УДК 618.145:612.017:618.179

Активність природних кілерних клітин в еутопічному ендометрії при аденоміозі у жінок з різними імплантаційними характеристиками

О.М. Носенко[1], Т.Я. Москаленко[1], О.М. Косюга[2]
[1]Одеський національний медичний університет
[2] КУ «Міська клінічна лікарня №1», м. Одеса

Мета дослідження: **порівняльне вивчення кількості і розподілу кілерних клітин (NK-клітин) в еутопічному ендометрії при аденоміозі у жінок з різними імплантаційними характеристиками.**
***Матеріали та методи*. Проведено порівняльний аналіз зразків ендометрія від 32 невагітних жінок репродуктивного віку з аденоміозом і невиношуванням вагітності в анамнезі та від 30 невагітних жінок з аденоміозом, у яких бажана вагітність закінчилася пологами і не було епізодів мимовільного переривання вагітності, а також від 10 умовно гінекологічно здорових невагітних жінок без аденоміозу, у яких бажана вагітність закінчилася пологами. Досліджували вміст в ендометрії NK-клітин з використанням мишачих рідинних моноклональних антитіл до антигенів CD16+ та CD56+ імуногістохімічним методом.**
***Результати*. Установлено, що інфільтрація еутопічного ендометрія NK-клітинами у жінок з аденоміозом перевищує таку в умовно здорових фертильних осіб. При аденоміозі кількість NK-клітин CD56+ в еутопічному ендометрії у жінок з імплантаційною недостатністю перевищує таку у пацієнток з імплантаційною спроможністю у 6,8 разу (p<0,01), NK-клітин CD16+ – у 7,1 разу (p<0,01).**
***Заключення*. Визначення вмісту NK-клітин в еутопічному ендометрії у жінок з аденоміозом можна використовувати на етапі передгравідарної підготовки для прогнозу імплантаційного успіху і проведення необхідної імунокорекції.**
Ключові слова: *аденоміоз, еутопічний ендометрій, імуногістохімія, природні кілерні клітини, імплантаційна недостатність.*

Аденоміоз є поширеним захворюванням, що впливає на репродуктивний період життя жінки. За останні десять років різні патогенетичні гіпотези були запропоновані для пояснення зародження і розвитку захворювання [1]. З'ясовано, що при аденоміозі спостерігаються імунна дисфункція і зміни експресії молекул адгезії, активності проліферації та апоптозу клітин. Також спостерігається збільшення цитокінів і медіаторів запалення. І, нарешті, наявність окисного стресу і аномалій у вільнорадикальному метаболізмі може змінити маткову рецептивність [2]. Тому у даний час аденоміоз розглядається як поширена причина імплантаційної недостатності [3].

Важливу роль в імплантаційних подіях відіграють ендометріальній імунні клітини, у тому числі природні кілерні клітини (NK-клітини), макрофаги, індуцибельні Т-регуляторні та дендритні клітини, серед яких найчисленнішими є саме NK-клітини – до 70% [4, 5].

NK-клітини здатні вбивати певні клітини пухлини-мішені без попередньої сенсибілізації, є важливими ефекторами в імунній відповіді проти деяких вірусів, паразитів і внутрішньоклітинних бактерій. Вони швидко реагують на інфекції і продукують цитокіни і хемокіни, такі, як інтерферон-γ, фактор некрозу пухлин, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор, макрофагальний запальний 1α- та 1β-білок, хемокін, який експресується та секретується Т-клітинами при активації (RANTES), та інші [6] – отже, також виступають в якості регуляторів адаптивної імунної відповіді [5].

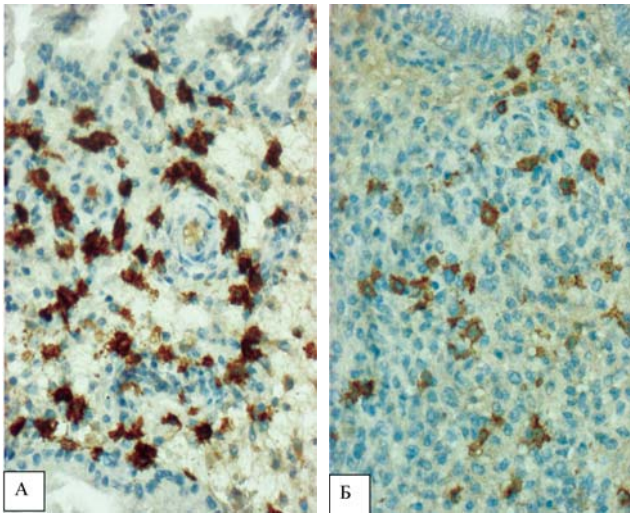
Ендометрій у здорових жінок відрізняється переважною експресією субпопуляції NK-клітин CD56CD16-, що має високу продукцію цитокінів, і малою чисельністю субпопуляції CD56CD16+, що характеризується цитотоксичними властивостями, високим ангіогенним потенціалом і експресією кілерних Ig-подібних рецепторів [6]. Кількість великих гранульованих лімфоцитів, які експресують CD56+CD16- і мають високу продукцію цитокінів, у разі запліднення та імплантації збільшується і досягає піку в кінці I триместра вагітності [6]. За відсутності імплантації CD56+CD16- видаляються з матки разом з іншими ендометріальними клітинами під час менструації. Функції NK-клітин в людській децидуальної оболонці чітко не визначені, але зниження їхнього числа, зміна субпопуляцій асоціюється з нездатністю до імплантації, з ранніми викиднями і порушеннями внутрішньоматкового зростання. Кілька досліджень встановили збільшення числа NK-клітин у жінок з рецидивною репродуктивною недостатністю [5–9].

Мета дослідження: порівняльне вивчення кількості і розподілу NK-клітин в еутопічному ендометрії при аденоміозі у жінок з різними імплантаційними характеристиками.

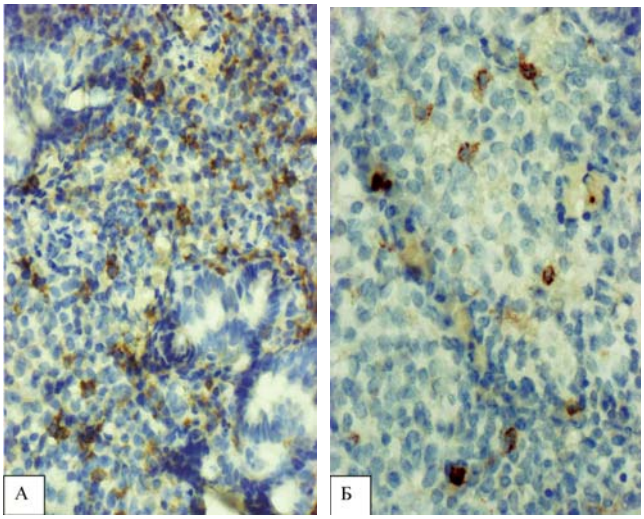
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено порівняльний аналіз зразків ендометрія від 32 невагітних жінок репродуктивного віку з аденоміозом та невиношуванням вагітності в анамнезі (група I) та від 30 невагітних жінок з аденоміозом, у яких бажана вагітність закінчилася пологами і не було епізодів мимовільного переривання вагітності (група II), а також від 10 умовно гінекологічно здорових невагітних жінок без аденоміозу, у яких бажана вагітність закінчилася пологами (контрольна група – К).

Біопсію ендометрія проводили на 21-й день менструального циклу, в період очікуваного вікна імплантації. Отримані зразки ендометрія вміщували у нейтральний забуферений 10% розчин формаліну (pH 7,4) і фіксували протягом 24 год. Після дегідратації шматочки заливали у парафін. На ротаційному мікротомі Microm HM325 з системою переносу зрізів STS («Carl Zeiss», Німеччина) виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 4 мкм, які потім фарбували гематоксиліном і еозином. Для подальшого імуногістохімічного дослідження (ІГХ) частину серійних парафінових зрізів вміщували на покрите адгезивом скло Super Frost Plus («Menzel», Німеччина). Дослідження вмісту в ендометрії NK-клітин проводили з використанням мишачих рідинних моноклональних антитіл (МАТ) до антигенів CD16 (Product Code: NCL-L-CD16, клон 2H7, «Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody», Велика Британія) та до CD56 (Product Code: Product Code: NCL-L-CD56-504, клон CD564,



Мал. 1. Підвищена кількість CD56+-імунопозитивних NK-клітин в еутопічному ендометрії при аденоміозі на 21-й день менструального циклу: А – у пацієнток з імплантаційною недостатністю; Б – в осіб з імплантаційною спроможністю. ІГХ з МАТ до CD56, зб. ×150



Мал. 2. Підвищена кількість CD16+-імунопозитивних NK-клітин в еутопічному ендометрії при аденоміозі на 21-й день менструального циклу : А – у пацієнток з імплантаційною недостатністю; Б – в осіб з імплантаційною спроможністю. ІГХ з МАТ до CD16, зб. ×150

«Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody», Велика Британія). У якості позитивного контролю для імунофарбування CD16 використовували тканину мигдалин, а CD56 – мозочка. Підраховували кількість клітин з пофарбованою у коричневий колір цитолемою на тисячу стромальних клітин.

Вивчення гістологічних препаратів у світлі проводили на мікроскопі Olympus AX70 (Японія) з цифровою відеокамерою Olympus DP50, з'єднаною з персональним комп'ютером. Мікрофотографування і морфометрію виконували з використанням програми «ANALYSIS Pro 3.2» («SoftImaqinq», Німеччина). Отримані дані статистично оброблені за допомогою програм EXCEL.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В обох групах пацієнток з аденоміозом спостерігалася підвищена кількість порівняно з пацієнтками контрольної групи NK-клітин CD56+ і NK-клітин CD16+, але серед жінок групи І з аденоміозом і наявністю імплантаційної недостатності вміст імунопозитивних клітин був вищий, ніж у групі ІІ. Вміст NK-клітин CD56+ в ендометрії жінок групи І був у межах від 10,1‰ до 221,3‰ і в середньому дорівнював 83,8±5,1‰, що перевищувало такий вміст у пацієнток групи ІІ (12,3±0,41‰) у 6,8 разу ($p<0,01$) і групи К (7,1±0,5‰) – в 11,8 разу ($p<0,01$) (мал. 1).

Кількість імунопозитивних клітин до МАТ до NK-клітин CD16+ в ендометрії жінок групи І складала від 5,8‰ до 121,7‰, в середньому – 45,6±2,1‰, що було більше аналогічного рівня у пацієнток групи ІІ (6,4±0,6‰) в 7,1 разу ($p<0,01$) і в контрольній групі (1,4±0,2 ‰) – у 32,6 разу ($p<0,01$) (мал. 2).

В еутопічному ендометрії жінок з аденоміозом реєстрували нерівномірний вміст NK-клітин в одному полі зору і різних ділянках препарату ендометрія. В окремих ділянках NK-клітин безпосередньо контактували з клітинами залозистого епітелію, місцями спостерігалося інтраепітеліальне розташування CD56+-позитивних NK-клітин. Більш характерною була структурна колокалізація NK-клітин з судинами і стромальними елементами.

ВИСНОВКИ

Інфільтрація еутопічного ендометрія NK-клітинами у жінок з аденоміозом перевищує таку в умовно здорових фертильних осіб. При аденоміозі кількість NK-клітин CD56+ в еутопічному ендометрії у жінок з імплантаційною недостатністю перевищує таку у пацієнток з імплантаційною спроможністю в 6,8 разу ($p<0,01$), NK-клітин CD16+ – в 7,1 разу ($p<0,01$). Визначення вмісту NK-клітин в еутопічному ендометрії у жінок з аденоміозом можна використовувати на етапі передгравідарної підготовки для прогнозу імплантаційного успіху і проведення необхідної імунокорекції.

Перспективи подальших досліджень. Необхідні подальші дослідження щодо визначення доцільності проведення імунокорекції при передгравідарній підготовці жінок з аденоміозом.

Активность натуральных киллерных клеток в эутопическом эндометрии при аденомиозе у женщин с различными имплантационными характеристиками

Е.Н. Носенко, Т.Я. Москаленко, О.Н. Косюга

Цель исследования: сравнительное изучение количества и распределения киллерных клеток (NK-клеток) в эутопическом эндометрии при аденомиозе у женщин с различными имплантационными характеристиками.

Материалы и методы. Проведен сравнительный анализ образцов эндометрия от 32 небеременных женщин репродуктивного возраста с аденомиозом и невынашиванием беременности в анамнезе, от 30 небеременных женщин с аденомиозом, у которых желанная беременность закончилась родами и не было эпизодов самопроизвольного прерывания беременности, а также от 10 условно гинекологически здоровых небеременных женщин без аденомиоза, у которых желанная беременность закончилась родами. Исследовали содержание в эндометрии NK-клеток с использованием мышиных жидкостных моноклональных антител к антигенам CD16+ и CD56+ иммуногистохимическим методом.

Результаты. Установлено, что инфильтрация эутопического эндометрия NK-клетками у женщин с аденомиозом превышает таковую у условно здоровых фертильных женщин. При аденомиозе количество NK-клеток CD56+ в эутопическом эндометрии у женщин с имплантационной недостаточностью превышает таковое у пациенток с имплантационной компетентностью в 6,8 раза ($p<0,01$), NK-клеток CD16+ – в 7,1 раза ($p<0,01$).

Заключение. Определение содержания NK-клеток в эутопическом эндометрии у женщин с аденомиозом можно использовать на этапе предгравидарной подготовки для прогноза имплантационного успеха и проведения необходимой иммунокоррекции.

Ключевые слова: *аденомиоз, эутопический эндометрий, иммуногистохимия, натуральные киллерные клетки, имплантационная недостаточность.*

Activity of natural killer cells in the eutopic endometrium AT adenomyosis in women with different implantation characteristics

O.M. Nosenko, T.Ya. Moskalenko, O.M. Kosyuga

The objective: of the study was a comparative study of the number and distribution of NK-cells in eutopic endometrium at adenomyosis in women with different implantation characteristics.

Patients and methods. A comparative analysis of 32 endometrial samples from non-pregnant women of reproductive age with adenomyosis and a history of miscarriage, 30 non-pregnant women with adenomyosis who desired pregnancy ended in childbirth, and there were no episodes of spontaneous abortion, and 10 conditionally gynecologically healthy non-pregnant women without adenomyosis, who desired pregnancy ended in childbirth. It was investigated endometrium content of NK-cells using liquid murine monoclonal antibodies to the antigens CD16 + and CD56 + by immunohistochemistry.

Results. It was found that infiltration of eutopic endometrial by NK-cells in women with adenomyosis exceeds that of conventionally healthy fertile persons. At adenomyosis the number of CD56+NK-cells in eutopic endometrium in women with implantation failure exceeds that in patients with implantation competence in 6.8 times ($p<0,01$), CD16+NK-cells – in 7.1 times ($p<0,01$).

Conclusion. Determination of NK-cells in eutopic endometrium of women with adenomyosis can be used at the stage of the pre-gravid preparation for the forecast of implantation success and carry out the necessary immune correction.

Key words: *adenomyosis, eutopic endometrium, immunohistochemistry, natural killer cells, implantation failure.*

Сведения об авторах

Носенко Елена Николаевна – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета, 65082, г. Одесса, пер. Валиховский, 2; тел.: (048) 723-84-41. E-mail: nosenko.olena@gmail.com

Москаленко Татьяна Яковлевна – Кафедра акушерства и гинекологии № 1 Одесского национального медицинского университета, КУ «Родильный дом № 7», 65080, г. Киев, ул. Космонавтов, 11; тел.: (048) 766-86-01. E-mail: 777Roddom@gmail.com

Косюга Ольга Николаевна – КУ «Городская клиническая больница № 1», 65000, г. Одесса, ул. Мясоедовская, 32; тел.: (048) 734-99-86. E-mail: gkb_1@list.ru.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Adenomyosis and its impact on women fertility / Garavaglia E., Audrey S., Annalisa I. [et al.] // Iran J. Reprod. Med. – 2015. – Vol. 13, № 6. – P. 327–336.

2. Benagiano G. Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis / Benagiano G., Brosens I., Habiba M. // Hum. Reprod. Update. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 386–402. doi: 10.1093/humupd/dmt052.

3. Adenomyosis and subfertility: a systematic review of prevalence, diagnosis, treatment and fertility outcomes / Maheshwari A., Gurunath S., Fatima F. [et al.] // Hum. Reprod. – 2012. – Vol. 18. – P. 374–392.

4. Robertson S.A. Immunological determinants of implantation success / Robertson S.A., Moldenhauer L.M. // Int. J. Dev. Biol. – 2014. – Vol. 58, № 2–4. – P. 205–217. doi: 10.1387/ijdb.140096sr.

5. The prognostic value of uNK cell count and histological dating in the mid-luteal phase of women with reproductive failure [Текст] / Liu B., Mariee N., Laird S. [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2014. – Vol. 181. – P. 171–175. doi: 10.1016/j.ejogrb.2014.07.010.

6. Рецептивность эндометрия у пациенток с бесплодием [Текст] : монография / В.К. Чайка, А.В. Чайка, Е.Н. Носенко, Л.В. Сусликова, И.Д. Гюльмамедова, В.Э. Дорошенко, А.И. Саенко, И.Г. Постолюк, О.И. Парницкая. – Донецк: Изд-во «Ноулидж», 2011. – 243 с.

7. Носенко Е.Н. Иммунная реактивность эндометрия у пациенток с неудачными попытками вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе [Текст] / Е.Н. Носенко, А.И. Саенко, И.Г. Постолюк // Таврійський медико-біологічний вісник. – 2012. – Т. 15, № 2, ч. 2 (58). – С. 157–159.

8. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage [Текст] / Tuckerman E., Laird S.M., Prakash A. [et al.] // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 22, № 8. – P. 2208–2213.

9. Backström E. Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed [Текст] / Backström E., Kristensson K., Ljunggren H.G. // Scand. J. Immunol. – 2004. – Vol. 60, № 1–2. – P. 14–22.

Статья поступила в редакцию 14.04.2016