

Klinický přínos kvantifikace a imunofenotypizace uterinních NK buněk při diagnostice a léčbě neplodnosti

Clinical significance of quantification and immunophenotyping of uterine NK cells in the diagnosis and treatment of infertility

K. Černá¹, P. Otevřel², Š. Luxová¹, L. Sedláčková¹

¹ GENNET s.r.o., Praha

² Reprofit International s.r.o., Brno

Souhrn: Úvod a cíl studie: Uterinní NK (uNK) buňky jsou specializovanou subpopulací NK (natural killer) lymfocytů nacházejících se v endometriu. Hrají klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi a v procesu implantace embrya. Cílem této studie je retrospektivní analýza výsledků léčby metodou *in vitro* fertilizace (IVF) v souboru žen, které podstoupily imunofenotypizaci uNK buněk a na základě výsledků tohoto vyšetření byly, nebo nebyly léčeny imunomodulační terapií. **Metody:** Studie zahrnovala 122 pacientek, které podstoupily imunofenotypizaci uNK buněk v období od dubna do prosince 2023. Imunofenotypizace byla provedena metodou průtokové cytometrie. Pacientky byly rozříděny do čtyř skupin dle fenotypu uNK buněk: normální nálezy, nízké absolutní a relativní počty uNK (LOW-IMMUNE profil), nízké počty uNK v kombinaci s nežádoucím posunem směrem k cytotoxickému uNKdim imunofenotypu (MIXED-IMMUNE profil) a normální počty uNK, ale nežádoucí posun v poměru cytotoxických a regulačních uNK s cytotoxickým fenotypem (OVER-IMMUNE profil). Byly hodnoceny výsledky embryotransferu a výskyt potratů do ukončeného 12. týdne těhotenství v jednotlivých skupinách. **Výsledky:** Nejvyšší míra dosažení klinické gravidity byla nalezena v léčené skupině OVER-IMMUNE (70 %), následované skupinou MIXED-IMMUNE (60 %). Skupina LOW-IMMUNE se od neléčené NORMAL skupiny signifikantně nelišila ($p = 0,205$). Nedostatečná imunitní aktivace (LOW-IMMUNE profil) byla signifikantně nejčastěji sdružena s prvotrimestrální těhotenskou ztrátou ($p < 0,0001$). **Závěr:** Tato studie přináší nové poznatky o potenciálu imunofenotypizace uNK buněk a následné imunomodulační terapie v léčbě poruch plodnosti. Ačkoli výsledky naznačují možné klinické přínosy, je zapotřebí dalšího výzkumu k potvrzení těchto zjištění a k objasnění mechanismů, které vedou ke zlepšení výsledků léčby technikami asistované reprodukce.

Klíčová slova: uterinní NK buňky – imunofenotypizace lymfocytů – *in vitro* fertilizace – opakované selhání implantace – habituální potráčení – imunomodulační léčba

Summary: Introduction and objective: Uterine NK (uNK) cells, a specialized subpopulation of natural killer (NK) lymphocytes located in the endometrium, play a crucial role in regulating the immune response and in the process of embryo implantation. This study aims to retrospectively analyze the outcomes of *in vitro* fertilization (IVF) treatment in a cohort of women who underwent uNK cell immunophenotyping with subsequent immunomodulatory therapy applied based on the results. **Methods:** The study included 122 patients who underwent uNK cell immunophenotyping between April and December 2023. Immunophenotyping was performed using flow cytometry. Patients were categorized into four groups according to their uNK cell phenotypes: normal findings, low absolute and relative numbers of uNK cells (LOW-IMMUNE profile), low numbers of uNK cells combined with the shift towards the cytotoxic uNK dim immunophenotype (MIXED-IMMUNE profile), and normal numbers of uNK cells, but an undesirable shift in the ratio of cytotoxic to regulatory uNK cells towards the cytotoxic uNK dim phenotype (OVER-IMMUNE profile). Embryo transfer outcomes and the occurrence of miscarriages up to the 12th week of pregnancy were evaluated in each group. **Results:** The highest clinical pregnancy rate was observed in the treated OVER-IMMUNE group (70%), followed by the MIXED-IMMUNE group (60%). The LOW-IMMUNE group did not differ significantly from the untreated NORMAL group ($P = 0.205$). Insufficient immune activation (LOW-IMMUNE profile) was significantly associated with first-trimester pregnancy loss ($P < 0.0001$). **Conclusion:** This study provides new insights into the potential benefits of uNK cell immunophenotyping and subsequent immunomodulatory therapy in treating fertility disorders. While the results indicate possible clinical advantages, further research is necessary to confirm these findings and elucidate the mechanisms leading to improved outcomes in assisted reproductive techniques.

Key words: uterine NK cells – lymphocyte immunophenotyping – *in vitro* fertilization – recurrent implantation failure – habitual miscarriage – immunomodulatory therapy

Úvod

Uterinní NK (uNK) buňky jsou specializovanou subpopulací přirozených zabíječů (NK – natural killer lymfocytů) nacházejících se v endometriu. Hrají klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi a v procesu implantace embrya. Mezi charakteristické CD znaky uNK buněk patří vysoká exprese CD56 a nízká exprese až absence CD16 znaku, což je odlišuje od periferních NK buněk, které mají nízkou expresi CD56 a vysokou expresi znaku CD16 [1].

Na základě exprese povrchového antigenu CD56 se uNK dělí na dvě hlavní subpopulace: dim a bright fenotyp. uNK buňky s dim fenotypem (CD56dim) mají nižší expresi CD56 a vyšší expresi CD16, což je situace obdobná jako u cytotoxických NK buněk periferní krve. Tyto buňky hrají primární roli v přímé cytotoxicitě a obranných mechanismech proti infekcím a maligním buňkám. uNK buňky s bright fenotypem (CD56bright) vykazují vysokou expresi CD56 a nízkou nebo žádnou expresi CD16. Tento fenotyp je charakteristický pro buňky, které se podílejí na regulaci imunitní odpovědi, vč. produkce proangiogenních faktorů a cytokinů. CD56bright uNK buňky jsou klíčové pro úspěšnou implantaci embrya a pro udržení zdravého imunitního mikroprostředí během těhotenství, jelikož podporují remodelaci cév a imunitní toleranci vůči plodu [2]. Přítomnost a správná funkční aktivita uNK jsou nezbytné pro úspěšné těhotenství, nedostatečná funkce či počet uNK buněk může vést k poruchám implantace, ztrátě těhotenství nebo k těhotenským komplikacím, jako je preeklampsie nebo HELLP syndrom [3].

Diagnostický význam kvantifikace a imunofenotypizace uNK buněk pro klinickou praxi je dosud předmětem diskuzí. Některé studie naznačují, že laboratorně prokázaná nerovnováha v zastoupení populací uNK buněk může přispívat k diagnostice sterility a/nebo infertility [4,5]. Seshadariho metaanalýza však žádný významný rozdíl

v procentuálním zastoupení periferních a uterinních NK buněk mezi neplodnými a plodnými ženami neprokázala [6].

Předkládaná studie si klade za cíl retrospektivně analyzovat výsledky léčby metodou *in vitro* fertilizace (IVF) v souboru žen jednoho klinického centra reprodukční medicíny, které podstoupily v období 1–4 měsíců před embryotransferem imunofenotypizaci uNK v biopsii endometria metodou průtokové cytometrie. Studie hodnotí jednotlivé imunofenotypy uNK a jejich zastoupení, zvolené imunomodulační léčebné postupy, míru dosažení klinického těhotenství po embryotransferu a výskyt potratů do ukončeného 12. týdne těhotenství po transferu v jednotlivých kohortách dle fenotypu uNK a zvolené terapie.

Pacientky a metodika

Byla provedena retrospektivní analýza klinických a laboratorních dat 122 pacientek, které podstoupily uNK imunofenotypizaci v období od dubna do prosince 2023. Pacientky byly do souboru zařazeny sousledně, k zařazovacím kritériím patřila:

1. probíhající nebo absolvovaná léčba některou z technik asistované reprodukce;
2. dostupnost relevantních anamnestických a klinických dat.

Laboratorní vyšetření

Vzorek endometria byl odebrán pipetou pro endometriální biopsii 20.–24. den menstruačního cyklu postupem dle Tersoglio et al. [7]. Vzorek byl zpracován ihned po doručení do laboratoře. Ze vzorku endometria byla vybrána vhodná část k analýze, a to kompaktní tkáň endometria bez viditelné krevní kontaminace. Tkáň byla promyta fosfátovým pufrům, osušena a zvážena. Následně byla děložní tkáň mechanicky dezintegrována a homogenizována. Obsah homogenizátoru byl přefiltrován do zkumavky přes filtr s propustností 50 μ m.

uNK imunofenotypizace byla provedena metodou průtokové cytometrie

modifikovaným postupem dle Harrity et al. [8]. K buněčné suspenzi byly přidány tyto fluorescenčními barvami značené protilátky proti povrchovým buněčným antigenům:

1. CD56 PC7 (FL5) IQ test (A21692, Beckman Coulter);
2. CD16 APC (FL6) ASRclone 3g8 (B008452110060, Beckman Coulter);
3. CD45 Chrome orange FL10 (B36294, Beckman Coulter);
4. CD3 (UCHT1) Pacific Blue™ FL (PB-514-T100, Exbio).

Po inkubaci s protilátkami byly vzorky lyzovány. Připravené zkumavky byly analyzovány na průtokovém cytometru NAVIOS (Beckman Coulter). Analýza naměřených dat byla provedena pomocí softwaru KALUZA.

Výsledky vyšetření byly hodnoceny s ohledem na referenční rozmezí normálních hodnot uNK pro danou metodu a danou laboratoř. Toto referenční rozmezí bylo stanoveno analýzou $n = 3\ 431$ nálezů všech vzorků dané laboratoře jako 5.–95. percentil naměřených hodnot následovně:

1. NK buňky (CD56+CD3–) ze všech lymfocytů: 21–60 %;
2. absolutní počet NK buněk: $0,9–8,1 \times 10^5$ /gram tkáně
3. NK CD56++ bright ze všech lymfocytů: 18–55 %;
4. T buňky (CD3+) ze všech lymfocytů: 33–71 %;
5. NKT buňky (CD3+CD56+) ze všech lymfocytů: < 8 %;
6. CD56+CD16+ z NK buněk (cytotoxické NK, NKc): 7,5–25,0 %;
7. CD56+CD16 – z NK buněk (regulační NK, NKr): 73–91 %;
8. poměr NKr/NKc (index regulační/cytotoxické NK): 3–11,5.

Statistická analýza

Data byla analyzována s pomocí softwaru MedCalc® Statistical Software v. 22.026 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgie). Test normality dat byl proveden

Tab. 1. Základní popisné charakteristiky vyšetřeného souboru 122 žen s poruchami plodnosti.

Tab. 1. Basic descriptive characteristics of the examined cohort of 122 women with fertility disorders.

Věk, roky, medián (IQR)	38,0 (34,4–40,0)
Délka trvání diagnózy neplodnosti, roky, medián (IQR)	5,9 (3,8–8,6)
BMI, medián (IQR)	23,0 (21,0–27,0)
FSH 1.–3. DC, IU/ml, medián (IQR)	8,06 (3,1–14,7)
LH 1.–3. DC, IU/ml, medián (IQR)	6,3 (3,0–14,9)
AMH, ng/ml, medián (IQR)	1,11 (0–12,8)
Počet předchozích vlastních IVF cyklů s punkcí folikulů, medián (min.–max.)	2 (1–10)
Počet předchozích embryotransferů s vlastními oocyty, medián (min.–max.)	3 (0–11)
Počet přechozích embryotransferů s donorskými oocyty, medián (min.–max.)	0,79 (0–13)
Počet předchozích spontánních potratů do 12. týdne gravidity, medián (min.–max.)	1,08 (0–7)
Parita, medián (min.–max.)	0,26 (0–2)

AMH – Anti-Müllerianý hormon, BMI – index tělesné hmotnosti, DC – den menstruačního cyklu, FSH – folikulostimulační hormon, IQR – interkvartilové rozmezí, IVF – *in vitro* fertilizace, LH – luteinizační hormon

AMH – Anti-Müllerian hormone, BMI – body mass index, DC – day of the menstrual cycle, FSH – follicle-stimulating hormone, IQR – interquartile range, IVF – *in vitro* fertilization, LH – luteinizing hormone

Shapiro-Wilksovým testem. Normalita rozložení proměnných nebyla potvrzena, proto byly dále použity neparametrické statistické metody. Spojité proměnné byly prezentovány jako mediány a mezikvartilové rozsahy (IQR), případně rozpětí minimálních a maximálních hodnot, kategoriální proměnné jako absolutní a relativní počty. K porovnání analyzovaných skupin byl použit Kruskal-Wallisův test pro spojité proměnné a Chí-kvadrát test pro kategoriální proměnné. Za statisticky významnou byla přijata hodnota $p \leq 0,05$.

Výsledky

Základní deskriptivní charakteristiky vyšetřeného souboru uvádí tab. 1.

U žen starších 35 let byly častěji použity darované oocyty ($p < 0,001$). U žen s hodnotou indexu tělesné hmotnosti (BMI) převyšující 30 kg/m^2 bylo zaznamenáno signifikantně méně gravidit po IVF ET ($p = 0,006$) a častější použití darovaných oocytů ($p = 0,017$).

Výsledky uNK imunofenotypizace $n = 122$ žen byly roztrženy do čtyř skupin takto:

1. Normální nálezy, tj. relativní a absolutní počty všech sledovaných lymfocytárních subpopulací v referenčním

rozmezí. Tato skupina je dále v textu označována jako NORMAL.

2. Nízké absolutní a relativní počty uNK při normálním poměrném zastoupení NK buněk s regulačním a cytotoxickým fenotypem (tj. s normálním indexem NKr/NKc). Tento nálezy byl hodnocen jako nedostatečná imunitní aktivace uterinního buněčného mikroprostředí a dále v textu je označován jako LOW-IMMUNE profil uNK.

3. Normální relativní a absolutní počet uNK, ale poměr uNKr/uNKc abnormálně vychýlený ve prospěch uNKc s cytotoxickým fenotypem. Tento nálezy byl hodnocen jako cytotoxické buněčné mikroprostředí a označen jako OVER-IMMUNE profil uNK.

4. Snížené celkové (absolutní, relativní) počty uNK v kombinaci s abnormálním poměrem uNKc/uNKr vychýleným ve prospěch uNKc s cytotoxickým fenotypem. Tento nálezy byl klasifikován jako smíšený a označen jako MIXED-IMMUNE profil.

Zastoupení jednotlivých uNK imunofenotypů a absolutní a relativní počty buněčných populací v jednotlivých profích uNK uvádí tab. 2.

U 48 % ($n = 57$) vyšetřených žen nebyla nalezena patologie uNK, těmto pacientkám nebyla přidána k další léčbě technikami asistované reprodukce imunointervenční terapie. Z těchto 57 žen absolvovalo do 3 měsíců od vyšetření uNK embryotransfer 43 žen (75 %).

Zbýlých 52 % ($n = 65$) vyšetřených žen vykazovalo při uNK imunofenotypizaci patologické výsledky. Z nich celkem $n = 57$ (88 %) absolvovalo do 3 měsíců od uNK imunofenotypizace embryotransfer. K embryotransferu byla indikována léčebná imunointervence, zastoupení jednotlivých léčebných protokolů uvádí graf 1.

Výsledky embryotransferu po uNK imunofenotypizaci s imunointervencí a bez imunointervence dle profilů uNK uvádí tab. 3. Vyplývá z ní, že nejvyšší míra dosažení klinické gravidity byla nalezena v léčené skupině OVER-IMMUNE, na druhém místě s jen mírně nižšími hodnotami byly výsledky v MIXED-IMMUNE skupině. Skupina LOW-IMMUNE se od neléčené NORMAL skupiny v míře dosažení klinické gravidity signifikantně nelišila (Chí-square 1,603; hodnota $p = 0,205$ na hladině významnosti 0,05), pregnancy rate v nich odpovídala

Tab. 2. Zastoupení sledovaných subpopulací lymfocytů v jednotlivých klinických skupinách.

Tab. 2. Lymphocyte subpopulations in individual clinical groups.

Populace uterinních lymfocytů	Medián (IQR)				P
	NORMAL n = 57	LOW-IMMUNE n = 12	MIXED-IMMUNE n = 28	OVER-IMMUNE n = 25	
NK buňky (CD56+CD3) ze všech lymfocytů, %	39,82 (33,04–47,04)	15,86 (13,20–16,87)	14,25 (13,36–16,72)	41,29 (36,46–52,07)	< 0,0001
absolutní počet NK buněk, 10 ⁵ buněk/gram tkáně	2,16 (0,94–4,18)	0,73 (0,32–0,99)	2,95 (1,28–5,20)	1,82 (0,53–3,8551)	0,0053
NK CD56++ bright ze všech lymfocytů, %	25,83 (26,64–45,17)	27,9 (16,33–48,20)	33,41 (25,13–42,80)	19,03 (12,02–26,15)	< 0,0001
T buňky (CD3+) ze všech lymfocytů	53,55 (44,53–61,89)	60,07 (39,08–76,36)	53,88 (49,24–67,16)	68,15 (59,44–79,41)	< 0,0001
NKT buňky (CD3+CD56+) ze všech lymfocytů, %	5,76 (3,60–7,04)	5,95 (4,03–7,82)	5,7 (4,54–6,83)	5,18 (3,90–8,35)	NS
CD56+CD16+ z NK buněk (cytotoxické NK), %	13,31 (9,63–17,30)	10,97 (8,05–14,32)	15,53 (10,44–21,0)	29,33 (25,67–33,52)	< 0,0001
CD56+CD16– z NK buněk (regulační NK), %	85,37 (81,83–89,51)	88,23 (84,25–91,15)	73,56 (67,41–78,25)	57,84 (62,77–71,72)	< 0,0001
poměr NKr/NKc (index reg/cytotox NK)	6,43 (4,70–9,30)	8,05 (5,90–11,42)	3,41 (2,69–8,41)	2,28 (1,88–2,76)	< 0,0001

NORMAL – fyziologické relativní a absolutní počty sledovaných lymfocytárních subpopulací;

LOW-IMMUNE – nedostatečná imunitní aktivace endometriálních lymfocytů, nízké absolutní a relativní počty uNK s normálním indexem NKr/NKc;

MIXED-IMMUNE – nižší celkové (absolutní, relativní) počty uNK a současně vysoké zastoupení uNKc;

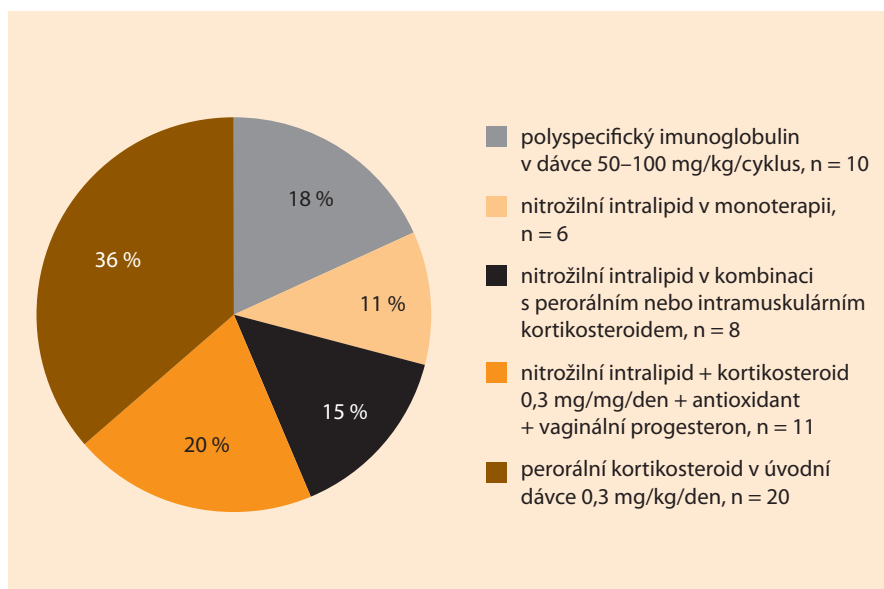
OVER-IMMUNE – cytotoxický profil uNK s normálním nebo vyšším relativní a absolutním počtem uNK, ale s poměrem uNKr/uNKc vychýleným ve prospěch uNKc (vysoké počty uNK s cytotoxickým fenotypem).

NORMAL – physiological relative and absolute lymphocyte counts;

LOW-IMMUNE – insufficient endometrial lymphocytes' immune activation, low absolute and relative numbers of uNK with normal NKr/NKc index;

MIXED-IMMUNE – low absolute/relative uNK counts with high share of uNKc;

OVER-IMMUNE – cytotoxic uNK profile with normal or high relative and absolute uNK counts, and with the uNKr/uNKc ratio deflected to uNKc (high uNK counts with cytotoxic phenotype).


Graf 1. Léčebná imunointervence u žen s patologickým uNK imunofenotypem.

Graph 1. Immune-modifying treatment in women with pathological uNK immunophenotype.

průměrné hodnotě českého registru asistované reprodukce pro medián věku 38 let [9].

Dalším sledovaným parametrem byl časný potrat po embryotransferu (zamlklý nebo spontánní potrat do ukončeného 12. týdne těhotenství). Výsledky uvádí tab. 4. Nedostatečná imunitní aktivace uterinních lymfocytů (LOW-IMMUNE profil) byla signifikantně častěji sdružena s prvotrimestrální těhotenskou ztrátou.

Míru živě narozených dětí nebylo možné do doby vzniku této práce vyhodnotit, protože některé gravidity stále probíhaly. V souvislosti s léčbou technikami asistované reprodukce a konkomitantní imunomodulační terapií je však tento údaj nevýznamný, protože těhotenství může být v celém svém průběhu

Tab. 3. Míra dosažení klinické gravidity ve sledovaných skupinách (Chí-kvadrát test).

Tab. 3. Clinical pregnancy rates in the study groups (Chi-square test).

Klinická gravidita po ET	NORMAL	LOW-IMMUNE	MIXED-IMMUNE	OVER IMMUNE	p
ano	10	5	15	14	0,0014
ne	33	7	10	6	
pregnancy rate %	34,9	41,7	60	70	

NORMAL – fyziologické relativní a absolutní počty sledovaných lymfocytárních subpopulací;

LOW-IMMUNE – nedostatečná imunitní aktivace endometriálních lymfocytů, nízké absolutní a relativní počty uNK s normálním indexem NKr/NKc;

MIXED-IMMUNE – nižší celkové (absolutní, relativní) počty uNK a současně vysoké zastoupení uNKc;

OVER-IMMUNE – cytotoxický profil uNK s normálním nebo vyšším relativní a absolutním počtem uNK, ale s poměrem uNKr/uNKc vychýleným ve prospěch uNKc (vysoké počty uNK s cytotoxickým fenotypem).

NORMAL – physiological relative and absolute lymphocyte counts;

LOW-IMMUNE – insufficient endometrial lymphocytes' immune activation, = low absolute and relative numbers of uNK with normal NKr/NKc index;

MIXED-IMMUNE – low absolute/relative uNK counts with high share of uNKc;

OVER-IMMUNE – cytotoxic uNK profile with normal or high relative and absolute uNK counts, and with the uNKr/uNKc ratio deflected to uNKc (high uNK counts with cytotoxic phenotype).

Tab. 4. Potrat do ukončeného 12. týdne gravidity po embryotransferu (Chí-kvadrát test).Tab. 4. Miscarriage before the 12th week of pregnancy after embryo transfer (Chi-square test).

n	NORMAL	LOW-IMMUNE	MIXED-IMMUNE	OVER-IMMUNE	p
sonograficky prokázaný gestační váček po ET	10	5	15	14	< 0,0001
potrat do ukončeného 12. týdne gravidity	4	4	3	3	
%	40	80	20	21	

NORMAL – fyziologické relativní a absolutní počty sledovaných lymfocytárních subpopulací;

LOW-IMMUNE – nedostatečná imunitní aktivace endometriálních lymfocytů, nízké absolutní a relativní počty uNK s normálním indexem NKr/NKc;

MIXED-IMMUNE – nižší celkové (absolutní, relativní) počty uNK a současně vysoké zastoupení uNKc;

OVER-IMMUNE – cytotoxický profil uNK s normálním nebo vyšším relativní a absolutním počtem uNK, ale s poměrem uNKr/uNKc vychýleným ve prospěch uNKc (vysoké počty uNK s cytotoxickým fenotypem).

NORMAL – physiological relative and absolute lymphocyte counts;

LOW-IMMUNE – insufficient endometrial lymphocytes' immune activation, = low absolute and relative numbers of uNK with normal NKr/NKc index;

MIXED-IMMUNE – low absolute/relative uNK counts with high share of uNKc;

OVER-IMMUNE – cytotoxic uNK profile with normal or high relative and absolute uNK counts, and with the uNKr/uNKc ratio deflected to uNKc (high uNK counts with cytotoxic phenotype).

ovlivněno řadou faktorů, které nemají žádnou souvislost s IVF a podávanou léčbou.

Přehled použitých imunointervenčních postupů dle profilu uNK ve vztahu k dosaženým hodnotám pregnancy rate uvádí tab. 5. Vyplývá z ní, že intralipidy v kombinaci s kortikosteroidy u pacientek v OVER-IMMUNE a MIXED-IMMUNE profily byly sdruženy s nejvyšší mírou dosažení klinického těhotenství.

Diskuze

Předkládaná práce je příspěvkem k diskuzi o klinickém přínosu imuno-

fenotypizace uterinních NK buněk k diagnostice a léčbě poruch plodnosti. Retrospektivně analyzuje vliv různých imunofenotypů uNK na úspěšnost léčby pomocí technik asistované reprodukce. Jedním z klíčových poznatků této studie je identifikace různých imunofenotypů uNK a jejich vliv na úspěšnost embryotransferů a průkaz signifikantně vyšší míry dosažení klinické gravidity u žen, které byly na základě výsledků vyšetření uNK léčeny personalizovanou imunomodulační terapií.

Práci tak lze zařadit po bok studie německých autorů [10] prokazující

v souboru n = 147 pacientek s habituálním potrácením na vysoké zastoupení cytotoxických NK buněk v endometriu nebo k rakousko-německé práci z roku 2020 [11], která v souboru 613 žen s habituálním potrácením a 185 žen s opakovaným selháním implantace embrya dospěla k podobným závěrům.

Naše práce navazuje na studie Ulčové-Gallové et al. z let 2017–2018 [12,13], liší se ale použitou metodou analýzy uNK. Zmíněné pracovní skupině patří v ČR ve vyšetřování uNK priorita. K vyšetření uNK použili plzeňští autoři imunohistochemickou metodu, což je technika, která

Tab. 5. Léčebné protokoly dle jednotlivých imunofenotypů uNK a dosažení klinického těhotenství.

Tab. 5. Treatment protocols according to individual immunophenotypes of uNK and achievement of clinical pregnancy.

Léčebný postup	LOW-IMMUNE	MIXED-IMMUNE	OVER-IMMUNE	Klinická gravidita, n
intralipid v monoterapii	0	4	2	4/6 (66 %)
intralipid a kortikosteroid (p.o. nebo i.m.)	0	5	3	6/8 (75 %)
intralipid + kortikosteroid p.o. + antioxidant + progesteron	0	8	3	10/11 (91 %)
kortikosteroid p.o.	0	8	12	9/20 (45 %)
polyspecifický imunoglobulin	10	0	0	5/10 (50 %)

NORMAL – fyziologické relativní a absolutní počty sledovaných lymfocytárních subpopulací;

LOW-IMMUNE – nedostatečná imunitní aktivace endometriálních lymfocytů, nízké absolutní a relativní počty uNK s normálním indexem NKr/NKc;

MIXED-IMMUNE – nižší celkové (absolutní, relativní) počty uNK a současně vysoké zastoupení uNKc;

OVER-IMMUNE – cytotoxický profil uNK s normálním nebo vyšším relativní a absolutním počtem uNK, ale s poměrem uNKr/uNKc vychýleným ve prospěch uNKc (vysoké počty uNK s cytotoxickým fenotypem).

NORMAL – physiological relative and absolute lymphocyte counts;

LOW-IMMUNE – insufficient endometrial lymphocytes' immune activation, = low absolute and relative numbers of uNK with normal NKr/NKc index;

MIXED-IMMUNE – low absolute/relative uNK counts with high share of uNKc;

OVER-IMMUNE – cytotoxic uNK profile with normal or high relative and absolute uNK counts, and with the uNKr/uNKc ratio deflected to uNKc (high uNK counts with cytotoxic phenotype).

umožňuje detekci specifických proteinů v buňkách tkáňových řezů. Tento postup zahrnuje fixaci a řezání tkáň, inkubaci s primárními a sekundárními protilátkami a vizualizaci pomocí mikroskopie a poskytuje informace o lokalizaci a expresi proteinů přímo v kontextu tkáňové architektury. Námi použitá metoda průtokové cytometrie umožňuje rychlou a kvantitativní analýzu fyzikálních a chemických vlastností buněk ve vzorku suspendovaném v kapalném médiu. Buňky procházejí proudem tekutiny přes laserový paprsek, který excituje fluorescenčně značené protilátky navázané na specifické buněčné povrchové antigeny. Detektory měří fluorescenční signály, což umožňuje stanovení počtu a typů buněk, jejich velikosti, granularity a exprese povrchových markerů. Domníváme se, že průtoková cytometrie je pro detailní a kvantitativní analýzu komplexních buněčných populací vhodnější, imunohistochemie je cennější pro lokalizaci proteinů v tkáňovém kontextu. Cytometrická analýza navíc umožňuje rychlou analýzu tisíců buněk za sekundu, což poskytuje statisticky významné množství dat v krátkém čase, poskytuje přesná kvantitativní data

o expresi sledovaných markerů, umí simultánně detekovat více markerů na jednotlivých buňkách pomocí různých fluorochromů, což umožňuje detailní fenotypizaci buněčných populací.

Přínos naší studie lze spatřovat též v tom, že analyzuje léčebné imunomodulační postupy, které byly k ovlivnění uterinního mikroprostředí použity. Naše výsledky se dosti přibližují personalizovaným léčebným postupům francouzských autorů Lédée et al. [14,15], byť samozřejmě imunologické profilování endometria provádí tato výzkumná skupina zcela odlišným způsobem [16]. Studie Lédée et al. hodnotila výsledky imunomodulační terapie v kohortě 215 žen, které byly léčeny:

- nízkodávkovým aspirinem a/nebo nízkomolekulárním heparinem;
- systémovými kortikosteroidy s aspirinem, nebo bez aspirinu, či heparinu;
- hydroxychlorochinem;
- intralipidy.

Léčené pacientky měly v této studii signifikantně vyšší míru kumulativního počtu živě narozených dětí než imunologicky neléčené ženy (43,0 vs. 34,8 %; $p = 0,04$), přičemž ženy léčené

systémovými steroidy a intralipidy měly ve srovnání s imunologicky neléčenými ženami až 2krát větší šanci na narození živého dítěte (OR 2,0 při 95% CI 1,1–3,7 pro kortikosteroidy a OR 1,8 při 95% CI 0,9–3,6 pro intralipidy).

Aktuálně již není sporu o tom, že úspěšná implantace plodu vyžaduje pečlivě řízené zapojení imunitního systému matky do procesu [17]. Jednou z možných příčin selhání implantace embrya nebo časné ztráty těhotenství mohou být aberantní imunitní funkce, avšak jasné důkazy pro klinický přínos testování dosud chybí. Je potřeba deklarovat, že existují jak studie a metaanalýzy dokládající význam uNK imunofenotypizace [18,19], ale i studie se zcela opačnými výsledky [20,21]. Evropská společnost pro humánní reprodukci a embryologii (ESHRE) proto aktuálně nedoporučuje uNK imunofenotypizaci k rutinnímu použití při diagnostice ženské neplodnosti [22]. Naše studie však naznačuje, že toto vyšetření může být přínosné v určitých klinických situacích, a to zvláště tehdy, pokud standardní diagnostické a terapeutické postupy selhávají. uNK imunofenotypizace poskytuje cenné informace

o stavu buněčné imunity v endometriu a může ovlivnit volbu léčebné strategie. Naše data naznačují, že personalizovaná léčebná imunointervence může vést k dosažení vyšší míry klinické gravidity. Tento přístup by mohl představovat nový standard péče u vybraných skupin pacientek, přispět k individualizaci léčby neplodnosti a zvýšit šanci na úspěšné těhotenství.

Naše práce má i slabá místa, ke kterým patří v první řadě relativně malý počet pacientek, a tedy možný výběrový bias, který by mohl ovlivnit výsledky. Jsme si vědomi toho, že nelze jednoznačně určit, zda byla imunomodulační terapie příčinou zlepšených výsledků, nebo zda k tomu přispěly i jiné faktory – klamná korelace (spurious correlation) může vést k chybným závěrům, pokud není pečlivě analyzována a interpretována. Obecným nedostatkem retrospektivních studií vč. naší je nemožnost randomizace a zaslepení. Nedostatečná standardizace v metodách měření a hodnocení výsledků mezi různými studii hodnotícími fenotyp uNK komplikuje srovnávání našich zjištění s jinými výzkumy. Další limitací naší práce je nedostatek dlouhodobých údajů o bezpečnosti a účinnosti použitých imunomodulačních postupů, což podtrhuje potřebu dalšího výzkumu v této oblasti.

Závěr

Naše studie přináší nové poznatky o potenciálu imunofenotypizace uNK buněk a následné imunomodulační terapie v léčbě poruch plodnosti. Prezentovaná data naznačují možné klinické přínosy, zapotřebí je však dalšího výzkumu k potvrzení těchto zjištění a k objasnění mechanismů, které vedou ke zlepšení výsledků těhotenství. Je

nutné provést rozsáhlejší a lépe kontrolované studie, které by zahrnuly větší počet pacientek a standardizovaly diagnostické a terapeutické postupy. Pouze tak můžeme získat přesvědčivé důkazy, které by mohly podpořit širší klinické použití imunofenotypizace uNK buněk a s ní spojených terapeutických intervencí v oblasti reprodukční medicíny.

Literatura

1. Cristiani CM, Palella E, Sottile R et al. Human NK cell subsets in pregnancy and disease: toward a new biological complexity. *Front Immunol* 2016; 7: 656. doi: 10.3389/fimmu.2016.00656.
2. Sharma R, Das A. Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans. *Immunol Res* 2014; 58(1): 125–131. doi: 10.1007/s12026-013-8477-9.
3. Cuadrado-Torroglosa I, García-Velasco JA, Alecsandru D. Maternal-fetal compatibility in recurrent pregnancy loss. *J Clin Med* 2024; 13(8): 2379. doi: 10.3390/jcm13082379.
4. Kofod L, Lindhard A, Hviid TV. Implications of uterine NK cells and regulatory T cells in the endometrium of infertile women. *Hum Immunol* 2018; 79(9): 693–701. doi: 10.1016/j.humimm.2018.07.003.
5. Aksu S, Çalıřkan E, Cakiroglu Y. Evaluation of endometrial natural killer cell expression of CD4, CD103, and CD16 cells in women with unexplained infertility. *J Reprod Immunol* 2016; 117: 70–75. doi: 10.1016/j.jri.2016.07.004.
6. Seshadri S, Sunkara SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014; 20(3): 429–438. doi: 10.1093/humupd/dmt056.
7. Tersoglio AE, Salatino DR, Tersoglio S et al. Normalization of endometrial histopathology and endometrial NK cells concentration predict successful pregnancy in repeated implantation failure. *JBRA Assist Reprod* 2021; 25(1): 59–70. doi: 10.5935/1518-0557.20200049.
8. Harrity C, Bereir MM, Walsh DJ et al. Moving from peripheral blood to local uterine immunophenotype analysis in patients with poor reproductive history: pilot study of a novel technique. *Ir J Med Sci* 2019; 188(3): 893–901. doi: 10.1007/s11845-018-1933-8.
9. ÚZIS ČR. Asistovaná reprodukce v roce 2020. 2020 [online]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008420/asistoreprodukce2020.pdf>.
10. Kuon RJ, Vomstein K, Weber M et al. The “killer cell story” in recurrent miscarriage: association between activated peripheral lymphocytes and uterine natural killer cells. *J Reprod Immunol* 2017; 119: 9–14. doi: 10.1016/j.jri.2016.11.002.
11. Vomstein K, Voss P, Molnar K et al. Two of a kind? Immunological and clinical risk factors differ between recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 2020; 141: 103166. doi: 10.1016/j.jri.2020.103166.
12. Ulčová-Gallová Z, Pešek M, Chaloupka P et al. Screeningové vyšetření endometriálních NK buněk u vybraných infertilních pacientek. 1. část – metodika a průběžné výsledky. *Ceska Gynecol* 2017; 82(5): 366–371.
13. Ulčová-Gallová Z, Pešek M, Haschová M et al. Výsledky léčby u vybraných infertilních pacientek s vysokou denzitou endometriálních NK buněk CD56+ a CD16+ druhá část. *Ceska Gynecol* 2018; 83(2): 115–118.
14. Cheloufi M, Kazhalawi A, Pinton A et al. The endometrial immune profiling may positively affect the management of recurrent pregnancy loss. *Front Immunol* 2021; 12: 656701. doi: 10.3389/fimmu.2021.656701.
15. Rahmati M, Lédée N. Targeted endometrial scratching: an example of endometrial diagnosis usage in reproductive medicine. *Front Immunol* 2020; 11: 589677. doi: 10.3389/fimmu.2020.589677.
16. Lédée N, Petitbarat M, Prat-Ellenberg L et al. The next frontier in ART: harnessing the uterine immune profile for improved performance. *Int J Mol Sci* 2023; 24(14): 11322. doi: 10.3390/ijms241411322.
17. Moffett A, Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum Reprod* 2015; 30(7): 1519–1525. doi: 10.1093/humrep/dev098.
18. Chen X, Marree N, Jiang L et al. Measurement of uterine natural killer cell percentage in the periimplantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: establishment of a reference range. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 217(6): 680.e1–680.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2017.09.010.
19. Marron K, Harrity C. Endometrial lymphocyte concentrations in adverse reproductive outcome populations. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36(5): 837–846. doi: 10.1007/s10815-019-01427-8.

Publikační etika: Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

Publication ethics: The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE uniform requirements for biomedical papers.

Konflikt zájmů: Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie/práce nemají žádný konflikt zájmů.

Conflict of interests: The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning the drugs, products or services used in the study.

20. Donoghue JF, Paiva P, Teh WT et al. Endometrial uNK cell counts do not predict successful implantation in an IVF population. *Hum Reprod* 2019; 34(12): 2456–2466. doi: 10.1093/humrep/dez194.

21. Salazar MD, Wang WJ, Skariah A et al. Post-hoc evaluation of peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in predicting the risk of recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures. *J Reprod Immunol* 2022; 150: 103487. doi: 10.1016/j.jri.2022.103487.

22. ESHRE Add-ons working group. Lundin K, Bentzen JG, Bozdag G et al. Good practice recommendations on add-ons in reproductive medicine†. *Hum Reprod* 2023; 38(11): 2062–2104. doi: 10.1093/humrep/dead184.

ORCID autorů

K. Černá 0000-0003-1593-5899

P. Otevřel 0009-0004-6974-3061

Š. Luxová 0009-0003-5119-7587

L. Sedláčková 0009-0005-9805-2208

Doručeno/Submitted: 7. 10. 2024

Přijato/Accepted: 10. 10. 2024

MUDr. Karin Černá

Imunologická ambulance a laboratoř

GENNET s.r.o.

Na Poříčí 26

110 00 Praha 1

karin.cerna@gennet.cz