

Б.В. Донської, В.П. Чернишов, В.Ю. Сіренко, Г.В. Стрелко, Д.В. Осипчук

Вплив акцентованої гіпо- та гіперактивності НК-лімфоцитів на імплантацію ембріонів

У попередній роботі нами був розроблений та описаний новий метод визначення активності НК-лімфоцитів за експресією маркера активації CD69, внаслідок стимуляції клітинами-мішенями K562 – клітинна лінія еритромієлолейкозу людини. Продемонстровано, що кількість активованих клітин відображає популяційно-функціональний стан НК-клітин периферичної крові. В цьому дослідженні, ми вивчали значення даного показника для фізіологічного перебігу імплантації ембріона у 84 пацієнток, які проходили лікування методом ІВФ (in vitro фертилізації). Слід відмітити, що пацієнти з акцентованими підвищеними або зниженими рівнями НК-активності мають несприятливі умови для настання імплантації (9,1 %, 3/13) і, відповідно, (15,1 %, 5/25) порівняно з пацієнтками з умовно нормальними рівням (52,2 % 25/46). Таким чином, умовно нормальний рівень НК-активності є важливим фізіологічним та одночасно зручним діагностично-прогностичним фактором імунологічної сприйнятливості імплантації ембріона.

Ключові слова: CD69-експресія, імплантація ембріона, НК-лімфоцити, НК-активність, НК-стимуляція.

ВСТУП

Фізіологічна неоднозначність і складність системи НК-лімфоцитів пов'язана з її філогенетичним походженням. У людини вони формують “еволюційний місток” між вродженими та власне імунними механізмами захисту та регуляції гомеостазу організму [28]. НК-клітини є базовий механізм одночасно як природної, так і адаптивної ланки імунної системи [34]. Вони є активними учасниками імунорегуляції, розвитку стовбурових клітин і нейроендокринної взаємодії [22].

Недостатня НК-реактивність часто призводить до розвитку хронічних вірусних процесів [26]. Водночас НК-лімфоцити відіграють критичну, проте не до кінця зрозумілу, роль у таких репродуктивних механізмах, як ембріоімплантація, інвазія трофобласта та перебудова спіральних артерій. Відомо, що підвищення кількості НК [3, 33], їх цитотоксичності [23] та дисбаланс між інгібіторними та активаційними рецепторами на НК-

клітинах [7], призводить до різних порушень репродуктивного процесу [35]. З іншого боку, ця ланка вкрай необхідна для репродукції: було показано, що затримка розвитку плоду пов'язана зі зниженням кількості НК-клітин у децидуальній оболонці [11], їх видалення призводить до аномального формування плаценти [2], недорозвинення спіральних артерій [6] та втрати вагітності [13]. Не дивно, що дослідження ролі імунних механізмів у репродукції фокусуються на саме ролі НК-лімфоцитів [5].

НК-клітини виявляють високу різноманітність в експресії поверхневих маркерів і рецепторів, баланс між сигналами від активаційних та інгібіторних рецепторів формує їх загальну активність [8, 21, 32]. Результат такого регулювання є особливо критичним у разі материнського реагування на плід [17], що відбувається під час спонтанних викиднів [23] та неплідді [20, 25]. Визначення функції НК-лімфоцитів є важливим для діагностики та прогнозування великої кількості захворювань [34].

© Б.В. Донської, В.П. Чернишов, В.Ю. Сіренко, Г.В. Стрелко, Д.В. Осипчук

Функціональна активність НК-клітин вимірюється у класичному 4-годинному цитотоксичному тесті проти HLA (від. англ. – human leukocyte antigen) негативної клітинної лінії K562, як клітин-мішеней [29]. Цей метод набув багато модифікацій з використанням радіоактивного Cr^{51} [4] та нерадіоактивних міток (dimethylthiazol-diphenyl bromide, tetrazolium bromide, methylumbelliferyl heptanoate, Alamar blue) [14]; або флюорисцентних міток (europium, D275, rhodamine-123, carboxy-fluorescein diacetate, bis-carboxyethyl-carboxy-fluorescein) [32], а також метод проточної флюориметрії [18, 31].

Треба зауважити, що цитотоксичні методи мають певні обмеження, які пов'язані з використанням як ефекторів виділених моноклеарних клітин периферичної крові. Таким чином частка НК-клітин і, відповідно, істинне співвідношення ефектор/мішень, а також вплив стеричних перешкод і шанси на зустріч з мішенню залишається невизначеним. Досліджена в такому тесті цитотоксичність НК-клітин є одночасно функцією від власне НК-активності, загальної частки цих клітин та збагаченням зразка моноклеарів моноцитами. Раніше було показано, що інкубація лімфоцитів з мішенями призводить до появи на НК-клітинах маркера активації CD69 [12, 19, 24]. Нами також було продемонстровано така реакція НК-клітин на інкубацію з лінією K562 [1]. Виявлена кореляція між НК-цитотоксичністю та рівнем експресії CD69 на НК після сумісної інкубації [9]. Це, в свою чергу, дає змогу використання такого підходу у аналізі активності НК-лімфоцитів [10].

Мета нашої роботи – провести дослідження взаємозв'язку активності НК та імплантації ембріона після його перенесення у матку.

МЕТОДИ

Для дослідження були відібрані пацієнтки з непліддям, що проходили лікування методом ІВФ (in vitro фертилізація). Переважна

їх більшість не проходили попереднього лікування за допомогою різних допоміжних репродуктивних технологій і мали здебільшого трубний фактор непліддя. Пацієнтки були соматично здорові, віком до 32 років та не мали акушерських ускладнень у минулому. В дослідження були взяті лише жінки, яким було перенесено у порожнину матки не менше двох власних ембріонів високої якості. У всіх випадках був використаний довгий протокол стимуляції з контрольованою гіперстимуляцією яєчників рекомбінантним фолікулоstimулювальним гормоном. Пацієнтки були проінформовані про участь у дослідженні та дали письмову згоду, згідно з протоколом, рекомендованим Комітетом з медичної етики ІПАГ НАМН України.

Роботу проводили за схемою подвійного сліпого дослідження. Периферичну кров від 84 пацієнток забирали в день переносу ембріонів.

НК-активність визначали згідно з методом, що був описаний раніше [9]. Гепаринізовану кров (100 мкл) інкубували 16 год із клітинами лінії K562 ($2,5 \cdot 10^6$) та 400 мкл живильного середовища RPMI-1640 у CO_2 -інкубаторі при $37^\circ C$ (“Revco”, Швейцарія). Спонтанну активність вимірювали на зразках, що культивувались за відсутності клітин K562. Клітини мітили FITC-, PE- та PE Cy5 моноклональними антитілами до CD69, CD56 та CD3 (“BD Bioscience”, США). Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації вимірювали на проточному цитометрі FACScan за допомогою програмного забезпечення CellQuest software (“BD Bioscience”, США).

Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після стимуляції ($CD69^{+стим}$, %) дорівнював різниці між середнім значенням експресії CD69 та спонтанної експресії CD69 в контрольних зразках. Загальну кількість НК-лімфоцитів, що здатні до активації, підраховували як добуток рівня експресії CD69 на НК-лімфоцитах після стимуляції ($CD69^{+стим}$, %) на відсотковий вміст НК-лімфоцитів в периферичній крові,

розділений на 100 %. NK-активність для аналізу було розділено на три зони – підвищену, нормальну та знижену, аналогічно до попередньо описаного кореляційного зв'язку із NK-цитотоксичністю [1, 10]. Норма відповідала 90 % CI (від англ. – confidence intervals) інтервалу із 74 здорових пацієнтів із нормальним рівнем активності NK - клітин.

Статистичний аналіз-апроксимація Вульфа, OR (від англ. – odds ratio) та 95 % CI, тест Фішера (непарний непараметричний із двобічним значенням P) був виконаний за допомогою програми In Stat version 3.0 for Windows (“Graph Pad Software” Inc., San Diego, CA, США).

РЕЗУЛЬТАТИ

Двобічність розподілу NK-активності

Вагітність було діагностовано у 33 пацієнок із 84 (39,3 %). У 5 пацієнок згодом вагітність замерла на першому триместрі. Ці пацієнтки не мали відмінностей за віком, кількістю попередніх спроб ІВФ, кількістю ембріонів, що були перенесені та за клінічним типом непліддя. Середні значення всіх досліджуваних показників NK-клітин, спонтанна та стимульована CD69-експресія були подібні у пацієнок з успішною імплантацією та пацієнок, які не завагітніли. Однак якісний розподіл параметрів демонстрував різницю між цими групами. Розподіли відсоткового вмісту NK та рівень CD69^{+стим}-експресії, представлені на рис. 1,а,б. Нормальні значення показника CD69^{+стим} були притаманні пацієнтам з успішною імплантацією – в цій групі значення утворили більш локальний розподіл з незначними “хвостами”, тоді як пацієнти з неуспіхом ІВФ мали здебільшого акцентовані рівні CD69^{+стим}-експресії. Знижені рівні CD69^{+стим} частіше виявлялись у пацієнок з неуспіхом ІВФ (39,2 %, 20/51) порівняно з жінками з успішною імплантацією (15,1 %, 5/33) та були достовірним фактором неуспішного прогнозу (OR 6,9, P=0,0004; таблиця). Проте підвищені зна-

чення відсоткового вмісту CD69^{+стим} також частіше виявлялися у пацієнок з неуспіхом ІВФ порівняно з групою, що завагітніли (20 та 9,1 % відповідно). Ця різниця не сягала повної достовірності (OR=3,96, P=0,061) і середні значення в цих групах були однакові (див. таблицю). Підвищені рівні CD69^{+стим}-експресії ставали вірогідним фактором неуспішного прогнозу за умов видалення з аналізу пацієнок із завмиранням вагітності (OR=5,47, P=0,047; рис. 1,б), оскільки акцентовані рівні CD69^{+стим}-експресії були у трьох із п'яти пацієнок із завмиранням вагітності (дві пацієнтки зі зниженим рівнем, одна – з підвищеним).

Загальна кількість здатних до активації NK-лімфоцитів також мала різний розподіл залежно від подальшого перебігу репродуктивного процесу. Знижені рівні NK-клітин здатних до активації, частіше виявлялися у пацієнок з неуспіхом ІВФ (20,9 %, 15/51) порівняно з жінками з успішною імплантацією (9,1 %, 3/33) та були достовірним фактором несприятливого прогнозу (OR=6,45, P=0,0115; див. рис. 1,в). Підвищені значення цього самого показника, також частіше виявлялися у пацієнок з безрезультатним ІВФ порівняно із групою жінок, що завагітніли (17,6 та 9,1 % відповідно; див. рис. 1,в).

Прогностичне значення нормальної NK-активності

У пацієнок з нормальними рівнями CD69^{+стим}-експресії вагітність після циклу ІВФ, наставала достовірно частіше порівняно із тими, в кого він був поза нормою – зниженим чи підвищеним (рис. 2). Прогностичними факторами для успішної імплантації були нормальні значення відсоткового вмісту NK (OR=2,48, P=0,109) та CD69^{+стим} (OR=4,46, P=0,0032). Успішність імплантації ембріона не була пов'язана із кількістю NK-клітин, проте асоціювалась із нормальним рівнем CD69^{+стим}-експресії. Крім того, нормальний рівень CD69^{+стим} рідше зустрічався у пацієнок із завмиранням вагітності (2 із 5; див. рис. 1,в).

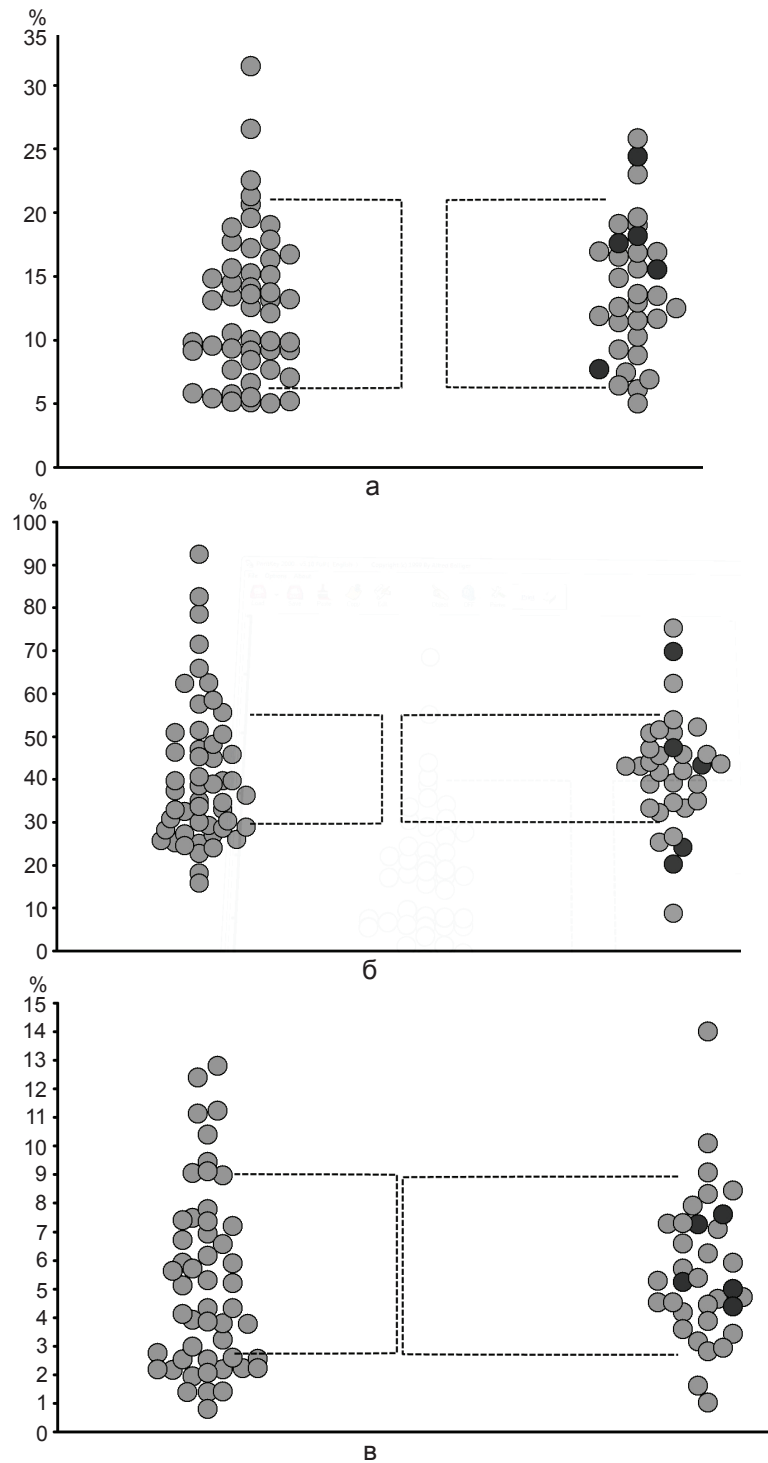


Рис. 1. Розподілення імунних параметрів у пацієнтів згідно з наступним результатом лікування (1 – безрезультативний ІВФ цикл, n=51, та 2 – настання вагітності в циклі *in vitro* фертилізації, n=33): а – кількість NK-лімфоцитів як відсоток CD56+CD3⁺ у крові, б, в – відсотковий вміст та загальна кількість NK-лімфоцитів, що стали позитивними за активаційним маркером CD69 внаслідок інкубації з клітинами пухлинної лінії, відповідно. Кожна точка відображає значення показника у кожного пацієнта, штрихові лінії – умовно нормальні рівні. Чорні точки це – кількість пацієток у яких вагітність, що настала внаслідок лікування, завмерла в першому триместрі

Прогностичне значення показників NK-лімфоцитів для подальшого розвитку вагітності внаслідок циклу in vitro фертилізації(ІВФ) для пацієнтів, розділених за ознакою відхилення від норми відсоткового вмісту NK-лімфоцитів та рівня CD69^{+стим}-експресії

Показники	ІВФ		OR* для безрезультатного циклу ІВФ	95%-й довірчий інтервал	P**
	неуспіх (n=51)	вагітність (n=33)			
Підвищення вмісту NK-лімфоцитів > 20 %	5 (9,8%)	3 (9,1%)	1,08	0,22-4,5	1
Зниження вмісту NK-лімфоцитів <6 %	8 (15,6%)	1 (3,0%)	4,8	0,5-40,6	0,115
Підвищений рівень експресії CD69 після стимуляції >55 %	10 (19,6%)	3 (9,1%)	3,96	0,96-16,33	0,061
Знижений рівень експресії CD69 після стимуляції <30%	20 (39,2%)	5 (15,1%)	6,9	2,27- 21,04	0,0004

* Апроксимація Вульфа, ** тест Фішера двопарний.

Результати засвідчили, що індукція експресії CD69 під впливом стимуляції K562 (CD69^{+стим}, %) на NK-лімфоцитах є фізіологічним маркером активаційного стану популяції. Цей стан відображає здатність NK-популяції підтримувати імплантаційну здатність ендометрія, і є клінічно значущим фактором для прогнозування успішності імплантації та подальшого розвитку вагітності.

ОБГОВОРЕННЯ

Загальний рівень NK-лімфоцитів є показником, що характеризує дану популяцію клітин і його підвищення, пов'язане із репродуктивними порушеннями [3]. Цитотоксична

активність цих клітин є функціональним показником і відображає стан NK-ланки більш фізіологічно та із більшою клінічною значущістю, ніж простий підрахунок загального числа NK-лімфоцитів. Вимірювання цитотоксичної активності не позбавлено впливу різних фізіологічних і методичних факторів. Невизначеність реального співвідношення ефектор/мішень і неоднакова ефективність під час інкубації зразків із різною кількістю NK-лімфоцитів впливають на рівень цитотоксичності та на можливість взаємодії ефекторних клітини із мішенню.

Попередньо ми продемонстрували кореляцію між NK-цитотоксичністю та відсотковим вмістом NK. Однак не завжди зразки

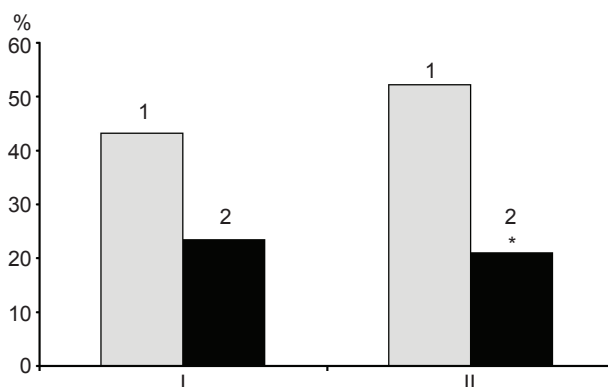


Рис. 2. Рівні настання вагітності у пацієток, розділених за відхиленням від норми: 1 – норма, 2 – відхилення від норми; I – відсотковий вміст NK-лімфоцитів, II – рівень експресії CD69^{+стим}. * P<0,05

із високим вмістом НК-клітин (більше ніж 18 або навіть 20 %) мають підвищену НК-цитотоксичність, тоді як зразки із вмістом НК-клітин менше ніж 10 % іноді мають високу цитотоксичність [9].

Ефективність цитотоксичної реакції, що вимірюється у кількості вбитих клітин-мішеней, зростає із зниженням співвідношення ефектор/мішень.

Лізіс сягає максимальної ефективності, коли кількість клітин-мішеней буде істотно перевищувати таку кількість ефекторних клітин. Природно, що у цій зоні співвідношення ефектор/мішень відсотковий вміст клітин-мішеней, що загинуть, критично низький для точного аналізу. Однак, побудувавши апроксимуючу криву у співвідношенні ефектор/мішень, ми отримуємо у цій зоні ефективність лізису 0,45–0,55, тобто при максимально сприятливих умовах лише кожний другий НК-лімфоцит вбиває клітину-мішень. Іншими словами, лише половина НК-лімфоцитів вступає у цитотоксичну реакцію. Цей аналіз підтверджується здатністю НК до активації після стимуляції надлишком клітин K562. Так, нами продемонстровано, що в середньому 50 % від числа НК-клітин стають CD69⁺ після стимуляції [9, 10].

Вимірювання активації НК-клітин після інкубації K562 є альтернативним методом визначення стану цієї популяції. В попередньому дослідженні [9] ми показали значну кореляцію між цим показником і НК-цитотоксичністю. Однак новий метод є незалежним від загальної кількості НК-клітин, що робить його більш фізіологічно-функціональним [10].

У цьому дослідженні ми оцінювали клінічне значення запропонованого методу в прогнозуванні імплантації. Підтверджено прогностичну роль НК-активності, а також продемонстровано діалектичність ролі НК у репродуктивних процесах – підвищення і зниження НК-активності має негативний вплив на імплантацію. Для нас була очікуваною асоціація підвищеної активації із

негативним прогнозом, оскільки подібне було описано попередньо на клінічних та експериментальних моделях [16, 23].

Ми вперше продемонстрували взаємозв'язок зниженої НК-функції із негативним впливом на імплантацію. До цього було лише продемонстровано, що затримка розвитку плода асоційована із низькою кількістю НК-лімфоцитів у децидуальній оболонці [11].

Можливим методичним поясненням нашої знахідки є покращена роздільна здатність нового методу визначення НК-активності, особливо у нижній зоні діапазону. Це дало змогу точніше визначити стан зниженої НК-активності та виявити клінічну асоціацію. Також важливим фактором у роботі є те, що зразки крові були відібрані безпосередньо перед введенням ембріона і демонструють саме актуальний для імплантаційного вікна функціональний статус популяції НК-лімфоцитів.

Зниження і підвищення НК-активності може погіршувати ефективність імплантації в один фізіологічний спосіб, а саме створення несприятливої НК-функції, що у свою чергу призводить до несприятливого стану рецептивного ендометрія. Раніше було показано, що гормональна стимуляція яєчників спричинює нагромадження НК-клітин у ньому [15]. Було опубліковано, що CD62L-залежна адгезія НК-лімфоцитів зростає під час овуляції у пацієток з наступним розвитком вагітності [30]. У нашому попередньому дослідженні ми продемонстрували, що високий рівень CD62L-експресії характерний саме для НК-клітин, що є неактивними у відповідь на стимуляцію K562 [9]. І в наших дослідженнях [7] і в працях інших авторів зазначається [25], що жінки із численними безрезультатними імплантаціями мають підвищену кількість НК-лімфоцитів та НК-цитотоксичності. Можливим поясненням цього феномену, є те, що обстежувані пацієнтки були без обтяженого анамнезу і більшість з них не мали підвищення числа НК-клітин, та інших несприятливих імунних параметрів.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз середніх значень не висвітлює різниці між групами через причини двобічності розподілу параметрів і є не придатним для таких випадків, тоді як якісний аналіз розподілу параметрів є більш інформативним і коректним.

2. Показано наявність меж сприятливих значень NK-активності та доведено негативне клінічне значення її акцентованих рівнів для імплантації ембріону.

3. Акцентовані стани NK-активності, що визначаються новим методом, можуть надалі допомогти у створенні діагностичного підходу до прогнозування репродуктивних порушень.

Б.В. Донской, В.П. Чернышов, В.Ю. Сиренко, Г.В. Стрелко, Д.В. Осипчук

ВЛИЯНИЕ АКЦЕНТИРОВАННОЙ ГИПО- И ГИПЕРАКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ НА ИМПЛАНТАЦИЮ ЭМБРИОНОВ

В предыдущей работе нами был разработан и описан новый метод определения активности NK-лимфоцитов по экспрессии маркера активации CD69 вследствие стимуляции клетками-мишенями K562 (клеточная линия эритромиелолойкоза человека). Продемонстрировано, что количество активированных клеток отражает популяционно-функциональное состояние NK-лимфоцитов периферической крови. В данном исследовании мы изучали значение этого показателя для физиологического протекания имплантации эмбриона у 84 пациенток, которые проходили лечение методом ИВФ (in vitro фертилизация). Следует отметить, что пациенты с акцентированным повышением или снижением уровней NK-активности, имеют неблагоприятные условия для имплантации (9,1 %, 3/13) и, соответственно, (15,1 %, 5/25) в сравнении с пациентками с условно нормальными уровнями (52,2 %, 25/46). Таким образом условно нормальный уровень NK-активности является важным физиологическим условием и одновременно удобным диагностическим-прогностическим фактором иммунологической готовности к имплантации эмбриона.

Ключевые слова: CD69-экспрессия, имплантация эмбриона, естественные киллерные лимфоциты.

B.V. Dons'koi, V.P. Chernyshov, V.Y. Sirenko, G.V. Strelko, D.V. Osypchuk

EFFECT OF HYPO- AND HYPER-ACCENTUATED NK CELL ACTIVITY ON EMBRYO IMPLANTATION

NK lymphocytes play an important role in implantation and during development in early pregnancy. Recently, we showed that

the proportion of NK that expressed CD69 after incubation with K562 (CD69^{stim}) cells reflected the NK population excitation potential. In the present study, we investigated the significance of NK activation levels in predicting the implantation outcome in 84 patients following IVF (in vitro fertilization). Remarkably, the patients with an accentuated increase or a decrease of the levels of NK activity, have unfavourable conditions for implantation (9,1 %, 3/13 and 15.1%, 5/25, respectively) compared to the patients with the nominally normal levels (52.2%. 25/46). Therefore, a nominally normal level of the NK activity is an important physiological condition and predictive factor for immune readiness to embryo implantation. This study describes an easy, efficient, sensitive and informative method for measuring NK cell activity that is relevant to clinical trials.

Key words: CD69-expression, embryo implantation, natural killer lymphocytes, NK-activity, NK-stimulation.

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology; National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv; Institute of Reproductive Medicine, Kyiv; Institute of Genetic of Reproduction, Kyiv

REFERENCES

1. Dons'koi B.V., Chernyshov V.P., Osypchuk D.V. Immunophenotypic characterization of two functionally different subpopulations of Natural killer cells in human peripheral blood. *Int J of Phys and Path.* 2011;**2**:P.327-334.
2. Barber E.M., Pollard J.W. The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.*-2003;**171**: P.37-46.
3. Beer A.E., Kwak J.Y., Ruiz J.E. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol.*1996;**35**:P.376-382.
4. Brunner K.T., Mael J., Cerottini J.C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.*1968;**14**:181-196.
5. Coulam C.B., Roussev R.G. Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.*2003;**20**:58-62.
6. Croy B.A., Zhang J., Tayade C., Colucci F., Yadi H., Yamada A.T. Analysis of uterine natural killer cells in mice. *Methods Mol Biol.*2010;**612**:465-503.
7. Chernyshov V.P., Sudoma I.O., Dons'koi B.V., Kostyuchyk A.A., Masliy Y.V. Elevated NK cell cytotoxicity, CD158a expression in NK cells and activated T lymphocytes in peripheral blood of women with IVF failures. *Am J Reprod Immunol.*2010;**64**:58-67.
8. Di Santo J.P. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance *Annu Rev Immunol.*2006;**24**:257-286.
9. Dons'koi B.V., Chernyshov V.P., Osypchuk D.V. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69

- up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J Immunol Methods*.2011;**30**:187-195.
10. Dons'koi B.V., Chernyshov V.P., Osypchuk D.V. The immunophenotypic characteristics of two functionally different subpopulations of natural killer cell in human peripheral blood. *Int J of Phys and Path*.2011;**2**:327-334.
 11. Eide I.P., Rolfseng T., Isaksen C.V., Mecsei R., Roald B., Lydersen S., Salvesen K.A., Harsem N.K., Austgulen R. Serious foetal growth restriction is associated with reduced proportions of natural killer cells in decidua basalis. *Virchows Arch*.2006;**448**:269-276.
 12. Giavedoni L.D., Velasquillo M.C., Parodi L.M., Hubbard G.B., Hodara V.L. Cytokine Expression, Natural Killer Cell Activation, and Phenotypic Changes in Lymphoid Cells from Rhesus Macaques during Acute Infection with Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus. *J Virol*.2000;**74**:1648-1657.
 13. Guimond M.J., Luross J.A., Wang B., Terhorst C., Danial S., Croy B.A. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod*.1997;**56**:169-179.
 14. Hussain R.F., Nouri A.M., Oliver R.T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods*.1993;**160**:89-96.
 15. Junovich G, Mayer Y, Azpiroz A, Daher S, Iglesias A, Zylverstein C, Gentile T, Pasqualini S., Markert U.R., Gutiérrez G. Ovarian stimulation affects the levels of regulatory endometrial NK cells and angiogenic cytokine VEGF. *Am J Reprod Immunol*. 2011;**65**:146-153.
 16. Kinsky R., Delage G., Rosin N., Thang M.N., Hoffmann M., Chaouat G. A murine model of NK cell mediated resorption. *Am J Reprod Immunol*.1990;**23**:73-77.
 17. Kusumi M., Ymashita T., Fujii T., Nagamatsu T., Kozuma S., Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56 bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol*.2006;**70**:33-42.
 18. Kolber M.A., Quinones R.R., Gress R.E., Henkart P.A. Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J. Immunol. Methods*.1988;**108**:255-264
 19. Korbel D.S., Newman K.C., Almeida C.R., Davis D.M., Riley E.M. Heterogeneous Human NK Cell Responses to Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology*.2005;**175**:7466-7473.
 20. Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol*.2008;**59**:388-400.
 21. Lanier L.L. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*.2003;**15**:308-14.
 22. Le Bouteiller P., El Costa H., Aguerre-Girr M., Tabiasco J. Immunity of pregnancy: novel concepts. *Bull Acad Natl Med*.2009;**193**:1029-1041.
 23. Matsubayashi H., Hosaka T., Sugiyama Y., Suzuki T., Arai T., Kondo A., Sugi T., Izumi S., Makino T. Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women. *Am J Reprod Immunol*.2001;**46**:318-322.
 24. Ntrivalas E.I., Kwak-Kim J.Y., Gilman-Sachs A., Chung-Bang H., Beaman K.D., Mantouvalos H.P., Beer A.E. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod*. 2001;**16**:855-861.
 25. Ntrivalas E.I., Bowser C.R., Kwak-Kim J., Beaman K.D., Gilman-Sachs A. Expression of killer immunoglobulin-like receptors on peripheral blood NK cell subsets of women with recurrent spontaneous abortions or implantation failures. *Am J Reprod Immunol*.2005;**53**:215-221.
 26. Riley J.K., Yokoyama W.M. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol*.2008;**59**:371-387.
 27. Roussev R.G., Dons'koi B.V., Stamatkin C., Ramu S., Chernyshov V.P., Coulam C.B., Barnea E.R. Preimplantation factor inhibits circulating natural killer cell cytotoxicity and reduces CD69 expression: implications for recurrent pregnancy loss therapy. *Reprod Biomed Online*.2013;**26**:79-87.
 28. Sun J.C, Lanier L.L. Natural killer cells remember. An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*.2009;**39**:2059-2064.
 29. Szekeres J., Pacsa A.S., Pejtsik B. Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *J Immunol Methods*.1981;**40**:151-154.
 30. Van den Heuvel M.J., Horrocks J., Bashar S., Taylor S., Burke S., Hatta K., Lewis J.E., Croy B.A. Menstrual cycle hormones induce changes in functional interactions between lymphocytes and decidual vascular endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*.2005;**90**:2835-2842.
 31. Wang X.M., Terasaki P.I., Rankin G.W. Jr., Chia D., Zhong H.P., Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum Immunol*.1993;**37**:264-270.
 32. Warren H.S. Using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester to monitor human NK cell division: Analysis of the effect of activating and inhibitory class I MHC receptors. *Immunology and Cell Biology*.1999;**77**:544-551.
 33. Winger E.E., Reed J.L., Ashoush S., El-Toukhy T., Ahuja S., Taranissi M. Elevated Preconception CD56(+) 16(+) and/or Th1:Th2 Levels Predict Benefit from IVIG Therapy in Subfertile Women Undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol*.2011;**66**:394-403.
 34. Whiteside T.L., Herberman R.B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol*.1995;**7**:704-710.
 35. Yamada H., Kato E.H., Kobashi G., Ebina Y., Shimada S., Morikawa M., Sakuragi N., Fujimoto S. 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**:132-136.

ДУ “Ін-т педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України”, Київ;

Ін-т репродуктивної медицини НАМН України”, Київ;

Ін-т генетики репродукції НАМН України”, Київ

E-mail: boris_donskoy@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 10.07.2013