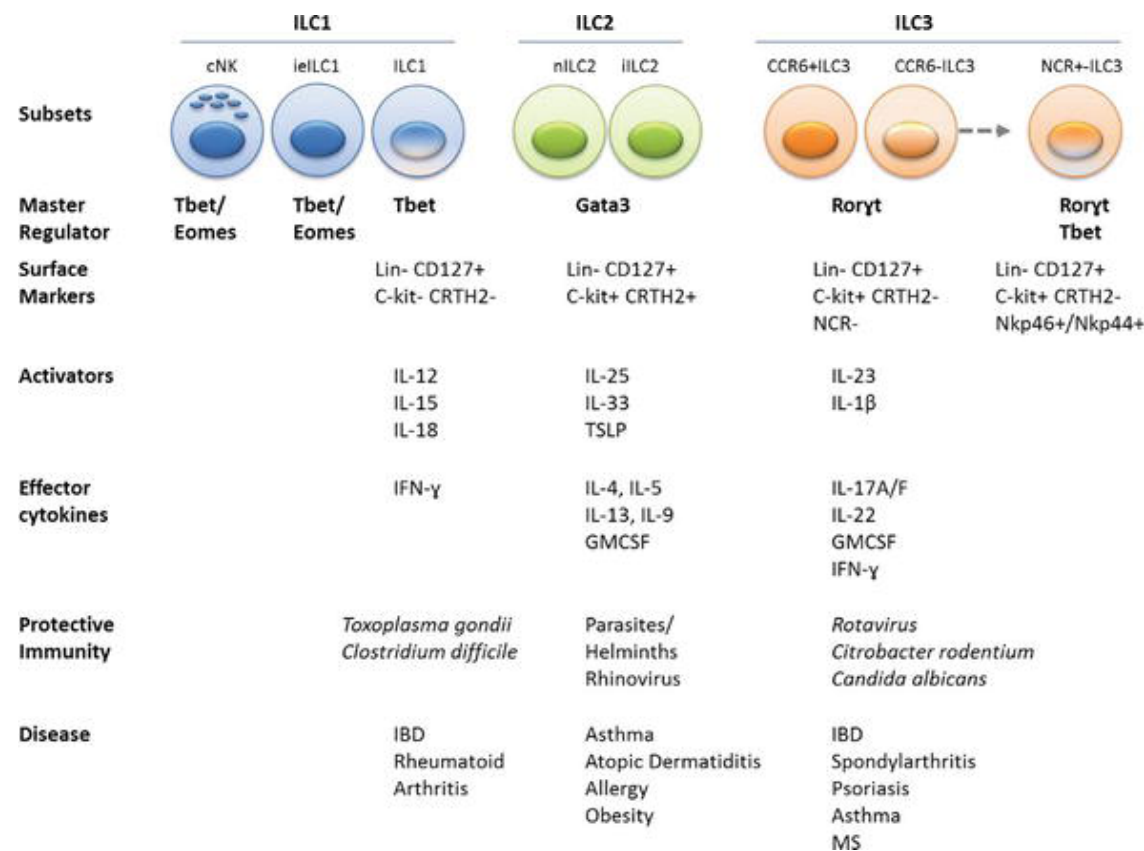
# NK buňky

- Lymfocyty s různými biologickými účinky
  - cytotoxická aktivita
  - Regulační funkce – cytokiny, chemokiny
- V PK dvě populace
  - CD56<sup>+</sup>-CD16<sup>+</sup> (cytotoxické, 90% NK)
  - CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (regulační – sekrece cytokinů)
- V děloze a deciduu – odlišná subpopulace od PK
  - Fenotypově podobné (ale ne identické) populaci CD56<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> v PK
  - Dominující leukocytární populace v endometriu, nárůst během menstruačního cyklu, maximum v rané fázi těhotenství (až 75%)
  - Zvýšená exprese řady povrchových proteinů (lektinové receptory, KIR, tetraspaniny, integrinové podjednotky)
  - Aktivované uNK produkují angiogenní faktory (VEGF a ANG2) a velké množství cytokinů (GM-CSF, CSF-1, TNF- $\alpha$ , IFN-g, TGF- $\beta$ , LIF, IL2, CXCL10 a CXL12)



# Přirozeně cytotoxické buňky

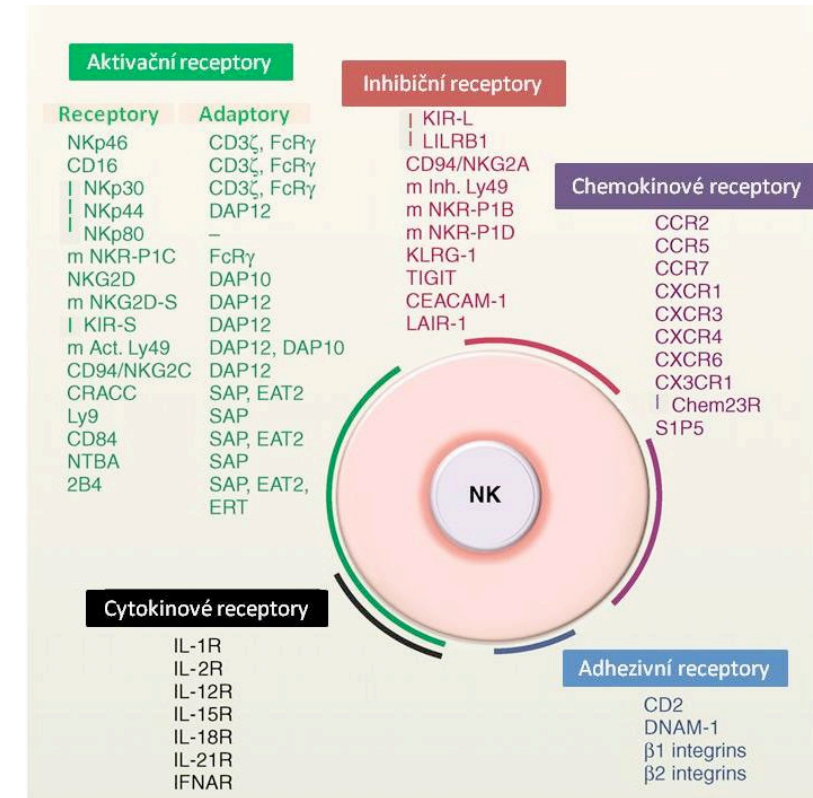
- Přirozené lymfoidní buňky (ILC)
  - Nemají antigenně specifický receptor
  - Lymfoidní buněčná morfologie
  - Lokalizace v různých tkáních, orgánech i PK
  - Fenotypová i funkční paralela k Th lymfocytům
- NKT buňky
  - Přítomnost TcR a CD3
  - Ve všech tkáních a orgánech těla
  - Identifikace neproteinové Ag především lipidového typu (prezentované prostřednictvím molekuly CD1d)
  - Regulace obranného (poškozujícího) zánětu



Science, this issue [10.1126/science.aaa6566](https://doi.org/10.1126/science.aaa6566)

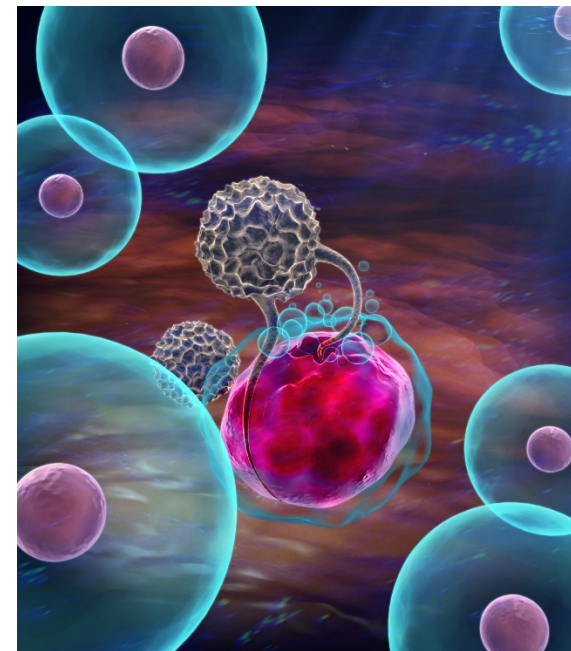
# Membránové receptory

- Funkce NK buněk je regulována souhrou signálů vycházejících z aktivačních a inhibičních receptorů
- Aktivační receptory (KAR)
  - lektinové CLR (NKG2D), Imunoglobulinové NCR (Nkp46, Nkp30, Nkp44), SLAM (2B4, DNAM-1), FcγRIII (CD16)
  - Rozpoznávají heterogenní skupinu ligandů, které se objeví na povrchu v důsledku stresu, infekce, maligní konverze
  - Aktivace tyrosinové kinázy – fosforylace transkripčních faktorů – přepis genů - aktivace
- Inhibiční receptory (KIR)
  - KIR Ig-like (KIR2DL1,2 - CD158, KIR3DL1 - CD158c), CLR (NKG2A - CD159, CD94, NKRPI - CD161)
  - Ligandy – molekuly HLA I. Třídy (HLA-C, B, E)
  - Aktivace fosfotyrosinových fosfatáz - inhibice
- Cytokinové receptory, receptory pro kostimulační molekuly, adhezivní molekuly



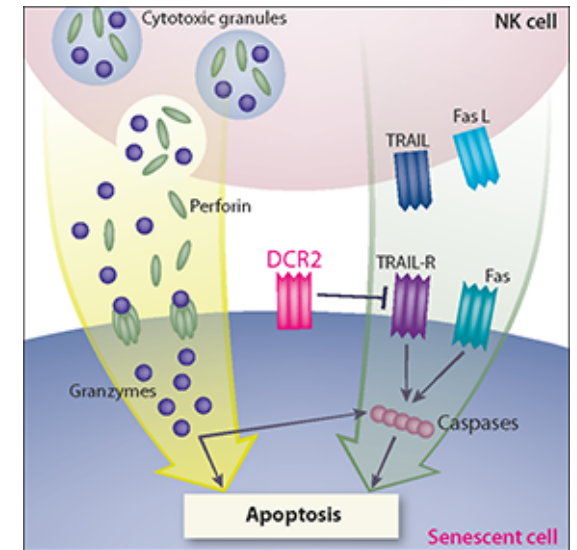
# NK buňky - funkce

- Obranné funkce – cytotoxická eliminace infikovaných a maligně transformovaných buněk
- Regulace zánětu (produkované cytokiny ovlivňují iniciaci obranného zánětu )
  - Významný zdroj INF- $\gamma$ 
    - Regulace diferenciaci Th0  $\rightarrow$  Th1
    - Podpora fagocytujících buněk (MF)  $\rightarrow$  likvidace intracelulárních patogenů
- Stěžejní pro interakce mezi matkou a plodem (rozhodující pro úspěšné těhotenství)



# Mechanismus cytotoxického působení

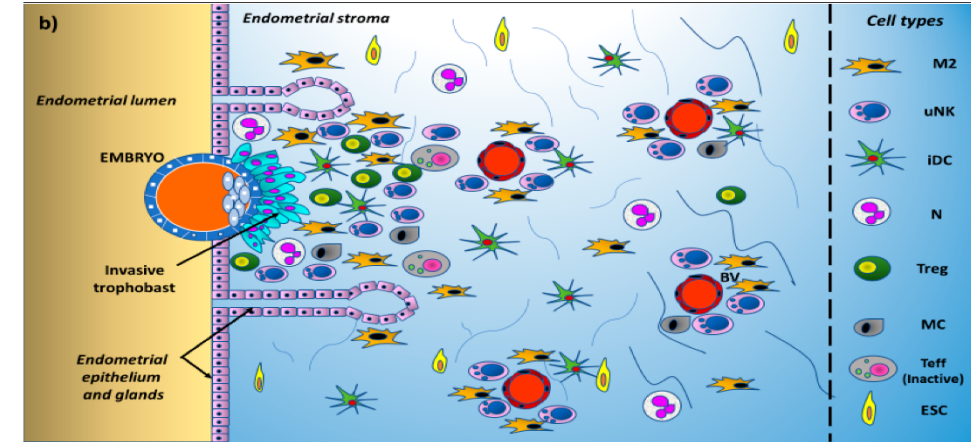
- Vyvolání apoptózy u terčové buňky
  - převaha aktivačních signálů → translokace granulí uvnitř cytoplazmy → aktivní transport přes cytoplazmatickou membránu, uvolnění perforinů → vytvoření kanálků v terčové buňce → vstup biologicky aktivních látek (proteolytické enzymy - granzymy) → aktivace kaspáz → Apoptóza
  - Proapoptotická interakce Apo/Fas – Apo/FasL



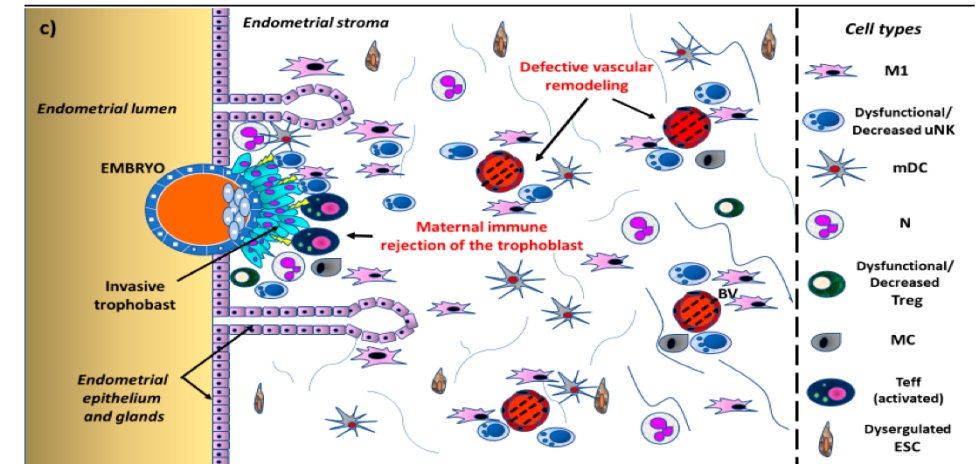
# Funkce uNK na fetomaternálním rozhraní

- Snížená cytotoxická aktivita (HLA-G, HLA-E na trofoblastu)
- Kumulace poblíž spirálních artérií
- Produkce angiogenních faktorů (VEGF-C, A, angiopoetin 1, PlGF) a růstového modulačního cytokinů TGF- $\beta$
- Dilatace, aktivace endotelové výstelky, remodelace vaskulárních buněk hladké svaloviny → remodelace spirálních arterií → vznik funkční placenty
- Regulace invaze trofoblastu
  - Zdroj matrixových metaloproteináz (MMP) důležitých pro nidaci (narušení extracelulární matrix) i tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP)

Implantace embrya – fyziologické těhotenství

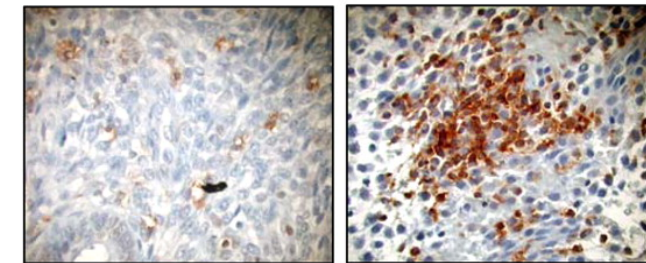
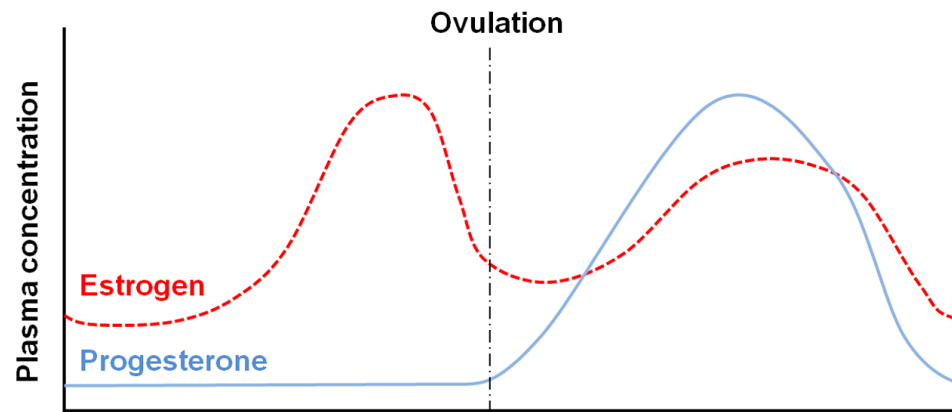


Implantace embrya – opakované těhotenské ztráty





# Zastoupení endometriálních leukocytů během menstruačního cyklu



Proliferative phase

Secretory phase

Day of Menstrual cycle	10-12 day	22-23 day	26-28 day
T cells	+	+	+
B cells	+/-	+/-	+
Natural Killer cells	+/-	+/++	+++
Macrophages	+	++	+++
Neutrophils	+/-	+/-	+++
Mast cells	++	++	++
Eosinophils	-	-	++

Leukocytes in the Female Reproductive Tract, Sung Ki Lee, et al.

# Význam stanovení NK buněk v patogenezi opakovaných potratů a implantačních selhání

- Velké množství studií s rozporuplnými výsledky

Human Reproduction Update, Vol.20, No.3 pp. 429–438, 2014  
Advanced Access publication on November 27, 2013 doi:10.1093/humupd/dmt056

human  
reproduction  
update

## Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis

Srividya Seshadri\* and Sesh Kamal Sunkara

King's College London, London, UK

\*Correspondence address. E-mail: v9dya@hotmail.com

Submitted on December 21, 2012; resubmitted on September 22, 2013; accepted on October 7, 2013

Downloaded from http://

### Meta-analýza (2013)

- 22 studií
- Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v % pNK a uNK mezi skupinami fertálních a infertálních žen
- Signifikantně vyšší počet Nk buněk PK infertálních žen
- Signifikantně vyšší % i počet NK buněk v PK žen s opakovanými potraty
- Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v zastoupení uNK mezi opakovaně potrácejícími ženami a kontrolní skupinou

### Možné příčiny:

- Výrazná heterogenita studií (různě definované skupiny pacientek, imunoterapie, různé načasování odběrů, různé metodiky kvantifikace Nk buněk, různý způsob vyhodnocení)
- Neexistuje standardizovaný postup ani referenční rozmezí pro stanovení uNK (imunohistochemie, cytometrie)
- Kontaminace bioptických vzorků periferní krví (průtoková cytometrie)

# Možnosti stanovení uNK

- **Imunohistochemie**

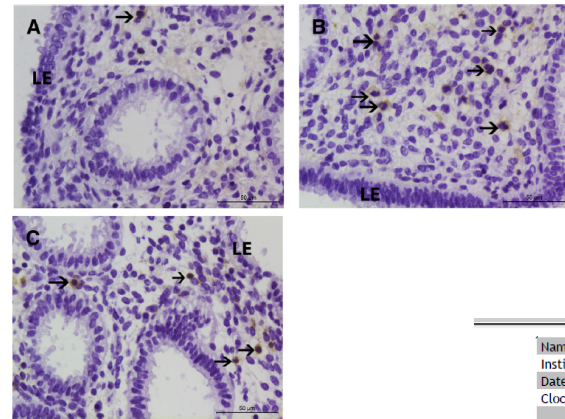
- + Rozložení buněk ve tkáni
- Problematická víceparametrová analýza
- Hodnocení nízkého počtu buněk

- **Průtoková cytometrie**

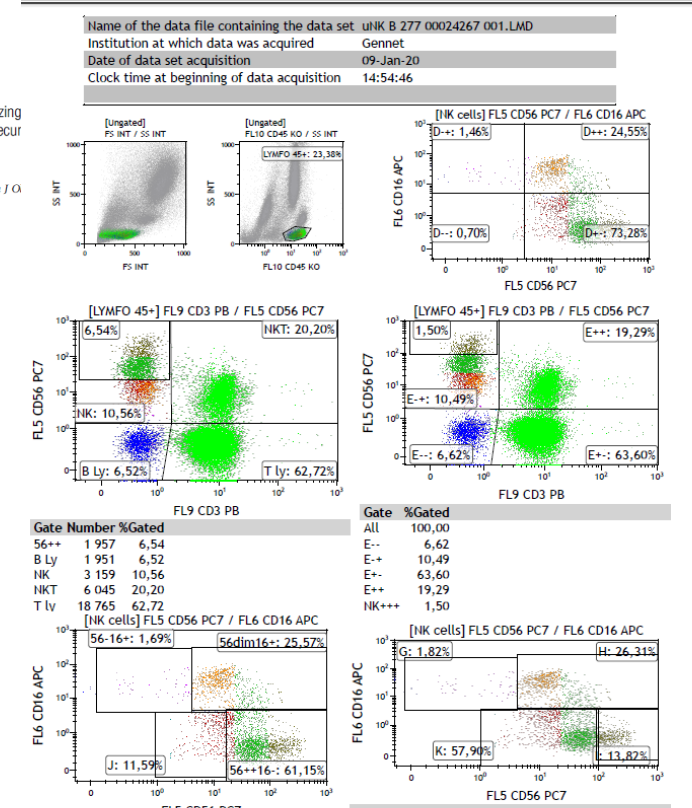
- + Analýza velkého počtu buněk
- + Více parametrová analýza
- + Objektivní
- Problematická kvantifikace počtu (obvykle jen % z Ly)
- Nutnost destrukce a homogenizace tkáně
- Možná kontaminace periferní krve

- **Molekulárně biologické metody (PCR)**

**FIGURE 1**  
Photomicrograph of CD56 immunostaining endometrium 7 days after luteinizing hormone surge



Photomicrograph of CD56 immunostaining endometrium 7 days after luteinizing hormone surge. Positive staining cells (arrow). Scale bar = 50 μm. LE, luminal epithelium. Chen et al. Measurement of uNK cells in fertile women and women with reproductive failure. Am J O



# Možnosti využití průtokové cytometrie



- **Procentuální zastoupení a počet subpopulací NK**

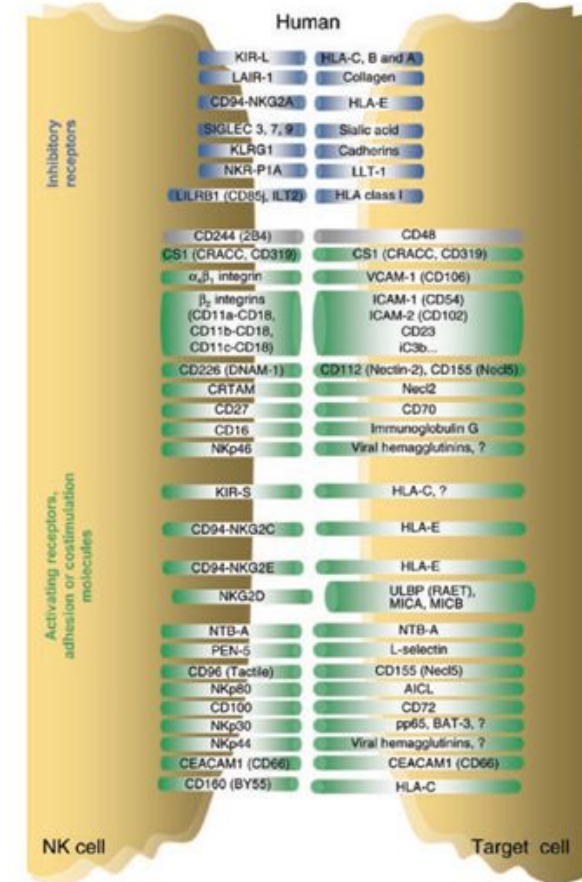
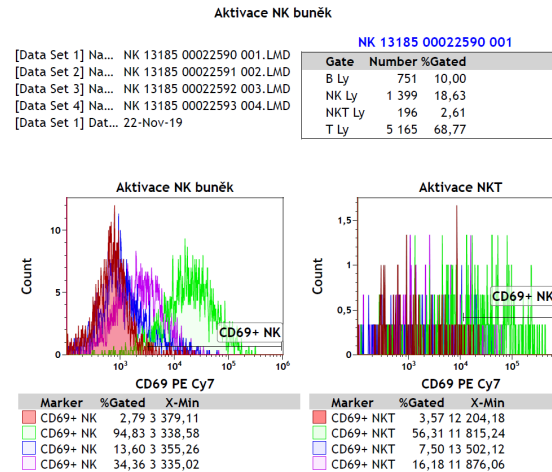
- Povrchové značení (CD45, CD3, CD56, CD16)

- **Funkční aktivitu**

- Aktivita (K562), aktivace (CD69)
- Produkce cytokinů (TGF- $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )

- **Aktivační a inhibiční receptory**

- Inhibiční KIR2DL1,2 - CD158 (rozeznává HLA-C)
- Aktivační NKp46, NKp44, NKp30



# Stanovení uNK v IML GENNET

## • Cíl práce

- Vypracovat metodiku na identifikaci subpopulací NK buněk
- Porovnat zastoupení subpopulací NK v různých materiálech
  - periferní krev
  - výplach děložní dutiny,
  - endometriální biopsie
- Zjistit prediktivní potenciál pro úspěšnou graviditu

## • Postup

- Rešerše publikací
- Zvolení vhodných markerů a postupů pro identifikaci NK buněk
- Standardizace, referenční rozmezí



# Moving from peripheral blood to local uterine immunophenotype analysis in patients with poor reproductive history: pilot study of a novel technique

Conor Harrity<sup>1</sup> · Mamoun M. Bereir<sup>2</sup> · David J. Walsh<sup>3</sup> · Kevin D. Marron<sup>3</sup>

Received: 26 June 2018 / Accepted: 13 November 2018  
© Royal Academy of Medicine in Ireland 2018

## Abstract

**Background** A complete reproductive immunophenotype is poorly described, with most focus on peripheral blood natural killer cells rather than uterine populations. There is debate regarding normal endometrial levels, with no consensus, and much controversy on correlation with implantation/miscarriage.

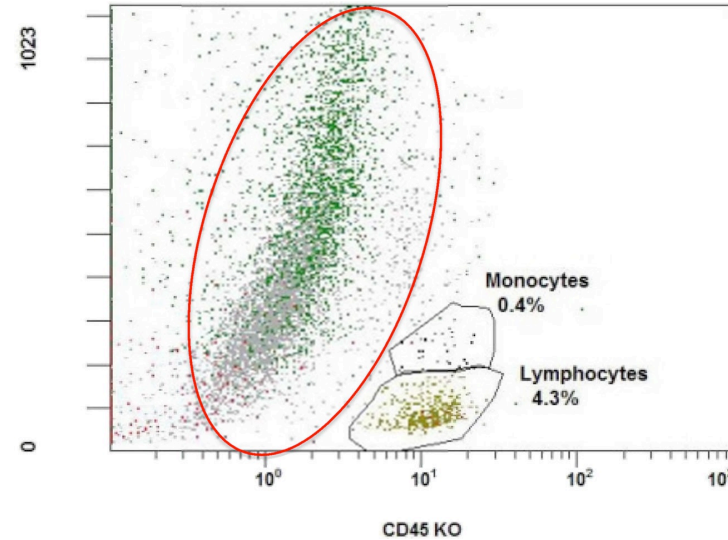
**Aims** Development and validation of a rapid endometrial assessment flow cytometry (FCM) technique, allowing determination of local lymphocyte subset ranges, comparison to peripheral blood, and patient subgroup analysis.

**Methods** Prospective pilot, assessing patients with prior implantation, failure offered endometrial biopsy before subsequent ART cycle, functioning as therapeutic scratch. HRT regime administered to standardise environment, and progesterone-primed mid-luteal biopsy (five completed days progesterone, P+5) analysed using comprehensive flow panel to identify lymphocyte subsets.

**Results** Two hundred patients were recruited in a tertiary university-affiliated ART centre. FCM identified differing lymphocyte ranges between peripheral blood and biopsy. Uterine/decidual natural killer cells are the dominant endometrial subtype. Patients with repeated implantation failure had higher uNK levels (52.4 vs 43.7%,  $p=0.01$ ). Conversely, B lymphocytes (0.87 vs 0.72%,  $p=0.032$ ), pNK (1.21 vs 0.8%,  $p=0.041$ ), and NK-T (2.68 vs 2.26,  $p=0.031$ ) cells were higher in recurrent pregnancy loss.

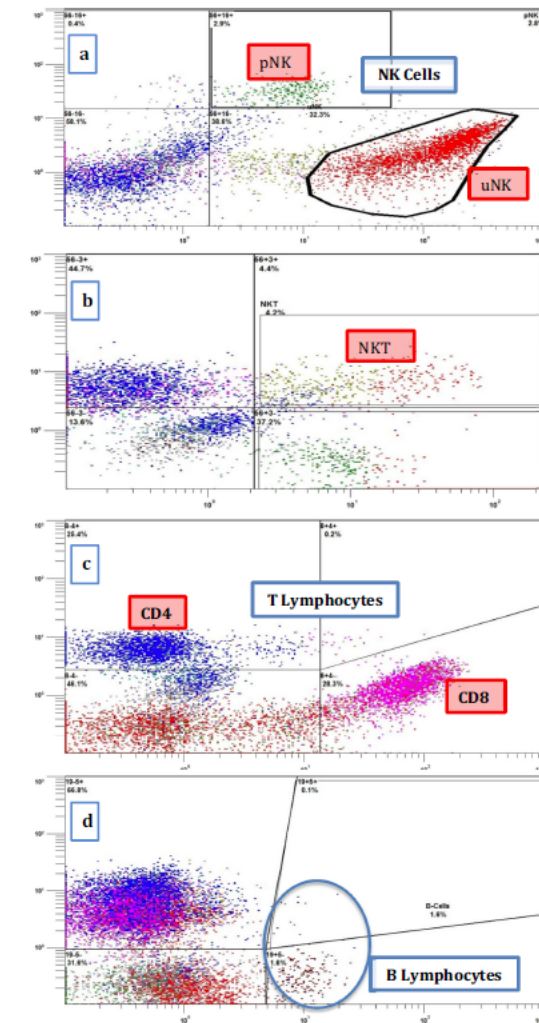
**Conclusion** FCM is widely used to assess cellular populations, but not typically employed for endometrial evaluation. FCM provides a rapid, detailed, and quantitative analysis and reduces inter-observer subjectivity bias. Detailed understanding of the normal endometrial immunophenotype, and associated deviations, may provide insight into the aetiology of infertile patients labelled “unexplained”. Failure despite transfer of high grade, or proven euploid blastocysts, is a difficult problem, and endometrial profiling may help identify research areas to determine potential future therapeutic interventions for this difficult population.

**Keywords** ART · Endometrium · Immunophenotype · Lymphocytes · Natural killer cells



**Table 3** Median percentage of immunological subtypes as a proportion of total CD45+ endometrial lymphocytes for all patients ( $n=200$ ) and proposed “normal” ranges

Lymphocyte subtype	Median	Range (5–95th centile)
uNK	46.0	13.2–78.3
pNK	1.0	0.0–4.7
NK-T	2.5	0.8–8.4
CD4+	10.4	3.8–21.4
CD8+	15.7	4.4–34.5
B cells	0.7	0.2–4.5





## Moving from peripheral blood to local uterine immunophenotype analysis in patients with poor reproductive history: pilot study of a novel technique

**Table 4** Median percentage distribution of immunological subtypes as a proportion of total CD45+ endometrial lymphocytes between patient subgroups. *p* values determined using Mann-Whitney *U* test (SPSS v24)

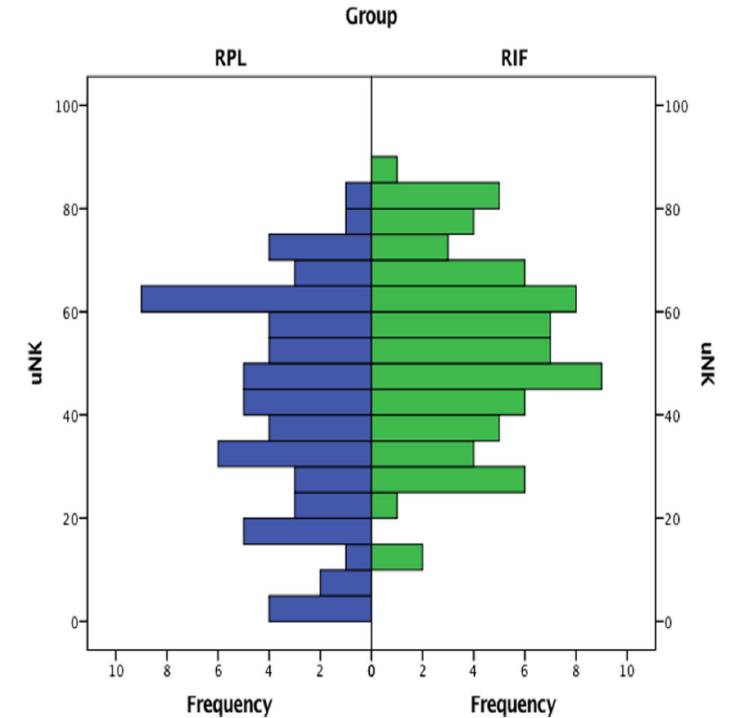
Cell type	RPL (%)	RIF (%)	<i>p</i> value
pNK	1.21	0.80	<i>0.041*</i>
NK-T	2.68	2.26	<i>0.031*</i>
uNK	43.7	52.4	<i>0.010*</i>
B cells	0.87	0.72	<i>0.032*</i>
CD8+	15.1	14.1	<i>0.685</i>
CD4+	9.75	9.36	<i>0.168</i>

The italic entries with asterisk indicate statistical significance below *p* = 0.05

**Table 2** Mean percentage of immunological subtypes as a proportion of total CD45+ lymphocytes for endometrial (*n* = 200) and peripheral blood samples

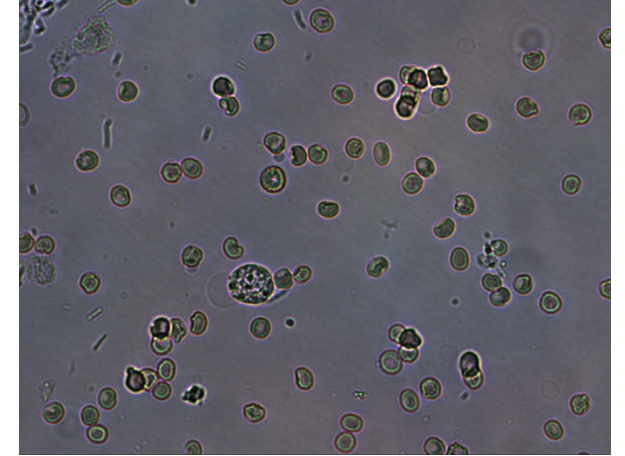
Lymphocyte subtype	Endometrium Mean (%)	Peripheral blood Mean (%)
NK	48.5	10.2
NK-T	3.5	4.5
CD4+	11.4	40.7
CD8+	16.9	21.0
B cells	1.3	12.9

**Fig. 4** Histogram demonstrating distribution uNK populations, in patients with RIF and RPL



# Fenotypizace NK buněk v IML GENNET

- Materiál:
  - periferní krev,
  - výplach děložní dutiny (minimálně 2 ml)
  - biopsie děložní sliznice (30mg)
- Načasování odběru (implantační okno)
  - Nativní cyklus: 21-23 den m.cyklu (7-9 den po ovulaci)
  - Hormonální stimulace – 6. den užívání progesteronu
- Zpracování biopsie
  - Transport v kultivačním médiu nebo PBS do 5 hodin od odběru
  - Opláchnutí, mechanické rozrušení tkáně a homogenizace, filtrace
- Zpracování laváže
  - Centrifugace, promytí PBS, filtrace, (lyzace)





# Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii

- 50 ul vzorku (PK, buněčné suspenze získané z laváže nebo biopsie)
- 5ul CD45KO + 5ul CD56PC7 + 5ul CD3PB + 5ul CD16 APC
- 20 min inkubace ve tmě

## PK nebo buněčné suspenze s příměsí erytrocytů

- 500 µl lyzačního roztoku Versallyse, promíchat
- 15 min inkubace ve tmě
- Analýza na průtokovém cytometru

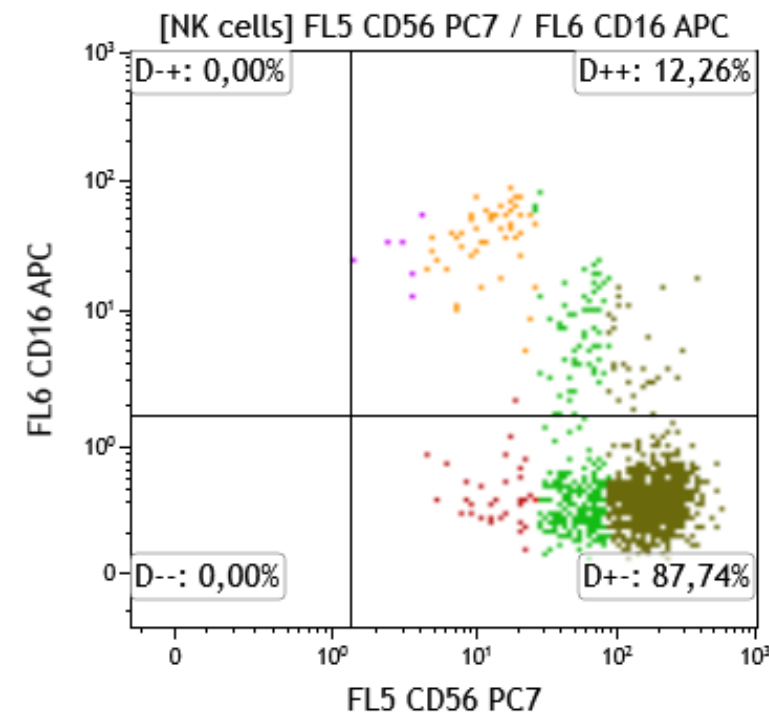
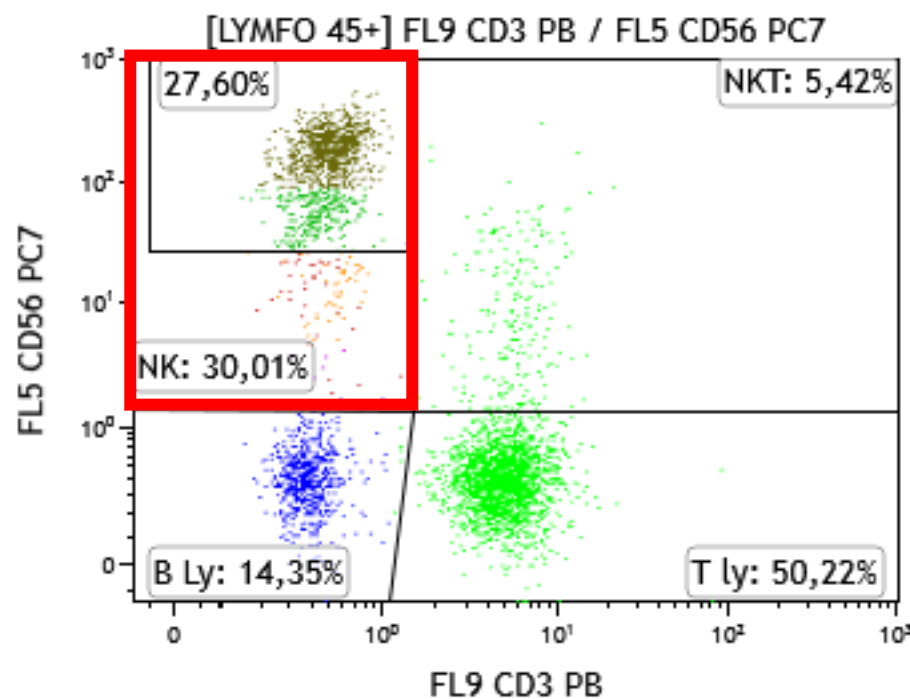
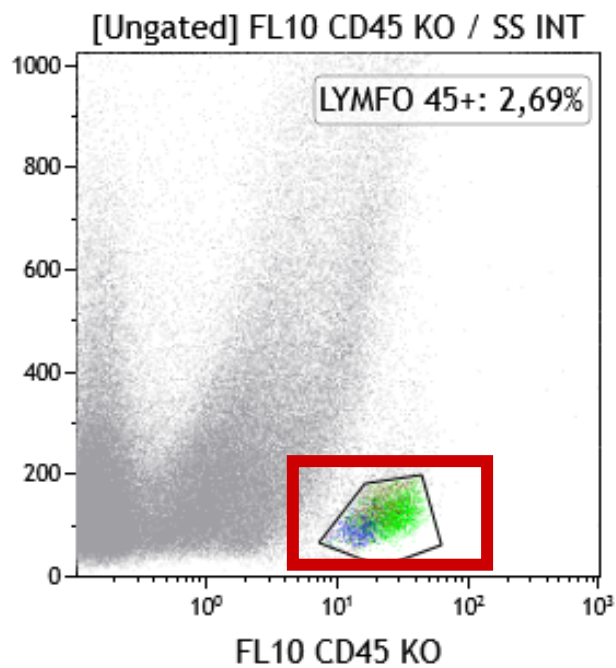
## Buněčné suspenze bez příměsi erytrocytů

- Promytí 1 ml PBS, centrifugace, dekantace, resuspendace ve 250 ul PBS
- Analýza na průtokovém cytometru

# Gateovací strategie

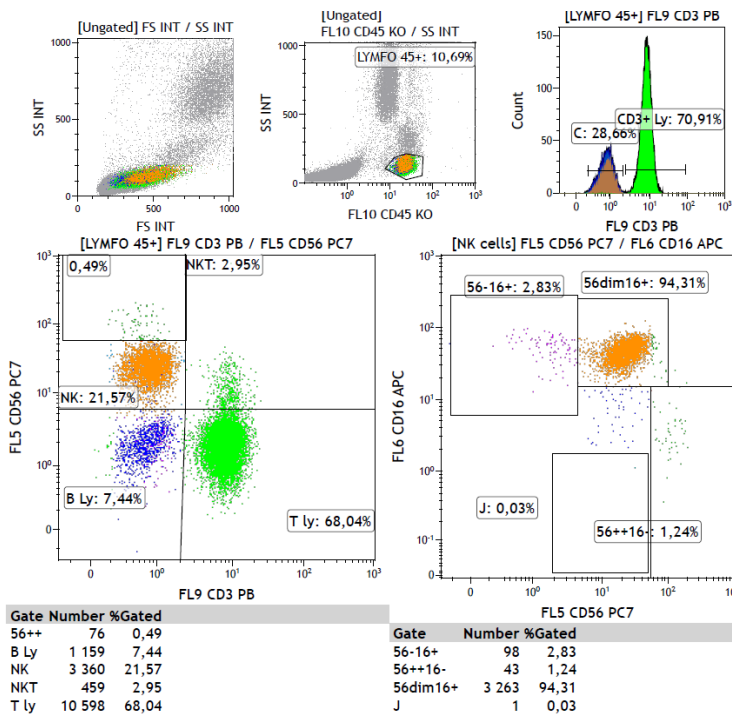
Lymfocyty CD45+

NK buňky CD3-CD56+

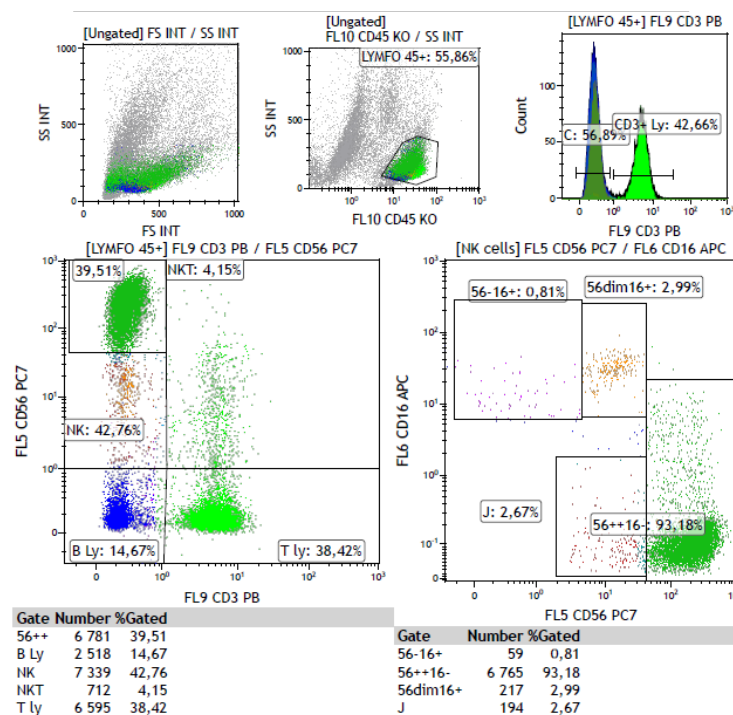


# Imunofenotypizace NK buňky periferní krev / laváž / biopsie

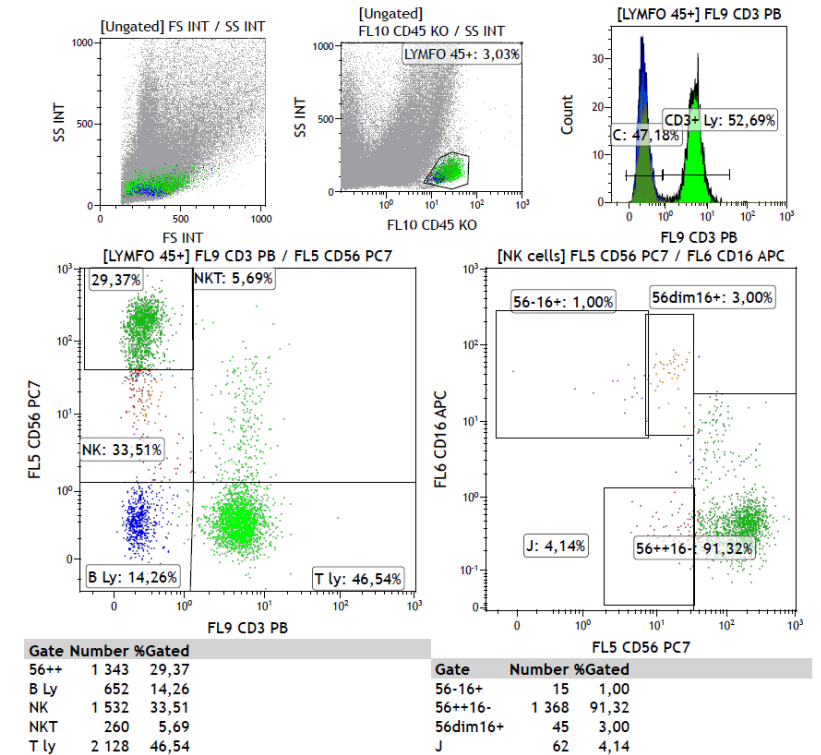
periferní krev



výplach děložní dutiny

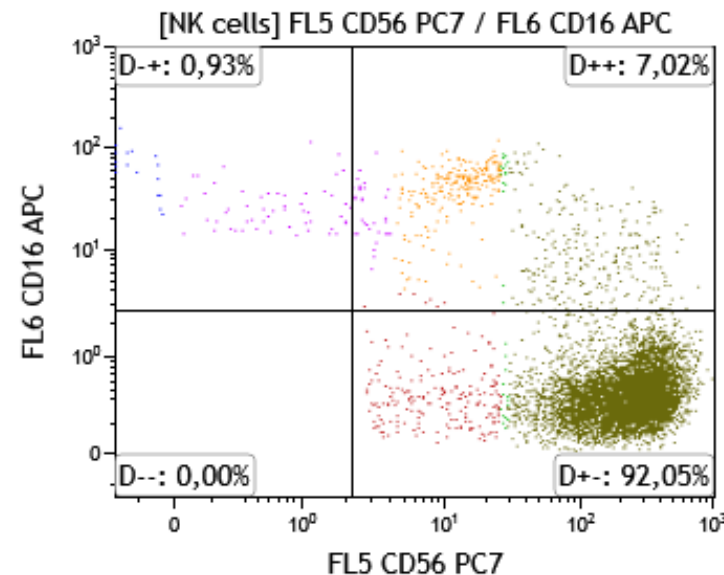
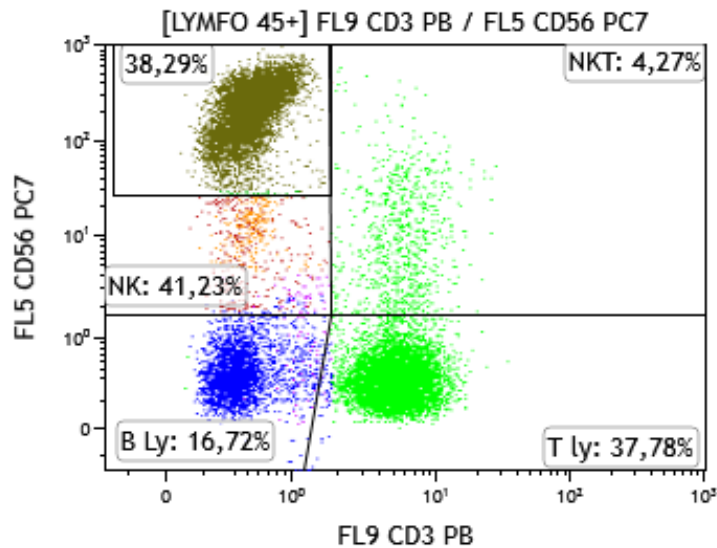


endometriální biopsie



# Výsledky cytometrické analýzy

		gate na lymfocytech (CD45+)					gate na NK (CD3-CD56+)			gate na lymfocytech (CD45+)		
		NK 56+3-	NK 56bright	NK 56dim	NKT 3+56+	T CD3+CD56-	56+16+	56+16-	56-16+	56+16+	56+16-	56-16+
krev (14)	median	<b>13,0</b>	<b>0,4</b>	<b>13,2</b>	<b>4,2</b>	<b>70,5</b>	<b>91,2</b>	<b>2,1</b>	<b>4,0</b>	<b>12,9</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>
	5 perc	6,0	0,3	3,3	2,1	62,3	87,3	0,7	2,3	3,4	0,1	0,1
	95 perc	18,2	0,9	17,2	7,5	79,0	96,3	7,1	11,1	16,7	0,4	1,2
Laváž (23)	median	<b>21,6</b>	<b>16,24</b>	<b>4,0</b>	<b>6,1</b>	<b>64,17</b>	<b>23,16</b>	<b>74,3</b>	<b>2,6</b>	<b>3,7</b>	<b>13,0</b>	<b>0,5</b>
	5 perc	12,7	7,2	2,3	2,9	44,9	11,1	47,2	1,4	3,0	7,7	0,3
	95 perc	35,9	31,8	11,8	12,6	74,0	49,4	87,0	4,0	12,0	30,3	1,0
biopsie (11)	median	<b>20,7</b>	<b>28,9</b>	<b>2,7</b>	<b>4,6</b>	<b>59,64</b>	<b>12,4</b>	<b>86,7</b>	<b>0,9</b>	<b>3,6</b>	<b>28,0</b>	<b>0,3</b>
	5 perc	17,8	15,2	2,1	4,0	43,1	6,5	76,4	0,7	2,0	15,0	0,2
	95 perc	45,2	42,2	3,7	6,2	73,0	22,6	92,6	1,7	8,8	38,3	0,4
Harrity (biopsie (200))	median		<b>46,0</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>	<b>26,1</b>						
	5 perc		13,2	0,0	0,8	8,2						
	95 perc		78,3	4,7	8,4	55,9						



**Table 3** Median percentage of immunological subtypes as a proportion of total CD45+ endometrial lymphocytes for all patients ( $n=200$ ) and proposed "normal" ranges

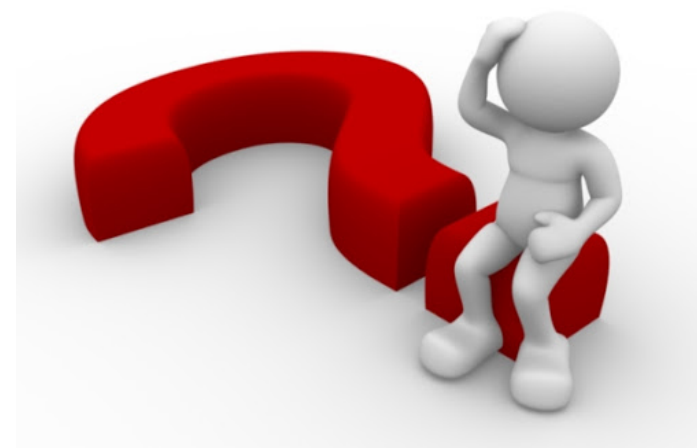
Lymphocyte subtype	Median	Range (5–95th centile)
uNK	46.0	13.2–78.3
pNK	1.0	0.0–4.7
NK-T	2.5	0.8–8.4
CD4+	10.4	3.8–21.4
CD8+	15.7	4.4–34.5
B cells	0.7	0.2–4.5



Pokračování příště 😊

# Otázky

- Má stanovení uNK buněk klinický význam?
  - a. ANO
  - b. NE
  - c. Možná, zatím není dostatek objektivních důkazů



# Otázky

- Kdy je nejvýhodnější provádět odběr uNK (biopsie)?
  - a. Kdykoliv, hladina uNK se během menstruačního cyklu nemění
  - b. Během ovulace
  - c. V období implantačního okna (21.-23. den cyklu)



# Otázky

- Která subpopulace NK buněk dominuje v děložní sliznici?
  - a. CD3-CD56<sup>bright</sup> CD16-
  - b. CD3-CD56<sup>dim</sup>CD16+
  - c. CD3+CD56+





# Děkuji Vám za pozornost.

## Poděkování

MUDr. Pavlovi Otevřelovi, Reprofit International s.r.o., Brno

MUDr. Karin Malíčkové, ISCARE a.s. Praha

Pracovníkům IML GENNET s.r.o., Praha

[www.gennet.cz](http://www.gennet.cz)

[Stepanka.luxova@gennet.cz](mailto:Stepanka.luxova@gennet.cz)



**GENNET**

člen skupiny  
**FutureLife**

# Literatura

- <https://www.intechopen.com/books/lymphocyte-updates-cancer-autoimmunity-and-infection/innate-lymphoid-cells-non-nk-ilcs->
- **Endometrial Immune Dysfunction in Recurrent Pregnancy Loss**, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20(21), 5332; <https://doi.org/10.3390/ijms20215332>
- J. Krejsek, *Imunologie člověka*, Garamon s.r.o. 2016
- Kofod, L., Lindhard, A., Hviid, T.V.F., **Implications of uterine NK cells and regulatory, T cells in the endometrium of infertile women**, *Human Immunology* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.humimm>. 2018.07.003
- Miller D, Motomura K, Garcia-Flores V, Romero R, Gomez-Lopez N. **Innate Lymphoid Cells in the Maternal and Fetal Compartments**. *Front Immunol.* 2018;9:2396. Published 2018 Oct 26. doi:10.3389/fimmu.2018.02396
- Chen X, Liu Y, Cheung WC, Zhao Y, Huang J, Chung JPW, Wang CC, Li TC., **Increased expression of angiogenic cytokines in CD56+ uterine natural killer cells from women with recurrent miscarriage.**, *Cytokine*. 2018 Oct;110:272-276. doi: 0.1016/j.cyto.2018.01.013. Epub 2018 Feb 1.
- [Montaldo E<sup>1</sup>](#), [Del Zotto G](#), [Della Chiesa M](#), [Mingari MC](#), [Moretta A](#), [De Maria A](#), [Moretta L](#), **Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function.**, *Cytometry A*. 2013 Aug;83(8):702-13. doi: 10.1002/cyto.a.22302. Epub 2013 May 6.
- Chen X, Mariee N, Jiang L, et al. **Measurement of uterine natural killer cell percentage in the periimplantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: establishment of a reference range.** *Am J Obstet Gynecol* 2017;217:680.e1-6.
- Beytamouni TS, Ghanem E (2016) **Properties of Uterine Natural Killer Cells in Human Pregnancy, Major Receptors Involved, and Routes of Trophoblast Invasion**. *Single Cell Biol* 5: 133. doi:10.4172/2168-9431.1000133
- Irit Manaster, Saar Mizrahi, Debra Goldman-Wohl, Hen Y. Sela, Noam Stern-Ginossar, Dikla Lankry, Raizy Gruda, Arye Hurwitz, Yuval Bdolah, Ronit Haimov-Kochman, Simcha Yagel, Ofer Mandelboim, **Endometrial NK Cells Are Special Immature Cells That Await Pregnancy**, *The Journal of Immunology* August 1, 2008, 181 (3) 1869-1876; DOI: 10.4049/jimmunol.181.3.1869
- Seshadri, Sunkara SK., **Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis.**, [Hum Reprod Update](#). 2014 May-Jun;20(3):429-38. doi: 10.1093/humupd/dmt056. Epub 2013 Nov 27.
- Marron K, Walsh D, Harrity C., **Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations.**, [J Assist Reprod Genet](#). 2019 Feb;36(2):199-210. doi: 10.1007/s10815-018-1300-8. Epub 2018 Sep 7.