

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd

**MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ BUNĚČNÉ IMUNITY U INFERTILNÍCH  
ŽEN**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Konzultant: Mgr. Karolína Jankovičová, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Bc. Barbora Červenková

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Karolíně Jankovičové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky, cenné rady a čas, který mi věnovala při psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za připomínky týkající se formální úpravy diplomové práce.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Bc. Barbora Červenková

Školitel: Mgr. Karolína Jankovičová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Možnosti vyšetření buněčné imunity u infertilních žen**

Laboratorní diagnostika v reprodukční imunologii prošla v posledních letech rychlým rozvojem. Protože imunologické příčiny neplodnosti a opakovaného potrácení jsou jedny z nejčastějších, zabývá se tato práce vlivem různých faktorů na buněčnou imunitu. Hodnotí přítomnost protilátek vliv klinických dat a kvality ejakulátu partnerů na buněčnou imunitu vyšetřovaných žen. Také jsou srovnávány dva diagnostické postupy k hodnocení buněčné imunity, a to dlouhodobě prováděný test inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny spermií a trofoblastu a novější test aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu hodnocený průtokovou cytometrií. NK buňky hrají významnou roli v etiologii opakovaného potrácení, proto je sledována úroveň jejich aktivity.

U hodnoceného souboru 305 infertilních žen vyšetřených v letech 2009 až 2011 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové na Ústavu klinické imunologie a alergologie byla nalezena spojitost mezi výskytem antifosfolipidových protilátek a aktivovanou buněčnou imunitu sledovaných žen a dále vliv kvality ejakulátu partnerů na buněčnou imunitu vyšetřovaných žen. Při srovnávání dvou výše zmíněných diagnostických testů byl objeven vztah mezi testem inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny spermií a testem aktivace NK s antigeny spermií. Ženy s přítomností inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií mají rovněž častěji vyšší procento aktivace NK buněk.

*Klíčová slova:* buněčná imunita, infertilita, NK buňky, test aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu, test inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny spermií a trofoblastu.

## **Abstract**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Bc. Barbora Červenková

Supervisor: Mgr. Karolína Jankovičová, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Possibilities of Cell Mediated Immunity Examination in Infertile Women**

Laboratory diagnostics in reproduction immunology has fast progressed during the last years. This work is focused on influence of various factors on cell mediated immunity, because immunological reasons of infertility and recurrent spontaneous abortions are one of the most often. It evaluates influence of presence of antibodies, clinical data and partner's ejaculate quality on cells mediated immunity of examined women. It also compares two diagnostics procedures to evaluate cells mediated immunity, the long-term migration-inhibition leukocytes test under agarosis with sperm's and trophoblast's antigens and the later NK cells activation test with sperm's and trophoblast's antigens analysed by flow cytometry. NK cells play an important role in etiology of recurrent spontaneous abortions, and that is why we observe their activation level.

By the evaluated set of 305 infertile women, who were examined between years 2009 and 2011 in the Clinical Immunology and allergology department of the Hradec Králové's Faculty Hospital, has been found relations between antiphospholipides antibodies appearance and activated cells mediated immunity of observed women and partner's ejaculate quality influence on cells mediated immunity of examined women as well. After comparison of two above mentioned diagnostics tests the relations between the migration-inhibition leukocytes test under agarosis with sperm antigens and the NK cells activation test with sperm antigens have been found. The women with leukocytes migration inhibition with sperm antigens have more often higher ratio of the NK cells activation.

*Keywords:* cell mediated immunity, infertility, NK cells, NK cells activation test with sperm and trophoblast antigens, migration-inhibition test with sperm and trophoblast antigens.

## Obsah

1 Zadání diplomové práce-cíl práce.....	7
2 Úvod.....	8
3 Teoretická část .....	9
3.1 Buněčná biologie oplodnění.....	9
3.2 Imunologie těhotenství.....	11
3.2.1 Úloha NK buněk v těhotenství .....	13
3.2.1.1 Periferní NK buňky.....	14
3.2.1.2 Děložní NK buňky .....	14
3.2.2 Úloha dalších imunitních buněk v těhotenství .....	15
3.3 Infertilita a její příčiny .....	16
3.3.1 Genetické příčiny infertility .....	16
3.3.2 Anatomické příčiny infertility .....	17
3.3.3 Hormonální příčiny infertility .....	17
3.3.4 Infekční onemocnění a infertilita.....	18
3.3.5 Toxické vlivy na těhotenství .....	18
3.3.6 Imunologické příčiny infertility .....	18
3.3.6.1 Protilátky.....	19
3.3.6.2 Cytokiny.....	24
3.3.6.3 Buněčná imunita .....	25
3.4 Vyšetření prováděná u neplodných párů.....	27
3.4.1 Vyšetření prováděná k identifikaci imunologických příčin neplodnosti u muže .....	28
3.4.2 Vyšetření prováděná k identifikaci imunologických příčin opakovaného potrácení a neplodnosti u ženy .....	29
4 Materiál a metodika .....	31
4.1 Inhibice migrace leukocytů pod agarózou .....	31
4.1.1 Materiál, pomůcky, přístroje .....	31

4.1.2 Pracovní postup .....	33
4.2 Aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu .....	38
4.2.1 Materiál, pomůcky přístroje .....	39
4.2.2 Pracovní postup .....	39
5 Výsledky .....	42
5.1 Statistická charakteristika souboru.....	42
5.2 Srovnání výsledků testu inhibice migrace leukocytů pod agarózou a testu aktivace NK buněk .....	45
5.3 Vztahy mezi buněčnou imunitou žen a protilátkami.....	49
5.4 Vztahy mezi buněčnou imunitou žen a ejakulátem partnerů .....	52
6 Diskuze .....	58
7 Závěr .....	61
8 Seznam zkratk .....	62
9 Literatura.....	64

## **1 Zadání diplomové práce - cíl práce**

- Seznámit se s laboratorním postupem vyšetření buněčné imunity u infertilních žen.
- Srovnat výsledky testů hodnotících aktivaci buněčné imunity. Test inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií a trofoblastu s testem aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu.
- Zhodnotit vztahy sledovaných parametrů a buněčné imunity u infertilních žen vyšetřených od roku 2009 do roku 2011 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové na Ústavu klinické imunologie a alergologie.
- Vyhodnotit vliv klinických ukazatelů na aktivaci buněčné imunity v souboru sledovaných žen.
- Vyhodnotit vztah pozitivitu různých typů autoprotilátek a aktivace buněčné imunity v souboru sledovaných žen.
- Vyhodnotit vztah kvality ejakulátu partnerů a aktivace buněčné imunity v souboru sledovaných žen.



## 2 Úvod

Těhotenství a oplodnění (fertilizace) vyžaduje nejen toleranci imunitního systému matky vůči plodu, ale také jeho podporu. Tato tolerance je zajišťována složitými imunoregulačními mechanismy ze strany matky, trofoblastu i plodu. Narušení této rovnováhy může vést k neschopnosti otěhotnět nebo k potracení plodu.

Jako příčina opakovaného potracení se uvádí anatomické příčiny, genetické příčiny, toxické příčiny, hormonální příčiny, infekční příčiny a v neposlední řadě imunologické příčiny. Imunologické příčiny jsou nejčastějším důvodem opakovaného potracení. Práce se proto zabývá mechanismem účinku aktivovaných NK buněk jakožto prokázané příčiny ztráty těhotenství. Na patologické aktivaci buněčné imunity (NK buněk) se může podílet celá řada faktorů jako je systémové autoimunitní onemocnění, infekční onemocnění, ale také kvalita spermií partnera.

V této práci je hodnocena buněčná imunita u infertilních žen vyšetřených v letech 2009 až 2011 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové na Ústavu klinické imunologie a alergologie a její vztah k protilátkám, klinickým údajům (věk prodělané IVF a INS pokusy, přítomnost infekčního onemocnění v době vyšetření) a kvalitě spermií partnerů vyšetřených žen. Také jsou porovnávány výsledky dvou diagnostických postupů určených ke stanovení míry aktivace buněčné imunity. Jedná se o test inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny spermií a trofoblastu zavedený do praxe před více než 20 lety a novější test aktivace NK buněk za užití průtokové cytometrie rovněž s antigeny spermií a trofoblastu. Cílem práce bylo zhodnotit výsledky těchto testů a posoudit, zda je některý vhodnější na stanovení aktivace buněčné imunity.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Buněčná biologie oplodnění

Během oplodnění dochází ke spojení dvou haploidních gamet s odlišnou genetickou výbavou (obr. 1). Tyto gamety jsou produkovány v unikátním mikroprostředí ovariálního folikulu a v testikulárním semenotvorném epitelu.

Konečným produktem spermatogeneze je vysoce polarizovaná spermie skládající se z oblasti hlavičky, která obsahuje jádro, jedinou sekreční granuli - akrozom, který vzniká při spermatogenezi splynutím váčků Golgiho aparátu, a bičíku obsahující řady mikrotubulů. Po uvolnění ze semenotvorného epitelu ve varleti je spermie transportována skrz nadvarle, kde dochází k další biochemické a funkční modifikaci.

Největší lidská buňka, vajíčko, během ovulace vstupuje do vejcovodu. Vajíčko má svá specifika, za prvé, zastaví svůj buněčný cyklus v metafázi druhé meiózy, za druhé, extracelulární matrix vajíčka, čili zona pellucida obsahuje tři glykoproteiny (ZP1, ZP2 a ZP3), které jsou syntetizovány a vylučovány oocytem, za třetí, cumulus oophorus se skládá z několika vrstev ovariálních folikulárních granulózních buněk začleněných do extracelulární matrix složené z kyseliny hyaluronové.

Spermie získávají schopnost oplodnit vajíčko procesem kapacitace během migrace ženským reprodukčním traktem. Kapacitovaná spermie penetruje cumulus oophorus, dostane se do kontaktu se zona pellucida a ta podstoupí reakci s akrozomem, jedná se o kalcium-dependetní jev. Po dokončení akrozomové reakce spermie penetruje zona pellucida, nakonec se kontaktuje a spojí s plasmatickou membránou vajíčka.

Kapacitace se skládá z počtu procesů včetně funkčního spojení signálních drah, které regulují iniciační reakci akrozomu ZP3 proteinem. Jedná se také o změny v motilitě bičíku, které mohou být požadovány k penetraci zona pellucida. Fúze spermie a vajíčka je doprovázena změnami metabolismu, fyzikálních charakteristik membrány, změnami stavu fosforylace proteinů, zvýšením intracelulárního pH a hodnoty kalcia a hyperpolarizací membránového potenciálu. Některé faktory mohou řídit kapacitaci *in vitro*: uvolnění cholesterolu z membrány spermie je zprostředkován sterol vázajícími proteiny. Reorganizace membrány spermie po vyčerpání cholesterolu může být časný krok v procesu kapacitace. Řada proteinů spermie je fosforylována na tyrozinu prostřednictvím cAMP-dependentního mechanismu. Zvýšení intracelulárního pH a hladiny bikarbonátu spojeného s produkcí cAMP, může aktivovat nukleotidové kanály, které jsou přítomny v bičících spermii, a jsou spojeny s řízením motility bičíku.

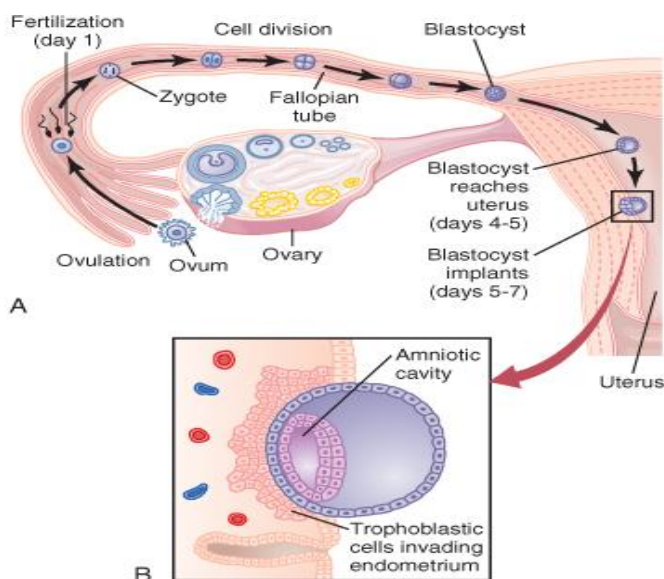
*In vivo*, je pravděpodobná rozmanitá spolupráce mnoha faktorů zprostředkujících kapacitaci spermie. Sterol-vázající proteiny, jako lipoprotein o vysoké hustotě, jsou přítomny ve vejcovodu a mohou akcelarovat vyplavování cholesterolu ze spermií. Navíc také progesteron může regulovat některé aspekty kapacity. Tento steroidní hormon je přítomný v prostředí vejcovodu, pochází jak z folikulární tekutiny, tak ze sekrece buněk cumulus oophorus spojených s vajíčkem.

Kapacitace je nezbytný krok pro navázání spermie na zona pellucida. První adheze spermie na zona pellucida je zprostředkována ZP3, základním proteinem zona pellucida, který se váže na receptory na přední straně hlavičky spermie v místě neporušeného akrozomu. Izolovaný ZP3 má schopnost vázat přímo spermie a funguje jako kompetitivní inhibitor adheze. Naproti tomu ostatní glykoproteiny zona pellucida, ZP1 a ZP2, postrádají tuto aktivitu. ZP3 stimuluje spouštěče akrozomální reakce na spermiích vázající se na zona pellucida. ZP3 oligosacharidy odpovídají za adhezi, ale nejsou dostačující pro řízení akrozomální reakce. Prvotní reakce po vazbě ZP3 a spermie je signální transdukce mající za následek přechodný vstup kalcia a aktivaci G proteinů,  $G_{11}$  a  $G_{12}$ . Tyto počáteční pochody vyvolávají aktivaci fosfolipázy C (PLC) a zvýšení intracelulárního pH, což má za následek trvalý vstup kalcia, který přímo řídí exocytózu. Před exocytózou kapacitovaná spermie může penetrovat cumulus oophorus a selektivně adherovat na zona pellucida, ale akrozomální reakce je nezbytný krok pro schopnost spermie splynout s plazmatickou membránou vajíčka.

Po penetraci zona pellucida spermie adheruje a spojí se s plazmatickou membránou vajíčka. Do adheze spermie-vajíčko jsou zapojeny spermatický fertilin- $\alpha$  (známý také jako ADAM1 a disintegrin and metalloproteinase 1), fertilin- $\beta$  (ADAM2) a cyritestin (ADAM3), stejně jako i CRISP1 (cysteine-rich secretory protein 1). Integryny nalezeny na povrchu vajíčka jsou považovány za receptory pro spermatické ADAMs. Ve vajíčku je s integrinem asociovaný protein, tetramerní CD9, který je důležitý pro interakci spermie-vajíčko.

Aktivace vajíčka nastává po fertilizaci a zahájení embryonálního vývoje. V počátku aktivace vajíčka dochází k zvýšení koncentrace cytozolického kalcia. Malé výkyvy v koncentraci kalcia jsou zajišťovány  $\text{InsP}_3$  (inositol-1,4,5-trifosfát) přes aktivaci  $\text{InsP}_3$  receptorů v endoplazmatickém retikulu. Zvýšení koncentrace cytozolického kalcia indukuje výstup z meiotické vazby, postup do mitózy a exocytózu kortikálních granulí, jejichž obsah modifikuje zona pellucida před možnou fertilizací další spermií.

Aktivace vajíčka později zahrnuje syntézu maternální mRNA pro translaci, změny v proteinové syntéze a aktivaci zygotického genomu. (Evans, a další, 2002)



© Elsevier. Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology 11e - www.studentconsult.com

Obr. 1 Průběh fertilizace.

([fyziologie.lf2.cuni.cz/uceni/Fyziologie%20tehotenstvi.ppt](http://fyziologie.lf2.cuni.cz/uceni/Fyziologie%20tehotenstvi.ppt))

### 3.2 Imunologie těhotenství

Za 3 dny po oplození se zygota, která již prošla několika děleními a má charakter moruly, dostává do děložní dutiny. Embryo ve fázi moruly má stále ještě zachovanou zonu pellucidu, ke které přiléhá budoucí trofoblast. V děloze se diferencuje vnitřní cytotrofoblast a zevní syncytiotrofoblast a vzniká tak blastocysta. Šestý den po oplození dochází k následné implantaci blastocysty. Místem implantace je nejčastěji zadní stěna dělohy.

Implantace je složitý, několikastupňový proces, který začíná adhezí embrya. V tomto kroku se uplatňují adhezivní molekuly jako jsou: E-cadherin, P-cadherin, konexiny a integriny. Následuje interakce buněk endometria a trofoblastu, kde je významná interakce NK buněk a HLA-G. Po překonání mucinové bariéry a průniku trofoblastu, za účasti štěpících enzymů (metaloproteinázy, kolagenázy, stromolyzin, plazmin) a adhezních molekul (selektiny), dochází k proliferaci a syncytializaci trofoblastu za účasti růstových faktorů a cytokinů. Posledním krokem je decidualizace provázena intenzivní angiogenezí. (Nouza, a další, 2007)

Ze syncytiotrofoblastu vyrůstají výběžky (choriové klky), které se zanořují do hypertrofující děložní sliznice. Zbujelá děložní sliznice mezi blastocystou a děložní svalovinou se nazývá decidua basalis a jejím rozvojem a narůstáním choriových klků vzniká placenta. V tomto procesu sehrává významnou roli trofoblast, jež zajišťuje styčnou pluchu mezi vajíčkem a sliznicí dělohy. Důležitou úlohu při kontaktu vajíčka se sliznicí dělohy mají trofoblastové buňky, jejichž povrchová výbava zajišťuje nízkou imunogenost a vysokou odolnost k matčině vypuzovací imunitní reakci.

Na syncytiotrofoblastu nejsou exprimovány klasické znaky HLA I. a II. třídy, působící jako aktivátory aloimunitní reakce. Místo toho jsou zde exprimovány nepolymorfni HLA znaky E, F a G, které neindukují imunitní odpověď matky a nejsou citlivé na útok matčiných cytotoxických lymfocytů. HLA-G je neklasická HLA molekula s typickou strukturou skládající se z těžkého řetězce a beta-2-mikroglobulinu. HLA-G plní regulační úlohu při ovlivnění imunity na fetomaternálním rozhraní, především tlumí aktivitu NK buněk reakcí s jejich KIR (Killer-Inhibiting Receptors). Tyto receptory byly zatím prokázány jen na lidských buňkách. Jedná se o inhibiční receptory imunoglobulinové skupiny. Jejich inhibiční činnost je založena na asociaci s cytoplazmatickými fosfatázami, rušícími signalizační dráhy zahájené stimulačními receptory s vlastní proteinkinázovou aktivitou. O tom, zdali se NK buňka aktivuje či nikoliv, rozhoduje převaha buď stimulačních nebo inhibičních signálů. (Hořejší, a další, 2009; Szekeres, 2002)

Na cytotrofoblastu jsou exprimovány specifické diferenciacní znaky, ty jsou ale za fyziologických podmínek slabě imunogenní. Na rozhraní matka plod, také působí antikomplementární působky (např. CD46, CD55, CD59), které mají za úkol zbavovat cytotoxické protilátky jejich aktivity. Embryo je rovněž pro svůj úspěšný vývoj vybaveno množstvím aktivních ochranných a podpůrných humorálních mechanismů (např. EPF – faktor časného těhotenství, alfa – fetoprotein, trofoblastový hCG, progesteron – induced blocking factor PIBF) a mnoho dalších. Tyto látky inhibičně působí na matčin imunitní systém a stupňují odolnost buněk trofoblastu a fétu. (Nouza, a další, 2007)

Na imunodepresi se podílí i četné humorální mechanismy např. transformační růstový faktor (TGF tumor growth factor), embryonální cytokiny (CSF – 1, GM – CSF, IL-3). Významnou roli hraje také zonální těhotenská bílkovina, jež snižuje aktivitu T-lymfocytů, těhotenský protein PP 14, který tlumí odpověď lymfocytů na antigenní podněty, inhibitory embryotoxických prostaglandinů (PGF 2) a ochranné prostaglandiny E2. (Nouza, a další, 2007)

Na supresi imunity během těhotenství se významně podílí také hormony např. kortizol, který je v graviditě produkován až 10x více, progesteron a estrogény, které se koncentrují na rozhraní matka plod. Významný je přesun v subpopulacích Th lymfocytů směrem k tlumivým Th2. Na tomto procesu se podílí progesteron, prostaglandin E2 a interleukiny 4 a 10. (Zhang, a další, 2010; Luppi, a další, 2002)

Mimo uvedené mechanismy je plod chráněn také pevnými bariérami (plodové obaly, plodová voda). V patologických případech nemusí dojít k dostatečnému imunologickému zajištění vývoje embrya plodu, což má za následek potrat plodu. (Ulčová-Gallová, 2006)

### 3.2.1 Úloha NK buněk v těhotenství

NK buňky jsou velké granulární lymfocyty, které nejsou ani z T ani z B buněčné linie. Exprimují CD16 a CD56 a neexprimují CD3. Funkce NK buněk je přímo zabíjet virem infikované buňky a produkovat cytokiny zajišťující rychlou, ale relativně nespecifickou odpověď na infekci. Další funkcí NK buněk je včasná likvidace nádorových buněk. NK buňky jsou bohatě prezentovány v děloze v čase implantace, a jsou v blízkém kontaktu s placentárními trofoblastovými buňkami. (Wold, a další, 2005; Moffett, a další, 2004)

NK buňky se tedy nalézají jak v periferní krvi, tak v děložní mukóze. Nicméně mezi NK buňkami prezentovanými na těchto dvou místech je důležitý fenotypový a funkční rozdíl. V periferní krvi se nachází NK buňky CD56<sup>dim</sup> i CD56<sup>bright</sup>, hlavní populaci tvoří CD56<sup>dim</sup> NK buňky. CD56<sup>bright</sup> NK buňky jsou převážně prezentovány v decidui, ačkoliv relativně malá populace je přítomna i v cirkulaci. NK buňky vykazují srovnatelnou polaritu ve svém profilu cytokinové sekrece jako Th1/Th2 lymfocyty (v těhotenství je převaha Th2 cytokinů, Th1 cytokiny jsou abortivní, Th2 cytokiny jsou protektivní a napomáhají udržení těhotenství). Repertoár cytokinů NK buněk periferní krve převážně odpovídá cytokinům typu 1, jako jsou IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$ . Nicméně NK buňky mohou indukovat produkci cytokinů typu 2, jako jsou IL-4, IL-5 a IL-13. Během těhotenství převažuje produkce cytokinů typu 2 a to přednostně v NK buňkách a NKT buňkách, ve srovnání s produkcí cytokinů T-helper lymfocyty nebo cytotoxickými T-lymfocyty. (Carolis, a další, 2010; Fukui, a další, 2008; Rai, a další, 2005)

### 3.2.1.1 Periferní NK buňky

Většina periferních krevních buněk je CD56<sup>dim</sup> a exprimuje vysokou densitu CD16. Tato densita se nevychyluje během menstruačního cyklu. Během těhotenství je počet periferních NK buněk a jejich funkční aktivita potlačena. (Rai, a další, 2005)

NK buňky jsou součástí vrozeného imunitního systému, rychle odpovídají na různou škálu inzultů prostřednictvím sekrece cytokinů a cytolytickou aktivitou. Membránový znak CD69 je jeden z nejčasnějších markerů povrchové aktivace NK buněk. PNK buňky jsou kontrolovány především aktivačními a inhibičními receptory. PNK buňky se nevyznačují jenom přímým cytotoxickým a antivirovým působením, nejsou výhradními zabijáky, ale mohou také působit jako regulátory adaptivní imunity např. interakcemi a poskytováním stimulačních signálů pro komponenty adaptivního imunitního systému včetně T-lymfocytů a dendritických buněk. PNK buňky hrají podstatnou roli jako dohlížející buňky nad cizími buňkami, při tvorbě nádoru a při virové infekci. Rozpoznávají chybějící nebo odlišnou expresi HLA I molekul. (Carolis, a další, 2010; Rai, a další, 2005)

### 3.2.1.2 Děložní NK buňky

Nejvýznamnější charakteristikou děložní mukózy během reprodukčního života je přítomnost velké populace NK buněk. Velký počet NK buněk není charakteristikou normálních solidních tkání. Málo se vyskytují ve slezině, játrech, plicích a střevě. UNK (děložní NK buňky) buňky mají fenotyp CD56<sup>bright</sup>, CD16<sup>-</sup>, který je rozdílný od NK buněk v periferní krvi (CD56<sup>dim</sup>, CD16<sup>+</sup>). UNK exprimují vysoké množství CD56 a jsou směřovány k sekreci cytokinů. UNK buňky jsou převládající leukocytární populací v endometriu a částečně v decidua basalis na implantační straně. (Rai, a další, 2005; Parham, 2004)

Počet uterinních NK buněk se mění během menstruačního cyklu. Není-li žena těhotná je počet UNK buněk v endometriu různý v závislosti na fázi menstruačního cyklu, nejnižší počet bývá ve folikulární fázi cyklu, roste po ovulaci a dosahuje vrcholu v pozdní luteální fázi. Ke konci menstruačního cyklu dochází ke snížení hladiny progesteronu a přibližně dva dny před menstruačním odlučováním endometria prodělají UNK buňky změnu jádra podobnou apoptotické buněčné smrti. (Carolis, a další, 2010; Wold, a další, 2005)

Jestliže dojde k otěhotnění, UNK buňky expandují a kumulují se v děloze až do středu gestačního období. V časném těhotenství se UNK buňky akumulují jako hustý

infiltrát okolo trofoblastové spirální arterie. V tomto období NK buňky tvoří přibližně 70 % celkové leukocytární populace v decidui. Přítomnost NK buněk v decidui je charakteristická pouze pro časně těhotenství, protože klesnou zhruba po 20 týdnech gestace a chybí v terminální decidui. Rozšířená UNK populace pak hraje důležitou roli při produkci cytokinů podporujících trofoblast a placentární růst, stejně tak při vaskularizaci decidui. Formování spirálních arterií v endometriu je realizováno za podpory IFN- $\gamma$ . Bylo prokázáno, že deficit IFN- $\gamma$  ve sliznici se projevil jako preeklamptický stav. Jak bylo uvedeno výše, UNK buňky hrají roli v placentární vaskulární remodelaci. Jeden z nejvíce aktivovaných genů v UNK buňkách kóduje galectin-1 (gal1), který indukuje apoptózu aktivovaných CD8 T-lymfocytů a indukuje posun k Th2 cytokinům. UNK buňky se mohou během produkce imunomodulačních molekul účastnit na tvorbě lokálního imunopresivního fetomaternálního rozhraní. (Carolis, a další, 2010; Wold, a další, 2005)

Koopman a další, (2003) byli schopni demonstrovat, že UNK buňky mají imunoregulační potenciál, který periferní NK buňky nemají. To naznačuje, že UNK buňky buď reprezentují rozdílnou subpopulaci cirkulujících NK buněk, nebo že podstoupily tkáňově specifickou diferenciaci.

Jones a další, (2004) dokázali, že v endometriu bylo přítomno 9 velmi početných chemokinů: monocyte chemotactic protein-3, eotaxin, fractlakine, macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ , 6CKine, IL-8, hemofiltrate CC chemokine-1 a 4, a macrophage-derived chemokine. Tyto údaje podpořily myšlenku, že deciduální deriváty chemokinů přitahují prekurzory NK buněk do endometria. Tyto NK buňky podstupují následnou diferenciaci/aktivaci deciduálními nebo trofoblastovými faktory (IL-15 nebo prolaktin) pro vytvoření děložního fenotypu.

### **3.2.2 Úloha dalších imunitních buněk v těhotenství**

Mimo ústřední roli NK buněk se v procesu fertilizace uplatňují i další buňky imunitního systému, mezi které patří deciduální makrofágy a T-lymfocyty, které představují více než 20 % a 10 % samostatného leukocytárního děložního poolu.

NKT buňky zahrnují heterogenní podskupinu T-lymfocytů charakterizovanou expresí markerů, jak T-lymfocytů, tak i NK buněk. Tyto buňky jsou neobvyklý subset  $\alpha\beta$  T-lymfocytů schopný produkovat Th1 i Th2 cytokiny. Tato malá podskupina T-lymfocytů moduluje jak vrozenou, tak adaptivní imunitní odpověď. Nejvíce studované NKT buňky jsou klasické NKT buňky známé také jako Typ I nebo iNKT buňky. Tyto



NKT buňky rozpoznají glykolipidy prezentované monomorfní třídou I MHC, jako je glykoprotein CD1d. Přesněji, klasická NKT buňka je charakterizována svým rozpoznáním CD1d ligandu. Rozpoznávání je zprostředkováno přes semi-invariantní T-lymfatický receptor (TCR), sestávající se z invariantního TCR alfa řetězce preferenčně spojeným s variabilním TCR beta řetězcem.

Klasické NKT buňky jsou buď CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> nebo CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN-double negative). Lidské CD4<sup>+</sup> a DN buňky jsou funkčně odlišné, v DN populaci je charakteristický převládající Th1 vzorec cytokinové sekrece, zatím co CD4<sup>+</sup> populace produkuje Th1 i Th2 cytokiny. Nejtypičtější NKT buňky jsou CD161 (NK1,1)<sup>+</sup>. (Boyson, a další, 2008)

### **3.3 Infertilita a její příčiny**

Nesprávně regulovaná imunita na fetomaternálním rozhraní má značný podíl na některých typech sterilit, opakovaných časných potratech i na selhání embryotrasferu. Přibližně 70 % až 80 % oplodnění končí neúspěšně z hlediska životaschopnosti plodu. Potratem pak končí 15 % až 38 % těhotenství. Diagnóza infertilita je stanovena na základě potracení dvou a více plodů v prvním trimestru, k takové situaci dochází u 0,8 % až 3 % fertálních žen. Ve většině případů jde o kombinaci několika příčin (anatomické, genetické, hormonální a infekční), přičemž imunopatologické mechanismy jsou příčinou potratů v 40-60 % případů, především u žen se systémovými poruchami imunity. (Nouza, a další, 2007)

#### **3.3.1 Genetické příčiny infertility**

V tomto případě se jedná zejména o morfologické poruchy chromozomů u rodičů (aneuploidie, polyploidie, delece, zlomy, translokace) a funkční poruchy genů (polymorfismus genů faktoru V Leiden, protrombinu, fibrinogenu s následnou trombofilií). Dále může být prokázáno chybění některých genů např. pro LIF, IL-11R alfa, Ca vázící D9K nebo narušení některých genů jako např. genu pro nespecifický supresor beta či splicing faktor SC35. Také zvýšené aktivity některých genů např. pro TLR8, CD14, STAT1, se mohou podílet na geneticky podmíněné infertilitě. Klíčové jsou geny pro HLA-DR3 a HLA-G. HLA DR se nachází v oblasti HLA-D na 6. chromozomu, která je nejbližší k centromere. Tři páry genů lokusů HLA-DR, -DQ, -DP kódují  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce HLA antigenů II. třídy, které se podílejí na regulaci imunitní odpovědi. Např. HLA-DR3 alela bývá asociována s autoimunitními chorobami jako je např. celiakie, myastenia gravis, systémový lupus erytematodes, juvenilní diabetes a další. HLA-G je nekla-

sická molekula vyskytující se na povrchu buněk trofoblastu. HLA-G hraje významnou roli v imunitní toleranci těhotenství. (Nouza, a další, 2007)

### **3.3.2 Anatomické příčiny infertility**

Nejčastější anatomickou příčinou infertility bývají vrozené anatomické odchylky dělohy. Příčinou může být také poškozené endometrium po prodělaném zánětu nebo po rozsáhlém nitroděložním výkonu. Z vrozených anatomických poruch jsou nejčastější vadné splynutí Müllerova vývodu (uterus unicornis), ageneze dělohy, přechodné tvary děložní (uterus tricuspidalis, T-děloha) a děložní hypoplazie. K získaným anatomickým poruchám patří stavy po resekčních výkonech v dutině děložní. (Nouza, a další, 2007)

### **3.3.3 Hormonální příčiny infertility**

Nejčastější příčinou infertility z hormonálních důvodů bývá hyperandrogenismus a porucha poměru luteinizačního hormonu a folikuly stimulujícího hormonu, což se vyskytuje u polycystózy ovarií, u tohoto onemocnění dochází v 57 % k hypersekreci luteinizačního hormonu. Významnou roli sehrává také nedostatek estrogenů v luteální fázi, dále pak nedostatek hCG a růstového faktoru podobného inzulinu. Nízká hladina progesteronu způsobuje nedostatek imunoregulačního PIBF (progesteron-induced blocking factor). Nadbytek hormonu prolaktinu, jeho receptorů a androgenů vede k negativnímu účinku na ovulaci i na implantaci zárodku. (Nouza, a další, 2007)

Těhotenství mohou ohrožovat i mnohá další endokrinní onemocnění, především onemocnění štítné žlázy. Štítná žláza je v období těhotenství vystavena vyšším nárokům a její hormony jsou důležitým faktorem diferenciací buněk během nitroděložního vývoje. V prvním trimestru gravidity se zvyšuje hCG, ten je stimulatorem tvorby tyreoidálních hormonů, které zajišťují správný vývoj mozkové kůry (11-14. týden). Onemocnění štítné žlázy mohou mít vliv jak na těhotnou ženu, tak i na plod. Nejzávažnější je hypotyreóza s autoprotilátkami jako jsou např. protilátky proti tyreoidální peroxidáze, pozitivita u těhotných je kolem 11 %, nebo protilátky proti tyreoglobulinu. Hypotyreóza může způsobit preeklampsii, nízkou porodní váhu plodu, abrupci placenty, častý výskyt spontánních potratů a perinatální úmrtnost. Autoimunitní tyreoiditida je jedna z nejčastějších negynekologických chorob vyskytujících se u neplodných žen.

Komplikace v těhotenství může způsobit také neléčená Gravesova-Basedowova tyreotoxikóza, která vzniká na autoimunitním podkladě. Je potřeba ji odlišit od přechodné těhotenské tyreotoxikózy, která nemá zásadní vliv na průběh těhotenství. Na infertilitě se mohou také podílet myasthenia gravis, hyperprolaktinémie, diabetes melli-

tus a další. Toxický vliv na embryo má také endometrióza, která vyvolává deregulaci genů embrya. (Martínková, a další, 2007; Springer, 2010a; Springer, 2010b)

### **3.3.4 Infekční onemocnění a infertilita**

Negativní roli v těhotenství mohou sehrát záněty a infekce, postihující především pochvu, děložní čípek nebo samotnou dělohu. Zde se může vyskytnout zánět ze zavedeného kontracepčního tělíska, dále to mohou být příčiny periovariální a tubální (mimoděložní těhotenství). Poruchu implantace mohou způsobit záněty endometria a bakteriální toxiny. Tyto pochody mohou mít své imunologické důsledky jako je aktivace deciduálních makrofágů, T-lymfocytů, NK buněk, zvýšení úrovně prozánětlivých a embryotoxických cytokinů.

Mezi nejnebezpečnější mikroorganismy způsobující závažné infekce ohrožující těhotenství patří: mykoplasmata, ureaplasmata, toxoplasmata, trichomonády, chlamydie, listerie, viry CMV, EBV, rubeoly, chřipky, spalniček, herpetické viry, parvoviry B19, ale i běžné mykózy mohou aktivovat imunitu v pohlavním systému ženy. (Nouza, a další, 2007)

### **3.3.5 Toxické vlivy na těhotenství**

Mimo jiné i toxické faktory mohou negativně ovlivnit průběh těhotenství. Proto je nutné se jim v průběhu těhotenství vyhýbat. Jedná se zejména o různé druhy léčivých přípravků. U všech léčivých přípravků je uvedena jejich použitelnost v době těhotenství. Těhotenství ovlivňují také návykové látky např. alkohol, který negativně působí na vývoj gamet a embrya, ale také má inhibiční vliv na syntézu progesteronu. Také nikotin negativně působí na implantaci embrya. Podle údajů American Society for Reproductive Medicine z roku 2003 je kouření 15 cigaret denně příčinou nejméně dvojnásobného snížení úspěšnosti embryotrasferu při IVF. (Nouza, a další, 2007; Mlynarcikova, a další, 2005)

### **3.3.6 Imunologické příčiny infertility**

Imunologické příčiny jsou významnými činiteli v etiologii opakovaného potratu. Případů, kdy je imunita příčinou potratu je podle různých autorů 40 % až 60 %. Významnou roli zde hrají různé druhy protilátek, jak autoprottilátky tak i aloprottilátky, cytokiny a v neposlední řadě se na opakovaných potratech může podílet i buňkami zprostředkovaná imunita. (Nouza, a další, 2007; Krajčovičová, a další, 2007)

### 3.3.6.1 Protilátky

Uplatňují se zde zejména protilátky proti spermiím, proti orgánově specifickým antigenům invazivního trofoblastu, autoprottilátky proti zona pellucida, proti cévám mateřské části placenty, proti fosfolipidům a mnoha dalším strukturám.

Na opakovaných potratech se podílí řada autoimunitních onemocnění, jedná se zejména o systémový lupus erythematoses a příbuzné autoimunitní choroby jako je dermatomyozitida, Sjögrenův syndrom, vaskulitidy, chronická aktivní hepatitida, roztroušená skleróza a idiopatická trombocytopenická purpura. V patogenezi se při těchto onemocněních uplatňuje druhotný antifosfolipidový syndrom, vyskytovat se však může i primární autoimunitní antifosfolipidový syndrom. (Nouza, a další, 2007)

Antifosfolipidové protilátky patří mezi skupinu imunoglobulinů namířených proti negativně nabitým buněčným fosfolipidům. Do této skupiny patří protilátky proti fosfatidylserinu, kyselině fosfatidové, fosfatidylinositolu, fosfatidyletanolaminu, fosfatidylglycerolu, antikardiolipinové protilátky a protilátky proti  $\beta$ 2-glykoproteinu1 ( $\beta$ 2GPI). Význam mají také další antifosfolipidové protilátky jako jsou protilátky proti annexinu V a proti protrombinu. Rozbor jednotlivých protilátek u opakovaně potrácejících žen viz tab. 1. (Drahošová, a další, 2010; Nouza, a další, 2007)

Tab. 1 Rozbor sérových protilátek proti jednotlivým fosfolipidům u pacientek, které potratily a u kontrolní skupiny zdravých fertálních žen. (Ulčová-Gallová, a další, 2006)

Protilátky proti		Potrácující	Kontrolní skupina		P
		pacientky	*Ø poz. hodnoty	N (%)	
		N (%)	(µg/L)		
Ph-acid	IgG	1 (0,6)	0,335	0 (0)	NS
	IgM	0 (0)		0 (0)	NS
Ph-ethanolamin	IgG	92 (59)	0,453	0 (0)	≤ 0,05
	IgM	2 (1,3)	0,223	0 (0)	NS
Ph-glycerol	IgG	9 (5,8)	0,412	S1 (1,3)	NS
	IgM	1 (0,6)	0,325	0 (0)	NS
Ph-inositol	IgG	94 (60,3)	0,386	0 (0)	≤ 0,01
	IgM	5 (3,2)	0,458	0 (0)	NS
Ph-serin	IgG	93 (59,6)	0,584	0 (0)	NS
	IgM	8 (5,12)	0,365	0 (0)	NS
Kardiolipin	IgG	14 (9)	22	0 (0)	NS
	IgM	3 (1,9)	15	S4 (5,4)	NS
β2GPI	IgA	15 (9,6)	26	S1 (1,3)	NS
	IgG	1 (0,6)	14	0 (0)	NS
Protrombin	IgA	2 (1,3)	47 IU/L	0 (0)	NS
	IgG	16 (10,2)	26 IU/L	0 (0)	NS
	IgM	0 (0)			
Annexin V	Poz.	21 (13,5)		0 (0)	NS

*P – významné, N – počet pacientek pozitivních v jednotlivé antifosfolipidové protilátce, S – slabě pozitivní*

Velká rodina antifosfolipidových protilátek může být příčinou hyperkoagulace na fetomaternálním rozhraní, mohou také zasahovat do růstu a invaze trofoblastu a mohou poškozovat jeho funkci. Zvýšené hladiny těchto cirkulujících protilátek byly nalezeny ve spojení s reprodukčními poruchami u pacientek antifosfolipidovým syndromem, pacientek s lupusem, u pacientek s preeklamsií, dále u uteroplacentární insuficience trofoblastu. (Blank, a další, 2010)

Je všeobecně známo, že hlavní autoantigen u antifosfolipidového syndromu je  $\beta$ 2GPI molekula, která zprostředkovává vazby na endoteliální buňky, monocyty, krevní destičky, trofoblast a neuronové buňky, což vede k trombóze a ztrátě plodu.  $\beta$ 2GPI je glykosylovaný membránový adhezni glykoprotein. Na zvířecích modelech byla prokázána možnost přímého zapojení protilátek proti  $\beta$ 2GPI do poruch reprodukce. Patogeneze selhání těhotenství s antifosfolipidovým syndromem je multifaktoriální. Existuje několik mechanismů, které mohou vysvětlit, jak působí protilátky proti  $\beta$ 2GPI při ztrátě plodu:

1. Antifosfolipidové protilátky aktivují komplement. Výsledky Salmona a dalších (2008) ukazují, že jak klasická tak alternativní cesta aktivace komplementu mohou přispět k selhání těhotenství. Salmon a další (2008) publikovali, že antifosfolipidové protilátky aktivují komplement uvnitř deciduální tkáně, překonají normální inhibiční mechanismy, indukují zánět, zvyšují hladinu TNF $\alpha$  a jsou příčinou poškození plodu. Uvolněný TNF $\alpha$  je důležitý meziprodukt, který působí ve směru aktivace C5. U myši s nedostatkem C5 a s přítomností antifosfolipidových protilátek nedojde ke zvýšení hladiny TNF $\alpha$ . Salmon a de Groot (2008) navrhli následující scénář: antifosfolipidové protilátky se přednostně zaměřují na deciduu a placentu a aktivují komplement, což vede ke generaci C3a a mediátorů buněčné aktivace, včetně tkáňového faktoru (TF), oxidantů, a TNF $\alpha$ . Zvýšení počtu zánětlivých buněk urychluje místní alternativní cestu aktivace a vytváří prozánětlivé zesílení smyčky, která způsobuje další příliv zánětlivých buněk do placenty a zvýšení generace TF, oxidantů a TNF $\alpha$ .
2. Anti- $\beta$ 2GPI protilátky vyvolávají uvolnění tkáňového faktoru, což vede k tvorbě mikrovaskulárních trombů a k předčasnému stárnutí klků s nekrózou. Tkáňový faktor hraje důležitou roli jak v trombóze tak při zánětu. Exprese tkáňového faktoru přispívá k respiračnímu vzplanutí a následnému poškození trofoblastu a ztrátě plodu zprostředkované antifosfolipidovými protilátkami.
3. Anti- $\beta$ 2GPI protilátky jsou schopny snížit sekreci hCG trofoblastem a tak indukovat patofyziologický stav placenty. (Blank, a další, 2010)
4. Anti- $\beta$ 2GPI protilátky hrají roli jako tzv. blokující protilátky. Tato subpopulace antifosfolipidových protilátek snižuje účinek megalinového receptoru na placentě a žloutkovém váčku. Megalin je transmembránový protein exprimován na absorpčním epitelu ve žloutkovém váčku a neurální trubici raného embrya, stejně jako i v ledvinách, střevu, mozku, žaludku a urogenitálním traktu v pozdějším

životě. Lokalizace receptoru je na apikálním povrchu buněk. (Blank, a další, 2010; Willnow, a další, 1996)

Významné jsou také protilátky proti fosfatidylserinu. Fosfatidylserin se nachází především na zevní straně membrány placentárního trofoblastu. Během embryonální a placentární diferenciaci dochází k narušení lipidové asymetrie, což vede k expozici fosfatidylserinu na vnější povrch. Mechanismy podílející se na ztrátě plodu zprostředkované antifosfatidylserinovými protilátkami jsou následující: protilátky proti fosfatidylserinu mohou působit jako blokuující protilátky zastíněním molekuly fosfatidylserinu na trofoblastových buňkách, což vede k narušení signalizace a ke snížení produkce hCG. Jiné studie ukázaly silnou cytotoxickou reakci proti myšimu trofoblastu po expozici sérem žen s opakujícími se potraty, které měly vysoké titry antifosfatidylserinových protilátek. (Blank, a další, 2010)

Další z řady antifosfolipidových protilátek spojených se selháním těhotenství na pozadí trombózy je antifosfatidylethanolamin vyskytující se především v plazmě pacientů se systémovým lupusem erytematodem a antifosfolipidovým syndromem. Protože fosfatidylethanolamin je hlavní součástí vnější i vnitřní strany plasmatické membrány buněk, autoprotiilátky proti fosfatidylethanolaminu nebo proti fosfatidylethanolamin vázajícím proteinům mohou mít účinek na klidové i aktivované buňky. Protilátky proti fosfatidylethanolaminu jsou polyklonální populací protilátek, které se vážou na fosfatidylethanolamin přímo nebo se vážou na plasmatické bílkoviny, jako jsou vysokomolekulární kininogen nebo nízkomolekulární kininogen. Je zajímavé, že ženské reprodukční ústrojí, je druhým nejbohatším místem pro kininogen a jeho metabolické produkty v těle, které se zvyšují během těhotenství a jsou sníženy u stavů s poruchou reprodukce. Třetí doména kininogenu je cílovým epitopem pro vazbu protilátky proti fosfatidylethanolaminu. (Blank, a další, 2010)

Annexin V je negativně nabitý fosfolipid vázající protein se silnou antikoagulační aktivitou, která je nezbytná pro zachování integrity placenty a může hrát trombo-regulační roli v mikroprostředí placenty tvorbou dvojrozměrných krystalů, které chrání negativně nabitě fosfolipidy před komplexy koagulačních proteinů z cirkulující krve. Protilátky proti annexinu V vážou negativně nabitě fosfolipidy přes annexin V glykoprotein a korelují s poruchami reprodukce. Annexin V se nachází na apikálním povrchu placentárního syncytiotrofoblastu a je výrazně snížen na placentárních klících pacientek s antifosfolipidovým syndromem. Protilátky proti annexinu V byly zjištěny u pacientek s antifosfolipidovým syndromem a systémovým lupusem erytematodem ve

spojení se ztrátou těhotenství. Stejně tak, snížení annexinu V na placentárních klíčích bylo pozorováno u žen s antifosfolipidovými protilátkami a s opakujícími se ztrátami plodu na pozadí trombogenního stavu. (de Laat, a další, 2008)

Podíl na opakovaných potratech má také protilátka proti proteinu Z. Protein Z je K-dependenční fosfolipidy vážící plazmatická bílkovina, která slouží jako kofaktor pro inaktivaci faktoru Xa protein Z-dependenčním proteázovým inhibitorem (ZPI). Deficit proteinu Z je spojen s cévními příhodami a časnou ztrátou plodu. Jedním z možných mechanismů patologické role v reprodukci je schopnost IgG protilátek narušit, *in vitro*, na proteinu Z/ZPI závislou inhibici faktoru Xa. Protilátky proti proteinu Z izotypů IgG a IgM byly nalezeny u žen s nevysvětlenou ztrátou embrya nebo plodu. (Blank, a další, 2010)

Přítomnost vysokých hladin protilátek primárně poškozuje cévy decidui a placenty tvorbou trombóz a rozsáhlých infarktů. Tyto projevy vznikají díky snížení poměru mezi vazodilatačním prostacyklinem a vazokonstrikčním trombaglutinačním tromboxanem. Tyto změny se mohou podílet na vzniku preeklampsie či hypotrofie plodu. (Krajčovičová, a další, 2007; Nouza, a další, 2007; Ulčová-Gallová, 2001)

V etiologii opakovaného potrácení mohou hrát roli také protilátky proti gliadinu, proti tkáňové transglutamináze a endomysiu, které se mohou vyskytovat u celiakie. Pacienti s celiakií vykazují pozitivitu protilátek proti gliadinu (Gliadin je v alkoholu rozpustná frakce glutenu) ve třídách IgA i IgG. Při dodržování dietních opatření se hladiny protilátek snižují. Protilátky proti endomysiu jsou namířeny proti bílkovinné složce pojivové tkáně, která se nachází mezi myofibrilami stěny gastrointestinálního traktu. (Malíčková, a další, 2005)

Při poruchách plodnosti se také uplatňují protilátky proti spermiím a zona pellucida. Spermie jako antigenně cizí buňky mohou v těle ženy vyvolat imunitní reakci spojenou s produkcí protilátek plazmatickými buňkami, nejčastěji se jedná o protilátky typu IgG, IgA vzácněji i IgE většinou v kombinaci s jinou protilátkou. Protilátky mohou pocházet z ejakulátu přímo od muže nebo se vytvoří až v hrdle děložním. V případě spermaglutinačních protilátek ztrácejí spermie možnost pohybu z důvodu tvorby aglutinátů. Jsou-li přítomny cytotoxické protilátky je porušena akrozomální část spermií, tudíž spermie není schopna lytický porušit zona pellucida oocyty. Dalším důvodem proč spermie nepronikne do vajíčka, má-li normální enzymatické vybavení, je přítomnost antizonálních protilátek. Výzkumy ukázaly, že hladiny protilátek proti zona pellucida se



zvyšují se zvyšujícím se počtem odběru vajíček ze stimulované ovariální tkáně v průběhu IVF. (Ulčová-Gallová, 2001)

Častěji se vyskytující je potrácení z aloimunitních příčin. Předpokládá se porucha blokády potencionální imunitní reakce matky proti plodovým antigenům zděděným po otci. U potrácejících žen často chybí blokující protilátky regulující toxické humorální faktory. Tato situace nastává při značné shodě znaků HLA matky a otce. Možnou příčinou potratu může být také zkřížená protispermatická buněčná imunita. Časnou fází implantace mohou poškodit protilátky proti antigenům invazivního trofoblastu. (Nouza, a další, 2007; Krajčovičová, a další, 2007)

### 3.3.6.2 Cytokiny

Cytokiny jsou nejdůležitější imunologické faktory hrající roli v interakci mezi embryem a deciduou. Uplatňují se zde především imunosupresivní cytokiny jako je IL-10, TGF $\beta$ , GM-CSF, glykodelin, leptin, které jsou tvořeny především Th2 buňkami. Hlavními podpůrnými cytokiny jsou proimplantační IL-1, IL-11, LIF, EGF a další látky produkované T-lymfocyty. Podle současných poznatků je zásadní správný poměr mezi interleukiny IL-12 a IL-18. Významnou úlohu hraje také v roce 2005 objevený PAF-1, jedná se o první významný autokrinní embryotrofin, který má pozitivní účinek i na dělohu a matku. (Nouza, a další, 2007; Ulčová-Gallová, a další, 2006; Krüssel, a další, 2003)

Imunosupresivní GM-CSF je zapojený do morfologického a funkčního vývoje placenty. Podporuje proliferaci DNA, diferenciaci a zvyšuje sekreční aktivitu v cytotrofoblastových buňkách. Cytokiny jako IL-3 a GM-CSF stimulují proliferaci placentárních buněk, *in vitro* umožňují trofoblastu produkovat hCG a lidský placentární laktogen. Abnormální placentární funkce a vývoj byl prokázán na GM-CSF deficitních myších. Také bylo prokázáno, že se GM-CSF zvyšuje u normálního těhotenství a velmi nízký je u žen s opakovanými potraty. (Fukui, a další, 2008)

Na blastocystu, trofoblast a plod mohou velmi nepříznivě působit některé trofoblastotoxické a embryotoxické cytokiny produkované aktivovanými imunitními buňkami. Jedná se zejména o TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  a IL-6. (Nouza, a další, 2007)

Skupina žen s opakovaným potrácením vykazovala významně vyšší poměr TNF $\alpha$ /GM-CSF než zdravé kontroly. Poměr intracelulárního TNF $\alpha$ /GM-CSF exprimovaných CD56<sup>bright</sup> NK buňkami může být použit pro diagnózu opakovaných potratů. (Fukui, a další, 2008)

Role TNF $\alpha$  v těhotenství je poměrně složitá. TNF $\alpha$  je důležitý pro růst trofoblastových buněk, buněčnou diferenciaci a angiogenezi, ale může také regulovat apoptózu trofoblastu. Na druhé straně vysoké koncentrace TNF $\alpha$  mají za následek potracení plodu. Z toho vyplývá, že zásadní pro správnou funkci TNF $\alpha$  je jeho správná koncentrace. (Fukui, a další, 2008, Nouza, a další, 2007) Další významnou látkou ovlivňující těhotenství je IFN $\gamma$ . Má základní roli v procesu implantace, zejména v procesu vaskulární remodelace. Genetická absence IFN $\gamma$  u UNK buněk myši má za následek chybění těhotenstvím indukované spirální arterie. Na druhé straně, při normálním těhotenství je produkce IFN $\gamma$  periferními krevními NK buňkami významně snížena ve srovnání s negravidním stavem. (Fukui, a další, 2008)

### 3.3.6.3 Buněčná imunita

V poslední době se stále více dostává do popředí buněčná imunita jako příčina opakovaných potratů. U opakovaně potrácejících žen jsou v děložní sliznici prokázány zvýšené počty leukocytů, především makrofágů a NK buněk, které jsou výrazně aktivovány. Bývá narušena rovnováha mezi pomocnými a tlumivými T-lymfocyty. Tlumivých T-lymfocytů může být někdy tak málo, že se jejich imunopresivní aktivitu nedaří prokázat. U opakovaně potrácejících žen bývá naopak zvýšena hladina aktivovaných T-lymfocytů CD26+ a 69+, HLA-DR+, navíc se snižuje i jejich apoptóza a v cirkulaci jsou zvýšeny Th1 buňky tvořící IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$ . Klíčovou úlohu v indukci imunologické tolerance aloantigenů zárodku hrají CD4+CD25+ T-regulační buňky. (Nouza, a další, 2007; Ulčová-Gallová, a další, 2006)

Při opakovaném potracení bývá nalezena přítomnost aktivovaných makrofágů, které mohou narušovat implantaci embrya. Negativní roli při opakovaném potracení mohou sehrát také žírné buňky, které tvoří abortigenní tryptázu a IL-8.

NK buňky představují hlavní populaci imunologicky aktivních buněk v děložní sliznici (70 až 80 %). Jejich hlavní úloha (viz tab. 2) ve fyziologickém těhotenství spočívá v rozpoznání trofoblastu, kdy dochází k interakci HLA-G s inhibičními KIR receptory NK buněk a v tvorbě angiogenních faktorů. V těhotenství dochází k výraznému snížení aktivity cytotoxických NK buněk v placentě. (Nouza, a další, 2007; Ulčová-Gallová, a další, 2006)

CD56<sup>bright</sup> buňky exprimují nízkou úroveň perforinu a CD16, ale exprimují vysoké úrovně cytokinů. Tyto buňky jsou primární zdroj NK buněk produkujících cytokiny a jsou považovány za důležité regulační podjednotky. Naproti tomu CD56<sup>dim</sup> buňky

tvořící většinu periferních krevních NK buněk exprimují vysokou úroveň Fc- $\gamma$  receptoru - CD16, stejně jako i perforiny. Tyto buňky jsou efektivními zabijáky a jsou velmi cytotoxické. Produkují zanedbatelné množství cytokinů. CD56<sup>bright</sup> a CD56<sup>dim</sup> NK buňky reprezentují funkčně odlišné podjednotky zralých lidských NK buněk. (Fukui, a další, 2008; Lightner, a další, 2008)

Počet a stav NK buněk ať aktivovaných, či inhibovaných je rozhodující pro úspěšné těhotenství. Vysoké koncentrace NK buněk hrají významnou roli v imunologických příčinách opakovaného potrácení. Vysoká koncentrace tradičních NK buněk typu CD56+ CD16- nalezena v děloze žen, které prodělaly potrat, ukazuje, že cytotoxická aktivita je přítomna v místě implantace. V důsledku nerovnováhy v Th1-Th2 odpovědi, kdy převládá Th1 cytokinové prostředí v periferní krvi, může docházet k aktivaci a proliferaci NK buněk, které mohou migrovat do dělohy a zapojit se do mechanismu potratu. Lokální endometriální imunita může být porušena na různých úrovních. Poruchy v putování správné populace NK buněk do dělohy a lokální produkce cytokinů a hormonů jako je IL-15 a prolaktin ještě více zhoršují produkci imunoregulačních faktorů UNK buňkami. (Carolis, a další, 2010)

S infertilitou neznámé etiologie je také spojeno zvýšení exprese CD69 na NK buňkách. CD69 spouští molekulární aktivaci NK buněk, které jsou schopné indukovat cytotoxicitu a stimulovat cytokinovou produkci. Molekula CD69 také zprostředkovává ostatní funkce NK buněk jako je proliferace, produkce TNF $\alpha$  a produkce ostatních aktivních antigenů. Bylo prokázáno, že ženy s vysokým podílem CD56<sup>dim</sup>CD16+ v periferní krvi mají sníženou implantační schopnost a vyšší míru potratovosti. Při opakovaném potracení bývají sníženy NK buňky s inhibičními receptory KIR (killer-inhibiting receptor) a zvýšeny aktivované NK buňky (CD69, CD101, CD94). (Wold, a další, 2005; Ulčová-Gallová, a další, 2006)

Ukázalo se také, že infertilní ženy vykazují vysoký podíl CD56<sup>bright</sup>/IFN  $\gamma$ + /TNF $\alpha$ + buněk ve srovnání se zdravou kontrolou a nízký podíl CD56<sup>bright</sup>/IL-4+/IL-10+ buněk. Bylo prokázáno, že dochází k potlačení TNF $\alpha$  exprimovaného NK buňkami při setkání se s trofoblastovými buňkami. To ukazuje, že trofoblastové buňky mohou modulovat sekreci TNF $\alpha$  produkovaného NK buňkami. (Carolis, a další, 2010; Fukui, a další, 2008)

Tab. 2 Role NK buněk v těhotenství. (Carolis, a další, 2010)

---

### 1. Fyziologické

Imunitní dohled

Angiogeneze (nutná pro pokračování těhotenství)

Remodelace spirálních arterií na uteroplacentární arterie

Podpora správného trofoblastového a placentárního růstu

Vaskularizace decidui

Produkce imunomodulačních molekul (mohou se účastnit tvorby lokální imunosuprese na fetomaternálním rozhraní)

---

### 2. Patologické

Killing-cytotoxická aktivita

Inhibice sekrece lidského choriového gonadotropinu

Aktivace komplementu

Cytokinová nerovnováha

Selhání vývoje Th2 typu odpovědi

Aktivace antigen prezentujících buněk vede k vývoji patologické Th1 odpovědi

---

## 3.4 Vyšetření prováděná u neplodných párů

Základem pro úspěšnou léčbu neplodnosti je kompletní spektrum diagnostických vyšetření, které zasahují do různých oborů jako je gynekologie, imunologie, endokrinologie a další. Pro stanovení správné diagnózy je žádoucí, aby byli vyšetřeni oba partneři ještě před zahájením léčby. Nesprávná léčba může být příčinou neúspěchu IVF popř. inseminace. V posledních letech dochází k značnému rozvoji v oblasti výzkumu, diagnostiky a léčby neplodnosti z imunologických příčin. Podíl imunologických příčin na snížení plodnosti se musí sledovat komplexně s ohledem na ostatní funkce neuroendokrinního aparátu.

Indikace imunologického vyšetření párů s poruchami plodnosti:

1. Páry, kterým se nepodaří dosáhnout těhotenství po roce pravidelného nechráněného pohlavního styku.
2. Ženy s opakovanými spontánními potraty plodu (po 2 spontánních potrazech bez rozdílu věku).

3. Po neúspěšných metodách asistované reprodukce (neotěhotnění, nedonošení životascapného plodu). Indikace po 2 neúspěšných IVF.

(Drahošová, a další, 2010; Drahošová, 2010)

### **3.4.1 Vyšetření prováděná k identifikaci imunologických příčin neplodnosti u muže**

Před zahájením imunologického vyšetření ejakulátu je nezbytné vyšetření spermioqramu dle standardů WHO. Toto vyšetření může významně ovlivnit preanalytická fáze (rychlý transport, správná teplota, transport ve tmě). Hodnocení kvality ejakulátu (SpermFlow-Test) zahrnuje: počet spermií, počet leukocytů, vitalita spermií, integrita akrozomu spermií, přítomnost intraakrozomálního proteinu. Motilita spermií a morfologie je hodnocena mikroskopicky.

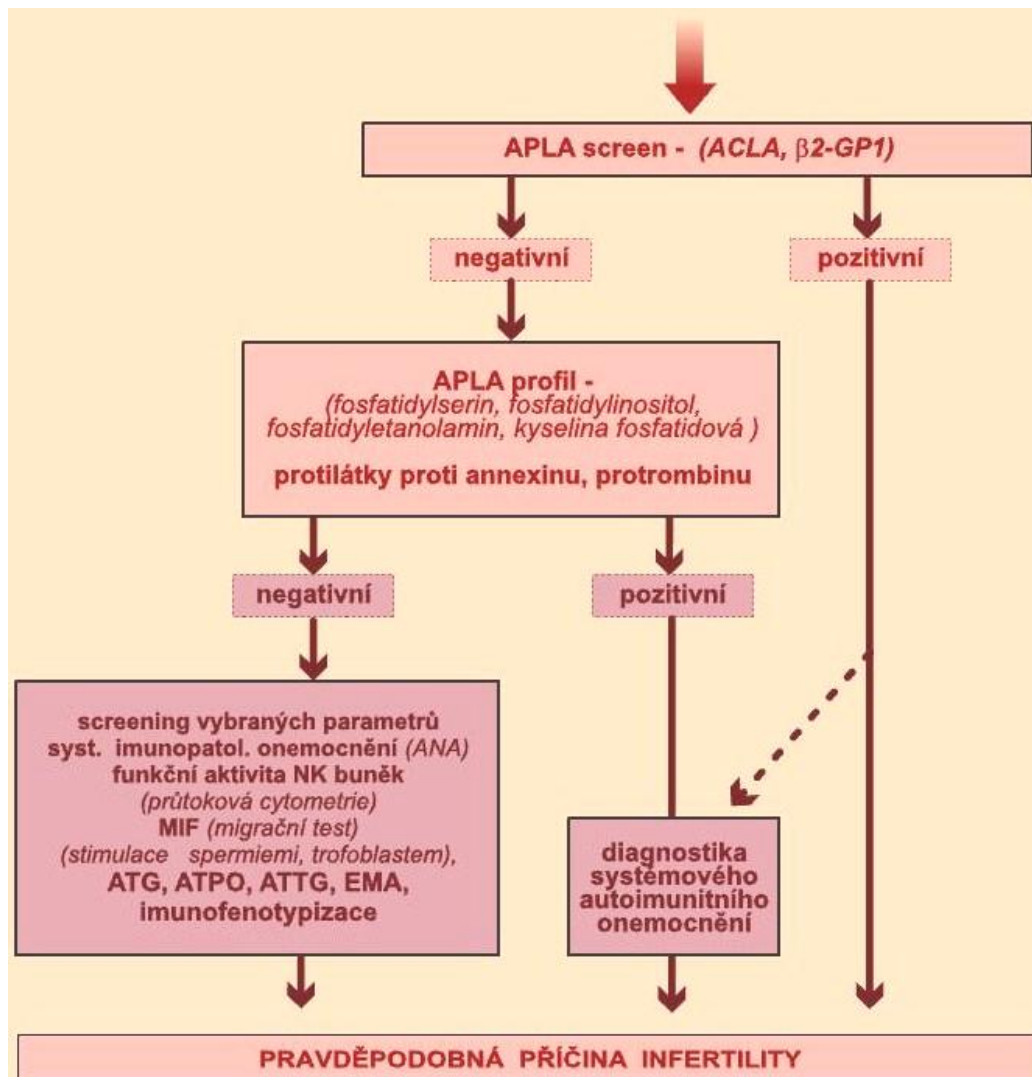
Tyto parametry se stanovují za použití průtokového cytometru. Měření koncentrace je založeno na přidání vnitřního standardu k ejakulátu. Detekce leukocytů ve vzorku je prováděna pomocí protilátky anti-CD45/PE-DY647. Při zvýšeném počtu leukocytů je vhodné mikrobiologické vyšetření ejakulátu k vyloučení infekční příčiny. Vitalita spermií se měří pomocí propidium jodidu, který proniká narušenou membránou mrtvých buněk a váže se na DNA. Integrita akrozomu se stanovuje detekcí intraakrozomálního proteinu, není-li akrozom spermie narušen, nelze tento protein detekovat, u narušených spermií je tento protein rozpoznán protilátkou. Přítomnost intraakrozomálního proteinu se stanovuje po permeabilizaci membrány spermií. Intraakrozomální protein se tak stane dostupný pro protilátku a je detekován. Nemá-li spermie intra-akrozomální protein není po permeabilizaci spermií protilátku detekován. (Drahošová, 2010)

Dále se provádí stanovení přítomnosti autoprotilátek ve třídách IgG a IgA navázaných na spermie v ejakulátu, tyto protilátky mohou být spermaglutinační, spermobilizační nebo spermocytotoxické, namířené především na enzymatický aparát hlavičky spermie. Může se provést také stanovení autoprotilátek v seminální tekutině, stanovení autoprotilátek proti spermiím v séru, stanovení funkční aktivity NK buněk, test inhibice migrace leukocytů pod agarózou, protilátky proti tkáňové transglutamináze, endomysiu ve třídě IgA a gliadinu a v neposlední řadě screening systémového imunopatologického onemocnění. (Drahošová, a další, 2010)

### **3.4.2 Vyšetření prováděná k identifikaci imunologických příčin opakovaného potrácení a neplodnosti u ženy**

Možnou příčinou ženské neplodnosti může být celá řada. Mohou se na ní podílet protilátky proti zona pellucida, protilátky proti spermiím v séru, protilátky proti tyreoperoxidáze a tyreoglobulinu, protilátky proti spermiím v cervikálním hlenu. Dále se provádí funkční stanovení aktivity NK buněk, stanovení antiovariálních protilátek, protilátek proti tkáňové transglutamináze, endomysiu ve třídě IgA a protilátek proti gliadinu. Význam má také screening systémového imunopatologického onemocnění a případné stanovení profilu antifosfolipidových protilátek ve třídě IgM a IgG (fosfatidylserin, kyselina fosfatidová, fosfatidylinositol, fosfatidyletanolamin, kardiolipin +  $\beta$ 2GPI).

Vyšetření prováděná k identifikaci imunologických příčin opakovaného potrácení se provádí u žen, které prodělaly opakované časně ztráty plodu nebo které předčasně porodily morfologicky normálního novorozence před 34. týdnem těhotenství. U těchto žen se také vyšetřují antifosfolipidové protilátky (viz výše), protilátky proti annexinu V ve třídách IgG a IgM a protilátky proti protrombinu ve třídách IgG a IgM. Dále se jako u neplodných žen vyšetřuje funkční aktivita NK buněk, stanovují se protilátky proti tkáňové transglutamináze (ATTG), proti endomysiu (EMA) ve třídě IgA a proti gliadinu (GL). Rovněž se provádí screening systémového imunopatologického onemocnění a stanovení protilátek proti tyreoperoxidáze (ATPO) a protilátek proti tyreoglobulinu (ATG). Lze také provést imunofenotypizaci lymfocytů periferní krve. Algoritmus jednotlivých vyšetření viz obr. 2. (Drahošová, a další, 2010)



Obr. 2 Algoritmus pro stanovení parametrů protilátkou a buněčné imunity u žen s opakovaným potrácením.

([http://www.lfhk.cuni.cz/UKIA/Data/imunologicke\\_vysetreni\\_neplodnosti.pdf](http://www.lfhk.cuni.cz/UKIA/Data/imunologicke_vysetreni_neplodnosti.pdf))

## 4 Materiál a metodika

K vyšetření bylo použito testu inhibice migrace leukocytů pod agarózou a aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu.

### 4.1 Inhibice migrace leukocytů pod agarózou

Základním mechanismem této reakce je produkce biologicky aktivních látek v průběhu interakce přecitlivělých lymfocytů se specifickým antigenem (spermie, trofoblast). Jedna skupina těchto látek se nezávazně migračně inhibiční faktory a má schopnost potlačit migrační aktivitu testovaných buněk. Podle druhu efektorových buněk jde o inhibici migrace makrofágů nebo polymorfonukleárních leukocytů.

Metoda inhibice migrace leukocytů pod agarózou vychází ze skutečnosti, že leukocyty umístěné do kruhových jamek vyříznutých v agarózovém gelu migrují centrifugálně v kapilární vrstvě mezi agarózou a podložkou. Migrujícími buňkami v tomto systému jsou polymorfonukleární leukocyty. Tato diagnostická *in vitro* metoda je využívána k hodnocení stavu buňkami zprostředkované imunitní reakce. Metoda se používá u párů s poruchami plodnosti a slouží k vyhodnocení buňkami zprostředkované imunity proti antigenům spermií a trofoblastu. Hodnocení imunologické reaktivity se provádí posouzením velikosti migrační zóny vůči kontrole. (Procházková, a další, 1986)

#### 4.1.1 Materiál, pomůcky, přístroje

K vyšetření byla použita nesrážlivá venózní krev (cca 8 ml), která se odebírá do zkumavek s heparinem a sperma odebrané po třídní sexuální abstinenci. Kratší odstup od předchozí ejakulace může snížit objem ejakulátu a koncentraci spermií, delší abstinence naopak může snížit motilitu spermií. Na odběr vzorků se používají nejlépe sterilní jednorázové nádobky. Při odběru mimo ambulanci je důležité dopravit vzorek do 60 minut při pokojové teplotě do laboratoře. Cílem je udržet optimální motilitu spermií. Pro vyšetření buněčné imunity je potřeba živých buněk, proto je nutný správný odběr a rychlý transport do laboratoře.

Přístroje a pomůcky potřebné pro vyšetření jsou: box s laminárním prouděním vzduchu, vibrační třepačka, automatické pipety na objemy 5-20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a 500  $\mu$ l, kádinky, stojánky na zkumavky, pipeta-dávkoč, CO<sub>2</sub> inkubátor, vodní lázeň, projekční zařízení pro odečet výsledků.



Spotřební materiál: buničitá vata, jednorázové špičky (200  $\mu$ l), Petriho misky polystyrénové (průměr 6 cm), polystyrénové zkumavky s víčkem (15  $\text{cm}^3$ ), Pasteurovy pipety, kelímky na použité špičky.

Reagencie: agaróza (Sigma), voda pro infuzní roztoky, médium H-199 (Sigma), FBS-fetal bovine serum (Gibco)-inaktivace 25 min/56  $^{\circ}\text{C}$ , glutamin (Sigma), gentamicin (Lek), 1M NaOH (4 g NaOH na 100 ml vody),  $\text{NaHCO}_3$ , 5% dextran,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ , EDTA.

### **Příprava misek s agarózou, pro jeden pár pH 7,5:**

1. Agaróza: 2 g agarózy + 10 ml vody
2. Médium pro agarózu

MEM H-199	1,8 ml
FBS	2,0 ml
Glutamin	0,232 ml
Gentamicin	0,200 ml
Voda	5,5 ml
$\text{NaHCO}_3$	0,266 ml

### **Izolace leukocytů:**

1. pracovní roztok

MEM H-199(10x koncentrovanější)	10 ml
FBS	10 ml
Glutamin	1 ml
Gentamicin	1 ml
Voda	doplnit do 100 ml
NaOH (1M)	150 $\mu$ l

2. lyzační roztok

$\text{NH}_4\text{Cl}$	8,260 g
$\text{KHCO}_3$	1,000 g
EDTA	0,037 g
Voda pro infuze	

Rozpuští se ve 100ml vody, před použitím roztok ředí vodou 1 : 10

## 4.1.2 Pracovní postup

### Příprava misek s agarózou

1. Navážená agaróza se smísí s vodou (0,2 g agarózy do 10 ml vody pro infuzní roztoky) a bez míchání, aby agaróza neulpěla na stěnách kádinky, se rozvaří ve vodní lázni nad kahanem do rozpuštění agarózy v čirý roztok (cca 15 minut).
2. Rozvařená agaróza se umístí do vodní lázně vyhřáté na 60 °C.
3. Lázeň se ochladí na 45 °C a do ní se vloží předeřát připravené médium (bez NaHCO<sub>3</sub>).
4. Těsně před slitím s agarózou se přidá do media NaHCO<sub>3</sub> a medium se smísí s rozehřátou a vytemperovanou agarózou.
5. Vzniklý roztok se důkladně promíchá, opatrně, aby nedošlo k napěnění roztoku.
6. Do připravených Petriho misek se nepipetuje po 6 ml roztoku agarózy.
7. Misky se nechají s pootevřeným víčkem krátce ztuhnout na vodorovné podložce (max. 15 minut).
8. Do doby použití se umístí do lednice, v miskách nesmí kondenzovat voda.

### Izolace leukocytů z krve sedimentací v prostředí dextranu

Jedná se o jednoduchý způsob získání leukocytů, založený na rozdílné sedimentaci elementů nesrážlivé krve smíšené s dextranem. Dextran shlukuje erytrocyty a urychluje tak jejich sedimentaci. Prakticky všechny leukocyty zůstávají ve sloupci plazmy.

1. 2 ml dextranu (5 g dextranu do 100 ml fyziologického roztoku) se převrství 8 ml heparinizované krve a inkubuje se 45 minut v termostatu při 37 °C v šikmé poloze pod úhlem 45 °.
2. Plazma se stáhne do čisté zkumavky (15 ml) a hladiny v jednotlivých zkumavkách se vyrovnají pomocí pracovního roztoku (cca do  $\frac{3}{4}$  zkumavky).
3. Centrifuguje se při 1200 otáčkách po dobu 10 minut.
4. Supernatant se stáhne, sediment roztřepá a erytrocyty se lyzují lyzačním roztokem NH<sub>4</sub>Cl (cca  $\frac{3}{4}$  zkumavky) po dobu 10 minut. Během lyzace 2x zkumavky promíchat.
5. Centrifuguje se při 1200 otáčkách po dobu 10 minut.
6. Supernatant se stáhne, sediment roztřepá a 2x propere 5 ml pracovního roztoku. (centrifugace při 1200 otáčkách po dobu 10 minut).

7. Po druhém promytí se přidá 5 ml pracovního roztoku a vzorek se dá aktivovat do termostatu (37 °C, CO<sub>2</sub>) na cca 1 hodinu.
8. Následuje opět centrifugace, po které se velmi důkladně odlije supernatant, buňky se roztřepají a po té jsou připravené ke kapání.

### **Příprava spermií**

1. Připraví se proprané spermie (3x promytí pracovním roztokem, centrifugace při 2600 otáčkách po dobu 10 minut).
2. Zjistí se koncentrace spermií ve vzorku (dle analýzy na průtokovém cytometru).
3. Podle koncentrace spermií se odměří 1 ml (u málo buněčných vzorků 2 ml, popř. 3 ml) a umístí se v umělohmotných zkumavkách do mrazícího boxu (-40 °C).
4. Po úplném zmrznutí (suspenze spermií zežloutne) se vzorek dá do vodní lázně a proces zmražení a rozmražení se ještě jednou opakuje, aby došlo k úplnému rozbití spermií.
5. Po posledním rozmražení se vzorky centrifugují (2600 otáček/10 minut), supernatant se slije a sediment rádně roztřepá.
6. K suspenzi promytých spermií se přidá promývací médium tak, aby množství buněk na jamku bylo 0,75 10<sup>6</sup> (tzn., pokud se kape 5 µl, koncentrace ve vzorku by měla být 150 10<sup>6</sup>/ml).
7. Výpočet objemu promývacího média, které se přidává k sedimentu spermií:

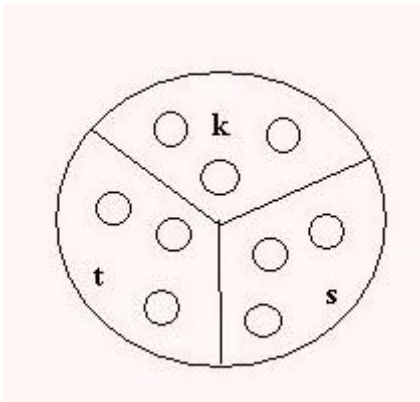
$$V = \frac{\text{Koncentrace dle cytometrické analýzy v } 10^6 \text{ /ml} \times \text{objem vzorku při zmražování v ml}}{150}$$

### **Příprava trofoblastu**

1. Trofoblast, jedná se o JAR linii (Exbio) (JAR linie byla vyvinuta R. A. Pattillem a jeho kolegy přímo z choriokarcinomu) je připravena v zamražených alikvotech.
2. Před vlastním kapáním se trofoblast vyjme z mrazícího boxu (-70 °C) a nechá rozmrznout.

### Plnění jamek v miskách

1. Před nanesením buněčné suspenze se vyříznou do agarů dířky podle níže uvedeného schématu (obr. 3).

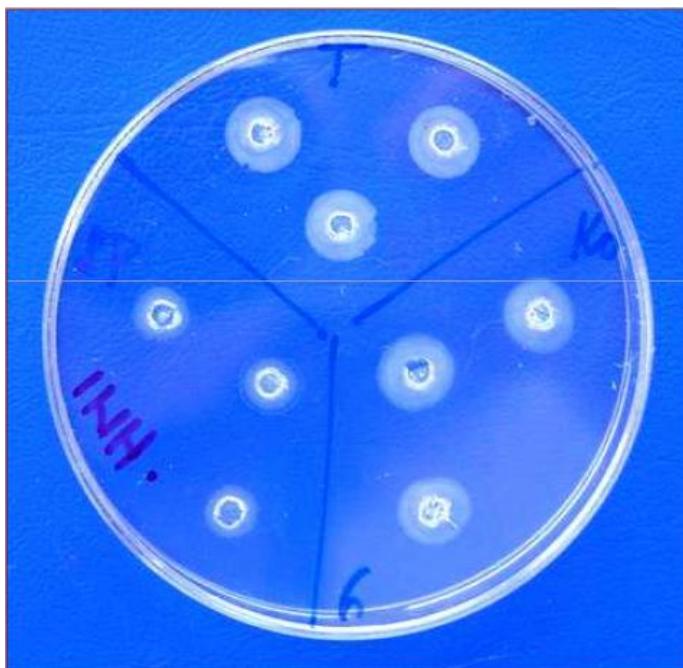


Obr. 3 Rozmístění jamek v agarů, vyšetření ženy (k-kontrola, t-trofoblast, s-spermie).

2. Otvory v agarůze se plní vždy po 10  $\mu$ l buněčné suspenze, nechá se vsáknout a potom se doplní 5  $\mu$ l suspenze trofoblastu nebo spermii.
3. Do jamek s kontrolou se kape 10  $\mu$ l buněčné suspenze a 5  $\mu$ l pracovního roztoku.  
Kontrola: 10  $\mu$ l leukocytární suspenze + 5  $\mu$ l pracovního roztoku  
Trofoblast: 10  $\mu$ l leukocytární suspenze + 5  $\mu$ l trofoblastu  
Spermie: 10  $\mu$ l leukocytární suspenze + 5  $\mu$ l suspenze spermii

### Inkubace misek

1. Po nakapání se misky umístí ve vlhké komůrce do termostatu (37 °C, CO<sub>2</sub>) a inkubují se přes noc.
2. Druhý den se provede fixace buněk v migračních zónách přelitím agarůzového gelu 3 ml 37% formaldehydu, který se nechá působit po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.
3. Opláchne se vlažnou vodou z kohoutku.
4. Agarůza se vyjme z misek a misky se nechají uschnout. Hotové plotny na obr. 4.



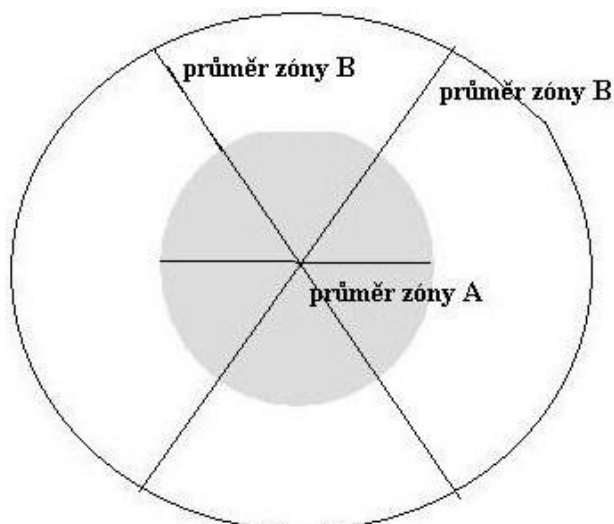
Obr. 4 Výsledek testu inhibice migrace leukocytů u ženy.

Nahoře trofoblast bez přítomnosti inhibice, vpravo kontrola, vlevo spermie, kde je přítomna inhibice migrace.

([http://www.dynex.cz/files/akce-dynex/casomil2010/03\\_Casomil-neplodnost2010.pdf](http://www.dynex.cz/files/akce-dynex/casomil2010/03_Casomil-neplodnost2010.pdf).)

### **Dokumentace, zpracování a hodnocení dat**

Po uschnutí misek se provede hodnocení pomocí projekčního přístroje. Určí se dva poloměry zóny B, vypočítá se jejich aritmetický průměr a následovně se vypočítá obsah ( $\pi \cdot r^2$ ) zóny B, toto se provede nejméně u dvou jamek a spočítá se průměrná plocha. Obdobně se určí průměrný obsah zóny A (viz obr. 5) Odečtením obsahů jednotlivých zón (B-A) se určí plocha migračních zón u kontroly, spermií i trofoblastu a vypočítá se migrační index MI (viz výpočet).



Obr. 5 Způsob odečtení průměru jednotlivých zón v jednotlivých jamkách.

### Výpočet:

$$MI = \frac{\text{průměrná plocha migrace buněk inkubovaných v Ag}}{\text{průměrná plocha migrace kontrolních buněk}} \times 100$$

### Hodnocení:

Spermie, fyziologické rozmezí 65 % - 120 %

0-22 % +++

23-44 % ++

45-65 % +

Trofoblast, fyziologické rozmezí 75 % - 120 %

0-25 % +++

26-50 % ++

51-75 % +

Jsou vypracovány 2 možnosti uspořádání testu, přímé (jednostupňové) nebo nepřímé (dvoustupňové). V přímém testu lymfokiny produkované senzitivními lymfocyty ovlivňují migraci indikátorových buněk přítomných v téže suspenzi. V případě nepřímého uspořádání se v první fázi během inkubace lymfocytů s příslušným stimulačním agens uvolní do supernatantu lymfokiny, které se v druhém kroku testují na indikátorových buňkách. (Procházková, a další, 1986)

## 4.2 Aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu

Analýza aktivace NK buněk slouží k vyšetření vlivu buněčné složky imunity na neplodnost u žen. Test doplňuje komplexnější vyšetření buněčné imunity vůči antigenům spermií a trofoblastu metodou inhibice migrace leukocytů pod agarózou.

Součástí buněčné reaktivity je také buněčná imunita představována NK buňkami. Za užitečné vyšetření v případě žen s diagnózou opakovaného potrácení, po neúspěšných IVF zákrocích či s jiným neobjasněným důvodem neplodnosti, je proto považována také detekce buňkami zprostředkované imunologické reaktivity, která je namířena proti spermiím či buňkám trofoblastu. U těchto žen bývá vyšší podíl aktivovaných NK buněk *in vivo* i po kultivaci s antigeny spermií či trofoblastu.

Schopnost stimulace lymfocytů pomocí mitogenů nebo antigenů se sleduje měřením zvýšené exprese aktivačních znaků. Tyto znaky je možno měřit již po 24 hodinách inkubace. (V našem případě se měří exprese po 40 hodinách inkubace vzhledem k návaznosti na předcházející testy-vyšetření počtu spermií průtokovou cytometrií a zpracování spermií opakovaným zmrazováním a rozmrazováním). Mitogen PWM (Pokeweed mitogen) vykazuje velkou aktivační schopnost vzhledem k NK buňkám.

Stanovení aktivace NK buněk se provádí za použití průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie umožňuje současné měření řady parametrů na velkém množství částic. Nejčastěji měřenými parametry jsou rozptyl světla v malém úhlu tzv. forward scatter, který je přímo úměrný velikosti buněk, rozptyl světla v 90° úhlu, tzv. side scatter, který je ovlivněn granularitou částic a fluorescence různé vlnové délky. Buňky obarvené různými fluorochromy jsou unášeny laminárním proudem nosné kapaliny. Fluorescence se excituje laserovým paprskem. Jednotlivé buňky v izotonickém roztoku protékají velmi tenkou tryskou do silnější kapiláry, kterou proudí nosná tekutina. To usměrní buňky do tenkého proudu, kde postupují jedna za druhou průtokovou komůrkou a v ní protínají světelný paprsek, tento jev se nazývá hydrodynamická fokusace. Světlo vznikající interakcí buněk usměrněných hydrodynamickou fokusací při průchodu paprskem laseru (rozptýlené světlo a emitovaná fluorescence) je rozděleno systémem hranolů, optických filtrů a zrcadel podle vlnové délky (barvy) emitované fluorescence. Jednotlivé signály jsou převedeny na elektrické impulzy a zesíleny fotonásobičem. Počítačové zpracování naměřených dat umožňuje získat údaje o subpopulacích buněk charakterizovaných na základě jiných znaků tzv. gatování. Výstupem měření na cytometru jsou vý-

sledky v grafické a číselné formě. Ke grafickému zobrazení se používají jak jednoparametrové histogramy tak dvouparametrové dotploty. (Eckschlager, a další, 1999)

#### **4.2.1 Materiál, pomůcky přístroje**

Test se provádí s nesrážlivou krví odebranou do heparinu litného nebo sodného. Odebraná krev se musí zpracovat do 6 hodin. Speciální příprava ani dieta není nutná. Vhodný je odběr ráno nalačno. K vyšetření je dále zapotřebí čerstvé sperma, které se získává po 2-3 denní sexuální abstinenci masturbací. Na odběr vzorků se používají nejlépe sterilní jednorázové nádoby.

Potřebné přístroje a pomůcky: box s laminárním prouděním vzduchu, vibrační třepačka, laboratorní centrifuga, automatické pipety na objemy 5-20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  a 500 $\mu\text{l}$ , kádinky, stojánky na zkumavky, mikrotitrační destičky, inkubátor (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), průtokový cytometr Cytomics FC 500 firmy Beckman Coulter s analyzačním softwarem CXP, mrazicí box, Beckman Coulter Q-Prep Workstation na lýzu erytrocytů.

Spotřební materiál: buničitá vata, jednorázové špičky (200  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ ), polystyrenové zkumavky s víčkem (15 cm<sup>3</sup>), Pasteurovy pipety, kelímky na použité špičky, zkumavky pro průtokovou cytometrii.

Reagencie: monoklonální protilátky anti CD3 PC5 nebo APC (Beckman Coulter), anti CD56 PE (Beckman Coulter), anti CD69 FITC (Beckton Dickinson), kultivační médium X-VIVO 10 (Lonza, Belgie), aqua pro injectione, mitogen PWM (Pokeweed mitogen)-koncentrace 12,5  $\mu\text{g/ml}$  = zásobní koncentrace (5 mg PWM se rozpustí ve 40 ml destilované apyrogenní vody a rozplní se po 0,5 ml do zkumavek, které se zmrazí na -20 °C).

#### **4.2.2 Pracovní postup**

##### **Kultivace buněk**

1. Připraví se PWM mitogen v pracovní koncentraci 2  $\mu\text{g/ml}$  (rozmrazí se alikvot s PWM o pracovní koncentraci a pipetuje se 320  $\mu\text{l}$  + 1680  $\mu\text{l}$  média X-VIVO).
2. Ve sterilní mikrotitrační destičce se vyčlení a popíšu celkem 4 jamky pro jednoho pacienta.
3. Do jamky 1-KO se kape 100  $\mu\text{l}$  čistého média jako negativní kontrola.
4. Do jamky 2-PWM se kape 100  $\mu\text{l}$  mitogenu PWM o pracovní koncentraci ředěného médiem. Slouží jako pozitivní kontrola.



5. Do jamky 3- SPERM se kape 90  $\mu$ l čistého média a 10  $\mu$ l zpracovaných spermií o upravené koncentraci (příprava spermií je stejná jako u testu inhibice migrace leukocytů pod agarózou) viz příprava spermií (str. 34).
6. Do jamky 4-TROFO se kape 90  $\mu$ l čistého média a 10  $\mu$ l rozmražených buněk trofoblastu (stejně jako u testu inhibice migrace leukocytů pod agarózou).
7. K napipetovaným reagentům se přidá 100  $\mu$ l periferní nesrážlivé krve a po jemném oklepání se destička uloží do inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Na cca 22 hodin.

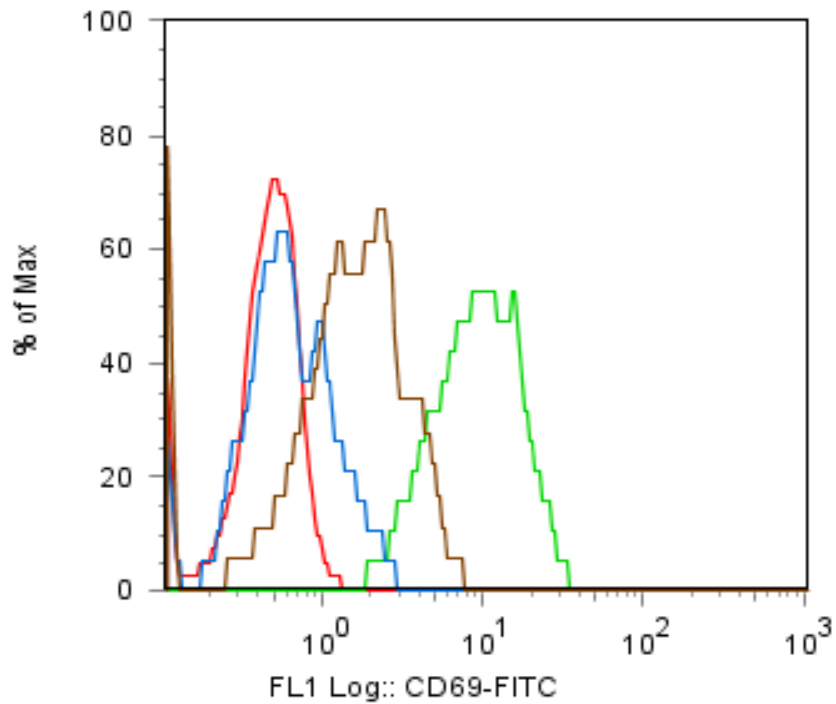
### **Značení buněk**

1. Pro každého pacienta se připraví 4 cytometrické zkumavky KO, PWM, SPERM, TROFO.
2. Do všech zkumavek se nepipetuje 15  $\mu$ l koktejlu monoklonálních protilátek anti CD69/CD56/CD3.
3. Do každé zkumavky se kape 75  $\mu$ l promíchané krve z odpovídajících jamek.
4. Zkumavky se protřepou a nechají se 15 minut inkubovat ve tmě při laboratorní teplotě.
5. Po skončení inkubace se vzorky lyzují na Q-Prepu.

### **Měření a hodnocení výsledků**

Měření se provádí na cytometru FC500. Sbírá se 50 000 buněk. V gatu B (NK buňky) a C (NKT buňky) by mělo být minimálně 300 buněk. Výsledky měření se analyzují softwarem CXP.

Udává se procento aktivovaných NK buněk s PWM, spermiemi a trofoblastem. Je-li více než 30 % NK buněk, které jsou aktivovány antigeny spermií, nebo více než 25 % NK buněk, které jsou aktivovány antigeny trofoblastu, může se výsledek považovat za pozitivní, pokud spontánní exprese CD69 na NK buňkách nepřesahuje 5 %. Příklad výsledku vyšetření na obr. 6.



Obr. 6 Výsledek testu aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu u ženy, která spontánně potratila. Žena má vysoké procento aktivovaných NK buněk s antigeny trofoblastu (více než 25 %).

Kontrola 2,4 % (červená), PWM 98 % (zelená), spermie 21,7 % (modrá), trofoblast 67,3 % (hnědá).

## 5 Výsledky

V hodnoceném souboru 305 žen s opakovaným potrácením vyšetřených i s jejich partnery od roku 2009 do roku 2011 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové na Ústavu klinické imunologie a alergologie, byly sledovány různé parametry, které mohou mít vliv na opakované potrácení.

V práci byly také hodnoceny vztahy mezi testy inhibice migrace leukocytů pod agarózou a testem aktivace NK buněk. Ve skupině pacientek přítomnosti inhibice migrace vůči spermiím bylo nalezeno zvýšené procento aktivovaných NK buněk po kultivaci s antigeny spermií. Jako významné vzhledem k buňkami zprostředkované imunitě se ukazují protilátky proti fosfolipidům, podstatnou roli hraje také kvalita ejakulátu partnera.

Data byla hodnocena statistickým programem MedCalc.

### 5.1 Statistická charakteristika souboru

V tabulkách 3, 4 a 5 jsou vyčísleny jednotlivé klinické a laboratorní ukazatele sledovaného souboru pacientek. V souboru byly hodnoceny různé klinické údaje, jako je věk, podstoupené předchozí IVF pokusy (IVF) a inseminace (INS), předchozí užívání hormonální antikoncepce a infekční onemocnění v době vyšetření. Dále byla hodnocena přítomnost protilátek proti zona pellucida (AZPA), proti tyreoglobulinu a tyreoidální peroxidáze (ATHYR), proti spermiím (ASA) a antifosfolipidové protilátky (APA).

Tab. 3 Charakteristika věkového složení hodnoceného souboru žen.

Počet testovaných	305
Nejnižší hodnota	22 let
Nejvyšší hodnota	44 let
Aritmetický průměr	32,5 let
Medián	32 let
95% IS pro medián	32-33 let
Rozptyl	16,8 let
Směrodatná odchylka	4,1 let

*IS-interval spolehlivosti*

Tab. 4 Klinické údaje hodnoceného souboru žen.

	IVF	INS	Hormonální antikoncepce	Infekční onemocnění
Ano	153 (50,2 %)	81 (26,6 %)	231 (75,7 %)	28 (9,2 %)
Ne	151 (49,5 %)	223 (73,1 %)	71 (23,3 %)	272 (89,2 %)
Neví se	1 (0,3 %)	1 (0,3 %)	3 (1,0 %)	5 (1,6 %)
Celkem	305	305	305	305

Tab. 5 Procentuální zastoupení výskytu protilátek u hodnoceného souboru žen.

	AZPA	ATHYR	ASA	APA
Negativní	296 (97 %)	250 (82 %)	241 (79 %)	279 (91,5 %)
Hraniční	9 (3 %)	0	0	0
Pozitivní	0	52 (17 %)	64 (21 %)	25 (8,2 %)
Nemá vyšetřeno	0	3 (1 %)	0	1 (0,3 %)
Celkem	305	305	305	305

V panelu buněčné imunity byly hodnoceny počty žen s aktivovanými NK buňkami s antigeny spermií (NKSP) a trofoblastu (NKTR) a počty žen s pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií (INH SP) a trofoblastu (INH TR) viz tab. 6. Výsledky naznačují, že věk hodnocených žen, nemá vliv na zvýšení aktivity NK buněk jak s antigeny spermií, tak s antigeny trofoblastu. Průměrný věk vyšetřovaných žen s pozitivním i negativním výsledkem aktivity NK buněk s antigeny spermií i trofoblastu je 32 let.

Tab. 6 Výsledky vyšetření buněčné imunity u hodnoceného souboru žen.

	INH SP	INH TR	NKSP	NKTR
Pozitivní	43 (14,1 %)	16 (5,2 %)	62 (20,3 %)	31 (10,2 %)
Negativní	262 (85,9 %)	289 (94,8 %)	243 (79,7 %)	274 (89,8 %)
Celkem	305	305	305	305

*INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, INH TR – inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím, NKTR – aktivace NK buněk vůči trofoblastu.*

Vliv na neplodnost žen má rovněž kvalita ejakulátu partnera. V tabulce 7 je uvedeno jaké hodnoty byly naměřeny u mužů hodnocených žen. Hodnotil se počet spermií, vitalita spermií (VITA), přítomnost a počet leukocytů (LEU) a integrita akrozomu spermií (Hs14N) a přítomnost intra-akrozomálního proteinu po permeabilizaci membrány spermií (Hs14P).

Tab. 7 Kvalita ejakulátu partnerů vyšetřovaných žen.

	Počet spermií $\times 10^6 / \text{ml}$	VITA %	LEU $\times 10^6 / \text{ml}$	Hs14N %	Hs14P %
Počet testovaných	305	305	305	305	305
Nejnižší hodnota	2	27	0	6	19
Nejvyšší hodnota	386	96	12	71	100
Aritmetický průměr	82,3	69	0,83	20,3	88
Medián	60	70	0,3	18	92
95% IS pro medián	51- 71,6	68- 72	0,2-0,3	17-79	90-93
Rozptyl	5033	147	2,5	110	119
Směrodatná odchylka	71	12	1,5	10,5	11

*IS-interval spolehlivosti*

## 5.2 Srovnání výsledků testu inhibice migrace leukocytů pod agarózou a testu aktivace NK buněk

V práci byly porovnávány vztahy mezi výsledky testů inhibice migrace leukocytů pod agarózou a výsledky testů aktivace NK buněk. V tabulce 8 jsou výsledky testu inhibice migrace leukocytů vůči spermiím ve skupinách pacientek s pozitivním a negativním testem aktivace NK buněk vůči spermiím.

Statisticky významná byla asociace pozitivní inhibice migrace leukocytů vůči spermiím s aktivací NK buněk po kultivaci s antigeny spermií (cut off 30 %). Výsledky testů byly hodnoceny McNemarovým statistickým testem.

Tab. 8 Výsledky testu inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny spermií u žen s pozitivním a negativním testem aktivace NK buněk vůči spermiím.

Výsledek testu inhibice migrace leukocytů	Negativní aktivace NK buněk vůči spermiím (< 30)	Pozitivní aktivace NK buněk vůči spermiím (> 29,99)
Pozitivní	18 (7,4 %)	25 (40,3 %)
Negativní	225 (92,6 %)	37 (59,7 %)
Celkem	243	62

Rovněž byl sledován vztah ve výskytu aktivovaných NK buněk vůči spermiím v souborech pacientek s pozitivním (tab. 9) a negativním (tab. 10) výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií (obr. 7). Ke statistickému hodnocení bylo použito Wilcoxonova testu. Pacientky s pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů mají vyšší hodnoty aktivovaných NK buněk po kultivaci s antigeny spermií.

Tab. 9 Statistická charakteristika hodnot aktivovaných NK buněk vůči spermii u souboru žen s pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermii.

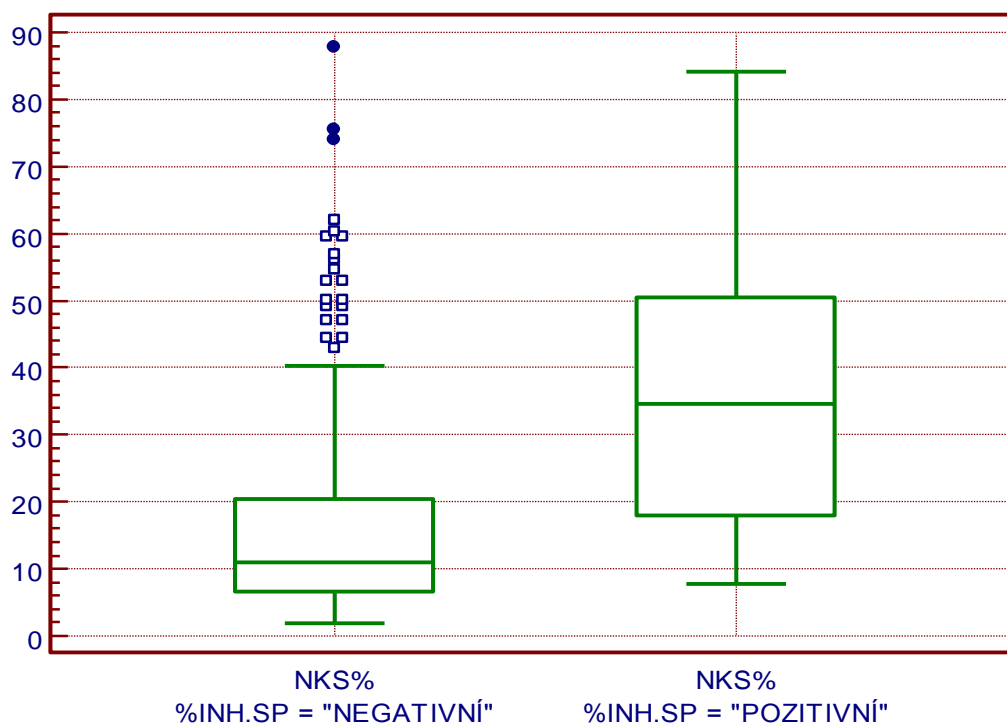
Počet pozitivních	43
Nejnižší hodnota	7,7 %
Nejvyšší hodnota	84,2 %
Aritmetický průměr	37,4 %
Medián	34,6 %
95% IS pro medián	19-47,7 %
Rozptyl	477 %
Směrodatná odchylka	21,8 %

*IS-interval spolehlivosti*

Tab. 10 Statistická charakteristika hodnot aktivovaných NK buněk vůči spermii u souboru žen s negativním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermii.

Počet negativních	262
Nejnižší hodnota	1,8 %
Nejvyšší hodnota	87,8 %
Aritmetický průměr	16,3 %
Medián	11 %
95% IS pro medián	10-12,6 %
Rozptyl	220 %
Směrodatná odchylka	14,8 %

*IS-interval spolehlivosti*



Obr. 7 Grafické znázornění výskytu aktivovaných NK buněk vůči spermii ve skupinách pacientek s negativním a pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermii.

*NKS%*-procento NK buněk aktivovaných s antigeny spermii, *%INH.SP*- inhibice migrace leukocytů s antigeny spermii (cut off 65 %).

Při porovnávání výsledků testu inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu s pozitivními (> 24,99) a negativními (< 25) výsledky aktivace NK buněk s antigeny trofoblastu nebyly zjištěny statistické významnosti (viz tab. 11).

Tab. 11 Výsledky testu inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny trofoblastu u žen s pozitivním a negativním testem aktivace NK buněk vůči trofoblastu.

Výsledek testu inhibice migrace leukocytů	Negativní aktivace NK buněk vůči trofoblastu (< 25)	Pozitivní aktivace NK buněk vůči trofoblastu (> 24,99)
Pozitivní	15 (5,5 %)	1 (3,2 %)
Negativní	259 (94,5 %)	30 (96,8 %)
Celkem	274	31



Rovněž vztah počtu aktivovaných NK buněk vůči trofoblastu a pozitivitu testu inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu nebyl statisticky významný. Počty aktivovaných NK buněk po kultivaci s antigeny trofoblastu jsou uvedeny v tabulkách 12 (pacientky s pozitivním testem inhibice migrace) a 13 (pacientky s negativním testem inhibice migrace).

Tab. 12 Statistická charakteristika hodnot aktivovaných NK buněk vůči trofoblastu u souboru žen s pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu.

Počet pozitivních	16
Nejnižší hodnota	2,2 %
Nejvyšší hodnota	31,6 %
Aritmetický průměr	12,5 %
Medián	11 %
95% IS pro medián	6-18 %
Rozptyl	63,7 %
Směrodatná odchylka	8 %

*IS-interval spolehlivosti*

Tab. 13 Statistická charakteristika hodnot aktivovaných NK buněk vůči trofoblastu u souboru žen s negativním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu.

Počet negativních	289
Nejnižší hodnota	0,4 %
Nejvyšší hodnota	58 %
Aritmetický průměr	13,2 %
Medián	11,4 %
95% IS pro medián	10-12 %
Rozptyl	91,6 %
Směrodatná odchylka	19,5 %

*IS-interval spolehlivosti*

### 5.3 Vztahy mezi buněčnou imunitou žen a protilátkami

V této části byl hodnocen vztah mezi buněčnou imunitou a protilátkami proti zona pellucida (AZPA), proti štítné žláze (ATYR), proti spermiím (ASA) a antifosfolipidovými protilátkami (APA), (tab. 14, 15, 16, 17, obr. 8, 9).

Ze statistického hodnocení vyplývá, že je přítomen vztah mezi buněčnou imunitou a přítomností antifosfolipidových protilátek. Ženy s přítomností inhibice migrace leukocytů vůči trofoblastu mají častěji pozitivní autoprotiilátky proti fosfolipidům. Hodnocení bylo provedeno McNemarovým testem. Vztahy ostatních sledovaných protilátek, nebyly statisticky významné.

Tab. 14 Hodnocení výskytu protilátek proti zona pellucida (AZPA) při pozitivních a negativních výsledcích testů inhibice migrace leukocytů a aktivace NK buněk vůči antigenům spermií a trofoblastu.

AZPA	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. INH TR	Poz. INH TR	Neg. NKSP	Poz. NKSP	Neg. NKTR	Poz. NKTR
Pozitivní	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativní	254 (96,9%)	42 (97,7%)	281 (97,2%)	15 (93,8%)	235 (96,7%)	61 (98,4%)	267 (98,4%)	29 (93,5%)
Hraniční	8 (3,1%)	1 (2,3%)	8 (2,8%)	1 (6,2%)	8 (3,3%)	1 (1,6%)	7 (2,6%)	2 (6,5%)
Celkem	262	43	289	16	243	62	274	31

*INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, INH TR – inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím, NKTR – aktivace NK buněk vůči trofoblastu.*

Tab. 15 Hodnocení výskytu protilátek proti štítné žláze (ATYR) při pozitivních a negativních výsledcích testů inhibice migrace leukocytů a aktivace NK buněk vůči antigenům spermií a trofoblastu.

ATYR	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. INH TR	Poz. INH TR	Neg. NKSP	Poz. NKSP	Neg. NKTR	Poz. NKTR
Pozitivní	45 (17,2%)	7 (16,3%)	48 (16,6%)	4 (25%)	43 (17,3%)	9 (14,5%)	48 (17,5%)	4 (12,9%)
Negativní	214 (81,7%)	36 (83,7%)	238 (82,4%)	12 (75%)	197 (81,1%)	53 (85,5%)	224 (81,8%)	26 (83,9%)
Nemá vyšetřeno	3 (1,1%)	0	3 (1,0%)	0	3 (1,2%)	0	2 (0,7%)	1 (3,2%)
Celkem	262	43	289	16	243	62	274	31

*INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, INH TR – inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím, NKTR – aktivace NK buněk vůči trofoblastu.*

Tab. 16 Hodnocení výskytu protilátek proti spermiím (ASA) při pozitivních a negativních výsledcích testů inhibice migrace leukocytů a aktivace NK buněk vůči antigenům spermií a trofoblastu.

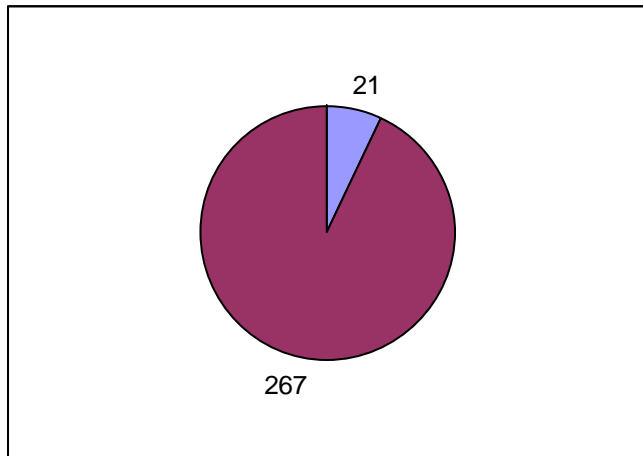
ASA	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. INH TR	Poz. INH TR	Neg. NKSP	Poz. NKSP	Neg. NKTR	Poz. NKTR
Pozitivní	53 (20,2%)	11 (25,6%)	63 (21,8%)	1 (6,2%)	48 (19,8%)	16 (25,8%)	54 (19,7%)	10 (32,3%)
Negativní	209 (79,8%)	32 (74,4%)	226 (78,2%)	15 (93,8%)	195 (80,2%)	46 (74,2%)	220 (80,3%)	21 (67,7%)
Nemá vyšetřeno	0	0	0	0	0	0	0	0
Celkem	262	43	289	16	243	243	274	31

*INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, INH TR – inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím, NKTR – aktivace NK buněk vůči trofoblastu.*

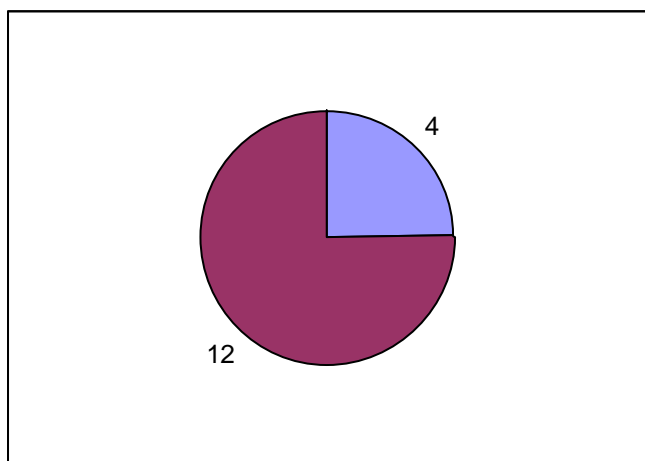
Tab. 17 Hodnocení výskytu antifosfolipidových protilátek (APA) při pozitivních a negativních výsledcích testů inhibice migrace leukocytů a aktivace NK buněk vůči antigenům spermií a trofoblastu.

APA	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. INH TR	Poz. INH TR	Neg. NKSP	Poz. NKSP	Neg. NKTR	Poz. NKTR
Pozitivní	23 (8,8%)	2 (4,7%)	21 (7,3%)	4 (25%)	22 (9,1%)	3 (4,8%)	22 (8%)	3 (9,7%)
Negativní	239 (91,2%)	40 (93%)	267 (92,4%)	12 (75%)	221 (90,9%)	58 (93,5%)	252 (92%)	27 (87,1%)
Nemá vyšetřeno	0	1 (2,3%)	1 (0,3%)	0	0	1 (1,6%)	0	1 (3,2%)
Celkem	262	43	289	16	243	62	274	31

*INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, INH TR – inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím, NKTR – aktivace NK buněk vůči trofoblastu.*



Obr. 8 Podíl v zastoupení pozitivních (21) a negativních (267) výsledků testu na přítomnost protilátek proti fosfolipidům u žen s negativním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů vůči trofoblastu.



Obr. 9 Podíl v zastoupení pozitivních (4) a negativních (12) výsledků testu na přítomnost protilátek proti fosfolipidům u žen s pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů vůči trofoblastu.

#### 5.4 Vztahy mezi buněčnou imunitou žen a ejakulátem partnerů

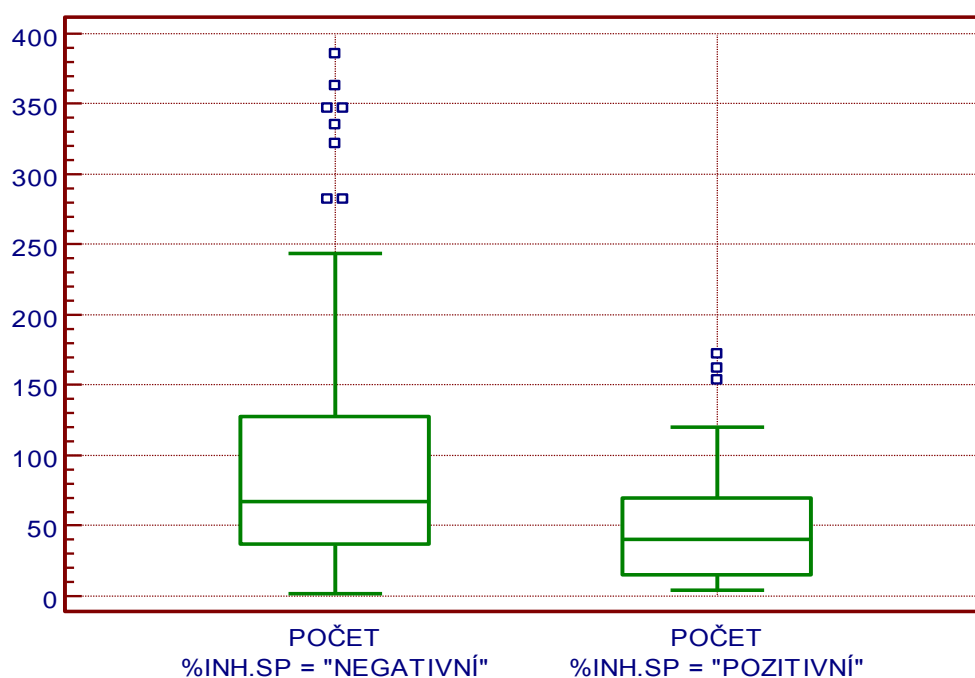
Hodnoceny byly vztahy mezi počtem spermií v ejakulátu partnerů vyšetřovaných žen, vitalitou spermií, počty leukocytů v ejakulátu, kvalitou akrozomu a přítomností intra-akrozomálního proteinu.

Při hodnocení vztahu mezi buněčnou imunitou vyšetřovaných žen a ejakulátu jejich partnerů se ukázalo, že pozitivní testy inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií u žen jsou spojeny s nižšími počty spermií v ejakulátu partnera (tab. 18, obr. 10). Vztahy mezi počtem spermií v ejakulátu partnerů vyšetřovaných žen a výsledky testu aktivace NK buněk vůči spermiím u žen byly na hranici statistické významnosti. Hodnocení bylo provedeno Wilcoxonovým statistickým testem.

Tab. 18 Charakteristika počtu spermií v ejakulátu partnerů žen, které měly pozitivní a negativní testy inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií a test aktivace NK buněk vůči spermiím. Počet spermií udán hodnotou  $\times 10^6 / \text{ml}$ .

Počet spermií	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. NKSP	Poz. NKSP
Počet testovaných	262	43	243	62
Nejnižší hodnota	2	4	2	5
Nejvyšší hodnota	386	172	386	220
Aritmetický průměr	87,7	49,1	86,3	66,4
Medián	67,5	40	66	43
95% IS pro medián	54 - 76,8	24,44 - 51,85	52 - 74,7	37,3 - 71,9
Rozptyl	5357	1833	5502	2933
Směrodatná odchylka	73	42,8	74,2	54,2

*IS-interval spolehlivosti, INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím.*



Obr. 10 Grafické znázornění počtu spermií v ejakulátu partnerů u žen s pozitivním a negativním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií. Počet spermií udán hodnotou  $\times 10^6 / \text{ml}$ .

*%INH.SP- inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií (cut off 35 %)*

Při hodnocení vztahu mezi vitalitou spermií v ejakulátu partnerů testovaných žen a buněčnou imunitou oněch žen nebyly nalezeny statisticky významné souvislosti (tab. 19).

Tab. 19 Charakteristika vitality spermií (udáno v %) v ejakulátu partnerů žen, které měly pozitivní a negativní testy inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií a test aktivace NK buněk vůči spermiím.

Vitalita spermií	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. NKSP	Poz. NKSP
Počet testovaných	262	43	243	62
Nejnižší hodnota	27	29	27	27
Nejvyšší hodnota	96	94	96	82
Aritmetický průměr	69,3	66,9	69,7	66,5
Medián	70	68	70	68
95% IS pro medián	68 - 72	66 - 73	68,2 - 72	65 - 71,7
Rozptyl	141,2	182,1	146,2	144,6
Směrodatná odchylka	11,9	13,5	12	12

*IS-interval spolehlivosti, INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím.*

Při hodnocení vztahu výskytu leukocytů v ejakulátu partnerů (tab. 20) vyšetřovaných žen a buněčné imunity vyšetřovaných žen nebyly nalezeny žádné statisticky významné souvislosti.

Tab. 20 Charakteristika leukocytů v ejakulátu partnerů žen, které měly pozitivní a negativní testy inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií a test aktivace NK buněk vůči spermiím. Počet leukocytů udán hodnotou  $\times 10^6$  / ml.

Leukocyty v ejakulátu	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. NKSP	Poz. NKSP
Počet testovaných	262	43	243	62
Nejnižší hodnota	0	0	0	0,01
Nejvyšší hodnota	12	5	12	8,1
Aritmetický průměr	0,9	0,6	0,9	0,6
Medián	0,3	0,3	0,3	0,3
95% IS pro medián	0,2 – 0,4	0,2 – 0,4	0,2 – 0,4	0,2 – 0,4
Rozptyl	2,8	0,9	2,8	1,3
Směrodatná odchylka	1,7	0,9	1,7	1,1

*IS-interval spolehlivosti, INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím.*

Při hodnocení vztahu integrity akrozomu (Hs14N) spermií partnerů hodnocených žen a buněčné imunity těchto žen (tab. 21, obr. 11) se ukázalo, že ženy s pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií mají partnery s vyšším podílem spermií s narušenou integritou akrozomu oproti ženám s negativním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií.

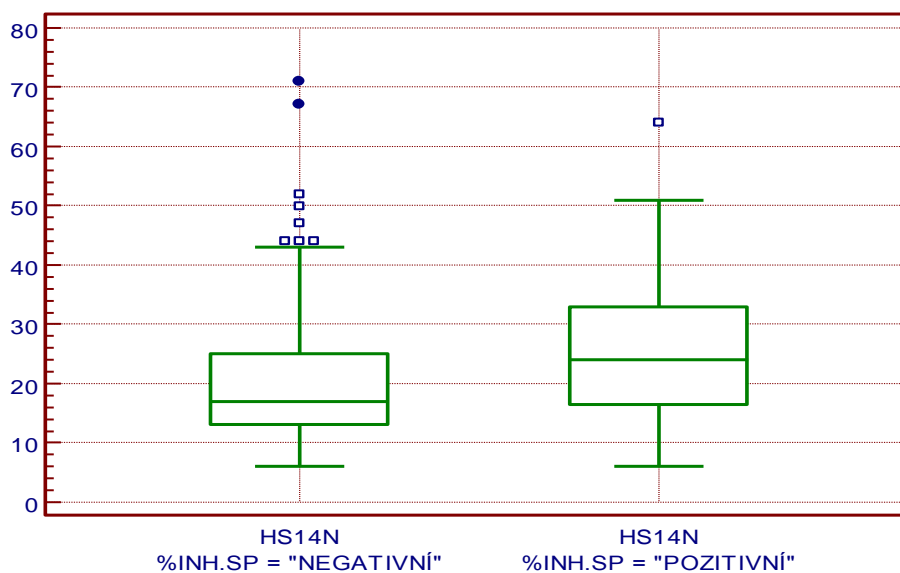
Výsledky hodnocení vztahu mezi integritou akrozomu spermií a testem aktivace NK buněk hodnocených žen jsou na hranici statistické významnosti. Hodnocení bylo provedeno Wilcoxonovým statistickým testem.



Tab. 21 Charakteristika integrity akrozomu spermií (udáno % spermií s narušenou integritou) partnerů žen, které měly pozitivní a negativní testy inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií a test aktivace NK buněk vůči spermiím.

Hs14N	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. NKSP	Poz. NKSP
Počet testovaných	262	43	243	62
Nejnižší hodnota	6	6	6	6
Nejvyšší hodnota	71	64	71	64
Aritmetický průměr	19,5	25,3	19,8	22,3
Medián	17	24	17	20,5
95% IS pro medián	16 – 18,9	18 – 28	16 – 18,8	17,3 – 24
Rozptyl	97,3	163,7	107,7	117,9
Směrodatná odchylka	9,9	12,8	10,4	10,9

*IS-interval spolehlivosti, INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím.*



Obr. 11 Grafické znázornění integrity akrozomu spermií partnerů u žen s pozitivním a negativním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií. Udáno % spermií s narušenou integritou.

*%INH.SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií (cut off 65 %), Hs14N – integrity akrozomu.*

Hodnocení vztahu mezi intra-akrozomálním proteinem spermií partnerů vyšetřovaných žen a jejich buněčné imunity nebylo statisticky významné (tab. 22).

Tab. 22 Charakteristika intra-akrozomálního proteinu spermií (udáno % spermií s přítomností intra-akrozomálního proteinu) partnerů žen, které měly pozitivní a negativní testy inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií a test aktivace NK buněk vůči spermiím.

Hs14P	Neg. INH SP	Poz. INH SP	Neg. NKSP	Poz. NKSP
Počet testovaných	262	43	243	62
Nejnižší hodnota	19	65	19	39
Nejvyšší hodnota	100	100	100	100
Aritmetický průměr	88,7	88,3	88,4	89,6
Medián	92	91	91	93,5
95% IS pro medián	90 – 93	88 – 94	89 – 92	90,3 – 95
Rozptyl	122,8	100	114,7	138
Směrodatná odchylka	11	10	10,7	11,7

*IS-interval spolehlivosti, INH SP – inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií, NKSP – aktivace NK buněk vůči spermiím.*

## 6 Diskuze

Pro hodnocení stavu buněčné imunity, jakožto možné příčiny opakovaného potrácení u infertilních žen, se používá stanovení aktivace NK buněk s antigeny spermií a trofoblastu a test inhibice migrace leukocytů rovněž s antigeny spermií a trofoblastu.

Je prokázáno, že zvýšení úrovně aktivace NK buněk má za následek ztrátu těhotenství. Prado-Drayer a další, (2008) zaznamenali zvýšenou aktivaci periferních NK buněk i T lymfocytů v periferní krvi u žen s opakovaným nejasným potrácením. Úroveň aktivace lymfocytů měřili též na základě exprese časného aktivačního znaku CD69. Podobně Coulam a další, (2003) publikovali zvýšenou expresi znaku CD69 na periferních NK buňkách u pacientek, které neúspěšně podstoupili *in vitro* fertilizaci v porovnání s pacientkami, u nichž byla *in vitro* fertilizace úspěšná. Stejně tak Thum a další, (2004) zjistili, že zvýšený absolutní počet aktivovaných CD69+ NK buněk v periferní krvi je asociován s horší prognózou u neplodných žen. Podobných prací sledujících aktivaci různých buněčných subpopulací v periferní krvi, produkci intracelulárních cytokinů či hodnocení sérové hladiny cytokinů je poměrně hodně. Pouze malá část prací se však zabývá úrovní aktivace jednotlivých buněk po kultivaci se specifickými antigeny. (Polgar, a další, 2002; Sivori, a další, 2000). Hodnocení aktivace po kultivaci se specifickými antigeny přitom napomáhá poznat reaktivitu jednotlivých buněk, která může být v periferní krvi ovlivněna řadou faktorů.

Test inhibice migrace je na rozdíl od hodnocení aktivity NK buněk testem dlouho užívaným. Již před 20 lety byly publikovány studie objektivně hodnotící buněčnou imunitu namířenou vůči spermiím pomocí testu inhibice migrace (Dimitrov, a další, 1992).

Opakované potrácení má multifaktoriální příčiny, infertilní ženy mohou potrácet z jiných než imunologických příčin, např. z hormonálních či anatomických příčin. Roli zde může hrát také zvýšený věkový průměr žen, vliv životního stylu (výživa, stres, kouření atd.), tyto vztahy však nebyly předmětem zkoumání práce.

V práci byl hodnocen soubor 305 žen, které se dostavily se svými partnery k vyšetření na Ústav klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové od roku 2009 do roku 2011. Ženy, které se dostavily k vyšetření bez partnera, byly ze souboru vyřazeny. U souboru žen byl hodnocen vliv klinických aspektů na opakované potrácení, vztahy mezi buněčnou imunitou a protilátkami a vztah mezi buněčnou imunitou a kvalitou ejakulátu partnerů vyšetřovaných žen. Porovnávány byly rovněž

dva testy sloužící k hodnocení buněčné imunity u žen s opakovaným potrácením. Konkrétně, souvislosti mezi testy inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny spermií a trofoblastu a testu aktivace NK buněk vůči spermiím a trofoblastu.

U klinických aspektů byla sledována přítomnost infekčního onemocnění v době vyšetření, zejména virového, které by mohlo mít vliv na zvýšení aktivace NK buněk, předchozí IVF pokusy nebo prodělaná inseminace a předchozí užívání hormonální antikoncepce. Ulčová-Gallová a další. (1996) zjistili, že hladiny protilátek proti zona pellucida bývají u některých žen tím vyšší, čím častěji u těchto pacientek dochází k odběru oocytů ze stimulované ovariální tkáně v průběhu IVF. V našem případě u těchto sledovaných klinických aspektů vyšetřovaných žen nebyl nalezen žádný přímý vztah k buněčné imunitě.

Srovnání výsledků testu inhibice migrace leukocytů a testu aktivací NK buněk ukázalo, že je souvislost mezi testem inhibice migrace vůči spermiím a testem aktivace NK buněk vůči spermiím. Ve skupině pacientek s pozitivním výsledkem inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií se rovněž častěji nachází zvýšená aktivace NK buněk s antigeny spermií. Lze tedy říci, že časově náročný a na provedení složitý test inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií je možné do jisté míry nahradit testem aktivace NK buněk s antigeny spermií prováděným pomocí průtokové cytometrie.

V další části práce byl hodnocen vztah protilátek k buněčné imunitě žen, konkrétně protilátek proti zona pellucida (AZPA), proti spermiím (ASA), proti štítné žláze (ATHYR) a antifosfolipidových protilátek (APA). Významný se ukázal vztah mezi antifosfolipidovými protilátkami a buněčnou imunitou. Antifosfolipidové protilátky zahrnují velkou skupinu protilátek, které bývají spojovány s komplikacemi v těhotenství. Ukázalo se, že u žen s pozitivním testem inhibice migrace leukocytů s antigeny trofoblastu se nacházely častěji pozitivní protilátky proti fosfolipidům. Antifosfolipidové protilátky mohou být příčinou hyperkoagulace na fetomaternálním rozhraní, mohou také zasahovat do růstu a invaze trofoblastu a mohou poškozovat jeho funkci. Přítomnost těchto protilátek v průběhu těhotenství může mít za následek indukci buňkami zprostředkované imunitní odpovědi. (Marai, a další, 2004; Mulla, a další, 2010)

Významný faktor ovlivňující buněčnou imunitu vyšetřovaných žen je kvalita ejakulátu jejich partnera. V tomto případě hraje roli snížený počet spermií v ejakulátu, který je spojen s aktivovanou buněčnou imunitou žen. Ženy s partnery, kteří měli nižší počet spermií v ejakulátu mely pozitivní test inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií. To může souviset zřejmě s faktem, že společně s horšící se kvalitou spermií

zároveň u mužů klesá jejich počet v ejakulátu. Další faktor, který hraje důležitou roli ve fertilizačním procesu je integrita akrozomu spermií. Akrozom je důležitý pro proniknutí spermie přes zona pellucida. Ženy s pozitivním výsledkem testu inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií mají partnery s vyšším podílem spermií s narušenou integritou akrozomu. To může být způsobeno tím, že imunitní systém ženy může reagovat na poškozený akrozom jako na antigenní strukturu.

Důvodem proč byly častěji nalezeny vztahy mezi sledovanými parametry (anti-fosfolipidové protilátky, počet spermií, integrita akrozomu) a testem inhibice migrace leukocytů, než vztahy mezi danými parametry a testem aktivace NK buněk může být takový, že test inhibice migrace leukocytů je nespecifický test hodnotící celou buněčnou imunitu naproti tomu test aktivace NK buněk je specificky zaměřen na určitou část buněčné imunity.

Práce má velký přínos pro laboratoř, protože ukazuje souvislost mezi oběma typy testů. Ukazuje nám, že NK buňky nesou podíl na aktivované buněčné imunitě vůči antigenům spermií a trofoblastu. Také nám ukazuje, že NK buňky nebudou jedinou populací, která zasahuje do imunitních reakcí vůči antigenům spermií a trofoblastu a další studium nám pomůže odhalit účast dalších buněčných subpopulací.

## 7 Závěr

Opakované potrácení je výsledek souhry mnoha faktorů od vlivů hormonálních, přes vlivy anatomické až po vlivy imunologické. Je proto žádoucí, aby byla laboratorní i klinická diagnostika opakovaného potrácení provedena v celém spektru, za účasti různých odborníků (gynekologů, imunologů, endokrinologů a dalších).

V práci byl zjištěn v souboru 305 žen vztah mezi buněčnou imunitou a antifosfolipidovými protilátkami a kvalitou spermií partnerů vyšetřovaných žen, jednalo se zejména o nízký počet spermií a porušenou integritu akrozomu. Závěrem lze říci, že stále se zhoršující kvalita spermií má nemalý podíl nejenom na mužské neplodnosti jako takové, ale i na aktivaci buněčné imunity žen, což může mít za následek potrat.

Při srovnávání dvou diagnostických testů určených k posouzení buněčné imunity infertilních žen byl zjištěn vztah mezi testem inhibice migrace leukocytů s antigeny spermií a testem aktivace NK buněk s antigeny spermií, kdy ženy, které měly pozitivní test inhibice migrace leukocytů, měly i zvýšené procento aktivace NK buněk. Z toho plyne, že lze pro hodnocení buněčné imunity u infertilních používat test aktivace NK buněk s (antigeny spermií) za použití průtokové cytometrie, který je rychlejší a jednodušší na provedení. Test inhibice migrace leukocytů pod agarózou může sloužit jako doplňující test ke komplexnímu hodnocení buněčné imunity.

Jak bylo zmíněno výše, neplodnost a opakované potrácení má multifaktoriální příčiny. Bylo by proto v budoucnu vhodné zhodnotit vlivy životního stylu a věku na buněčnou imunitu. Také by bylo vhodné zhodnotit úspěšnost terapeutických zásahů k potlačení patologické aktivace buněčné imunity.

## 8 Seznam zkratek

ADAM	a disintegrin and metalloprotease
APA	antifosfolipidové protilátky
ASA	protilátky proti spermím
ATHYR	protilátky proti štítné žláze
AZPA	protilátky proti zona pellucida
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	Cluster of Differentiation
CMV	cytomegalovirus
CRISP	cysteine-rich secretory protein
DN	double negative
CSF	colony-stimulating factor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barrové virus
EGF	epidermal growth factor
EPF	faktor časného těhotenství (Early Pregnancy Factor)
GM-CSF	granulocytární makrofágový colony stimulating factor CSF
hCG	lidský choriový gonadotropin
HLA	hlavní histokompatibilní systém člověka
IFN $\gamma$	interferon gama
IL	interleukin
INH SP	test inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny spermii
INH TR	test inhibice migrace leukocytů pod agarózou s antigeny trofoblastu
INS	inseminace
InsP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfát
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KIR	Killer-Inhibiting Receptors
LEU	leukocyty
LIF	gen pro leukemia inhibitory factor, regulační faktor
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger (mediátorová) ribonukleová kyselina
NK	natural killer buňky, přirození zabíječi

NKSP	test aktivace NK buněk s antigeny spermií
NKT	heterogenní podskupina T-lymfocytů
NKTR	test aktivace NK s antigeny trofoblastu
PAF-1	1 -0-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-fosfocholin
PIBF	progesteron – induced blocking factor
PLC	fosfolipáza C
PNK	periferní NK buňky
PWM	Pokeweed mitogen
STAT1	signal transducer and activator of transcription
TCR	semi-invariantní T-lymfatický receptor
TF	tkáňový faktor
TGF	tumor growth factor
Th lymfocyt	helper T-lymfocyt
TLR8	gen pro toll-like receptor 8
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
UNK	uterinní NK buňky
VITA	vitalita (spermií)
ZPI	protein Z dependentní proteázový inhibitor
$\beta$ 2GPI	$\beta$ 2-glycoprotein I



## 9 Literatura

**Blank, M. a Shoenfeld, Y.** Antiphospholipid antibody-mediated reproductive failure in antiphospholipid syndrome. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2010, 38(2-3), s. 141-147.

**Boyson, J. E., a další.** NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunol Invest.* 2008, 37(5), s. 565-582.

**De Carolis, C., Perricone, C. a Perricone, R.** NK cells, autoantibodies, and immunologic infertility: A Complex Interplay. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2010, 39(3), s. 166-175.

**Coulam, C. B. a Roussev, R.G.** Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 2003, 20(2), s. 58-62.

**de Laat, B., Mertens, K. a de Groot, PG.** Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008, 4(4), s. 192-199.

**Dimitrov, DG., a další.** A quantitative objective method for the evaluation of anti-sperm cell-mediated immunity in humans. *J Immunol Methods.* 1992, 154(2), s. 147-153.

**Drahošová, M.** Rutinní imunologická vyšetření neplodných párů. [Online] [Citace: 23. 1. 2012.]  
[http://www.dynex.cz/files/akce-dynex/casomil2010/03\\_Casomil-neplodnost2010.pdf](http://www.dynex.cz/files/akce-dynex/casomil2010/03_Casomil-neplodnost2010.pdf).

**Drahošová, M., a další.** Algoritmus pro stanovení parametrů protilátkové a buněčné imunity u žen a mužů s poruchami plodnosti. *Alergie.* 2010, 4, s. 285-291.

**Eckschlager, T. a Bartůňková, J.** *Průtoková cytometrie v klinické praxi.* Praha : Grada Publishing, 1999. s. 7-13. ISBN 80-7196-279-4.

**Evans, J. a Florman, H.** The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol.* 2002, 4, s. 57-63.

**Fukui, A., a další.** Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. *Fertil Steril.* 2008, 89(1), s. 157-165.

**Hořejší, V. a Bartůňková, J.** *Základy imunologie.* Praha : Triton, 2009. s. 151-153. ISBN 987-80-7387-280-9.

**Jones, RL., a další.** Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89(12), s. 6155-6167.

**Koopman, LA., a další.** Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med.* 2003, 98(8), s. 1201-1212.

**Krajčovičová, R., Hudeček, R. a Kalvodová, J.** Diferenciální diagnostika a terapie opakovaných těhotenských ztrát-2. část. *Prakt Gyn.* 2007, 11(5), s. 200-204.

**Krüssel, JS., a další.** Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003, 1, s. 2-9.

**Lightner, A., a další.** The fetal allograft revisited: does the study of an ancient invertebrate species shed light on the role of natural killer cells at the maternal-fetal interface? *Clin Dev Immunol.* 2008, 2008, s. 1-10.

**Luppi, P., a další.** Normal pregnancy is associated with peripheral leukocyte activation. *Am J Reprod Immunol.* 2002, 47(2), s. 72-81.

**Malíčková, K., a další.** Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii. *Interní Med pro parxi.* 2005, 10, s. 440-443.

**Marai, I., a další.** Autoantibody panel screening in recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol.* 2004, 51(3), s. 235-240.

**Martínková, J., a další. 2007.** *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů.* Praha : Grada Publishing, 2007. s. 255. ISBN 987-80-247-1356-4.

**Mlynarcikova, A., Fickova, M. a Scsukova, S.** Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocr Regul.* 2005, 39(1), s. 21-32.

**Moffett, A., Regan, L. a Braude, P.** Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *Brit Med J.* 2004, 329, s. 1283-1285.

**Mulla, MJ., a další.** Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol.* 2010, 63(5), s. 339-348.

**Nouza, K., Madar, J. a Nouza, M. a Kučera, E.** Imunologie a imunopatologie reprodukčního procesu. II. Imunologie těhotenství, opakovaného potrácení a poruch implantace blastocysty *Alergie.* 2007, 9(3), s. 233-240.

**Parham, P.** NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. *J. Exp. Med.* 2004, 200(8), s. 951-955.

**Prado-Drayer, A., a další.** Immunophenotype of peripheral T lymphocytes, NK cells and expression of CD69 activation marker in patients with recurrent spontaneous abortions, during the mid-luteal phase. *Am J Reprod Immunol.* 2008, 60(1), s. 66-74.

**Polgar, K. a Hill, JA.** Identification of the white blood cell populations responsible for Th1 immunity to trophoblast and the timing of the response in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecol Obstet Invest.* 2002, 53(1), s. 59-64.

**Procházková, J. a John, C.** *Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie.* Praha : Avicenum, 1986. s. 248-255. ISBN 08-043-86.

**Rai, R., Sacks, G. a Trew, G.** Natural killer cells and reproductive failure-theory, practice and prejudice. *Hum Reprod.* 2005, 20(5), s. 1123-1126.

**Salmon, JE. a de Groot, PG.** Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2008, 17(5), s. 405-411.

**Sivori, S., a další.** Triggering receptors involved in natural killer cell-mediated cytotoxicity against choriocarcinoma cell lines. *Hum Immunol.* 2000, 61(11), s. 1055-1058.

**Springer, D.** Štítná žláza. *Labor Aktuell.* 2010a, 1(10), s. 4-9.

**Springer, D.** Vyšetření funkce štítné žlázy v těhotenství. *Labor Aktuell.* 2010b, 2(10), s. 12-18.

**Szekeres-Bartho J.** Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol.* 2002, 21(6), s. 471-95.

**Thum, MY., a další.** An increase in the absolute count of CD56dimCD16+CD69+ NK cells in the peripheral blood is associated with a poorer IVF treatment and pregnancy outcome. *Hum Reprod.* 2004, 19(10), s. 2395-23400.

**Ulčová-Gallová, Z. a Mardešič, T.** Does in vitro fertilization (IVF) influence the levels of sperm and zona pellucida in infertile women? *Am J Reprod Immunol.* 1996, 36(4), s. 216-219.

**Ulčová-Gallová, Z., a další.** Placenta a annexin V receptory, protilátky proti annexinu V a proti ostatním fosfolipidům u žen opakovaně potrácejících. *Čes Gynek.* 2006, 71(6), s. 469-473.

**Ulčová-Gallová, Z.** *Neploďnost-útok imunity.* Praha : Grada Publishing, 2006. s. 73-86. ISBN 80-247-1493-0.

**Ulčová-Gallová, Z.** Poruchy plodnosti očima reprodukčního imunologa. *Forum Medicinae*. 2001, 5-6, s. 105-109.

**Willnow, TE., a další.** Defective forebrain development in mice lacking gp330/Megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93(16), s. 8460-8464.

**Wold, AS. a Arici, A.** Natural killer cell and reproductive failure. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005, 17(3), s. 237-41.

**Zhang, J., a další.** Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell Mol Immunol*. 2010, 8(1), s. 1-11.