

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Význam přirozeně cytotoxických buněk v těhotenství

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Kateřina Komárková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Komárková**
Osobní číslo: **C19239**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Význam přirozeně cytotoxických buněk v těhotenství**
Téma práce anglicky: **Importance Of Naturally Occurring Cytotoxic Cells In Pregnancy**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Vypracujte rešerši z odborné literatury zaměřenou na úlohu nespecifického imunitního mechanismu přirozeně cytotoxických buněk, tzv. NK buněk, v těhotenství. Zpracujte charakteristiku a vyšetření NK buněk a vysvětlete, jak jsou zapojeny do imunologické tolerance plodu. Vyhledejte, jaké existují komplikace a onemocnění.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Význam přirozeně cytotoxických buněk v těhotenství jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Kateřina Komárková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, cenné rady a profesionální vedení při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá významem přirozeně cytotoxických buněk, tzv. NK buněk v těhotenství. Část práce se zabývá nejnovější charakteristikou NK buněk. V práci je shrnuto, jakými imunitními mechanismy matky je plod tolerován a jaká je role NK buněk v těhotenských komplikacích a onemocnění. Závěr práce je věnován vyšetření NK buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, těhotenství, endometrium, trofoblast, HLA molekuly

TITLE

Importance Of Naturally Occurring Cytotoxic Cells In Pregnancy

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with importance of naturally occurring cytotoxic cells, so-called NK cells in pregnancy. Part of the bachelor thesis deals with latest characteristics of NK cells. It summarizes which mothers mechanisms is the fetus tolerated by and the role of NK cells in pregnancy complications and diseases. The end of the bachelor thesis is devoted to the examination of NK cells.

KEYWORDS

NK cells, pregnancy, endometrium, trophoblast, HLA molecules

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM ZKRATEK	10
ÚVOD	12
1. NK buňky	13
1.1. Receptory NK buněk	13
1.1.1. Aktivační receptory a cytokiny	13
1.1.2. Inhibiční receptory	14
1.2. Cytotoxický mechanismus NK buněk	15
1.2.1. Cytotoxicita zprostředkovaná enzymy	15
1.2.2. Cytotoxicita závislá na protilátkách	16
1.2.3. Cytotoxicita zprostředkována receptory smrti	17
1.3. Fenotypy NK buněk	17
1.4. Endometriální NK buňky	18
1.5. Deciduální NK buňky	19
2. Placenta	19
2.1. Anatomie a vývoj placenty	20
2.2. Fetomaternální rozhraní	20
3. Vztah NK buněk k trofoblastu	20
4. Role deciduálních NK buněk v implantaci a placentaci	22
4.1. Invaze trofoblastu	22
4.2. Remodelace spirální tepny	23
5. Placentární exozómy	24
6. Role NK buněk v eliminaci senescentních deciduálních buněk	25
7. Paměť deciduálních NK buněk	26
8. Obranná funkce faktorů produkovaných NK buňkami během nitroděložní infekce	27

8.1. Lidský cytomegalovirus	27
9. Komplikace v těhotenství a onemocnění	28
9.1. Preeklampsie	28
9.1.1. Role angiogenních faktorů produkovaných NK buňkami.....	29
9.1.2. Role receptorů přirozené cytotoxicity	30
9.1.3. Role MHC molekul	30
9.2. Endometrióza	31
9.3. Opakovaná ztráta těhotenství	32
9.4. Opakované selhání implantace.....	33
9.5. Role NCR receptorů v opakovaných ztrátách těhotenství a v opakovaném selhání implantace	34
9.6. Emulzní lipidová terapie	34
10. Vyšetření NK buněk.....	34
10.1. Průtoková cytometrie	35
10.2. Imunohistochemie	36
10.2.1. Polyklonální a monoklonální protilátky	38
10.3. Stanovení uterinních NK buněk	38
10.4. Degranulační test.....	39
10.5. Stanovení funkční aktivity	39
10.5.1. Cytotoxický test.....	39
10.5.2. Aktivační test.....	40
ZÁVĚR.....	41
ZDROJE LITERATURY	42

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Cytotoxicita závislá na protilátkách	17
Obrázek 2: Receptory NK buněk	18
Obrázek 3: Receptory na dNK buňkách, které se vážou na molekuly trofoblastu HLA I. třídy	21
Obrázek 4: Schéma průtokového cytometru	36

SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, z angl. Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ANG	angiopoetin
ANXA1	annexin A1
Bak, Bax	protein podobný Bcl-2
BID	proapoptotický protein s BH3 doménou
BH3	protein rodiny Bcl-2
B4GALNT1	beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferáza 1
CD	diferenční skupina, z angl. Cluster of Differentiation
CYP26A1	cytochrom P450 26A1
CXCL10	interferon gama indukovaný protein 10
CX3CL1	fraktalkin
DIABLO	protein vázající IAP s nízkým izoelektrickým bodem, z angl. Direct IAP Binding Protein with Low pI
DISC	signální komplex indukující smrt, z angl. Death-Inducing Signaling Complex
DNA-PKcs	DNA-dependentní protein kináza
dNK	deciduální NK buňky
eNK	endometriální NK buňky
EVT	extravilózní trofoblast
GM-CSF	granulocyty a makrofágy stimulující faktor
GTPáza	guanosintrifosfatáza
HCMV	lidský cytomegalovirus
HIF-1 α	hypoxii indukující faktor 1
IL	interleukin
INF	interferon
ITGB2	integrin- β 2
IP-10	interferonem indukovaný protein 10
ITAM	aktivační motiv imunoreceptorů na bázi tyrosinu
ITIM	inhibiční motiv imunoreceptorů na bázi tyrosinu
KAR	aktivační receptory, z angl. Killer Activation Receptors
KIR	inhibiční receptory, z angl. Killer Inhibitory Receptors
LFA-1	antigen 1 asociovaný s funkcí lymfocytů

LILRB1	(ILT-2) inhibiční imunoglobulinu podobný receptor
Mac-1	makrofágový antigen 1
MIC-A	gen A příbuzný s MHC 1. třídy
MIC-B	gen B příbuzný s MHC 1. třídy
MIP-1 α	makrofágový zánětlivý protein 1 alfa
MIP-3 α	makrofágový zánětlivý protein 3 alfa
miRNA	mikroribonukleová kyselina
MHC	hlavní histokompatibilní komplex, z angl. Major Histocompatibility Complex
MMP	metaloproteináza
MUNC	proteiny fúzního proteinového komplexu synaptických vezikul
NCR	receptory přirozené cytotoxicity, z angl. Natural Cytotoxicity Receptors
NF- κ B	nukleární faktor κ B, transkripční faktor
PE	preeklampsie
PIGF	placentární růstový faktor
Rab	rodina proteinů, zařazena do nadrodiny Ras monomerních G proteinů
RIF	opakované selhání implantace, z angl. Repeated implantation failure
RPL	opakovaná ztráta těhotenství, z angl. Recurrent pregnancy loss
S1PR1	sřingosin-1-fosfátový receptor
SMAC	supramolekulární aktivační shluk
SNARE	skupina proteinů, podílející se na transportu vezikul uvnitř buňky
STAT4	aktivátor transkripce 4, z angl. Signal Transducer and Activator of Transcription 4
TGF- β	transformující růstový faktor β
TIE	tyrosinkinázový receptor
TIGIT	imunoreceptor s imunoglobulinovou a ITIM doménou
TORCH	zkratka pro specifické infekce, které mohou nepříznivě ovlivnit vývoj plodu a průběh těhotenství a je složena z názvů patogenů, které tyto komplikace způsobují
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRAIL	ligand indukující apoptózu spřízněný s TNF
ULBP1	UL16 vazebný protein 1
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

ÚVOD

Plod je považován za aloštěp a navzdory zákonitostem transplantační imunologie přežije těhotenství. Cizí antigeny plodu se dostanou do kontaktu s mateřským imunitním systémem, který ovšem nevyvolá imunitní reakci ani následnou rejekci. Plod je tedy matkou tolerován a zároveň je zachována schopnost obrany proti infekčním organismům. U lidské hemochoriální placenty bezprostředně po implantaci blastocysty, kdy je endometrium infiltrováno fetálními trofoblasty, je zvýšen počet imunitních buněk, což je důležité pro další procesy v těhotenství a ochranu integrity dělohy a matky.

Během prvního trimestru tvoří 50–70 % všech lymfocytů decidua přirozeně cytotoxické buňky, tzv. NK buňky. Jsou to velké lymfocytární buňky, které se řadí do nespecifické imunity. Jejich hlavními funkcemi jsou cytotoxická likvidace buněk napadených virem nebo nádorových buněk a sekrece cytokinů. Bylo prokázáno, že NK buňky hrají významnou roli v raném těhotenství, hlavně v implantaci a placentaci. Dále se podílejí na eliminaci senescentních, tj. stárnoucích, deciduálních buněk a na obraně plodu během nitroděložní infekce. Aktivace těchto velkých granulárních lymfocytů musí být přísně regulována, aby nedošlo ke zhroucení tolerance mezi matkou a plodem.

Cílem této rešeršní práce je charakterizovat NK buňky, shrnout jejich roli ve fyziologickém těhotenství a při těhotenských komplikacích a onemocněních, jako jsou preeklampsie, endometrióza, opakovaná ztráta těhotenství a opakované selhání implantace. Závěr práce je věnován laboratornímu vyšetření NK buněk.

1. NK buňky

NK buňky neboli přirozeně zabíječské buňky (z anglického natural killers) jsou cytotoxické buňky nespecifické imunity. Vznikají v kostní dřeni z lymfoidního progenitoru a po vyzrání putují do periferní krve. Tvoří třetí hlavní subpopulaci lymfocytů s podílem 5–20 %. Osidlují nelymfoidní i lymfoidní tkáň včetně lymfatických uzlin, mandlí, brzlíku, sleziny a dělohy.

1.1. Receptory NK buněk

Na povrchu NK buněk se nacházejí aktivační (pozitivní) a inhibiční (negativní) receptory.

1.1.1. Aktivační receptory a cytokiny

Aktivační receptory KAR (killer activation receptors) patří mezi adhezivní molekuly [1]. Po navázání ligandu na aktivační receptory dojde k aktivaci cytotoxických mechanismů NK buněk. Většina těchto receptorů interaguje s proteiny, které na vnitřní straně cytoplazmatické membrány obsahují molekuly ITAM, tj. aktivační motiv imunoreceptorů na bázi tyrosinu. Patří mezi ně lektinový receptor NKR-P1 (CD161), který má afinitu k sacharidovým molekulám, CD16 a NCR receptory jako jsou NKp30 (CD337), NKp44 (CD336) a NKp46 (CD335). Ligandy aktivačních receptorů mohou být produkty virem infikovaných buněk a produkty nádorových buněk [2].

1.1.1.1. CD2

Rozpoznávacím znakem NK buněk je CD2 receptor, který má důležitou roli v konjugaci NK buněk k terčové buňce. Slouží jako kostimulační molekula s funkcí generace signálů ke zvýšení cytotoxicity NK buněk, konkrétně rekrutuje CD16 do imunologické synapse při spontánní cytotoxicitě [3, 4].

1.1.1.2. CD56

CD56 (NCAM-1) je imunoglobulinový fenotypový marker NK buněk. Tento receptor má na NK buňky výrazný imunostimulační účinek, včetně spuštění produkce cytokinů [5]. Přestože je přítomný na každé NK buňce, jeho role v cytotoxickém mechanismu není definována [6].

1.1.1.3. CD16

CD16 (také známý jako FcγRIII) je imunoglobulinový Fc receptor, který obsahuje ITAM. Je to jeden z nejdůležitějších receptorů přímé cytotoxicity, ale i buněčné cytotoxicity

závislé na protilátkách (ADCC). Jeho další funkce jsou produkce cytokinů a postaktivační apoptická smrt NK buněk. Stejně jako NKp46 zprostředkovává lýzu virem infikovaných buněk a nádorových buněk [7].

1.1.1.4. NCR

NKp30, NKp44 a NKp46 jsou imunoglobulinové transmembránové receptory typu I. Jsou to první receptory, které aktivují buňky. Indukují cytotoxicitu a jsou důležité pro imunitní dozor nad nádory. NKp46 je specifický pro NK buňky, kdežto druhé dva receptory se nacházejí i na podskupinách T lymfocytů [8]. NKp46 a NKp30 jsou přítomny v aktivovaných i neaktivovaných buňkách, zatímco NKp44 je exprimován pouze v NK buňkách aktivovaných cytokiny [9].

1.1.1.5. Aktivační cytokiny

NK buňky mohou být dále aktivovány cytokiny, které při zánětu produkují buňky imunitního systému. Mezi tyto cytokiny patří IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-12, IL-15 a další. Interferony α a β jsou secernovány aktivovanými myeloidními buňkami, stimulují expanzi NK buněk a zároveň zesilují efektorové funkce po stimulaci receptorem IFN- α [10].

IL-2 je imunostimulační cytokin, který pochází z T lymfocytů a může zvýšit reakce NK buněk na infekci. Dosahuje svých funkcí převážně vazbou s heterotrimerním receptorem, který je složený z IL-2R α (CD25), IL-R β (CD122) a CD32 [11].

IL-12 byl poprvé pojmenován jako faktor stimulující NK buňky. Signalizace IL-12 je zprostředkována především fosforylací STAT4, která je nezbytná pro expresi IFN- γ a perforinu. Dále může IL-12 pracovat ve shodě s IL-15 a IL-18 a tak vytvářet paměťové NK buňky [10, 11].

1.1.2. Inhibiční receptory

Inhibiční receptory jsou buď imunoglobulinové nebo C-lektinové a na vnitřní straně cytoplazmatické membrány obsahují doménu ITIM. Imunoglobulinové inhibiční receptory KIR nalezneme pouze na lidských NK buňkách v podobě imunoglobulinů nebo imunoglobulinům podobných molekul. Jejich mechanismus inhibice funguje na principu asociace s cytoplazmatickými fosfatázami, které narušují signalizační dráhy zahájené stimulačními receptory spojenými s proteinkinázami [1]. Patří mezi ně KIR2DL, KIR3DL a imunoreceptor s imunoglobulinovou a ITIM doménou (TIGIT). C-lektinové receptory lidských NK buněk jsou heterodimery CD94/NKG2.

Ligandy inhibičních receptorů jsou komplexy MHC 1. třídy. Pokud má buňka na povrchu náležitě množství těchto molekul, převáží inhibiční signály a NK buňka zůstane

neaktivní. Má-li terčová buňka na povrchu nedostatečný počet receptorů MHC 1. třídy, nebo jsou tyto molekuly pozměněny, převáží stimulační signály a terčová buňka je NK buňkou cytotoxicky usmrcena [1].

1.1.2.1. CD94/NKG2

CD94/NKG2 je heterodimer spojený sulfidickými můstky. NKG2A obsahují inhibitory domén ITIM, které aktivují SHP-1 a SHP-fosfatázy, což vede k inhibici cytotoxicity. Tento komplex rozpoznává molekuly třídy HLA-E. Interakce CD94/NKG2 a HLA-E je centrálním mechanismem, kterým NK buňky nepřímo monitorují expresi jiných molekul MHC 1. třídy v cílové buňce. HLA-E prezentuje vedoucí řetězce z jiných molekul MHC 1. třídy a je tedy závislá na jejich expresi. Exprese HLA-E může na buněčném povrchu představovat náhradní marker pro funkční zpracování antigenu nezbytné pro expresi jiných molekul MHC 1. třídy [12, 13].

1.1.2.2. KIR2DL a KIR3DL

KIR rozpoznávají epitopy sdílené podskupinami alotypů HLA-A, HLA-B a HLA-C. KIR2DL1 rozpoznávají alely HLA-C s lysinovým zbytkem na 80. pozici aminokyselinové sekvence a KIR2DL2 a KIR2DL3 rozpoznávají alely HLA-C s asparaginem na pozici 80 aminokyselinové sekvence. Ligandy KIR3DL1 jsou HLA-B alotypy obsahující epitop Bw4 a ligandy KIR3DL2 jsou molekuly HLA-A3 a HLA-A11. KIR2DL4 se nachází v endozomech, ze kterých signalizují prozánětlivou a proangiogenní odpověď. Jediným známým ligadem tohoto receptoru jsou molekuly HLA-G [14, 15, 16].

1.1.2.3. TIGIT

TIGIT je inhibiční receptor, který zprostředkovává inhibiční signály nábořem SHIP fosfatáz do ITIM, rozpoznává tedy vlastní buňky nezávisle na MHC. Jeho vysoce afinitní ligand je imunoglobulin CD155, který můžeme najít na epiteliálních nebo endoteliálních buňkách tkání [17].

1.2. Cytotoxický mechanismus NK buněk

1.2.1. Cytotoxicita zprostředkovaná enzymy

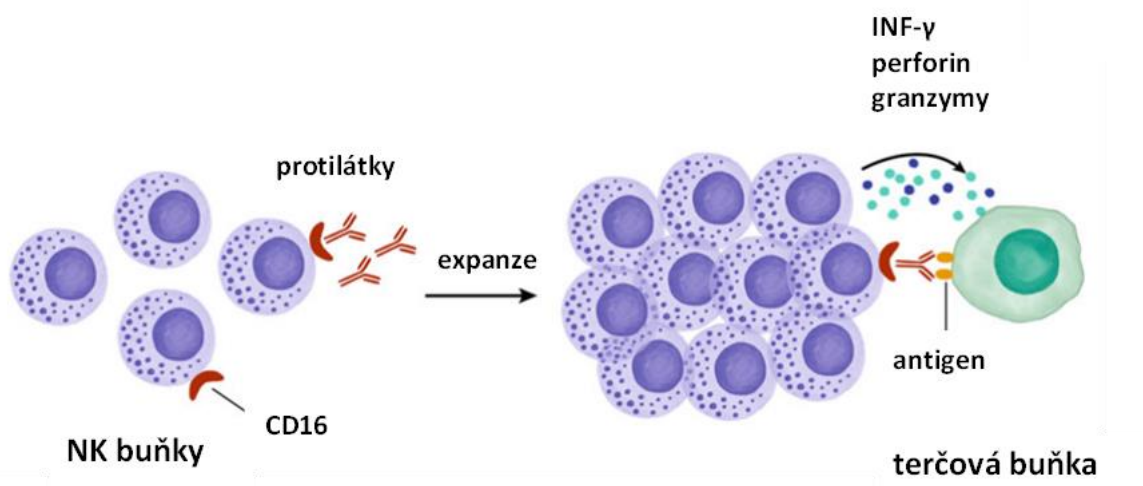
Jeden z mechanismů cytotoxicity NK buněk je cytotoxicita zprostředkovaná enzymy perforinem a granzymy. Granzymy jsou serinové proteázy. Rodinu lidských granzymů tvoří 5 členů – granzym A, B, H, K a M. Cytolytická granula obsahují granzym B, který přednostně štěpí za kyselinou asparagovou. Granzym B štěpí kaspázy 3 a 7 terčové buňky, tím aktivuje buněčnou smrt štěpením různých buněčných složek. Dále může granzym B indukovat

buněčnou smrt štěpením BH3 proteinu Bid, jehož výsledná zkrácená forma tBid se přemístí do mitochondrií, interaguje s proapoptickými proteiny Bax a Bak, což naruší integritu membrány mitochondrie. Následně dojde k uvolnění apoptických faktorů jako jsou SMAC/DIABLO, cytochrom, faktor indukující apoptózu a další, a tím je zahájena apoptóza terčové buňky [18, 19].

Cytotoxické usmrcování buněk pomocí enzymů je komplexní kontrolovaný proces zahrnující několik kroků, které vedou k uvolnění cytolytických granulí a následnému usmrcení terčové buňky. Nejprve dochází k adhezi NK buňky na terčovou buňku, která má snížené množství inhibičních receptorů nebo je postrádá úplně. Takto se vytvoří imunologická synapse. Poté se adhezní molekuly jako je LFA-1 a Mac-1 segregují do vnější oblasti synapse pSMAC, kde zprostředkovávají tvorbu konjugátu mezi buňkami [20]. Lytická granula jsou pomocí motorických dyneinových proteinů transportována podél mikrotubulů ve směru do centra organizujícího mikrotubuly a následně jsou polarizována směrem k synapsi. Granula jsou na synapsi spojena s plazmatickou membránou pomocí malých GTPáz ze skupiny Rab, MUNC proteinů a SNARE komplexu, což má za následek uvolnění obsahu granul do synaptické štěrbině [18]. Perforin se v extracelulárním prostoru s neutrálním pH naváže na membránu terčové buňky a za přítomnosti vápenatých iontů agreguje. Vytváří oligomery a v membráně terčové buňky vznikají póry s průsvitem 13–20 nm, kterými granzym prochází do cytosolu buňky. Druhý mechanismus vstupu granzymu do terčové buňky je příjem pomocí endocytózy, přičemž z endocytotického váčku je granzym uvolňován pomocí perforinu. Aktivita granzymů v terčové buňce navodí apoptózu prostřednictvím reaktivních forem kyslíku, poškození mitochondrií a fragmentaci DNA. Tyto účinky lze navodit cestou závislou nebo nezávislou na kaspázách [20, 18].

1.2.2. Cytotoxicita závislá na protilátkách

Jiný mechanismus buněčné cytotoxicity NK buněk je závislý na protilátkách. Většina aktivačních receptorů NK buněk je založena na motivu tyrosinu a jejich signalizace začíná fosforylací tyrosinových zbytků. Fc receptor CD16 (FcγRIIIa) se váže na IgG protilátku opsonizované terčové buňky, čímž se spustí kaskáda reakcí, která vede k uvolnění cytolytických granulí a nastane apoptóza (obrázek 1) [21].



Obrázek 1: Cytotoxicita závislá na protilátkách (upraveno) [22]

1.2.3. Cytotoxicita zprostředkována receptory smrti

NK buňky mohou na svém povrchu prezentovat CD95L nebo ligand indukující apoptózu spřízněný s TNF (TRAIL). TRAIL je exprimovaný NK buňkami po stimulaci IL-2, IL-15 nebo interferony. Oba tyto receptory se podílejí na supresi nádorového růstu [19].

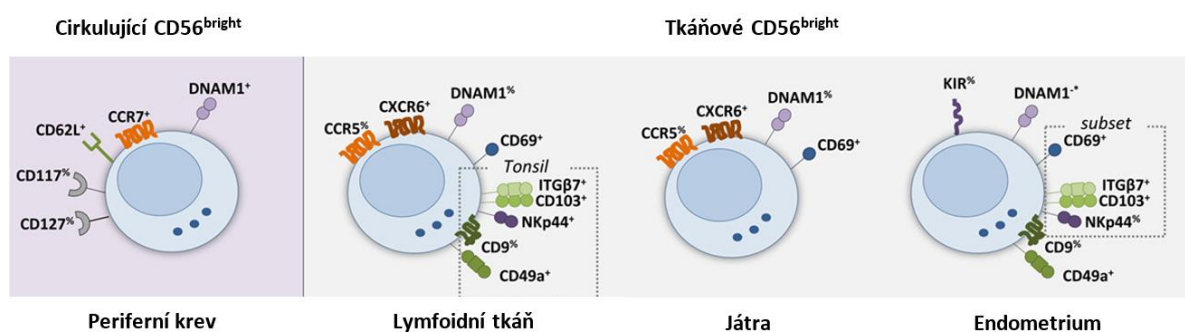
Nejprve je vytvořen tzv. signální komplex indukující smrt (DISC), složený z aktivovaných receptorů smrti, proteinů domény smrti asociovaných s FAS a prokaspáz 8 a 10, které aktivují kaspázy 8 a 10, což vede k apoptóze. Usmrcení terčových buněk zprostředkované receptory může trvat 1-2 hodiny. Je tedy výrazně pomalejší, než usmrcování buněk zprostředkované lytickými granuly, které můžeme pozorovat během několika minut po kontaktu s terčovou buňkou [23].

1.3. Fenotypy NK buněk

V lidském těle se vyskytují dva fenotypy NK buněk $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ a $CD56^{\text{dim}}CD16^+$. Předpokládá se, že tyto populace mají odlišné funkce. Populace $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ má zvýšenou schopnost vylučovat prozánětlivé cytokiny, exprimují vysoké hladiny CD56, CD94 a NKG2A, a naopak neexprimují KIR. $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ usmrcují buňky infikované viry a nádorové buňky a mají vyšší cytotoxickou kapacitu [24, 25].

Většina znalostí o fenotypu $CD56^{\text{bright}}$ a jeho funkcí jsou odvozeny z periferní krve, tedy z cirkulujících NK buněk. NK buňky infiltrující orgány se označují za reziduální. Najdeme je v lymfoidních orgánech, játrech a děloze, kde byly popsány fenotypově odlišné podskupiny. Tkáňově reziduální NK buňky mají povrchové markery, které znemožňují buňce opustit tkáň.

V reziduálních CD56^{bright} byl objeven povrchový marker, který potlačuje povrchovou expresi sfingosin-1-fosfátového receptoru (S1PR1). Jiný potenciální mechanismus pro tkáňovou rezidenci je zapojení chemokinových receptorů. Jako příklad lze uvést receptory CXCR6 a CCR5, které jsou exprimovány na CD56^{bright} tkáňových NK buňkách lymfoidních tkání a jater, nicméně periferní krvi nejsou. Další mechanismus je řízen expresí nebo absencí adhezních molekul. Na povrchu děložních NK buněk je exprimován integrin CD49a⁺ a v krevních NK buňkách opět chybí. Naopak CD56^{bright} postrádají CD62L⁺ selektin s CCR7⁺ (obrázek 2) [26].



Obrázek 2: Receptory NK buněk (upraveno) [26]

1.4. Endometriální NK buňky

Endometriální NK buňky (eNK) tvoří až 30 % lymfocytů v endometriu. Jejich počet výrazně stoupá od proliferativní do sekreční fáze menstruačního cyklu. Jako hlavní regulátor imunitní odpovědi v děloze působí podskupina NK buněk CD56^{bright}CD16⁻. Nachází se v tkáni endometria před otěhotněním a v tkáni decidua během těhotenství [25].

Děložní NK buňky rozlišíme od cirkulujících a dalších tkáňových NK buněk pomocí povrchového markeru CD49a⁺, který jako jedině obsahují, a naopak eNK neobsahují marker CCR5, který najdeme na povrchu NK buněk lymfoidních tkáních i jater. Dále eNK na povrchu exprimují heterodimer CD103⁺/ITGB7⁺, NKp44 a CD69. Receptory KIR a CD9, slabá produkce IFN- γ a cytotoxicita jsou typické znaky podskupiny NK buněk CD56^{bright} [26].

Cytotoxická aktivita čerstvě izolovaných eNK je nízká (okolo 20 %) a tyto buňky neprodukují cytokiny, jako je IFN- γ , interferonem indukovaný protein 10 (IP-10), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a placentární růstový faktor (PIGF) bez přídavné stimulace cytokinů. Tento nedostatek byl pozorován u eNK v proliferativní i sekreční fázi. Po aktivaci cytokinem IL-15 je sekrece IFN- γ a IP-10 up-regulována, tedy zvyšována, stejně jako cytotoxicita NK buněk. Do té doby jsou NK buňky v endometriu netečné [25].

1.5. Deciduální NK buňky

Deciduum je děložní sliznice v sekreční fázi menstruačního cyklu a v těhotenství, a po porodu je vyloučena s placentou. Nachází se mezi myometriem a fetálními membránami. Jakožto první buňky v kontaktu s antigeny plodu zajišťují deciduální buňky imunitní toleranci. Dále zajišťují invazi trofoblastu, který se diferencuje na vilózní a extravilózní trofoblastové buňky a během fáze implantace ukotvuje blastocystu k deciduu. Deciduum také přispívá k remodelaci spirálních arteriol po implantaci [27].

Deciduální NK buňky (dNK) lze najít v tkáni decidua. Tyto buňky v časně fázi těhotenství tvoří 50–70 % všech lymfocytů na fetomaternálním rozhraní. Převažuje fenotyp $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ a na jejich povrchu jsou exprimovány tkáňové markery CD9, CD69, CD49a⁺, adhezivní molekuly jako je CD62L a integrin- α 1 [28]. Dále eNK vysoce exprimují KIR a NKG2A, které se mohou vázat na HLA 1. třídy exprimované extravilózním trofoblastem (EVT), což hraje důležitou roli v regulaci biologického chování trofoblastů [29]. Cytotoxicita dNK je opět velmi nízká, i přestože obsahují velké množství perforinu a granzymu [28].

Tyto buňky lze rozdělit do tří podskupin, dNK1, dNK2, dNK3. První podskupina dNK1 exprimuje B4GALNT1, CYP26A1 proteiny a CD39 (regulační ekto-ATPáza), jehož funkce je navodit protizánětlivé prostředí. Dále u nich nalezneme inhibiční receptory KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, aktivační receptory KIR2DS1 a KIR2DS4, které se mohou navázat na HLA-C v trofoblastech. Expres LILRB1 (receptor pro dimer HLA-G) a zvýšený metabolismus značí, že dNK1 interaguje s EVT. Podskupinu dNK2 definuje exprese proteinů ANXA1 a ITGB2. Třetí podskupina dNK3 exprimuje CD160, CD161, TIGIT, CD103 a ITGB2 a naopak na ní nenalezneme lymfocytární markery CD127 [30].

Původ dNK není zcela jasně stanoven, nabízejí se tři možnosti. První je nábor $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ z periferní krve a jejich následná diferenciace. Trofoblasty a deciduální buňky vylučují velké množství chemokinů IP-10 a MCP-1, což podporuje tuto teorii. Dle další teorie dNK dozrávají z eNK stimulací těhotenskými hormony jako je progesteron a další nebo IL-15. Poslední teorie říká, že dNK se diferencují zráním děložních hematopoetických prekurzorů. Tyto tři mechanismy mohou působit zároveň [29].

2. Placenta

Placenta je dočasný orgán, který umožňuje vývoj plodu. Zajišťuje funkce, jako jsou výměna látek mezi krevním oběhem matky a plodu, metabolismus a syntéza sacharidů, cholesterolu, mastných kyselin, produkce hormonů potřebných pro těhotenství, rezervoár krve a také imunitní funkci.

2.1. Anatomie a vývoj placenty

Placenta se skládá ze dvou částí, mateřské a plodové. Mateřská část placenty je složena z *decidua basalis*, která se vytváří z endometria a je tvořena bazální ploténkou a bazálními septy. Plodovou část placenty tvoří mezenchymální rosolovité vazivo, které má nervové a cévní zásobení. V pupeční šňůře se označuje jako Wartonův rosol. Plodovou část lze rozdělit na choriovou ploténku a choriové klky tvořené trofoblastem.

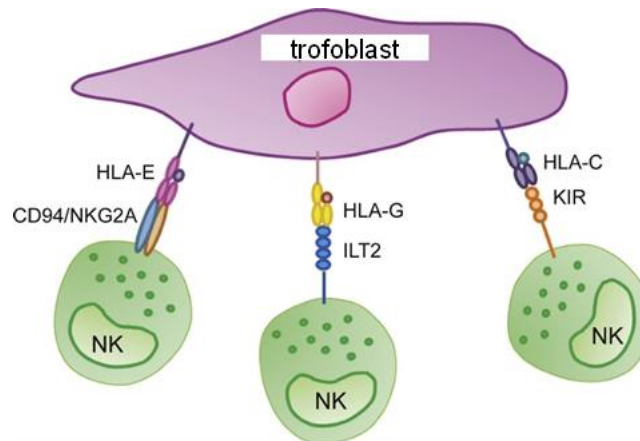
Placenta je obvykle zcela vytvářena ve třetím týdnu těhotenství. U lidí a myši je hemochoriální a proniká do mateřské děložní tkáně. Blastocysta se implantuje do decidua a je vytvářen placentární trofoblast [31]. Trofoblast je vrstva buněk ve stádiu blastocysty, jehož funkcí je nidace a výživa zárodku v rané fázi těhotenství, placentární bariéra a produkuje hormony, jako jsou choriogonadotropin, progesteron a další. Dělí se na cytotrofoblast a syncytiotrofoblast. Buňky cytotrofoblastu intenzivně proliferují, vycestují z embrya a formují syncytiotrofoblast, který je částečně zanořen do děložní sliznice a formuje zde vily. V endometriu začne rozrušovat cévy a dostane se tak do kontaktu s krví matky. Tímto mechanismem je plod vyživován do té doby, než dojde k vytvoření placenty. Postupem času začne cytotrofoblast a mezoderm prorůstat buňkami syncytiotrofoblastu a začínají se tvořit choriové klky, které se směrem k *decidua basalis* zvětšují a vytváří placentu [32].

2.2. Fetomaternální rozhraní

Fetomaternální rozhraní tvoří dvě části – deciduum a fetální placenta. Funkce tohoto rozhraní je příprava na semialogenní plod, zajištění imunitních interakcí mezi matkou a plodem a vývoj embrya [27]. Z hlediska buněk je tvořeno hlavně deciduálními stromálními buňkami, trofoblastovými buňkami, imunitními buňkami, jako jsou dNK, makrofágy, dendritické buňky, T lymfocyty, B lymfocyty, NKT buňky a rozpustné faktory odvozené z těchto buněk [33].

3. Vztah NK buněk k trofoblastu

EVT exprimuje HLA komplexy C, E a G, které se navazují na receptory NK buněk (obrázek 3). Bylo prokázáno, že vazba KIR2D NK buňky s HLA-C trofoblastu moduluje odpovědi eNK a může změnit migraci trofoblastu a remodelaci spirální arterie. Remodelace spirální tepny zahrnuje 2 různé kroky. V první fázi céva ztratí elastickou strukturu a vytvoří se zlomy v endoteliální vrstvě. Tento proces probíhá v přítomnosti NK buněk a makrofágů. V druhé fázi jsou fetální trofoblasty přitahovány k tepnám, a tak přechodně nahrazují endoteliální výstelku decidua a částečně i myometria [29].



Obrázek 3: Receptory na dNK buňkách, které se vážou na molekuly trofoblastu HLA I. třídy (upraveno) [34]

HLA-C jsou molekuly MHC 1. třídy a po navázání na KIR receptory tak inhibují cytotoxickou aktivitu NK buněk, proto je rozpoznávání fetálního HLA-C2 receptory KIR důležité pro normální vývoj placenty. Naopak rozpoznávání HLA-C2 receptorem genotypu KIR AA, čili bez aktivačních receptorů, může zvýšit riziko preeklampsie (PE). HLA-E a HLA-G se také podílejí na regulaci imunitní odpovědi, zejména vazbou na inhibiční KIR [29, 31].

HLA-E jsou ligandy pro inhibiční receptory CD94/NKG2. Protože jsou tyto molekuly exprimovány jak na mateřských buňkách, tak na buňkách trofoblastu, může interakce mezi CD94/NKG2A a HLA-E zabránit lýze trofoblastu a dalších mateřských buněk v okolí. Dále tato vazba může vést k uvolňování cytokinů, jako je GM-CSF a IL-10 děložními NK buňkami, a tím k ochraně trofoblastu před cytotoxicitou NK buněk [34, 35].

HLA-G jsou ligandy pro receptory KIR2DL4 a imunoglobulinu podobný transkript 2 (ILT-2, LILRB1) NK buněk. Rozpustná i povrchová forma HLA-G jsou po interakci s KIR2DL4 endocytovány do vezikul NK buněk, kde aktivují sekreci proangiogenních a prozánětlivých cytokinů a chemokinů, jako jsou IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-23, MIP-1- α a MIP-3- α . K aktivaci dochází pomocí DNA-dependentní proteinkinázy DNA-PKcs, která signalizuje poškození DNA a spouští fosforylaci proteinkinázy B na pozici Ser473. Fosforylovaná proteinkináza B aktivuje NF- κ B dráhu, a tím vede k produkci cytokinů. HLA-G dále chrání buňky cytotofoblastu před lýzou NK buňkami, podílí se tedy na vytváření fetomaternální tolerance. Nicméně nadměrná exprese HLA-G zvyšuje povrchovou expresi HLA-E [36].

4. Role deciduálních NK buněk v implantaci a placentaci

Implantace je proces uhnízdění oplozeného vajíčka ve stěnách endometria. Vajíčko se nachází ve stadiu blastocysty, přijde o vrstvu *zona pellucida* a dostane se do kontaktu s trofoblastem. Celý proces je ukončen přibližně 12. den po ovulaci kompletním zanořením blastocysty, uzavřením implantačního otvoru fibrinovou zátkou, kterou přeroste vrstva epitelu.

Během implantace nastává počáteční prozánětlivé období, které napomáhá invazi trofoblastu do děložního endometria a NK buňky putují do dělohy. Tyto buňky podporují imunotolerantní prostředí sekrecí IL-10, TGF- β a antagonisty receptoru IL-1, které potlačují proliferaci prozánětlivých T_H lymfocytů, včetně buněk T_H1 a T_H17. Navíc dochází k reciproční výměně intaktních fetálních a mateřských buněk, čímž vzniká mateřský a fetální mikrochimérismus [37].

Po implantaci a decidualizaci je zahájen proces placentace. Jejimi nejdůležitějšími kroky jsou invaze trofoblastů a remodelace spirální tepny. Role dNK v tvorbě placenty je závislá na gestačním věku. V osmém až desátém týdnu gestace dNK produkují hlavně angiogenní růstové faktory, které jsou spojeny s remodelací spirální tepny. Mezi dvanáctým a čtrnáctým týdnem těhotenství dNK produkují hlavně cytokiny a chemokiny, které ovlivňují invazi EVT [38].

4.1. Invaze trofoblastu

Invaze trofoblastu je regulována autokrinními a parakrinními faktory, včetně cytokinů, hormonů a kyslíku. Tyto látky regulují aktivitu matricové metaloproteinázy (MMP) a systém urokinázového aktivátoru plazminogenu, které hrají zásadní roli při invazi trofoblastů. Konkrétně matrixová metaloproteináza 2 (MMP-2) a matrixová metaloproteináza 9 (MMP-9) hrají klíčovou roli při degradaci bazální membrány. V časném těhotenství dNK po interakci s HLA molekulami produkují cytokiny a chemokiny jako jsou IL-8 a CXCL10, které zvyšují sekreci MMP-9 a také snižují apoptózu EVT. [38, 39]. Dále dNK vylučují velké množství galektinu, který se účastní diferenciaci trofoblastových kmenových buněk a invaze EVT prostřednictvím vazby integrinů- β 1, ačkoliv přesný mechanismus není známý. V časně fázi těhotenství tedy produkty dNK stimulují invazi EVT [40].

Naopak nadměrná invaze EVT může způsobovat těhotenské komplikace a ohrozit matku. dNK však vylučují cytokiny jako jsou TNF- α , TGF- β a IFN- γ , které inhibují invazi EVT v pozdějších stádiích gestace [38]. TNF- α se navazuje na LFA-1 na placentárním syncytiotrofoblastu a vyvolává jeho apoptózu [41]. Rodina TGF- β se skládá ze tří příbuzných proteinů TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3. Izotyp 1 snižuje růst EVT, jak snížením rychlosti

proliferace, tak indukci apoptózy. Snížená invaze byla také spojena se schopností TGF- β 1 zvýšit hladinu tkáňového inhibitoru MMP. TGF- β 3 také snižuje růst EVT [42]. IFN- γ inhibuje invazi EVT mechanismem závislým na zvýšení apoptózy EVT a snížení aktivity proteázy [43].

4.2. Remodelace spirální tepny

Během časného těhotenství jsou děložní spirální tepny remodelovány na cévy s větším průměrem a vyšším průtokem, což umožňuje až desetinásobné zvýšení přívodu krve do intervilózního prostoru pro příjem placentou. Plod tak získává dostatek kyslíku a živin, což je rozhodující pro jeho další vývoj [44]. V tomto procesu buňky EVT migrují z placentárních choriových klků, napadají deciduum a myometrium, kde remodelují spirální arterie [45]. Remodelace deciduálních částí spirálních tepen je obvykle dokončena do desátého až dvanáctého týdne gestace a remodelace myometrálních částí těchto cév je dokončena do čtrnáctého až šestnáctého týdne gestace. Po remodelaci arterie ztrácí endotelovou vrstvu a většinu svalových vláken [46]. Tyto cévy začínají vykazovat střední průměr, tedy mnohem větší než průměr, který je pozorován u dělohy netěhotných žen s nízkou rezistencí vůči průtoku krve [47]. Selhání tohoto procesu je spojeno s rozvojem komplikací v těhotenství, jako jsou preeklampsie, omezení růstu plodu nebo potrat ve druhém trimestru [48].

Remodelaci spirální tepny u člověka lze rozdělit na dvě fáze – fázi nezávislou na trofoblastu a fázi závislou na trofoblastu. Počáteční fáze nezávislá na trofoblastu zahrnuje procesy jako otok endoteliálních buněk, degradace extracelulární matrix a separace buněk hladkého svalstva cév [38, 45].

V této fázi hrají důležitou roli angiogenní faktory produkované dNK. Tyto faktory ovlivňují separaci buněk hladkého svalstva cév, zprostředkovávají jejich apoptózu, diferenciaci a migraci ze spirální arterie. Studie ukázaly, že podpora dediferenciace je specificky indukována angiopoetinem-1 (ANG-1) a angiopoetinem-2 (ANG-2) dNK buněk. Navíc VEGF-A, VEGF-C, ANG-2, produkované dNK ovlivňují migraci buněk hladkého svalstva cév ze spirální tepny. Kromě toho, MMP-2 a MMP-9, vylučované z dNK, mohou degradovat extracelulární matrix, a tím podporovat tvorbu fibrinoidního materiálu, který napomáhá invazi trofoblastu. Souhrnně tato data naznačují, že angiogenní růstové faktory dNK indukují separaci buněk hladkého svalstva cév a degradaci extracelulární matrix. Hrají tak klíčovou roli v počátečním procesu remodelace spirální arterie během fáze nezávislé na trofoblastech [40].

V osmém až desátém týdnu těhotenství vylučují dNK vysoké hladiny ANG-1 i ANG-2, přičemž hladiny ANG-2 klesají s rostoucím gestačním obdobím a mění tak poměr těchto dvou angiopoetinů. Angiopoetiny jsou rodinou angiogenních růstových faktorů, z nichž jsou nejlépe

charakterizováni členy ANG-1 a ANG-2. Jsou to ligandy membránově vázaných tyrosinkinázových receptorů TIE-1 a TIE-2 [49]. ANG-2 jako antagonistický ligand pro TIE-2 hraje roli při dilataci cév a narušení integrity cév. Protože ANG-2 je antagonistou stabilizačního účinku ANG-1 na cévy, předpokládá se, že poměr těchto faktorů je důležitý pro tvorbu cév [50]. Ve dvanáctém až čtrnáctém týdnu těhotenství jsou dNK a EVT schopny vyvolat diferenciaci buněk hladkého svalstva cév prostřednictvím mechanismu částečně závislého na angiopoetinech [49]. Podle Wang a kol. (2017) není přesný mechanismus znám.

V rodině VEGF je pět podtypů VEGF – VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E a dva typy PlGF. Ukázalo se, že koncentrace VEGF-C dosahuje vrcholu během časně a střední sekreční fáze menstruačního cyklu. VEGF-C je charakteristickým produktem necytotoxických děložních NK buněk [51]. Fukui a kol. (2012) dokázali, že VEGF-C může chránit cílové endoteliální a trofoblastové buňky před zabíjením cytotoxickými NK buňkami periferní krve.

Fázi remodelace spirální tepny závislou na trofoblastu lze rozdělit na 2 stádia. V prvním stadiu hraje hlavní roli intersticiální trofoblast, který migruje ke spirálním arteriím (tj. perivaskulární intersticiální trofoblast), rozrušuje vrstvu hladkého svalstva cév a vylučuje fibrinoidní materiál složený z fibronektinu, kolagenu typu IV a laminu. Trofoblastové buňky se vmezeřují do tohoto fibrinového materiálu, kde se jich část transformuje na trofoblasty hvězdicového tvaru [52].

Druhé stadium fáze závislé na trofoblastu je charakterizováno retrográdním pohybem endovaskulárního trofoblastu podél arteriální stěny. Trofoblast nahrazuje endotel a dále narušuje arteriální svalovou výstelku v lumen tepny. K endovaskulární invazi trofoblastových buněk dochází pouze v tepnách obklopených a remodelovaných perivaskulárním intersticiálním trofoblastem, což naznačuje, že remodelace perivaskulárním intersticiálním trofoblastem (první stadium) slouží k přípravě cesty pro následnou invazi endovaskulárního trofoblastu (druhé stadium) [52].

5. Placentární exozómy

Exozómy jsou 40–100 nm velké nanovezikuly, které patří do skupiny extracelulárních vezikulů. Dříve se předpokládalo, že exozómy mají pouze odpadní funkci, později však byla prokázána jejich účast v mezibuněčné komunikaci [53].

Během těhotenství placenta uvolňuje exozómy do mateřského oběhu a lze je detekovat v krvi již v prvním trimestru těhotenství. V průběhu těhotenství se počet exozómů výrazně zvyšuje. Jsou nezbytné pro fungování placenty a vývoj plodu, v těhotenství také hrají roli

v imunitní regulaci. Placentární exozómy transportují proteiny, lipidy a miRNA na značnou vzdálenost od místa původu, mohou tak měnit aktivitu sousedních buněk nebo působit na dálku přenosem nákladu přes biologické tekutiny [53].

Placentární exozómy nesou v membráně ligandy inhibičního receptoru NKG2D, čímž inhibují cytotoxicitu dNK. Nejvíce významné jsou ligandy MIC-A, MIC-B a ULBP [54]. Proteiny MIC-A a MIC-B jsou produkovány syncytiotrofoblastovými exozómy. Molekuly ULBP, jinak známé jako molekuly časného transkriptu kyseliny retinové, obsahují 5 glykoproteinů. Jsou to povrchové proteiny, které se navazují na NKG2D receptor a aktivují ho. Jsou vzdáleně příbuzné MHC 1. třídy, ale na rozdíl od nich nejsou závislé na β 2-mikroglobulinu pro expresi na buněčném povrchu a neobsahují peptidy [55].

6. Role NK buněk v eliminaci senescentních deciduálních buněk

Po implantaci embrya aktivuje prudký nárůst progesteronu Forkhead box O1, což je základní deciduální transkripční faktor, který indukuje diferenciaci buněk endometriálního stromatu na deciduální buňky. Tento faktor také vede k urychlenému stárnutí deciduálních buněk způsobem závislým na IL-8. Akumulace senescentních buněk může vyvolat zánět dělohy a zhoršit vnímavost endometria, proto je nutná jejich eliminace [40].

Jednobuněčná analýza RNA sek endometria ukázala, že několik genů zapojených do imunitního dohledu nad senescentními buňkami, včetně genů pro CXCL14, IL-15 a TIMP-3, bylo aktivováno paralelně se vznikem senescentních deciduálních buněk. IL-15 je silný faktor, který aktivuje dNK a zvyšuje sekreci cytolytických granulí s perforinem a granzymem, které indukují apoptózu senescentních buněk [40].

Brighton a kol. (2017) společně kultivovali dNK a buňky endometriálního stromatu decidualizované po dobu 8 dnů, což vedlo ke ztrátě životaschopnosti těchto buněk. dNK vizuálně transformovaly monovrstvu deciduálních buněk do vzoru včelí plástve s ostrůvky bez buněk. Selektivní zacílení a clearance deciduálních buněk pomocí dNK buněk bylo také zachyceno pomocí časosběrné mikroskopie [56].

Existují dva mechanismy, které podporují clearance senescentních buněk zprostředkovanou NK buňkami. Za prvé, vazba NK buněčných povrchových ligandů TRAIL a FAS ligandu na odpovídající receptory na cílových buňkách může vést k aktivaci kaspázy a buněčné smrti. Druhý mechanismus zahrnuje sekreci granulí obsahujících perforin a granzym aktivovanými NK buňkami [56].

7. Paměť deciduálních NK buněk

Ačkoli jsou NK buňky součástí vrozeného imunitního systému, několik autorů naznačilo, že NK buňky u myši, opic a lidí mají adaptivní vlastnosti [57, 58, 59]. Toto relativně nové pole vrozené imunitní paměti se také nazývá „trénovaná imunita“. U myši byly v několika experimentálních systémech pozorovány vlastnosti podobné adaptivní imunitě, včetně dlouhověkých paměťových buněk, klonální expanze, zpětné odpovědi a antigenní specifity [57, 60]. U lidí byla paměť NK buněk prokázána především zjištěním, že podskupina lidských periferních NK buněk exprimujících receptor CD94/NKG2C expanduje po infekci lidským cytomegalovirem (HCMV). Paměťové NK buňky také mohou být indukovány cytokiny, jako je IL-12, IL-15 a IL-18 [60, 61].

Pozorování naznačovala, že děloha a placentární lůžko se lišilo mezi ženami, které byly těhotné opakovaně a ženami, které byly těhotné poprvé. U opakovaně gravidních žen byla zesílena vaskularizace a angiogeneze v důsledku hlubší a časnější invaze endovaskulárního trofoblastu, oproti ženám těhotným poprvé, kterým hrozilo vyšší riziko preeklampsie. Stav spojený s nedostatečnou placentací označované jako „velké porodnické syndromy“ (např. růstové restrikce plodu, narození dítěte s podprůměrnou porodní délkou nebo hmotností) se vyskytovaly v nižších frekvencích u opakovaných těhotenství. Dále bylo prokázáno, že se děloha po těhotenství z hlediska anatomie zcela nevrátila do původního stavu. Všechna tato pozorování naznačovala, že vývoj placenty u lidí je efektivnější v následujících těhotenstvích, ačkoliv přesné mechanismy jsou zatím neznámé [60].

Expresce receptorů NKG2D a LILRB1 byla výrazně zvýšena u opakovaně těhotných žen nezávisle na věku matky. Tento výsledek byl detegován i u žen, které potratily. Podmínkou pro vytvoření paměti tedy není porod, ale těhotenství [58, 61]. Po navázání NKG2C na HLA-E a LILRB-1 na HLA-G se dNK aktivovaly a vylučovaly více INF- γ a VEGF, které pozitivně ovlivňovaly zahájení remodelace endometriální vaskulatury, angiogenezi v místech implantace a udržování decidua [58, 60].

Bylo také zkoumáno, ve kterých tkáních a tělních tekutinách se receptory paměťových NK buněk nacházejí po prvním těhotenství. Expresce receptorů NKG2C a LILRB1 byla významně zvýšena v NK buňkách menstruační krve u žen po opakovaném těhotenství, oproti tomu v NK buňkách periferní krve nebyla expresce ani jednoho z těchto receptorů významně zvýšena. Proto se předpokládalo, že prekurzory paměťových dNK obsahuje endometrium, nicméně celý repertoár paměťových dNK z těchto dvou materiálů nebyl identický. Gamliel a kol. (2018) se pokusili převést eNK na paměťové dNK přímým spuštěním

NKG2C a LILRB1 jejich ligandy, nicméně byli neúspěšní pravděpodobně proto, že se jim nepodařilo napodobit stejné prostředí jako je v těle během těhotenství [60].

8. Obranná funkce faktorů produkovaných NK buňkami během nitroděložní infekce

Infekce patogeny může narušit rovnováhu mezi mateřskými a fetálními buňkami a způsobit tak mateřskou i fetální morbiditu. Například rostoucí rodina patogenů označených jako TORCH, které zahrnují *Toxoplasma gondii*, virus zarděnek, lidský cytomegalovirus a virus *herpes simplex* se mohou replikovat na rozhraní matky a plodu a šířit se do placenty a kompartmentu plodu, což vede k potenciálně závažnému reprodukčnímu selhání [40]. Dnes lze mezi patogeny TORCH zařadit i genotyp 1 viru hepatitidy E a viru Zika. Jak se však tyto viry dostanou do vyvíjející se placenty, je stále velkou neznámou a vyžaduje další zkoumání. Výstupy ze studií *ex vivo* ukazují, že některé z těchto virů mohou využít fetomaternální rozhraní jako replikační platformu před rozšířením do placenty a fetálního kompartmentu [62]. Na druhou stranu vysoké počty dNK, které jsou přítomny na fetomaternálním rozhraní, omezují šíření mikroorganismů. Během infekce dNK infiltrují infikované tkáně a vyvíjejí cytotoxické reakce vůči infikovaným deciduálním stromatickým buňkám, zatímco kombinace aktivačních receptorů zvyšuje cytotoxicitu dNK v reakci na infikované HLA-C2⁺ mateřské deciduální stromální buňky [40].

Během virové infekce dNK interaguje s NCR a klasickými molekulami HLA za účelem zvýšení sekrece cytolytických molekul (granzymu B a perforinu), a produkce cytokinů. Například dNK jsou časným zdrojem IFN- γ , který je indukován receptorem podobným Toll receptoru dNK v reakci na *T. gondii* a hraje klíčovou roli ve vrozené obraně proti parazitům. Vysoké koncentrace IFN- γ však indukují apoptózu trofoblastu prostřednictvím kaspázové dráhy, což vede k abnormálnímu těhotenství. Kromě toho dNK zvyšuje produkci TNF- α a GM-CSF v reakci na virem infikované deciduální stromální buňky. Tyto buňky fungují při odstraňování infikovaných buněk, čímž omezují přenos patogenů [40].

8.1. Lidský cytomegalovirus

HCMV je nejčastější vrozená infekce a vyskytuje se u 0,5–2 % všech živě narozených dětí [63]. Tento virus je členem největšího druhu virů *Betaherpesviridae*, s genomem kódujícím více než 150 proteinů. Nejčastější příčinou vrozených infekcí se závažnými a trvalými porodními následky je právě nákaza HCMV. I když je rychlost přenosu mnohem vyšší ve třetím trimestru, primární infekce v prvním trimestru je spojena s vysokým rizikem placentární

patologie [62]. HCMV infikuje placentu před plodem a může inhibovat diferenciaci a invazi trofoblastů, což může vést k placentární insuficienci a omezení růstu plodu [63]. První důkaz o zapojení dNK do kontroly virové infekce byl popsán pro HCMV. Bylo dokázáno, že dNK jsou schopny infiltrovat HCMV infikovanou tkáň a navázat kontakt s infikovanými buňkami [62].

V prvním trimestru těhotenství mají dNK za normálních okolností sníženou cytotoxicitu, nicméně v reakci na HCMV se jejich cytotoxicita zvyšuje. dNK procházejí fenotypovou transformací zahrnující aktivační receptory NKG2D a CD94/NKG2C-E [62, 64]. Schopnost dNK buněk degranulovat se v přítomnosti HCMV infikovaných fibroblastů je způsobena vysokými hladinami exprese CD107a, klíčové buněčné povrchové molekuly v mechanismu uvolňování lytických granulí. dNK tvoří imunologické synapse s fibroblasty infikovanými HCMV, což umožňuje uvolnění perforinu a granzymu pro buněčnou destrukci. Dále je schopnost degranulace stimulována zvýšenou expresí KIR2DS1 aktivovaným molekulami HLA-C2 deciduálních stromálních buněk infikovaných HCMV [63].

9. Komplikace v těhotenství a onemocnění

9.1. Preeklampsie

Preeklampsie je onemocnění, které postihuje 3–5 % všech těhotných žen. Je charakterizováno hypertenzí a jedním z následujících stavů: proteinurie nebo uroplacentální dysfunkce nebo dysfunkce mateřských orgánů, např. postižení jater, renální insuficience, neurologické nebo hematologické komplikace. Tyto stavy se objevují po 20. týdnu těhotenství. Ve vyspělých zemích bylo 16 % úmrtí matek způsobeno hypertenzními poruchami, 13 % úmrtí následkem krvácení, 8 % úmrtí v důsledku potratu a 2 % úmrtí následkem sepse. PE je tedy jednou z hlavních příčin mateřské a perinatální morbidity a mortality. Toto onemocnění lze rozdělit na dva podtypy podle doby nástupu. PE s časným nástupem, která nastává před 34. týdnem těhotenství a vyskytuje se méně často, zato má vyšší míru morbidity matky, perinatálního úmrtí a neonatálního úmrtí. Druhý podtyp je PE s pozdním nástupem, který nastává po 34. týdnu těhotenství [51, 65].

Hlavním patologickým znakem PE s časným nástupem je abnormální vývoj placenty. EVT neproniká do myometrálního segmentu spirálních tepen, proto není mukoelastická stěna nahrazena fibrinoidním materiálem. Nedojde tak k remodelaci spirálních arterií a cévy zůstávají úzké s vysokým tlakem, což má za následek placentární hypoperfuzi [65].

U žen s PE s pozdním nástupem probíhá remodelace spirální tepny v pořádku, nebo s minimálními odchylkami a plod tedy není omezen v růstu. Problém nastává v interakci plně vyvinuté placenty s endotelem, což vede k mikrovaskulárním poškozením a generalizované vazokonstrikci, jejímž důsledkem je snížení prokrvení orgánů. Rozdíl mezi výše zmíněnými podtypy PE není vždy jasný a většina pacientek je postižena oběma podtypy. Patologie PE i přes intenzivní výzkum v posledních desetiletích není stále zcela pochopena. [65, 66].

Bylo prokázáno, že nedostatek dNK buněk vede k nižší plodnosti a vyšší fetální resorpci. Na druhé straně jsou NK buňky přijímány vrozeným imunitním systémem v reakci na neadekvátní invazi trofoblastů nebo nedostatečnou remodelaci spirální děložní arterie, tedy na procesy pozorované u PE. Mezi studiemi však existují určité nesrovnalosti, pokud jde o počet těchto buněk přítomných u PE ve srovnání s normotenzním těhotenstvím. Zatímco některé studie uvádějí významně nižší počty CD56⁺ dNK u PE, jiné zprávy naznačují opačný případ [67].

9.1.1. Role angienních faktorů produkovaných NK buňkami

VEGF přispívá k přežití trofoblastu, zvyšuje jeho migraci a tím podporuje proces angiogeneze. Je to ligand VEGF 1 (sFlt1), který je receptorem i pro PlGF. Přebytek tohoto receptoru v preklamptickém séru zhoršuje angiogenezi vyvázáním VEGF a PlGF, které pak nemohou remodelovat spirální arterii. U pacientek s PE byla zjištěna snížená exprese VEGF, jeho koncentrace byla nižší dokonce o 80 %, což vedlo k omezení růstu plodu, hypoperfuzi a následné hypoxii plodu [51, 68].

Podíl NK buněk a T lymfocytů, které exprimují galektin-1, byl výrazně snížen u preklamptických pacientek ve srovnání se zdravými těhotnými ženami. Důsledek tohoto jevu je narušení diference trofoblastových kmenových buněk a invaze EVT [69]. Galektin-3 stimuluje angiogenezi prostřednictvím dráhy závislé na VEGF receptoru a může také inhibovat apoptózu v různých typech buněk. Počet NK buněk exprimujících tento protein je opět snížen a jeho deficit vede k placentární insuficienci a následnému omezení růstu plodu [70].

Dalším nedávno publikovaným faktorem, který by se mohl podílet na rozvoji PE ovlivněním placentární angiogeneze je fraktalkin (CX3CL1). Je to chemokin exprimovaný v placentární tkáni hlavně syncytiotrofoblastem a vylučovaný do mateřského oběhu. Fraktalkin je schopen indukovat angiogenezi cestou HIF-1 α /VEGF a také stimulovat migraci trofoblastů závislou na integrinu. Receptor CX3CL1 je přítomen v NK buňkách, makrofázích a T lymfocytech. Fraktalkin tedy pomáhá navádět NK buňky do dělohy [70, 71].

9.1.2. Role receptorů přirozené cytotoxicity

Byla zkoumána exprese NCR na NK buňkách periferní krve žen s PE. Tyto ženy vykazovaly snížené procento buněk CD56⁺/NKp46⁺ a CD56^{bright}/NKp46⁺ oproti zdravým těhotným ženám. Zajímavé je, že nižší exprese CD56⁺/NKp46⁺ buněk u těhotných žen s PE byla pozorována 3 až 4 měsíce před nástupem PE a pokračovala až do porodu. Donedávna bylo možné klinickým screeningem detekovat pouze symptomatické konečné stadium PE. Existují však dvě fáze PE – preklinické a klinické stadium. NKp46 má potenciál stát se markerem pro predikci PE v preklinickém stadium, stejně jako jiné faktory, například sFlt1 a PlGF [51].

Kromě toho těhotné ženy s PE vykazovaly významně vyšší procento CD56⁺/NK44⁺ buňky, CD56^{dim}/NKp44⁺ buňky a CD56^{light}/NKp44⁺ buňky ve srovnání s těhotnými ženami bez PE. Navíc byla pozorována vyšší exprese CD56⁺/NKp44⁺ buněk u těhotných žen s PE ve 12. a 20. týdnu těhotenství. To znamená, že NK buňky žen s PE mají vyšší cytotoxicitu před nástupem PE v 1. asymptomatickém stadiu. To může být jedním z důvodů abnormální placentace u PE [51].

Produkce cytokinů NKp46⁺ buněk u těhotných žen negativně koreluje s CD56^{bright} NK buňkami produkující TNF- α . Nebyly však nalezeny žádné korelace mezi expresí NCR a produkcí cytokinů typu 2 a IL-10. Nízká exprese NKp46⁺ NK buněk u těhotných žen s PE může být zodpovědná za vyšší produkci cytokinu TNF- α , která je známá jako posun NK1 [51].

9.1.3. Role MHC molekul

Deciduální NK rozpoznávají otcovské HLA-C exprimované na EVT. Existují stovky variant HLA-C, jedna z možností jejich dělení je do dvou funkčních skupin dle přítomnosti asparaginu a lysinu v pozici 80 v proteinové sekvenci na HLA-C1 a HLA-C2. C1 je rozpoznáván inhibičními KIR2DL2 a KIR2DL3 receptory, zatímco C2 je rozpoznáván inhibičním KIR2DL1 a aktivačním KIR2DS1. C1 tedy není rozpoznáván žádným aktivačním receptorem KIR s HLA-C2 interaguje silněji než HLA-C1. KIR receptory lze rozdělit do dvou funkčních skupin KIR A a KIR B dle přítomnosti a nepřítomnosti konkrétních podskupin KIR genů. Po ligaci aktivačního KIR B je zesílena produkce angiogenních faktorů a cytokinů, zatímco KIR A tuto produkci naopak snižují. Mateřské KIR genotypy mohou být AA, čili bez aktivačních receptorů, nebo AB/BB s jedním nebo více aktivačními receptory. Fetální HLA-C2 s mateřským KIR B/B tedy podporuje placentaci a nepodporuje preeklampsii, naopak u fetálních HLA-C s mateřským KIR A/A je vysoké riziko preeklampsie [51].

HLA-G podporuje fetomaternální toleranci interakcí s deciduálními T lymfocyty, NK buňkami, makrofágy a dendritickými buňkami. Během 1. trimestru těhotenství

se koncentrace solubilního HLA-G v mateřském oběhu pětinašobně zvyšuje, poté klesá k termínu porodu. U časných i pozdních PE byly hladiny cirkulujícího i placentárního HLA-G relativně sníženy. Trofoblast tak není chráněn před napadením NK buňkami, což je možný mechanismus inhibice invaze trofoblastů na fetomaternálním rozhraní, jehož důsledkem může být nedostatečná přeměna spirální tepny. Několik studií prokázalo souvislost mezi polymorfismy HLA-G a výskytem preeklampsie, ačkoli výsledky jsou nekonzistentní [72, 73].

9.2. Endometrióza

Endometrióza je onemocnění s rysy chronického zánětu a je definováno jako přítomnost funkčních endometriálních žláz a stromatu mimo děložní dutinu [74]. V pánevní dutině je přítomnost lézí poměrně rozsáhlá, mohou se vyskytovat na pobřišnici, ve vaječnicích, kolem dělohy, v močových cestách, ve vagíně nebo ve střevě. Mimo břišní dutinu byly nalezeny výrůstky například v plicích, v mozku, a dokonce i v oku. Příznaky zahrnují chronickou pánevní bolest (dysmenorea, acyklická pánevní bolest, dyspareunie, dyschezie, dysurie) se závažností od mírné až po oslabující, neplodnost a nespecifické příznaky. Nicméně endometrióza může být i asymptomatická [75]. Endometrióza je v některých ohledech podobná malignitám – vyskytuje se zde progresivní a invazivní růst, estrogen-dependentní růst, recidiva a tendence k metastázování. Toto onemocnění bylo klasifikováno do čtyř stádií na základě závažnosti, množství, umístění, hloubky a velikosti výrůstků, přičemž tato stádia jsou – stádium I (minimální onemocnění), stádium II (mírné onemocnění), stádium III (střední onemocnění) a stádium IV. (těžké onemocnění) [74].

Původ endometriózy není zcela znám, nicméně nejčastěji přijímaná teorie navržená Sampsonem uvádí, že při menstruaci jsou endometriální buňky a fragmenty tkáně refluxovány vejcovody. Zde fragmenty přežívají, přichycují se k pánevním strukturám a napadají je. Přitom podléhají neuroangiogenezi a vyvolávají lokální zánětlivou reakci, jako je fibróza a bolest. Neplodnost je způsobena zjizvenou tkání, lokálními zánětlivými účinky na kvalitu oocytů a časný vývoj embrya v nehostinném prostředí pro nidaci [76]. Definitivní diagnóza endometriózy vyžaduje laparoskopii, což je invazivní technika zahrnující anestezii, proto skutečné zastoupení tohoto onemocnění ve společnosti není známo. Odhaduje se však, že postihuje 10 % všech žen a až 50 % žen s neplodností, což představuje 176 milionů postižených žen na celém světě [77].

Předpokládá se, že neplodnost u žen s endometriózou je způsobena narušeným místním vývojem eNK [78]. Tyto buňky pravděpodobně pocházejí z hematopoetických kmenových

buněk v endometriu a existují ve čtyřech stádiích zrání. V prvním stádiu eNK exprimují endometriální stromální marker (CD10) a marker hematopoetických kmenových buněk (CD34). Ve druhém stádiu exprimují CD34 a CD117. Ve třetím stádiu mají eNK fenotyp $CD34^-/CD117^+/CD94^-$, který je exprimován NK buňkami a $CD8^+$ T lymfocyty. Ve čtvrtém stádiu mají fenotyp $CD34^-/CD117^{-/+}/CD94^+$. Zajímavé je, že u žen, jejichž ložiska endometria byla lokalizována přímo ve svalovině děložní, bylo nalezeno více nezralých eNK (stádia I a II) ve srovnání s kontrolními vzorky [76]. Endometriální tkáň od žen s neplodností spojenou s endometriózou má snížený faktor kmenových buněk. Nahrazení tohoto růstového faktoru *in vitro* obnovuje potenciál zrání těchto nezralých eNK buněk [78]. Zdá se tedy, že *in situ* vývoj zralých eNK potenciálně přispívá k abnormálnímu vývoji endometria, abnormální placentaci a zvýšenému selhání implantace [76].

9.3. Opakovaná ztráta těhotenství

Opakovaná ztráta těhotenství (RPL) je těhotenská porucha, se kterou se setkává až 2,5 % žen, které se snaží otěhotnět. O definici RPL se dlouho diskutovalo. Americká společnost pro reprodukční medicínu definuje opakovanou těhotenskou ztrátu jako selhání dvou nebo více klinicky uznaných těhotenství (doloženými ultrasonografií nebo histopatologickým vyšetřením) před 20.–24. týdnem gestace a zahrnuje embryonální a fetální ztráty. Zatímco Evropská společnost pro lidskou reprodukci a embryologii uznává v definici i nevizualizované těhotenské ztráty [79, 80]. Přesná horní gestační hranice potratu závisí na právní definici fetální životaschopnosti plodu a liší se mezi státy [79].

Ve skutečnosti lze pouze v přibližně 50 % případů RPL nalézt definované příčiny nebo rizikové faktory, včetně pokročilého věku matky, genetických abnormalit, vybraných mateřských autoprotilátek, endokrinních dysfunkcí a abnormalit dělohy. Zbývající případy RPL jsou v současnosti nevysvětlené [81]. I když jsou znalosti o nevysvětlené RPL omezené, nově se objevující studie ukázaly, že nevysvětlená RPL je spojena s imunologickými faktory, včetně stavů periferní a deciduální imunity.

V posledních letech se studie zaměřují na vztah mezi lymfocyty v periferní krvi a patogenezi RPL. Počet NK buněk periferní krve (hlavně $CD56^{\text{dim}}$) u neplodných žen je významně vyšší než u fertálních žen. Procenta eNK se však významně neliší u žen s RPL ve srovnání s kontrolami [82].

V počtu a funkci eNK u RPL stále existují značné kontroverze. U žen s nevysvětlenou RPL byly skutečně zjištěny vyšší koncentrace uterinních NK než u normálních fertálních kontrol, i když toto zjištění nebylo vždy konzistentní. V jiných studiích byl u těchto žen objeven

signifikantní pokles v populaci CD56^{bright}/CD16⁻, která se běžně vyskytuje u normálních těhotenství a významně se zvýšil počet buněk CD16⁺ se zvýšenou expresí receptorů přirozené cytotoxicity NKp46, NKp44 a NKp30. Uterinní NK buňky u žen s nevysvětlitelnou RPL jsou tedy kvalitativně i kvantitativně odlišné od běžně vyskytujících se NK buněk v těhotenství [81].

Další podskupina NK buněk, NK22, které produkují IL-22, je u žen s RPL regulována odlišně. Těchto buněk je méně, než ve zdravém těhotenství a genová a proteinová exprese IL-22 je nižší, než u normálního těhotenství. IL-22 je regulátor endometriální homeostázy a může pomoci omezit zánět běžný v časném těhotenství. Jeho snížené hodnoty tedy mohou pomoci vysvětlit narušení homeostázy vedoucí k opakujícím se těhotenským ztrátám, nicméně k úplnému objasnění jeho role v RPL je zapotřebí další výzkum [81, 83].

Fukui a kol. (2017) prokázali, že eNK od žen s RPL mají nejen nižší expresi NKp46, ale také nižší produkci IFN- γ a TNF- α . Poměr NK buněk periferní krve produkujících pouze IFN- γ byl také významně nižší u žen s předchozími selháními implantace ve srovnání s kontrolami.

9.4. Opakované selhání implantace

Pro opakované selhání implantace (RIF) neexistuje všeobecně přijímaná definice, nicméně většina odborných článků se shoduje v následující definici. Opakované selhání implantace je selhání dosažení klinického těhotenství u *in vitro* oplodnění po transferu alespoň 4 kvalitních embryí v minimálně 3 cyklech v čerstvém nebo zamrazeném stavu u žen mladších 40 let. Kvalitní embryo bylo definováno jako embryo s počtem buněk odpovídajícím dne jeho vývoje [85]. Ačkoli etiologie RIF není zcela stanovena, je třeba zvážit proměnné, jako jsou věk matky, zvýšený index tělesné hmotnosti, imunologické faktory, kvalita spermií, děložní změny a psychologické stavy. Pravděpodobnost implantace u žen, které podstoupily *in vitro* oplodnění se pohybuje mezi 25 % a 40 % a kolem 10 % pacientek je postiženo RIF [86].

Studie NK buněk u tohoto problému jsou nekonzistentní a je zapotřebí další výzkum. Jedna studie naznačila, že počet a aktivita NK buněk periferní krve může být u žen s RIF zvýšena, tyto parametry tedy mohou být prediktory ztráty těhotenství. [87]. Podobně další studie prokázala zvýšenou cytotoxicitu NK buněk u žen s chromozomálně normálním těhotenstvím, které potratily. Na druhou stranu několik studií neuvádí žádný významný rozdíl v cytotoxicitě NK buněk periferní krve mezi ženami s opakovaným potratem nebo neplodností a zdravými kontrolami, což vede k domněnce, že zvýšená cytotoxicita NK buněk v periferní krvi nemusí být spojena s výsledkem těhotenství [87]. Dons'koi a kol. (2021) zjistili,

že procento NKp46 NK buněk bylo výrazně vyšší u žen s RIF ve srovnání s kontrolní skupinou a je tak negativním prognostickým faktorem pro implantaci embrya.

9.5. Role NCR receptorů v opakovaných ztrátách těhotenství a v opakovaném selhání implantace

Důležitou roli v cytotoxicitě NK buněk hrají NCR receptory. Comins-Boo a kol. (2021) zkoumali receptor NKp30, exprimovaný ve většině zralých cirkulujících NK buňkách. Povrchovou expresi těchto receptorů zvyšují INF- γ a IL-12. TGF- β selektivně snižuje expresi NKp30, ale ne NKp46. Lidský gen *NCR3* kódující NKp30 je transkribován v šesti různých variantách, z nichž nejvíce exprimované jsou NKp30a, NKp30b a NKp30c. Tyto izoformy mají různé imunostimulační a imunosupresivní funkce. NKp30a a NKp30b spouštějí produkci INF- γ , a tak i cytotoxické reakce NK buněk jako je degranulace. Naopak NKp30c způsobuje uvolnění inhibičního IL-10 a velmi málo uvolňuje INF- γ [80].

NK buňky periferní krve exprimují vysoké hladiny izoform NKp30a a NKp30b a nízké hladiny NKp30c, zatímco dNK exprimují vysoké hladiny NKp30c a podstatně nižší hladiny NKp30a/b. V placentě žen, které prodělaly sporadický nebo opakovaný potrat během prvního trimestru, byla zjištěna zvýšená aktivační izoforma NKp30a/b, která ovšem nebyla nalezena v periferní krvi. Tento výsledek naznačuje, že zvýšení exprese NKp30a/b izoform na dNK buňkách může zprostředkovat dysregulovanou produkci cytokinů v placentě, což přispívá k nepříznivým výsledkům těhotenství [80].

9.6. Emulzní lipidová terapie

Jedna z nejnovějších navržených terapií pro RPL a RIF je emulzní lipidová terapie. Lipidové emulze jsou směsi mastných kyselin, včetně esenciálních nenasycených mastných kyselin linolové a α -linolenové. V roce 1920 Yamahakawa jako první podal lidem intravenózní lipidové emulze a v roce 1945 McKibbin a kol. zavedli použití lipidové emulze pro parenterální výživu. Lipidové emulze se staly komerčně dostupnými až v 50. letech 20. století. V současné době jsou komerční lipidové emulze tvořeny n-3, n-6 a n-9-triglyceridy s dlouhým řetězcem, a jsou izolované nebo ve spojení s triglyceridy se středně dlouhým řetězcem [86].

Buněčné mechanismy, kterými intralipidy působí na NK buňky, nejsou zcela pochopeny, ale někteří autoři se domnívají, že lipidová emulze obnovuje abnormální aktivitu NK buněk na normální úroveň, čímž zlepšuje implantaci embrya. Mastné kyseliny přítomné v intralipidech mohou být rozpoznány pomocí receptorů aktivovaných

peroxisomovým proliferátorem, receptorů spřažených s G-proteinem a shluků diferenciačních receptorů [86].

Lipidová emulzní terapie byla navržena jako platná a slibná terapie pro léčbu RPL a RIF u žen s abnormální aktivitou NK buněk. Coulam a kol. (2012) prokázali, že 200 pacientek s RPL a RIF se zvýšenou aktivitou NK buněk mělo 61 % živě narozených potomků po lipidové emulzní terapii, což se významně nelišilo od 52 % pozorovaných při intravenózní terapii imunoglobulinem. Jinými slovy, bylo prokázáno, že lipidová emulzní terapie je stejně účinná jako terapie imunoglobulinem, ale je výhodnější, protože nepochází z krve a má nižší cenu. Nicméně taková zjištění by měla být zvažována s opatrností, protože je zapotřebí více studií k potvrzení výsledků a vysvětlení mechanismů, kterými lipidové emulze potlačují aktivitu NK buněk v RPL a RIF [87].

10. Vyšetření NK buněk

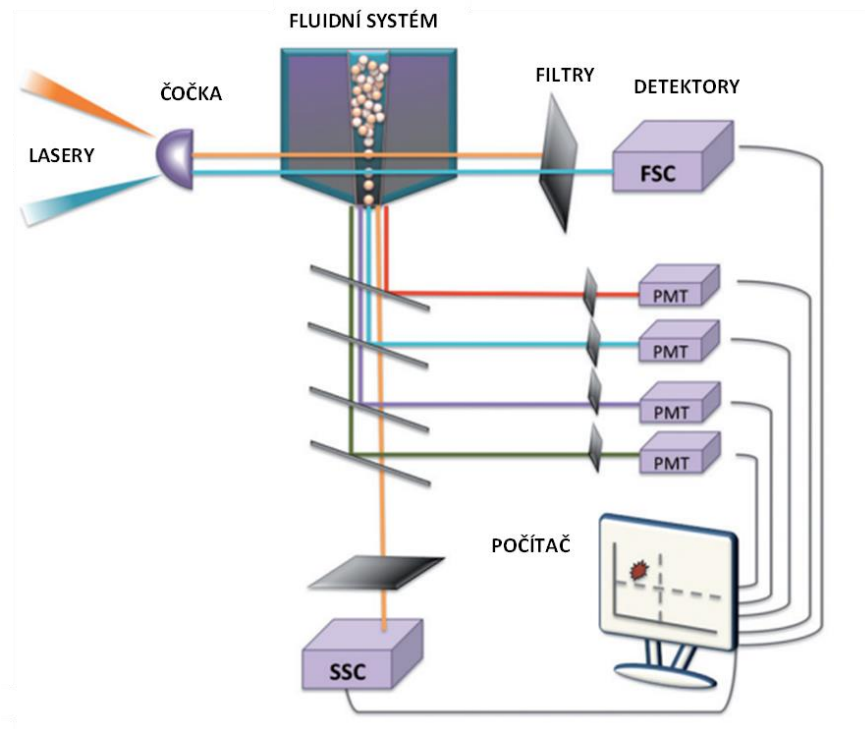
Laboratorní vyšetření NK buněk probíhají na imunochemickém principu vazby antigen-protilátka. Pro vyšetření imunologických příčin ženské neplodnosti, či jiných těhotenských komplikací, se provádí vyšetření počtu NK buněk a vyšetření jejich funkčních vlastností. Při vyšetření počtu NK buněk je zkoumána exprese povrchových receptorů na jejich membráně, např. metodou průtokové cytometrie nebo imunohistochemickými metodami. Z hlediska funkčních vlastností je zkoumána degranulace NK buněk, nebo funkční aktivita NK buněk, kterou lze vyšetřit cytotoxickým testem nebo aktivačním testem.

10.1. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní přesná laboratorní metoda stanovení pro analýzu buněk v suspenzi. Tato suspenze je značena pomocí monoklonálních protilátek s fluorochromem, které se naváží na antigeny vyšetřovaných buněk. Takto značená suspenze je vložena do průtokového cytometru, kde je analyzována [90]. Tento přístroj tvoří tři části – fluidní systém, optický systém a počítačová stanice. Vzorek je z nádoby nasáván do přístroje, kde je vytvářen fokusovaný proud buněk, které putují jednotlivě a za sebou (fluidní systém). Tento proud protíná laserový paprsek a laserové světlo se odráží od buněk, nebo v případě značení fluorochromem ho laser excituje za vzniku fluorescenčního světla, které dopadá na detektory (optický systém). V poslední fázi je optický signál převeden na elektronický a pomocí počítačové stanice je digitalizován a graficky znázorněn (obrázek 4).

Jsou měřeny dva parametry. První je Forward Scatter neboli přímý rozptyl (FSC), při kterém je detekován rozptyl světla v přímém směru od osy paprsku laseru. Tímto způsobem

je zjišťována velikost buněk, tzn. čím větší je buňka, tím širší je rozptyl světla. Druhý parametr se nazývá Side Scatter neboli boční rozptyl (SSC), při kterém je detekován rozptyl světla pod úhlem 90° , což je kolmý směr od osy paprsku laseru. Takto je zjišťována granularita buněk. Lze měřit také fluorescenci, jejíž záření je zachyceno fotonásobičem pro každý fluorochrom zvlášť pod úhlem 90° od osy paprsku laseru. Měření fluorescence o různých vlnových délkách dává kvalitativní a kvantitativní informaci o membránových nebo cytoplazmatických receptorech značených fluorochromem.



Obrázek 4: Schéma průtokového cytometru (upraveno) [90]

10.2. Imunohistochemie

Imunohistochemie je laboratorní diagnostická metoda využívaná v patologii a imunologii. Jejím cílem je znázornit konkrétní molekulu ve tkáních. Výhodou tedy je, že není studována směsná populace buněk, ale konkrétní detekovatelná buňka. Princip této metody je reakce antigenu a monoklonální či polyklonální protilátky, kterou lze pozorovat mikroskopicky nebo pomocí fluorescence. [90].

Pro běžné mikroskopické vyšetření se používá tkáň zalitá v parafínu, pokud jsou však antigeny či protilátky citlivé na takovéto zalití, používají se zamrazené tkáně. Při zamrazení je nezbytné zabránit tvorbě ledových krystalů, například zamrazením za velmi nízkých teplot tekutým dusíkem a použitím kryoprotektiv. Buňky v suspenzi mohou být připraveny pomocí nátěru nebo preparátu zhotoveného cytocentrifugou. Důležitým krokem vyšetření je fixace tkáně a permeabilizace buněčné membrány, díky které protilátky lépe pronikají do nitra buňky.

Nejčastějšími fixativy jsou paraformaldehyd, aceton či metanol. Aby nedošlo k nespecifické reakci protilátek a buněk, je nutná blokáce. Nejvíce používaný blokační činitel je hovězí albumin, který se naváže na studovanou tkáň nebo suspenzi a zabráni tak nespecifické vazbě protilátky. Vazba antigenu a protilátky musí být zviditelněna, čehož můžeme dosáhnout třemi metodami – přímou, nepřímou dvojstupňovou a nepřímou trojstupňovou [90].

V přímé metodě je primární protilátka označena fluorochromem, enzymem nebo kovem a v mikroskopu je hodnoceno jejich rozmístění. Tuto metodu lze použít, pokud je antigen ve tkáni ve vysoké koncentraci, to znamená pro nativní řezy, a naopak není vhodná pro parafínové řezy [92].

V nepřímé dvojstupňové metodě se používá primární neoznačená protilátka nebo sérum, které je specifické proti danému antigenu. V dalším kroku se aplikuje komerčně dostupná, fluorochromem nebo enzymaticky značená protilátka proti Fc fragmentu primární protilátky. Ve srovnání s přímou metodou je tato metoda citlivější [92].

Nepřímé trojstupňové metody se využívají k zesílení signálu v případě, že množství molekul antigenu ve tkáni je nízké. Tato metoda je nejcitlivější, nicméně je časově náročnější. Nejprve je navázána primární protilátka s antigenem ve tkáni, poté je aplikována neznačená specifická protilátka proti první a třetí protilátce a tvoří tzv. můstek. Tuto sekundární protilátku je nutno přidávat v nadbytku, aby nedošlo k vazebnému vysycení obou ramen, což by mohlo poskytnout falešně negativní výsledek. V posledním kroku je přidán značený komplex [92].

Imunohistochemickou metodou lze například zjistit počet NK buněk. Babayeva a kol. (2020) imunohistochemicky zkoumali počet eNK CD56⁺ u žen s anamnézou opakovaného selhání implantace a ženami, které porodily živé potomky. Endometriální biopsie byly získány během luteální fáze 21. - 24. den menstruačního cyklu a fixovány v 10% formaldehydu. Následovalo zalití vzorků do parafínu a inkubace po dobu 120 minut s primární protilátkou CD56, 30 minut s biotinem a 30 minut se streptavidinem. Poté byl 15 minut přidáván aminoethylkarbazolový chromogen. Vzorky tkáně zalité v parafínu byly obarveny pomocí Mayerova hematoxylinu. Patolog vyhodnotil všechny vzorky pomocí mikroskopu při 400 násobném zvětšení. Počty CD56⁺ buněk byly stanoveny jako buňky/mm². Takto bylo zjištěno, že ženy se selháním implantace měly snížený počet eNK [93].

10.2.1. Polyklonální a monoklonální protilátky

Protilátky jsou vyrobeny imunizací zvířat purifikovaným antigenem. Zvíře reaguje produkcí protilátek, které specificky rozpoznávají a váží se na antigeny vyšetřované tkáně [94].

Polyklonální protilátky jsou produkovány v různých druzích zvířat, jako jsou králíci, kozy, kuřata a další. Tyto protilátky mají vyšší afinitu a reaktivitu, mohou identifikovat více izoform cílového proteinu, ale mají nižší specifitu ve srovnání s monoklonálními protilátkami. Polyklonální antiséra zahrnují několik různých protilátek k cílovému proteinu, včetně protilátek, které s antigenem nereagují a sérum proto musí být purifikováno. Polyklonální přípravek by však mohl být velmi heterogenní kvůli přítomnosti protilátek k silným a slabě imunogenním epitopům ve stejném přípravku. Čím větší je počet protilátek k cílovému proteinu v jednom přípravku, tím větší je pravděpodobnost zkřížené reaktivity s podobnými epitopy v jiných proteinech, a tedy pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků. Variace v titru a kvalitě protilátek v závislosti na imunizovaném zvířeti také přispívají k rozptylu mezi šaržemi [94].

Monoklonální protilátky jsou produkovány většinou u myši hybridomovou metodou. Myšim je injektován purifikovaný imunogen a po dosažení imunitní odpovědi jsou B lymfocyty produkující protilátky sklizeny ze sleziny. Izolované B lymfocyty mají omezenou životnost, jsou fúzovány s myšimi myelomovými buňkami. Poté následuje selekce hybridomů požadované specifity. Produkovaná hybridní buňka je nesmrtelná a produkuje protilátky specifické pro jeden epitop, tedy monoklonální protilátky. Výhodou monoklonálních protilátek je jejich vyšší specifita ve srovnání s polyklonálními protilátkami. Snižuje se tak riziko zkřížené reaktivity s jinými antigeny. Hybridomy mohou být udržovány v buněčných kulturách, ze kterých pochází vysoce čisté protilátky, ale v nízké koncentraci, nebo v peritoneu myši, ze kterého se získá ascitická tekutina, která má 10–100 krát vyšší koncentraci protilátek než v buněčné kultuře, ale má nespecifické proteiny a endogenní protilátky z myši [94].

10.3. Stanovení uterinních NK buněk

Jako materiál pro stanovení uterinních NK buněk slouží bioptický vzorek endometria odebraný hysteroskopií nebo suspenze buněk z výplachu děložní dutiny. Analýza může být provedena imunohistochemicky z tkáně nebo průtokovou cytometrií, kterou lze analyzovat oba výše uvedené materiály [95]. Imunohistochemie se využívá detekci tkáňových antigenů pomocí protilátek za vzniku barevného produktu. Například lze prokázat přítomnost receptorů CD56 a CD16 pomocí myších polyklonálních protilátek z parafinových řezů endometria [96]. Stejně CD znaky lze vyhodnotit průtokovou cytometrií, jejíž hlavní výhodou je vyhodnocení

vysokého počtu buněk a víceparametrová analýza a nevýhodou je problematické určení počtu NK buněk [95]. Hodnocení funkce NK buněk je primárně kategorizováno do testů degranulace nebo cytotoxicity [97].

10.4. Degranulační test

Průtokovou cytometrií můžeme stanovit fenotyp a funkci NK buněk. Bylo vytvořeno několik monoklonálních protilátek proti receptorům a dalším povrchovým znakům NK buněk. Jako příklad lze uvést uvolňování sekrečních lysozomů, jejichž množství se určuje pomocí indukce povrchové exprese transmembránových proteinů. Neaktivované cytotoxické lymfocyty CD63, CD107a, CD107b a CD178 sídlí v sekrečních lysozomech. V NK buňkách od zdravých dárců je CD107a lokalizován společně s perforinem a nalezneme ho na povrchu NK buněk až po lýze citlivých cílových buněk [98]. K lýze se využívá buněčná linie K562, co je nediferencovaná lidská erytroleukemická linie, která neexprimuje molekuly MHC 1. třídy. K652 stimuluje NK buňky, které uvolní granula a na povrch je vystaven protein CD107a na který se naváží protilátky a suspenze je stanovována cytometricky [99]. Defektní indukce povrchové exprese CD107a je spojena s určitými podtypy syndromů hyperzánětlivé imunodeficiency [98].

CD107a a další proteiny této rodiny jsou vysoce glykosylované membránové proteiny, které představují přibližně 50 % proteinů v lysozomální membráně. Mají krátké cytosolové konce, o kterých se předpokládá, že interagují s trans Golgiho mediátory, které se podílejí na třídění a zacílení proteinů do lysozomální dráhy. Bylo také navrženo, že vysoce glykosylovaná část molekuly na lumenální straně vezikulu se podílí na ochraně buněčné membrány před napadením lytickými enzymy obsaženými v granulích, a tak může následně chránit extracelulární membránu efektorové buňky [99].

Degranulační testy jsou pouze ukazatelem aktivace NK buněk a nikoli jejich konečné funkce, přímého zabíjení cílových buněk [97].

10.5. Stanovení funkční aktivity

Ke stanovení funkční aktivity NK buněk lze využít cytotoxický nebo aktivační test, případně lze sledovat produkci cytokinů nebo expresi povrchových znaků [95].

10.5.1. Cytotoxický test

Principem cytotoxického testu je sledování počtu terčových buněk, které jsou usmrceny NK buňkami [95]. Dlouhodobým „zlatým standardem“ pro hodnocení cytotoxické aktivity T i NK buněk je test uvolňování chromu. Tento test zahrnuje radioaktivní značení cílových

buněk pomocí izotopů ^{51}Cr a jejich společnou inkubaci s efektorovými buňkami. Lýza buněk vede k uvolňování ^{51}Cr vázaného na protein do supernatantu, což lze měřit gama počítáním [97].

Test uvolňování chromu je velmi účinný, nicméně má několik problémů – je velmi nákladný, obtížně standardizovatelný a je zde velké riziko při práci s radioaktivním materiálem a jeho zneškodňováním [97]. Pro provedení testu je vyžadována přítomnost kvalifikovaného technika a vyhrazený prostor pro manipulaci s izotopy, což tento test činí nepraktickým a jeho aplikace je velmi omezena. Proto bylo popsáno několik neradioaktivních alternativ, jako je transdukce luciferázy do cílových buněk, detekce laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu a monitorování elektrické impedance cílových buněk přilnutých k povrchu elektrodové destičky. Tyto alternativy však jasně trpí nedostatky, včetně homogenní buněčné přípravy, vysokého signálu pozadí a znehodnocení nepřipojených buněk [100].

10.5.2. Aktivační test

Mnohem jednodušší, a také rozšířenější, je cytometrické stanovení aktivace NK buněk. Principem je detekce aktivačního antigenu CD69 na povrchu NK buněk [95]. CD69 patří do superrodiny typu C-lektinů a je integrálním membránovým proteinem typu II sestávající z disulfidicky vázaného homodimeru se dvěma fosforylovanými řetězci. Je to funkční spouštěcí molekula na aktivovaných NK buňkách a je jedním z prvních exprimovaných markerů aktivace buněčného povrchu [101].

NK buňky ze vzorku periferní krve se nechávají 24–48 hodin kultivovat *in vitro* s různými stimulanty, jako jsou mitogeny, trofoblast, spermie a další. Po inkubaci je stanovena exprese znaku CD69. Míra této exprese je porovnána s negativní kontrolou, tedy hodnotou zjištěnou u vzorku inkubovaného za stejných podmínek, ale bez přítomnosti stimulačního činidla [95]. Expresse je měřena po označení příslušnou monoklonální protilátkou na průtokovém cytometru, ideálně druhý den po stimulaci, kdy exprese nabývá vrcholu a je po určitou dobu stabilní. Tato metoda je, co se provedení týče jednoduchá, může se stanovit z plné krve, a to z velmi malého množství [90].

ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl zkoumán význam NK buněk v těhotenství. Tyto velké granulární lymfocyty se podílejí na implantaci a placentaci. Během implantace NK buňky produkují cytokiny, které podporují imunotolerantní prostředí. Při procesu placentace se podílí na invazi trofoblastu a remodelaci spirální tepny produkcí cytokinů, chemokinů, angiogenních faktorů a růstových faktorů. NK buňky eliminují senescentní deciduální buňky pomocí produktů z cytotoxických granulí nebo aktivací kaspáz. Během nitroděložní infekce sekretují cytolytické molekuly a prozánětlivé cytokiny.

Cytotoxická aktivita NK buněk musí být inhibována, aby nedošlo k eliminaci plodu. Na této inhibici se podílejí molekuly HLA-C, HLA-E a HLA-G vazbou na inhibiční receptory NK buněk. MHC molekuly také zvyšují produkci protizánětlivých cytokinů, čímž zabraňují cytotoxické lýze trofoblastu.

Pokud dojde k narušení funkce NK buněk, změně exprese jejich povrchových znaků nebo ke zvýšení či snížení jejich počtu, oplozené vajíčko se nemusí uhnízdít, nedojde tak k otěhotnění a ženu tak může potkat opakované selhání implantace. Dále může dojít ke ztrátě těhotenství, a to opakovaně, nebo matku mohou postihnout různá onemocnění, jako je např. preeklampsie. Role NK buněk v těhotenských komplikacích a onemocněních však není stále dostatečně prozkoumána a je zapotřebí dalšího výzkumu.

ZDROJE LITERATURY

1. HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005, s. 142-143. ISBN 80-725-4686-4.
2. ZHANG, Hua, Yongzhi CUI, Nga VOONG, et al. Activating Signals Dominate Inhibitory Signals in CD137L/IL-15 Activated Natural Killer Cells. *Journal of Immunotherapy* . 2011, 34(2), 187-195. Dostupné z: doi:10.1097/CJI.0b013e31820d2a21
3. TANG, Jennifer J.-J., Alexander P. SUNG, Michael J. GUGLIELMO, Lydia NAVARRETE-GALVAN, Doug REDELMAN, Julie SMITH-GAGEN a Dorothy HUDIG. Natural Killer (NK) Cell Expression of CD2 as a Predictor of Serial Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC). *Antibodies*. 2020, 9(4), 1-18. Dostupné z: doi:10.3390/antib9040054
4. BINDER, Christian, Filip CVETKOVSKI, Felix SELLBERG, Stefan BERG, Horacio PATERNINA VISBAL, David H. SACHS, Erik BERGLUND a David BERGLUND. CD2 Immunobiology. *Frontiers in Immunology*. 2020, 11, 1-14. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.01090
5. VAN ACKER, Heleen H., Anna CAPSOMIDIS, Evelien L. SMITS a Viggo F. VAN TENDELOO. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?. *Frontiers in Immunology* . 2017, 8, 1-9. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00892
6. GUNESCH, Justin T, Amera L DIXON, Tasneem AM EBRAHIM, et al. CD56 regulates human NK cell cytotoxicity through Pyk2. *ELife*. 2020, 9(1-12). Dostupné z: doi:10.7554/eLife.57346
7. KONJEVIĆ, Gordana, Katarina MIRJAČIĆ MARTINOVIĆ, Ana VULETIĆ, Vladimir JURISIĆ a Ivan SPUŽIĆ. Distribution of Several Activating and Inhibitory Receptors on CD3–CD16 NK Cells and Their Correlation with NK Cell Function in Healthy Individuals. *Journal of Membrane Biology*. 2009, 230(3), 113-123. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-009-9191-3
8. KUMAR, Santosh. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*. 2018, 154(3), 383-393. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12921
9. MONTALDO, Elisa, Genny Del ZOTTO, Mariella Della CHIESA, Maria Cristina MINGARI, Alessandro MORETTA, Andrea De MARIA a Lorenzo MORETTA. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry Part A* . 2013, 83A(8), 702-71. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.22302

10. GAGGERO, Silvia, Kristina WITT, Mattias CARLSTEN a Suman MITRA. Cytokines Orchestrating the Natural Killer-Myeloid Cell Crosstalk in the Tumor Microenvironment: Implications for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2021, 11. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.621225
11. WU, Yang, Zhigang TIAN a Haiming WEI. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Frontiers in Immunology*. 2017, 8. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00930
12. SULLIVAN, Lucy C., Craig S. CLEMENTS, Travis BEDDOE, et al. The Heterodimeric Assembly of the CD94-NKG2 Receptor Family and Implications for Human Leukocyte Antigen-E Recognition. *Immunity*. 2007, 27(6), 900-911. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2007.10.013
13. GUNTURI, Anasuya, Rance E. BERG a James FORMAN. The Role of CD94/NKG2 in Innate and Adaptive Immunity. *Immunologic Research*. 2004, 30(1), 029-034. Dostupné z: doi:10.1385/IR:30:1:029
14. ROSE, Mingus J. J., Andrew G. BROOKS, Lisbeth A. STEWART, Thi H. NGUYEN a Anthony P. SCHWARER. Killer Ig-Like Receptor Ligand Mismatch Directs NK Cell Expansion In Vitro. *The Journal of Immunology*. 2009, 183(7), 4502-4508. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.0803323
15. WANG, Wei, Amy K. ERBE, Kory A. ALDERSON, et al. Human NK cells maintain licensing status and are subject to killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and KIR-ligand inhibition following ex vivo expansion. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016, 65(9), 1047-1059. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-016-1864-z
16. RAJAGOPALAN, Sumati a Eric O. LONG. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Frontiers in Immunology*. 2012, 3. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2012.00258
17. HE, Yuke, Hui PENG, Rui SUN, Haiming WEI, Hans-Gustaf LJUNGGREN, Wayne M. YOKOYAMA a Zhigang TIAN. Contribution of inhibitory receptor TIGIT to NK cell education. *Journal of Autoimmunity*. 2017, 81, 1-12. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaut.2017.04.001
18. PRAGER, Isabel a Carsten WATZL. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019, 105(6), 1319-1329. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.MR0718-269R

19. SMYTH, Mark J., Erika CRETNEY, Janice M. KELLY, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*. 2005, 42(4), 501-510. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034
20. KRZEWSKI, Konrad a John E. COLIGAN. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in Immunology*. 2012, 3. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2012.00335
21. WEINER, Louis M., Rishi SURANA a Shangzi WANG. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2010, 10(5), 317-327. Dostupné z: doi:10.1038/nri2744
22. VAN DER HAAR ÀVILA, Irene, Patricia MARMOL, Rolf KIESSLING a Yago PICO DE COAÑA. Evaluating Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity by Chromium Release Assay. *Immune Checkpoint Blockade*. New York, NY: Springer New York, 2019, 2019-01-22, 167-179. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-8978-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8979-9_12
23. PRAGER, Isabel, Clarissa LIESCHE, Hanna VAN OOIJEN, et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *Journal of Experimental Medicine*. 2019, 216(9), 2113-2127. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20181454
24. DALBETH, Nicola, Roger GUNDLE, Robert J. O. DAVIES, Y. C. Gary LEE, Andrew J. MCMICHAEL a Margaret F. C. CALLAN. CD56 bright NK Cells Are Enriched at Inflammatory Sites and Can Engage with Monocytes in a Reciprocal Program of Activation. *The Journal of Immunology*. 2004, 173(10), 6418-6426. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.173.10.6418
25. MANASTER, Irit, Saar MIZRAHI, Debra GOLDMAN-WOHL, et al. Endometrial NK Cells Are Special Immature Cells That Await Pregnancy. *The Journal of Immunology*. 2008, 181(3), 1869-1876. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.181.3.1869
26. MELSEN, Janine E., Gertjan LUGTHART, Arjan C. LANKESTER a Marco W. SCHILHAM. Human Circulating and Tissue-Resident CD56bright Natural Killer Cell Populations. *Frontiers in Immunology*. 2016, 7(262), 1-10. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2016.00262
27. BALASUNDARAM P, Farhana A. Immunology At The Maternal-Fetal Interface. 2021 Nov 17. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan—. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574542/>

28. YANG, Shao-Liang, Hai-Yan WANG, Da-Jin LI a Ming-Qing LI. Role of decidual natural killer cells at the Maternal–Fetal interface during pregnancy. *Reproductive and Developmental Medicine*. 2019, 3(3), 165-169. Dostupné z: doi:10.4103/2096-2924.268161
29. FAAS, Marijke M. a Paul DE VOS. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*. 2017, 56, 44-52. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2017.03.001
30. MAHAJAN, Deviyani, Neeta Raj SHARMA, Sudhakar KANCHARLA, et al. Role of Natural Killer Cells during Pregnancy and Related Complications. *Biomolecules*. 2022, 12(1), 1-18. Dostupné z: doi:10.3390/biom12010068
31. GENE BRIER, Steve a Karin TARTE. The flawless immune tolerance of pregnancy. *Joint Bone Spine*. 2021, 88(5), 1-5. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbspin.2021.105205
32. ČECH, Evžen, Zdeněk HÁJEK, Karel MARŠÁL a Bedřich SRP. *Porodnictví. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006, s. 49-50. ISBN 80-247-1313-9.*
33. LIU, Yuefang, Shujun GAO, Yangjing ZHAO, Hui WANG, Qiong PAN a Qixiang SHAO. Decidual Natural Killer Cells: A Good Nanny at the Maternal-Fetal Interface During Early Pregnancy. *Frontiers in Immunology*. 2021, 12, 1-11. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.663660
34. LIU, Su, Lianghui DIAO, Chunyu HUANG, Yuye LI, Yong ZENG a Joanne Y.H. KWAK-KIM. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2017, 124, 44-53. Dostupné z: doi:10.1016/j.jri.2017.10.045
35. KING A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*. 2000, 30(6), 1623-1631. Dostupné z: doi:10.1002/1521-4141(200006)30:6<1623::AID-IMMU1623>3.0.CO;2-M
36. XU, Xiuxiu, Yonggang ZHOU a Haiming WEI. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2020, 11. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.592010
37. BOLY, Timothy J. a Jennifer R. BERMICK. Maternal–fetal tolerance: Not just a uterine affair. *Journal of Leukocyte Biology*. 2022, 111(3), 515-517. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.5CE1021-560
38. ZHANG, Xiuhong a Haiming WEI. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Frontiers in Immunology*. 2021, 12. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.728291

39. LASH, G. E., H. A. OTUN, B. A. INNES, K. PERCIVAL, R. F. SEARLE, S. C. ROBSON a J. N. BULMER. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Human Reproduction*. 2010, 25(5), 1137-1145. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deq050
40. ZHANG, Xueling, Yuye LI, Chunyu HUANG, Su LIU, Xian CHEN, Shuyi YU, Lianghui DIAO a Yong ZENG. The role of decidual natural killer cell-derived soluble factors in early pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2021, 86(5). Dostupné z: doi:10.1111/aji.13477
41. ROMANOWSKA-PRÓCHNICKA, Katarzyna, Anna FELIS-GIEMZA, Marzena OLESIŃSKA, Piotr WOJDASIEWICZ, Agnieszka PARADOWSKA-GORYCKA a Dariusz SZUKIEWICZ. The Role of TNF- α and Anti-TNF- α Agents during Preconception, Pregnancy, and Breastfeeding. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(6). Dostupné z: doi:10.3390/ijms22062922
42. LASH, Gendie E., Harry A. OTUN, Barbara A. INNES, Judith N. BULMER, Roger F. SEARLE a Stephen C. ROBSON. Inhibition of Trophoblast Cell Invasion by TGF β 1, 2, and 3 Is Associated with a Decrease in Active Proteases. *Biology of Reproduction*. 2005, 73(2), 374-381. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.105.040337
43. LASH, Gendie E., Harry A. OTUN, Barbara A. INNES, Maureen KIRKLEY, Leandro DE OLIVEIRA, Roger F. SEARLE, Stephen C. ROBSON a Judith N. BULMER. Interferon- γ inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *The FASEB Journal*. 2006, 20(14), 2512-2518. Dostupné z: doi:10.1096/fj.06-6616com
44. FRASER, Rupsha, Guy St.J. WHITLEY, Baskaran THILAGANATHAN a Judith E. CARTWRIGHT. Decidual natural killer cells regulate vessel stability: implications for impaired spiral artery remodelling. *Journal of Reproductive Immunology*. 2015, 110, 54-60. Dostupné z: doi:10.1016/j.jri.2015.04.003
45. ROBSON, Andrew, Lynda K. HARRIS, Barbara A. INNES, et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *The FASEB Journal*. 2012, 26(12), 4876-4885. Dostupné z: doi:10.1096/fj.12-210310
46. AYOUBI, Jean-Marc. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular Health and Risk Management*. 2011, 7, 467-474. Dostupné z: doi:10.2147/VHRM.S20181

47. MAYRINK, J., M. L. COSTA a J. G. CECATTI. Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction. *The Scientific World Journal*. 2018, 2018, 1-9. Dostupné z: doi:10.1155/2018/6268276
48. LASH, G. E. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006, 80(3), 572-580. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0406250
49. WANG, Qiong a Gendie E. LASH. Angiopoietin 2 in placentation and tumor biology: The yin and yang of vascular biology. *Placenta*. 2017, 56, 73-78. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2017.03.021
50. SCHIESSL, B., B.A. INNES, J.N. BULMER, H.A. OTUN, T.J. CHADWICK, S.C. ROBSON a G.E. LASH. Localization of Angiogenic Growth Factors and Their Receptors in the Human Placental Bed Throughout Normal Human Pregnancy. *Placenta*. 2009, 30(1), 79-87. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2008.10.004
51. FUKUI, Atsushi, Megumi YOKOTA, Ayano FUNAMIZU, et al. Changes of NK Cells in Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2012, 67(4), 278-286. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0897.2012.01120.x
52. SATO, Yukiyasu. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2020, 503. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2019.110699
53. BURKOVA, Evgeniya E., Sergey E. SEDYKH a Georgy A. NEVINSKY. Human Placenta Exosomes: Biogenesis, Isolation, Composition, and Prospects for Use in Diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(4). Dostupné z: doi:10.3390/ijms22042158
54. CZERNEK, Liliana a Markus DÜCHLER. Exosomes as Messengers between Mother and Fetus in Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(12). Dostupné z: doi:10.3390/ijms21124264
55. HEDLUND, Malin, Ann-Christin STENQVIST, Olga NAGAEVA, Lennart KJELLBERG, Marianne WULFF, Vladimir BARANOV a Lucia MINCHEVA-NILSSON. Human Placenta Expresses and Secretes NKG2D Ligands via Exosomes that Down-Modulate the Cognate Receptor Expression: Evidence for Immunosuppressive Function. *The Journal of Immunology*. 2009, 183(1), 340-351. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.0803477
56. BRIGHTON, Paul J, Yojiro MARUYAMA, Katherine FISHWICK, et al. Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *ELife*. 2017, 6. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.31274

57. PAUST, Silke, Harvinder S GILL, Bao-Zhong WANG, et al. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell–mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nature Immunology*. 2010, 11(12), 1127-1135. Dostupné z: doi:10.1038/ni.1953
58. RÖLLE, Alexander, Julia POLLMANN, Adelheid CERWENKA a Vincent RACANIELLO. Memory of Infections: An Emerging Role for Natural Killer Cells. *PLoS Pathogens*. 2013, 9(9). Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1003548
59. REEVES, R Keith, Haiying LI, Stephanie JOST, et al. Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nature Immunology*. 2015, 16(9), 927-932. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3227
60. GAMLIEL, Moriya, Debra GOLDMAN-WOHL, Batya ISAACSON, et al. Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. *Immunity*. 2018, 48(5), 951-962.e5. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2018.03.030
61. GOLDMAN-WOHL, Debra, Moriya GAMLIEL, Ofer MANDELBOIM a Simcha YAGEL. Learning from experience: cellular and molecular bases for improved outcome in subsequent pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2019, 221(3), 183-193. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajog.2019.02.037
62. JABRANE-FERRAT, Nabila. Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. *Frontiers in Immunology*. 2019, 10. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01397
63. CRESPO, Ângela C., Jack L. STROMINGER a Tamara TILBURGS. Expression of KIR2DS1 by decidual natural killer cells increases their ability to control placental HCMV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, 113(52), 15072-15077. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1617927114
64. PARKER, Elaine L., Rachel B. SILVERSTEIN, Sonam VERMA a Indira U. MYSOREKAR. Viral-Immune Cell Interactions at the Maternal-Fetal Interface in Human Pregnancy. *Frontiers in Immunology*. 2020, 11. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.522047
65. BOKSLAG, Anouk, Mirjam VAN WEISSENBRUCH, Ben Willem MOL a Christianne J.M. DE GROOT. Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate. *Early Human Development*. 2016, 102, 47-50. Dostupné z: doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.09.007
66. PHIPPS, Elizabeth, Devika PRASANNA, Wunnie BRIMA a Belinda JIM. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2016, 11(6), 1102-1113. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.12081115

67. ANEMAN, Ingrid, Dillan PIENAAR, Sonja SUVAKOV, Tatjana P. SIMIC, Vesna D. GAROVIC a Lana MCCLEMENTS. Mechanisms of Key Innate Immune Cells in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Frontiers in Immunology*. 2020, 11. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.01864
68. GUO, Xijiao, Ling FENG, Jing JIA, Ruibao CHEN a Jun YU. Upregulation of VEGF by small activating RNA and its implications in preeclampsia. *Placenta*. 2016, 46, 38-44. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2016.08.088
69. MOLVAREC, Attila, Sandra M. BLOIS, Balázs STENCZER, et al. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clinical Immunology*. 2011, 139(1), 48-56. Dostupné z: doi:10.1016/j.clim.2010.12.018
70. PANKIEWICZ, Katarzyna, Anna FIJAŁKOWSKA, Tadeusz ISSAT a Tomasz M. MACIEJEWSKI. Insight into the Key Points of Preeclampsia Pathophysiology: Uterine Artery Remodeling and the Role of MicroRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(6). Dostupné z: doi:10.3390/ijms22063132
71. LI, Z-Y, H-H CHAO, H-Y LIU, Z-H SONG, L-L LI, Y-J ZHANG, Y YANG a J-P PENG. IFN- γ induces aberrant CD49b NK cell recruitment through regulating CX3CL1: a novel mechanism by which IFN- γ provokes pregnancy failure. 2014, 5(11), e1512-e1512. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2014.470
72. JOHNSEN, Guro M., Heidi E.S. FJELDSTAD, Jos J.M. DRABBELS, et al. A possible role for HLA-G in development of uteroplacental acute atherosclerosis in preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*. 2021, 144. Dostupné z: doi:10.1016/j.jri.2021.103284
73. GOLDMAN-WOHL, Debra a Simcha YAGEL. NK cells and pre-eclampsia. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008, 16(2), 227-231. Dostupné z: doi:10.1016/S1472-6483(10)60578-0
74. Mehedintu C, Plotogea MN, Ionescu S, Antonovici M. Endometriosis still a challenge. *J Med Life*. 2014 Sep 15;7(3):349-57. Dostupné z: PMID: 25408753; PMCID: PMC4233437.
75. VERMEULEN, Nathalie, Mauricio S ABRAO, Jon I EINARSSON, et al. Endometriosis classification, staging and reporting systems: a review on the road to a universally accepted endometriosis classification. *Human Reproduction Open*. 2021, 2021(4). Dostupné z: doi:10.1093/hropen/hoab025
76. VALLVÉ-JUANICO, Júlia, Sahar HOUSHDARAN a Linda C GIUDICE. The endometrial immune environment of women with endometriosis. *Human Reproduction Update*. 2019, 25(5), 565-592. Dostupné z: doi:10.1093/humupd/dmz018

77. THIRUCHELVAM, Uma, Mary WINGFIELD a Cliona O'FARRELLY. Natural Killer Cells: Key Players in Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015, 74(4), 291-301. Dostupné z: doi:10.1111/aji.12408
78. THIRUCHELVAM, Uma, Mary WINGFIELD a Cliona O'FARRELLY. Increased uNK Progenitor Cells in Women With Endometriosis and Infertility are Associated With Low Levels of Endometrial Stem Cell Factor. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2016, 75(4), 493-502. Dostupné z: doi:10.1111/aji.12486
79. DIMITRIADIS, Evdokia, Ellen MENKHORST, Shigeru SAITO, William H. KUTTEH a Jan J. BROSENS. Recurrent pregnancy loss. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020, 6(1). Dostupné z: doi:10.1038/s41572-020-00228-z
80. COMINS-BOO, Alejandra, Ignacio CRISTÓBAL, Miguel FERNÁNDEZ-ARQUERO, et al. Functional NK surrogate biomarkers for inflammatory recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2021, 86(2). Dostupné z: doi:10.1111/aji.13426
81. TICCONI, Carlo, Adalgisa PIETROPOLLI, Nicoletta DI SIMONE, Emilio PICCIONE a Asgerally FAZLEABAS. Endometrial Immune Dysfunction in Recurrent Pregnancy Loss. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(21). Dostupné z: doi:10.3390/ijms20215332
82. LIU, Hong, Xin-Xiu LIN, Xiao-Bo HUANG, et al. Systemic Characterization of Novel Immune Cell Phenotypes in Recurrent Pregnancy Loss. *Frontiers in Immunology*. 2021, 12. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.657552
83. PERFETTO, Candice O'Hern, Xiujun FAN, Sabita DAHL, Sacha KRIEG, Lynn Marie WESTPHAL, Ruth Bunker LATHI a Nihar R. NAYAK. Expression of interleukin-22 in decidua of patients with early pregnancy and unexplained recurrent pregnancy loss. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015, 32(6), 977-984. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-015-0481-7
84. FUKUI, Atsushi, Ayano FUNAMIZU, Rie FUKUHARA a Hiroaki SHIBAHARA. Expression of natural cytotoxicity receptors and cytokine production on endometrial natural killer cells in women with recurrent pregnancy loss or implantation failure, and the expression of natural cytotoxicity receptors on peripheral blood natural killer cells. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2017, 43(11), 1678-1686. Dostupné z: doi:10.1111/jog.13448

85. COUGHLAN, C., W. LEDGER, Q. WANG, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014, 28(1), 14-38. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2013.08.011
86. CANELLA, Paula Renata Bueno Campos, Ricardo BARINI, Patrícia de Oliveira CARVALHO a Daniela Soares RAZOLLI. Lipid emulsion therapy in women with recurrent pregnancy loss and repeated implantation failure: The role of abnormal natural killer cell activity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021, 25(5), 2290-2296. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.16257
87. COULAM, Carolyn B. a Brian ACACIO. Does Immunotherapy for Treatment of Reproductive Failure Enhance Live Births?. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2012, 67(4), 296-304. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0897.2012.01111.x
88. ZHANG, Hongzhan, Chunyu HUANG, Xian CHEN, et al. The number and cytotoxicity and the expression of cytotoxicity-related molecules in peripheral natural killer (NK) cells do not predict the repeated implantation failure (RIF) for the in vitro fertilization patients. 2020, 7(2), 283-289. Dostupné z: doi:10.1016/j.gendis.2019.03.005
89. DONS'KOI, Boris V., Dariia V. OSYPOCHUK, Viktor P. CHERNYSHOV a Kseniia G. KHAZHYLENKO. Expression of natural cytotoxicity receptor NKp46 on peripheral blood natural killer cells in women with a history of recurrent implantation failures. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2021, 47(3), 1009-1015. Dostupné z: doi:10.1111/jog.14631
90. BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-7090-1. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/vysetrovaci-metody-v-imunologii-888380/#>
91. ADAN, Aysun, Günel ALIZADA, Yağmur KIRAZ, Yusuf BARAN a Ayten NALBANT. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017, 37(2), 163-176. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2015.1128876
92. BERANOVÁ, Milena a Zbyněk TONAR, 2002. *Principy a příklady imunohistochemie: příručka pro studenty*. Plzeň: Ústav histologie a embryologie LF UK. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf
93. BABAYEVA, Gulchin, Yunus Emre PURUT, Burak GIRAY, Pembe OLTULU, Rabia ALAKUŞ a Mehmet Cengiz ÇOLAKOĞLU. Endometrial CD56 natural killer cells in women with recurrent implantation failure: An immunohistochemical study. *Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology*. 2020, 17(4), 236-239. Dostupné z: doi:10.4274/tjod.galenos.2020.90359

94. RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2005, 42(4), 405-426. Dostupné z: doi:10.1354/vp.42-4-405
95. MALÍČKOVÁ, Karin, Zuzana AMBRUSOVÁ, Slávka BELVONČÍKOVÁ, et al. Současné možnosti diagnostiky a léčby imunologických příčin ženské neplodnosti. *ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH*. 2021, 160(1), 5-13. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2021-1-10/soucasne-moznosti-diagnostiky-a-lecby-imunologickych-pricin-zenske-neplodnosti-126263/download?hl=cs>
96. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., M. PEŠEK, P. CHALOUPKA, et al. Screeningové vyšetření endometriálních NK buněk u vybraných infertilních pacientek 1. část – metodika a průběžné výsledky. *ČESKÁ GYNEKOLOGIE*. 2017, 82(5), 366–371. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2017-5-3/screeningove-vysetreni-endometrialnich-nk-bunek-u-vybranych-infertilnich-pacientek-1-cast-metodika-a-prubezne-vysledky-61955/download?hl=cs>
97. KANDARIAN, Fadi, Gemalene M SUNGA, Diana ARANGO-SAENZ a Maura ROSSETTI. A Flow Cytometry-Based Cytotoxicity Assay for the Assessment of Human NK Cell Activity. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, (126). Dostupné z: doi:10.3791/56191
98. BRYCESON, Yenan T., Cyril FAURIAT, João M. NUNES, Stephanie M. WOOD, Niklas K. BJÖRKSTRÖM, Eric O. LONG a Hans-Gustaf LJUNGGREN. Functional Analysis of Human NK Cells by Flow Cytometry. *Natural Killer Cell Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, 2010-11-9, 335-352. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-60761-361-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-362-6_23
99. ALTER, Galit, Jessica M. MALENFANT a Marcus ALTFELD. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*. 2004, 294(1-2), 15-22. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2004.08.008
100. CUI, Lei, Feng YIN, Jingbo CHENG, Hui LIU, Meimei ZHENG, Di LIU, Zeji WU a Qiqun QIAN. Optimized cytotoxicity assay for co-suspended effector and target cells. *Journal of Immunological Methods*. 2021, 497. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2021.113100

101. DONS'KOI, Boris V., Viktor P. CHERNYSHOV a Darina V. OSYPCHUK.
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.
Journal of Immunological Methods. 2011, 372(1-2), 187-195. Dostupné z:
doi:10.1016/j.jim.2011.07.016