

Investigarea citotoxicității periferice și uterine în sarcinile normale și patologice de prim trimestru

Peripheral and uterine cytotoxicity in normal and pathologic first trimester pregnancies

Daniela Constantinescu^{1*}, Carmen Cozmei¹, Andreea Chiriac²,
Elena Mihălceanu^{2,3}, Irina Dumitrașcu^{2,3}, Eugen Carasevici⁴

1. Institutul de Sănătate Publică, Iași

2. Spitalul Clinic de Obstetrică și Ginecologie "Cuza Vodă", Iași

3. UMF "Gr. T. Popa", Facultatea de Medicină, Disciplina de Obstetrică – Ginecologie, Iași

4. UMF "Gr. T. Popa", Facultatea de Medicină, Disciplina de Imunologie, Iași

Rezumat

Creșterea activității citotoxice a celulelor NK a fost incriminată în oprirea evoluției sarcinii, complicația cea mai frecventă survenită în cursul primului trimestru. Scopul studiului nostru a fost acela de a investiga comparativ citotoxicitatea celulelor periferice și uterine în sarcini normale și patologice de prim-trimestru, pentru a evalua utilitatea efectuării acestui test în sângele periferic în cazul monitorizării sarcinilor cu risc.

Material și metode: Celulele mononucleare au fost separate din sângele periferic și din produsele de raclaj uterin prelevate de la 10 gravide cu sarcini întrerupte la cerere și de la 10 gravide cu sarcini oprite în evoluție. Procentul de celule natural-killer (NK) a fost determinat flow-citometric. Separarea prin centrifugare în triplu gradient de densitate Percoll a permis obținerea concomitentă și de celule trofoblastice din produsele de raclaj uterin. Evaluarea citotoxicității s-a făcut flow-citometric, folosind drept ținte celule K562 și celule trofoblastice autologe marcate cu carboxi-fluorescein-succinimidil ester (CFSE).

Rezultate: Activitatea citotoxică a celulelor uterine a fost mai mare decât cea a celulelor periferice. În sarcinile patologice citotoxicitatea a fost mai redusă decât în sarcinile normale. Indicii de citotoxicitate periferici au diferit semnificativ față de cei uterini și s-au corelat doar în sarcinile normale. Nu s-a evidențiat o corelație între procentul de celule NK și activitatea lor citotoxică.

Concluzii: creșterea activității citotoxice nu poate fi incriminată în oprirea evoluției sarcinilor investigate în acest studiu. Diferența dintre activitatea citotoxică a celulelor periferice și cea a celulelor uterine dovedește compartimentalizarea evenimentelor uterine.

Cuvinte-cheie: citotoxicitate, K562, trofoblast, CFSE, NK

*Adresa pentru corespondență: Daniela Constantinescu, Str. Fundac Mircea nr 13, Iași, 700377
Tel.: 0232 277 289; 0722 67 12 07. E-mail: dconstantinescu_ro@yahoo.com

Adresa instituției: Laboratorul de Imunologie și Genetică, Ambulatorul de specialitate al Spitalului Clinic de Urgențe "Sf Spiridon", etaj IV, Str. Vasile Conta nr. 2-4, Iași

Abstract

The maternal immune system is involved in pregnancy success or failure. Increased cytotoxic activity of NK cells was associated with first trimester abortion, which is the most frequent complication of pregnancy. The aim of our study was to compare peripheral and uterine cytotoxicity in normal and pathological first-trimester pregnancy, in order to evaluate the utility of this test in monitoring high-risk pregnancies.

Material and methods: mononuclear cells were separated from peripheral blood and from tissue fragments obtained by uterine curettage from 10 pregnant women with requested abortion and 10 women with spontaneous abortion. Natural-killer (NK) cells percentage was detected by flow-cytometry. Separation by triple gradient Percoll density centrifugation allowed simultaneous isolation of trophoblast cells from uterine tissue fragments. We used a flowcytometric method of cytotoxicity evaluation which used carboxy-fluorescein-succinimidyl ester (CFSE)-labelled K562 and autologous trophoblastic cells as targets.

Results: cytotoxic activity of uterine cells was higher than that of peripheral blood cells. Cytotoxicity was reduced in pathological compared to normal pregnancy. Peripheral blood and uterine cytotoxicity indexes were significantly different and were correlated only in normal pregnancies. The percentage of NK cells did not correlate with their cytotoxic activity.

Conclusions: increased cytotoxic activity cannot be incriminated in inducing abortion. The difference between the cytotoxic activity of uterine and peripheral blood cells proves the compartmentalisation of uterine events.

Keywords: cytotoxicity, K562, trophoblast, CFSE, NK

Introducere

Sistemul imun matern este implicat în succesul sarcinii sau în eșecul său. Celulele NK sunt considerate a avea o importanță crucială în patogenia avorturilor. Contactul lor direct cu trofoblastul le transformă în candidați principali pentru reacțiile aloimune, în cursul cărora fătul este perceput ca "străin" și e "rejetat" de sistemul imun matern (avort aloimun)¹⁶. Femeile care avortează au o populație numeroasă de NK uterine cu fenotipul CD56+CD16+^{7, 17}, iar în sângele periferic al femeilor la care s-a produs avortul embrionilor normali genetic a fost descris un subset mare de celule NK cu activitate citolitică puternică^{2, 3, 19}.

Material și metode

Au fost incluse în studiu 10 gravide cu sarcini oprite în evoluție, lotul martor cuprinzând 10 gravide care au solicitat întreruperea cursului sarcinii. Vârsta gravidelor din cele două loturi a fost cuprinsă între 18 și 39 de ani, iar vârsta gestațională a variat între 6 și 12 săptămâni.

Înainte de anestezia pentru chiuretaj, de la fiecare gravidă s-au recoltat 15 ml de sânge venos. Țesuturile uterine raclate au fost recoltate în recipiente sterile din plastic și transportate la laborator în primele 30 de minute de la recoltare. Probele biologice incluse în studiu au fost recoltate după informarea gravidelor despre obiectivele studiului și după obținerea consimțământului lor.

Celulele mononucleare periferice au fost izolate prin centrifugare în gradient de densitate utilizând mediul de separare Histopaque (SIGMA).

Separarea celulelor trofoblastice și a celor mononucleare uterine s-a făcut conform protocolului descris de Nagamatsu *et al*¹⁰. Fragmentele tisulare obținute în urma chiuretajului uterin au fost mărunțite mecanic și apoi au fost supuse digestiei enzimatică cu 20 U/ml DNAază I tip IV (Sigma) și 0,125 % tripsină (SIGMA) în trei cicluri. Diferitele componente celulare - celulele trofoblastice și celulele mononucleare deciduale - au fost separate pe un triplu gradient de densitate Percoll (SIGMA) 50%,

40%, 20%.

Celulele periferice și uterine izolate au fost numărate și s-a determinat viabilitatea lor prin metoda excluderii de albastru Tripzan.

Pentru investigarea citotoxicității s-a folosit o metodă flow-citometrică în care celulele țintă, K562 sau celulele trofoblastice autologe, au fost marcate cu carboxi-fluorescein-succinimidil ester (CFSE), evitându-se neajunsurile metodei clasice cu ^{51}Cr .

Întrucât pe parcursul optimizării tehnicii de lucru s-au obținut uneori valori mari ale lizei spontane, în ultima etapă de optimizare a testului s-a lucrat cu celule K562 aflate în faza logaritmică a dezvoltării care au fost marcate cu 1,25 μM CFSE și păstrate la -70°C în concentrație de aproximativ 1×10^6 celule/tub până în ziua testului. În test au fost utilizate numai celulele care la decongelare aveau o viabilitate de peste 95%. S-a creat în acest mod un stoc omogen de ținte care a fost folosit în toate experimentele astfel încât testul nu a mai depins de surprinderea fazei logaritmice a dezvoltării țintelor, comparându-se exclusiv activitatea efectorilor.

Celulele K562 CFSE⁺ decongelate au fost incubate cu efectorii - PBMC sau celule mononucleare separate de la interfața materno-fetală - în raport de 1:30, la 37°C , timp de 4 ore. Raportul a fost stabilit ca fiind optim în urma experimentului pilot efectuat pentru optimizarea tehnicii și a permis efectuarea testului de citotoxicitate în duplicat. S-a lucrat în tuburi sterile pentru flowcitometru.

La sfârșitul incubării, peste suspensiile celulare s-a adăugat 2,5 $\mu\text{g/ml}$ iodură de propidiu (PI). Țintele moarte devin permeabile pentru PI și pot fi identificate flowcitometric pe baza dublei pozitivități pentru CFSE și PI. Achiziția flowcitometrică s-a realizat la 10-15 minute după adăugarea iodurii de propidiu, iar analiza s-a făcut cu ajutorul programului CellQuest.

Indicele de citotoxicitate s-a calculat după formula:

$$\text{IC} = \frac{\text{liză probă} - \text{liză spontană}}{\text{liză totală} - \text{liză spontană}} \times 100$$

Liza spontană a fost determinată în tuburile în care au fost incubate doar ținte (K562 sau celule trofoblastice autologe) fără efectori.

Pentru a determina liza totală, țintele din tuburile de control au fost supuse unui șoc termic la sfârșitul incubării de 4 ore, prin scufundarea tuburilor timp de 3 minute în baie de apă la 56°C și apoi în apă la 4°C . Acest tratament termic permite ca volumul suspensiei celulare să fie același în toate tuburile investigate.

Procentele de celule NK din populația de limfocite circulante și uterine delimitată în coordonate volum-granularitate au fost determinate flowcitometric folosind anticorpi monoclonali anti-CD16 FITC (Becton Dickinson), anti-CD8 PE (Dako), anti-CD3 CyCr (Becton Dickinson) și anti-CD56 APC (Immunotech) (*Figura 1*).

Rezultate

Rezultatele testelor de citotoxicitate (exprimate în indici de citotoxicitate) față de țintele K562 CFSE⁺ sunt prezentate în *Tabelul 1*. Pentru citotoxicitatea celulelor periferice s-a folosit și un lot de femei neînsărcinate ca lot de referință.

Se observă că indicele de citotoxicitate este redus în sarcină, scăzând și mai mult în sarcinile oprite în evoluție. Aplicând metoda ANOVA de comparație multiplă, nu s-a găsit o diferență semnificativă statistic între cele trei grupuri ($p = 0,162$).

La nivel uterin activitatea citotoxică față de țintele K562 a fost mai intensă față de periferie, iar în sarcinile normale mai intensă decât în cele oprite în evoluție (*Tabel 1*).

Fenotiparea celulelor mononucleare a permis diferențierea a 3 subpopulații de celule NK distincte fenotipic. Ponderele acestora în cadrul populațiilor limfocitare circulante și uterine

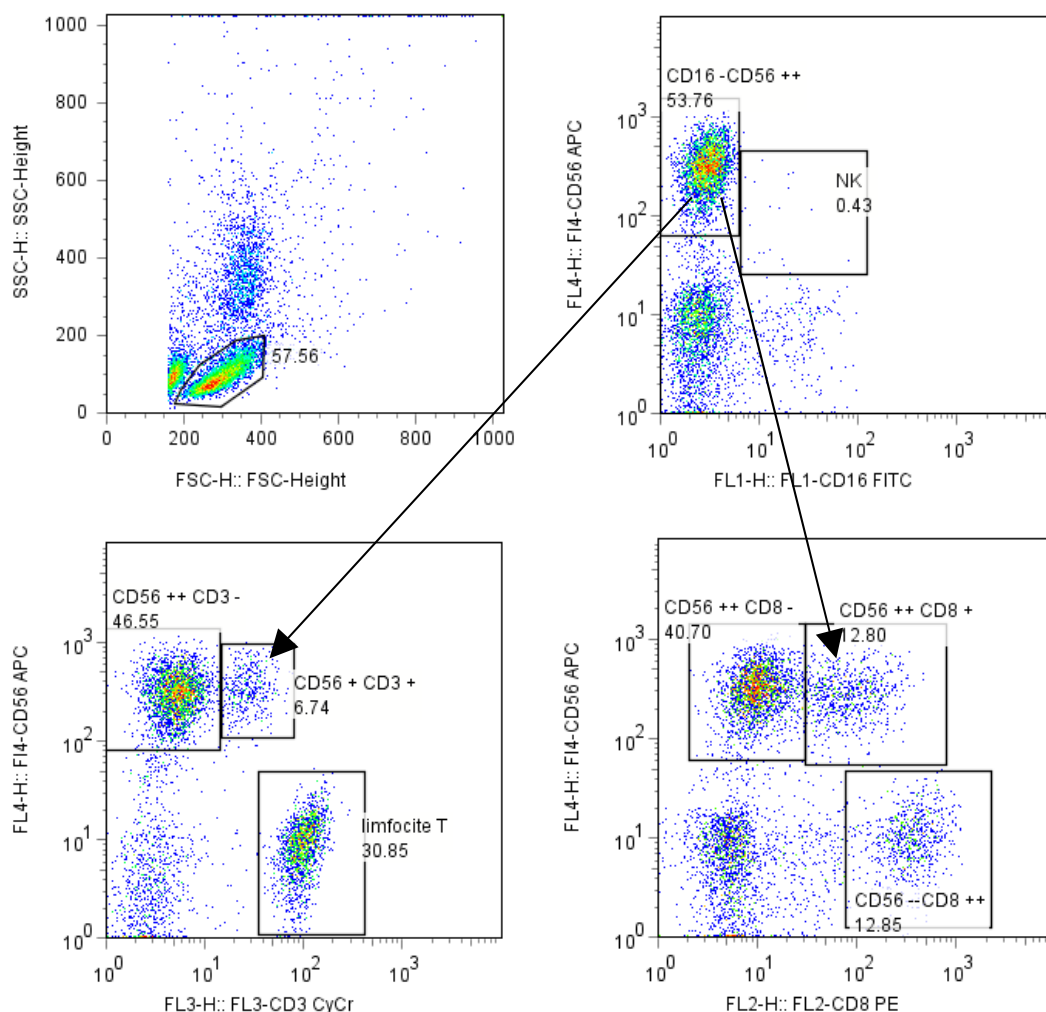


Figura 1. Marcarea limfocitelor uterine cu un amestec de 4 anticorpi monoclonali a adus informații suplimentare despre fenotipul celulelor.

este prezentată în *Tabelul 2*.

O etapă a prelucrării statistice a datelor a constat în calcularea corelațiilor dintre procente de celule NK și indicii de citotoxicitate față de ținte K562. Nu s-au găsit corelații semnificative la nici unul dintre loturi ($p > 0,05$).

În ambele loturi studiate a existat o diferență semnificativă statistic între mediile indicilor de citotoxicitate de la nivel periferic față de mediile uterine ($p < 0,05$). Deși pentru sarcinile întrerupte la cerere analiza statistică a evidențiat o corelație semnificativă ($p = 0,01$) între

indicii de citotoxicitate de la nivel periferic cu cei de la nivel uterin, pentru sarcinile oprite în evoluție semnificația statistică nu s-a menținut ($p = 0,72$).

Testarea citotoxicității celulelor NK periferice și uterine față de trofoblastul autolog a evidențiat indici de citotoxicitate mult mai mici decât cei obținuți pentru ținte K562, atât în cazul celulelor mononucleare separate de la interfața materno-fetală cât și pentru celulele periferice (*Tabel 3*). Indicii de citotoxicitate au fost comparabili între loturi.

Tabelul 1. Activitatea citotoxică a celulelor periferice și uterine față de ținte K562

	PBMC/K562			Celule uterine/K562	
	Negravide (n = 10)	Sarcini normale (n = 10)	Sarcini oprite în evoluție (n = 10)	Sarcini normale (n = 10)	Sarcini oprite în evoluție (n = 10)
MEDIE	23,33 %	20,51 %	11,44 %	50,04 %	43,46 %
DS	13,647 %	16,45 %	9,188 %	30,466 %	8,833 %

Tabelul 2. Structura populației NK periferice și deciduale

Celule NK	sânge periferic		uter	
	Sarcini normale medie ± DS	Sarcini patologice medie ± DS	Sarcini normale medie ± DS	Sarcini patologice medie ± DS
CD3 ^{neg} CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,1±6,9 %	10,5±7,5 %	10,0±11,2 %	15,7±16,9 %
CD3 ^{neg} CD16 ^{neg} CD56 ⁺⁺	1,0±0,8 %	3,8±5,8 %	32,4±19,8 %	39,9±19,2 %
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	4,8±6,1 %	5,3±2,0 %	4,4±2,9 %	4,5±2,5 %

Tabelul 3. Media indicilor de citotoxicitate a celulelor mononucleare periferice și uterine față de trofoblastul autolog

	sarcini normale	sarcini oprite în evoluție
IC celule uterine / trofoblast autolog	2,73 %	2,34 %
IC PBMC / trofoblast autolog	1,15 %	1,02 %

Discuții

În acest studiu evaluarea activității citotoxice s-a făcut flowcitic, metoda fiind apreciată ca precisă, cu o bună reproductibilitate și lipsită de riscul radioactivității pe care îl prezintă investigarea cu ⁵¹Cr^{1,5}.

Fenotiparea celulelor mononucleare a confirmat datele din literatură privitoare la predominanța la nivel uterin a celulelor CD16-CD56⁺⁺ și a evidențiat o populație CD16⁺CD56⁺ mai numeroasă decât la gravidele cu sarcini întrerupte la cerere.

Investigarea activității citotoxice a celulelor mononucleare a generat rezultate surprinzătoare, indicii de citotoxicitate fiind mai mari la nivel uterin decât în periferie.

Deși celulele NK sunt populația limfocitară predominantă la interfața materno-fetală, iar funcția lor este în general aceea de eliminare a celulelor care nu exprimă antigene MHC self⁹, numeroase studii au asociat celulele NK

CD56⁺⁺ în special cu secreția de citokine. O explicație a activității citotoxice uterine crescute remarcate în studiul nostru a fost oferită de un studiu recent care a descris în celulele deciduale NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺⁺ un întreg “arsenal” citolitic, perforine, granzime și Fas ligand, care poate fi folosit împotriva celulelor infectate viral, parazitare sau transformate, liza țintelor K562 implicând perforinele⁴.

Supoziția că această creștere a citotoxicității la nivel uterin s-ar datora proporției mai mari de celule NK între celulele mononucleare uterine față de periferie a fost infirmată prin absența unei corelații semnificative între indicii de citotoxicitate și procentele de celule NK CD56⁺CD16⁺, CD56⁺CD16⁻ și CD3⁺CD56⁺ periferice sau uterine, deși în literatură există studii în care s-a descris o bună corelație între cei doi parametri^{14,15}.

Concluzia noastră că cele două teste de investigare a răspunsului imun celular - cuantificarea celulelor NK și evaluarea citotoxicității

celulelor NK - nu se corelează și evaluează aspecte diferite ale celulelor NK coincide cu cea comunicată de Gilman-Sachs *et al*⁵.

Este posibil ca uciderea țintelor K562 să se datoreze altor celule de la interfața materno-fetală, în studiul nostru nefiind folosită o populație purificată de celule NK uterine. În sprinul acestei prezumții vine concluzia studiului lui Scaife *et al*¹³ care a selectat pozitiv limfocite T CD8+ din fragmente deciduale obținute din sarcini de 7 săptămâni și a dovedit capacitatea lor citolitică față de ținte K562, după o incubare similară de 4 ore.

Efectul citolitic asupra țintelor K562 s-ar putea datora celulelor NK CD8+, pe care le-am identificat la nivel uterin la o proporție de aproximativ 20% dintre celulele NK CD56++. Pittet *et al*¹² a identificat un tip similar de celule în sângele periferic și le-a catalogat după investigații fenotipice complexe ca limfocite T CD8+ efectoare care supraexprimă CD56. Aceste celule conțin cantități mari de perforine și granzime B și au activitate citolitică directă. Studiarea comparativă a citotoxicității acestor celule față de ținte K562 a evidențiat că celulele NK au potențial citolitic maxim, fiind urmate de limfocitele T CD56+ (CD56+CD8+), apoi de limfocitele T CD56-CD57+CD8+, cel mai redus potențial citolitic avându-l limfocitele T CD8+¹¹.

În ciuda numeroaselor molecule citolitice pe care le posedă, s-a raportat că celulele NK uterine au activitate citotoxică slabă față de trofoblast¹⁸, fapt confirmat și în studiul nostru, unde celulele NK uterine nu au ucis celulele trofoblastice la nici unul dintre loturi. Nu putem desigur exclude posibilitatea ca *in vivo*, sub influența citokinelor din micromediul uterin celulele NK să devină citotoxice față de trofoblast.

O altă observație surprinzătoare legată de investigarea activității citotoxice a fost aceea că pentru sarcinile oprite în evoluție indicii de citotoxicitate au fost mai mici decât în sarcinile întrerupte la cerere atât la nivel periferic cât și uterin. Este posibil ca activitatea citolitică mai

scăzută a celulelor NK la femeile cu sarcini oprite în evoluție să se datoreze unui deficit funcțional al celulelor NK la aceste femei, secreția mai redusă de granzime B și FasL putând traduce o expresie redusă a receptorilor activatori CD69, NKp46, NKG2DL și CD244^{6,8}.

În studiul nostru s-au înregistrat diferențe semnificative între indicii de citotoxicitate uterini și cei periferici, iar rezultatele testelor s-au corelat doar la lotul normal, în sarcinile oprite în evoluție existând o tendință de inversă proporționalitate între valorile uterine și cele periferice, probabil ca urmare a deficitului funcțional al celulelor uterine. Discordanțele observate ar putea indica faptul că acest test efectuat cu celule din periferie nu e adecvat pentru monitorizarea gravidelor, pentru că nu reflectă întotdeauna situația din uter.

Pentru cazurile investigate în studiul nostru activitatea citotoxică a celulelor NK nu poate fi incriminată în inducerea opririi în evoluție a sarcinii.

Mulțumiri: acest studiu a beneficiat de finanțare din partea CNCSIS, grant 1139.

Bibliografie

1. Andalib A., Rezaie A., Oreizy F. et al. - A study on stress, depression and NK cytotoxic potential in women with recurrent spontaneous abortion – Iran. J. Allergy Asthma Immunol, 2006; 5 (1): 9-16.
2. Aoki K., Kajiura S., Matsumoto Y. et al. - Pre-conceptional natural-killer cell activity as a predictor of miscarriage – Lancet, 1995; 345 (8961): 1340-1342.
3. Coulam C.B., Goodman C., Roussev R.G. et al. - Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome - Am. J. Reprod. Immunol, 1995; 33(1):40-46.
4. Crncic TB., Laskarin G., Frankovic K.J. et al. - Early pregnancy decidual lymphocytes beside perforin use Fas ligand (FasL) mediated cytotoxicity – J. Reprod. Immunol, 2007; 73 (2): 108-117.
5. Gilman-Sachs A., DuChateau B.K., Aslakson C.J. 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 (1): 99-105.

6. Hao S., Zhao J., Zhou J. et al. - Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors – *Int. Immunopharmacol.* 2007;7 (13):1765-1775.
7. Kwak J.Y., Beer A.E., Kim S.H. et al. - 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.
8. Li A., He M., Wang H. et al. - All-trans retinoic acid negatively regulates cytotoxic activities of natural killer cell line 92 – *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 ;352 (1): 42-47.
9. Ljunggren H.G., Kärre K. - In search of the „missing self”: MHC molecules and NK cell recognition – *Immunol. Today*, 1990; 11 (7): 237-244.
10. Nagamatsu T., Fujii T., Ishikawa T. et al. - A primary cell culture system for human cytotrophoblasts of proximal cytotrophoblast cell columns enabling in vitro acquisition of the extra-villous phenotype – *Placenta*, 2004; 25:153-165.
11. Ohkawa T., Seki S., Dobashi H. et al. - Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells – *Immunology*, 2001;103 (3): 281-290.
12. Pittet M.J., Speiser D.E., Valmori D. et al. - Cutting Edge: Cytolytic Effector Function in Human Circulating CD8+ T Cells Closely Correlates with CD56 Surface Expression – *J. Immunol.* 2000; 164: 1148-1152.
13. Scaife P.J., Bulmer J.N., Robson S.C. et al. - Effector activity of decidual CD8+ T lymphocytes in early human pregnancy – *Biol. Reprod.* 2006; 75 (4): 562-567.
14. Shakhkar K., Rosenne E., Loewenthal R. et al. - High NK cell activity in recurrent miscarriage: what are we really measuring? – *Hum. Reprod.* 2006; 21 (9): 2421-2425.
15. Souza S.S., Ferriani R.A., Santos C.M. et al. - Immunological evaluation of patients with recurrent abortion – *J. Reprod. Immunol.* 2002 56 (1-2): 111-121.
16. Stern J.J., Coulam C.B. - Current status of immunologic recurrent pregnancy loss - *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 1993; 5:252-259.
17. Vassiliadou N., Bulmer J.N. - Immunohistochemical evidence for increased numbers of 'classic' CD57+ natural killer cells in the endometrium of women suffering spontaneous early pregnancy loss – *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1569-1574.
18. Verma S., Hiby S.E., Loke Y.W. et al. - Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15 – *Biol. Reprod.* 2000; 62 (4): 959-968.
19. Yamada H., Kato E.H., Kobashi G. et al. - High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion - *Am. J. Reprod. Immunol.* 2001; 46(2):132-136.