

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH VĚD

Ústav porodní asistence

Denisa Valíková

Imunologické vyšetřovací metody neplodných párů

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Dr. Eva Kriegová

Olomouc 2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

Olomouc 30. dubna 2024

Denisa Valíková

Ráda bych upřímně poděkovala doc. Dr. Evě Kriegové za její odborné vedení a cenné rady, které mi byly velmi nápomocny při psaní této bakalářské práce. Poděkování bych také ráda předala celému týmu laboratoří Ústavu imunologie FNOL (přednosta prof. MUDr. Milan Raška, Ph.D.) za jejich praktické zkušenosti a ochotu. Velké díky patří mé rodině, která mi poskytovala nezbytnou podporu a bezpečné zázemí během celého studia.

Práce vznikla za finanční podpory grantu IGA_LF_2024_013.

ANOTACE

Typ závěrečné práce:	Bakalářská práce
Téma práce:	Imunologické vyšetřovací metody neplodných párů
Název práce v ČJ:	Imunologické vyšetřovací metody neplodných párů
Název práce v AJ:	Immunological screening methods for infertile couples
Datum zadání:	2023-11-24
Datum odevzdání:	2024-04-30
VŠ, fakulta, ústav:	Univerzita Palackého v Olomouci Fakulta zdravotnických věd Ústav porodní asistence
Autor práce:	Denisa Valíková
Vedoucí práce:	doc. Dr. Eva Kriegová
Oponent práce:	Bc. Helena Mogrovics
Abstrakt v ČJ:	Přehledová bakalářská práce se zaměřuje na současné možnosti vybraných imunologických vyšetřovacích metod pro neplodné páry. Práce shrnuje vybrané aspekty neplodnosti z imunologické příčiny jak u žen, tak u mužů. Současně popisuje přehled laboratorních imunologických testů a kritéria pro jejich indikaci se zaměřením na metody detekce protilátek proti spermiím a ovariím a antifosfolipidové protilátky a dysfunkce buněčné imunity. Použité poznatky byly čerpány z elektronických vědeckých databází Google Scholar, ProQuest, PubMed, Scopus a Web of Science.
Abstrakt v AJ:	The bachelor thesis focuses on the current possibilities of selected immunological testing methods for infertile couples. The thesis summarizes selected aspects of infertility due to immunological causes in both women and men. It also describes a review of laboratory immunological tests and the criteria for their indication, focusing on methods for detecting anti-sperm and ovarian

antibodies and antiphospholipid antibodies and cellular immunity dysfunction. The findings used were drawn from the electronic scientific databases Google Scholar, ProQuest, PubMed, Scopus and Web of Science.

Klíčová slova v ČJ: reprodukční imunologie, laboratorní metody, autoprotilátky, neplodnost, humorální a buněčná imunita

Klíčová slova v AJ: reproductive immunology, laboratory methods, autoantibodies, infertility, humoral and cellular immunity

Rozsah 44/5

(strany/přílohy):

OBSAH

ÚVOD	7
1 REŠERŠNÍ ČINNOST	9
2 INDIKAČNÍ KRITÉRIA IMUNOLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ.....	12
3 VYBRANÉ IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY NEPLODNOSTI	14
3.1 Imunitní systém a imunopatologie implantace.....	14
3.2 Poruchy buněčné složky imunitního systému	15
3.2.1 Populace T lymfocytů	16
3.2.2 NK buňky (Natural killer cells)	19
3.3 Poruchy humorální složky imunitního systému	23
3.4 Autoimunitní reakce v reprodukčním systému	23
3.4.1 Protilátky proti spermiiám (ASA)	24
3.4.2 Antiovariální protilátky (AOA)	27
3.4.3 Antifosfolipidové protilátky a antifosfolipidový syndrom	29
4 VÝZNAM A LIMITACE DOHLEDANÝCH POZNATKŮ	33
ZÁVĚR	34
SEZNAM ZKRATEK	42
SEZNAM OBRÁZKŮ	44

ÚVOD

Reprodukce je důležitou součástí lidského bytí, pro jehož úspěšnost je nezbytná biologická zdatnost jak ženy, tak muže. (Rehman et al., 2022, s. 227) Přesto se některým párům nedaří otěhotnět, což může mít řadu příčin. Mezi tyto příčiny patří genetická predispozice, anatomické nesrovnalosti, endokrinní dysbalance, a v neposlední řadě imunologický faktor. (Tomkiewicz, Darmochwał-Kolarz, 2023, s. 4-11) U zhruba deseti procent neplodných párů se setkáváme s poruchami imunity. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 52)

Proto by péče o páry s poruchou plodnosti měla zahrnovat i reprodukčně imunologické vyšetření. Poruchy imunity mohou ovlivnit jak samotnou schopnost početí, tak i udržení těhotenství a úspěšný průběh gravidity. V současné době nabízejí moderní imunologické vyšetřovací metody důležitý nástroj pro diagnostiku těchto problémů. Tyto metody umožňují důkladné zkoumání imunitních mechanismů spojených s poruchami plodnosti a poskytují cenné informace pro individuální přístup k léčbě neplodnosti u postižených párů. (GENNET, 2023) I přes nedávné pokroky v oblasti asistované reprodukce, mají některé páry za sebou několik neúspěšných pokusů in vitro fertilizace (IVF). Proto je klíčové zlepšit pochopení mechanismů této problematiky a identifikovat biomarkery pro hodnocení a předpověď výsledků těhotenství. (Wang et al., 2023) Cílem imunologického testování je identifikovat příčinu dysbalance, následně ji léčit a obnovit její správnou funkci. (GENNET, 2023) S ohledem na výše zmíněné aspekty se stává stále důležitějším začlenění metod reprodukční imunologie do běžných postupů péče o neplodné páry. (Čížková, Trnková, 2019)

Hlavním cílem bakalářské práce je představit současné nejčastější imunologické vyšetřovací metody neplodných párů. Cíl bakalářské práce je nadále specifikován dílčími cíli:

1. Shrnout imunologické aspekty neplodnosti u ženy a muže neplodného páru.
2. Představit indikační kritéria k reprodukčně imunologickým vyšetřením párů s poruchami plodnosti.
3. Představit současné možnosti imunologických laboratorních vyšetření neplodných párů.

Jako vstupní literatura byly prostudovány publikace:

1. JÍLEK, Petr, 2019. Imunologie stručně, jasně, přehledně. 2., doplněné vydání. Grada. ISBN 978-80-271-0595-3.
2. KREJSEK, Jan, 2016. Imunologie člověka. Garamon. ISBN 978-80-86472-74-4.

3. RAŠKA, Milan, 2013. Imunologické vyšetřovací metody pro studenty LF UP v Olomouci. Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3430-8.
4. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka a MADAR, Jindřich, 2020. Imunologie a imunopatologie lidské reprodukce. 2., přepracované a doplněné vydání. Maxdorf. ISBN 978-80-7345-648-1.

1 REŠERŠNÍ ČINNOST

ALGORITMUS REŠERŠNÍ ČINNOSTI



VYHLEDÁVACÍ KRITÉRIA

Klíčová slova v ČJ: reprodukční imunologie, laboratorní metody, autoprotilátky, neplodnost, humorální a buněčná imunita

Klíčová slova v AJ: reproductive immunology, laboratory methods, autoantibodies, infertility, humoral and cellular immunity

Jazyk: český, anglický

Období: 2018-2024

Další kritéria: plně dostupný text, recenzovaná periodika



DATABÁZE

Google Scholar, ProQuest, Pub Med, Scopus, Web of Science



Celkem nalezeno 116 článků



VYŘAZUJÍCÍ KRITÉRIA

Duplicitní články

Články nesplňující kritéria rešeršní činnosti

Články nekorelující s cíli bakalářské práce



SUMARIZACE VYUŽITÝCH DATABÁZÍ A DOHLEDANÝCH DOKUMENTŮ

Google Scholar – 11

ProQuest – 3

Pub Med – 15

Scopus – 4



SUMARIZACE DOHLEDANÝCH PERIODIK A DOKUMENTŮ

AJOG American Journal of Obstetrics & Gynecology – 1
Al-Anbar Medical Journal – 1
American Journal of Reproductive Immunology – 3
Annals of Translational Medicine – 1
BJOG An International Journal of Obstetrics & Gynaecology – 1
Central European Journal of Immunology – 1
ČGPS ČLS JEP – 1
European Society of Human Reproduction and Embryology – 1
Fertility and Sterility – 2
Folia Histochem Cytobiol – 1
Frontiers in Immunology – 1
Human Reproduction – 1
Human Reproduction Update – 1
Journal of Clinical Medicine – 1
Journal of Immunology – 1
Journal of Reproductive Immunology – 3
Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology – 1
Klinická Imunológia a Alergológia – 3
Maternal-Fetal Medicine – 1
RBGO Gynecology and Obstetrics – 1
Reproduction – 1
Reproductive and Developmental Medicine – 1
Reproductive BioMedicine – 1
The Journal of Immunology – 1
The Lancet – 1
The World Journal of Men's Health – 1
World Health Organization – 1

Webové stránky – 2



Pro tvorbu teoretických východisek bylo využito celkem 34 článků, 6 odborných knih a 4 doporučené postupy.

2 INDIKAČNÍ KRITÉRIA IMUNOLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ

Imunologické vyšetření odborníkem se párům, kterým se nedaří počít, doporučuje po roce pravidelného, nechráněného pohlavního styku. Tato diagnostika sterility je v České republice relevantní přibližně pro 15 % párů v reprodukčním věku. (Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP, 2021, s. 1) Ve světovém měřítku se hovoří o 50–70 miliónech párů. (Shen et al., 2021, s. 162) Dalším termínem, který trápí populaci žen, je ztráta těhotenství, tedy infertilita, která je definována jako spontánní zánik těhotenství před dosažením životaschopnosti plodu. Ztráta těhotenství zahrnuje veškeré ztráty od okamžiku početí do 24. týdne těhotenství. Avšak je třeba podotknout, že díky inovacím v péči o novorozence se definice může v různých zemích lišit. Taktéž je nutno rozlišit primární opakovanou ztrátu, kdy životaschopné těhotenství nikdy nepřekročilo hranici 24. týdne a sekundární opakovanou ztrátu, kdy životaschopné těhotenství pokračovalo i po 24. týdnu, a to jednou či ve více epizodách. (Godijn et al., 2017, s. 16)

Prvním krokem k diagnostice poruch plodnosti je podrobný odběr anamnézy a vyšetření lékařem, který komplexně zhodnotí neplodný pár. Lékař hodnotí například dobu trvání poruch, bere zřetel na rodinou historii předčasné menopauzy, genetické vady, dále anamnézu menstruačního cyklu, a také například užívání léků či předchozí sexuálně přenosná onemocnění. (Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP, 2021, s. 1) Lékař by měl být vzdělaným odborníkem v oblasti gynekologie a imunologie zároveň. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 154) Diagnostika poruch plodnosti by měla být zajištěna především efektivně a systematicky tak, aby se příčiny identifikovaly co nejdříve. (Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP, 2021) Nedávná studie (Quenby et al., 2021) kritizovala péči věnovanou sporadickým potratům. Autoři celosvětově vybízí ke zlepšení systému, který se prozatím věnoval pouze párům, které prožili tři opakované ztráty těhotenství. Tato průlomová práce navrhla model, který by měl podpořit budoucí těhotenství postižených párů, bez ohledu na to, zda se tato skutečnost odehrála jednou či vícekrát. Žena, která potratila jednou by měla být vyšetřena na základě zdravotních potřeb a informována o pokynech pro další těhotenství. Pokud žena potratí v epizodách, mělo by jí být zajištěno vstupní vyšetření, možnost návštěvy potratové kliniky a celá řada vyšetření založených na důkazech. (Quenby et al., 2021)

V České republice je doporučováno u neplodných párů vyšetření imunologického faktoru neplodnosti, a to jak u ženy, tak u muže. Jedná se zhruba o 10 % případů neplodnosti z imunologické příčiny, ale odhaduje se i vyšší výskyt až 40 % případů. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 52) Toto vyšetření však není zahrnuto do vstupního vyšetřovacího pilíře. (Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP, 2021, s. 1-4) Spektrum diagnostiky je v reprodukční

imunologii velké, a proto by výběr vyšetření měl odpovídat problémům neplodnosti ženy i muže. Současně jsou vyšetření vybírána tak, aby zohledňovala finanční stránku celého procesu včetně následné léčby páru. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 151-154) Indikace k reprodukčně imunologickému vyšetření zahrnují páry: 1) kterým se nepodařilo počít po roce pravidelného nechráněného styku a byly u nich vyloučeny jiné etiologické příčiny, 2) páry s 1-2 nevydařenými cykly IVF, 3) páry, kde žena během svého života prožila dva či více potratů, 4) páry, které se potýkají s autoimunitním onemocněním, onkologickou či jinou zatěžující diagnózou a 5) páry plánující kryokonzervaci pohlavních buněk z důvodu onkologické diagnózy a její léčby. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 154)

Doporučení vyšetření imunologických faktorů neplodnosti je odlišné u ženy infertilní a sterilní, stejně tak jako u muže. (GENNET, 2023) Stoupající věk žen, které se pokoušejí otěhotnět může mít velký vliv na to, zda těhotenství bude úspěšné či nikoliv. Ženu ve věku nad 35 let se doporučuje začít vyšetřovat po 4–6 měsících nevydařené snahy o graviditu, a to vzhledem k možné snížené reakci na pozdější léčbu. Ženu nad 40 let, která se taktéž potýká s neúspěšnými pokusy otěhotnět, odesíláme do specializovaného centra ihned, a to z důvodu vysokého rizika ztráty těhotenství. (Pilka, Dostál, 2022, s. 112) Stárnutí matek je spojeno se sníženým množstvím a kvalitou přežívajících oocytů, což zvyšuje pravděpodobnost, že oplodněná vajíčka budou aneuploidní. Dle prospektivní studie je u žen ve věku 30–34 let riziko potratu 15 %. (Regan et al., 2023) U žen ve věku 40–44 let je tato míra rizika až 51 %. Nejvyšší potratovost shledáváme u žen nad 45 let, kdy studie vyhodnotila 93% riziko ztráty těhotenství. (Regan et al., 2023) Kontraindikace k reprodukčně imunologickému vyšetření zahrnují: probíhající infekci, stimulaci hormonální léčbou, interval kratší než 6 týdnů po abortu, porodu či břišní operaci imunointervenční léčbu a užívání návykových látek. Za relativní kontraindikaci lze považovat stimulaci hormonální léčbou a modulaci imunitní odpovědi. (Koubková, 2023)

3 VYBRANÉ IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY NEPLODNOSTI

Úspěšnost léčby neplodnosti se díky rozvoji reprodukční medicíny výrazně zvýšila. Avšak i po oplodnění IVF nebo opakované ztrátě těhotenství může u žen docházet k opakovanému selhání implantace (RIF). (Ali et al., 2018) Příčiny neplodnosti lze zařadit do čtyř základních kategorií, kterými jsou: ženský faktor, mužský faktor, kombinace faktorů ze stran ženy i muže a nevysvětlitelné příčiny. (Wang et al., 2023) Obě pohlaví se na faktoru sterility podílejí zhruba stejně, asi 35 %. (Pilka, Dostál, 2022, s. 113) Dle zahraničního doporučeného postupu (Romualdi et al., 2023, s. 1882), trpí zhruba 30 % neplodných párů tzv. "nevysvětlitelnou neplodností" (UEI). Nerovnováha imunitního systému ovlivňuje výsledek snahy o graviditu a je považována za hlavní příčinu 50 % UEI. Neplodný pár spadá do kategorie UEI tehdy, splňuje-li následující kritéria. U ženy musí být průchodný alespoň jeden vejcovod, musí pravidelně ovulovat a u partnera nebyla nalezena žádná abnormalita ve vzorku spermatu. (Wang et al., 2023) Ukázalo se, že jedním z rizikových faktorů pro ztrátu ovulace a hormonální rovnováhy je obezita. Tuková tkáň je orgán, ze kterého buňky uvolňují cytokiny, které jsou významnými regulátory imunitní odpovědi, a tím přispívají ke chronickému zánětu. Je prokázáno, že vyšší množství tuků v těle souvisí se zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni, konkrétně IL-6, IL-1 β , TNF- α a další. Nerovnováha imunitního systému může zapříčinit nesprávnou implantaci vajíčka a nesprávný vývoj placenty. Matčín imunitní systém bude považovat buňky embrya za cizí a zaútočí na ně. Již 10% úbytek váhy má vliv na zlepšení plodnosti a snížení tvorby zánětlivých cytokinů. (Bergendiová, Tibenská, 2023, s. 10) Doporučený postup z roku 2023 uvádí, že opakované potrácení není náhodné a vyskytuje se i tehdy, není-li u plodu nalezena žádná chromozomální aberace. (Regan et al., 2023)

V posledních letech odborníci shledali spojitost mezi imunitním faktorem a mateřskou tolerancí. Pokud se vyskytne změna v imunitních buňkách, může být tato mateřská tolerance narušena a vést tak k neúspěšné implantaci a početí. (Wang et al., 2023) Nedávná práce Moldenhauera et al. (2022) prokázala, že v těhotenství není imunitní odpověď ženy potlačena. V děloze se totiž nachází velké množství imunitních buněk, které jsou v těsném kontaktu s infiltrujícím trofoblastem a aktivně se podílejí na mnoha aspektech vzniku, udržení a ukončení těhotenství.

3.1 Imunitní systém a imunopatologie implantace

Imunitní systém je složen ze dvou vzájemně kooperujících složek: přirozené a adaptivní imunity. Přirozená někdy taktéž nazývaná vrozená, či nespecifická imunita je první linií obrany a nemá paměť, reaguje okamžitě po rozpoznání patogenních motivů a vždy stejným

mechanismem. Naopak adaptivní imunita je založena na vazbě antigenu na specifický receptor a rozpoznává specifický antigen. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 20) V děloze dochází k významným změnám v imunitním systému plodu, které zahrnují jak vrozenou, tak adaptivní imunitu. Aby mohly fetální a mateřské buňky společně existovat, je nutno řady specializovaných mechanismů, které zajišťují materno-fetální toleranci. (Moldenhauer et al., 2022)

Důležitou vlastností imunitního systému je rozpoznat vlastní od cizího. Těmto pochodům se naše tělo učí již před narozením – v děloze. (Jílek, 2019, s. 48) V průběhu těhotenství matka toleruje antigeny plodu. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 20) Implantace zárodku do sliznice dělohy je multifaktoriální proces. Dnes již víme, že i embryo přenesené metodou IVF, ať je alogenní či darované, zvládne kooperovat s imunitou matky. Někdy však tyto mechanismy selžou a embryo tolerováno není. To může vést k neúspěšnému uhnízdění nebo časným potratům. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 50-51) Za schopnost rozpoznání vlastního od cizího zodpovídá systém tříd hlavního histokompatibilního komplexu (HLA). Rozdělujeme je na molekuly třídy I. a II., které jsou důležité pro kompatibilitu tkání a jiné biologické pochody. HLA–I se nacházejí na povrchu všech jaderných buněk v těle a spolupracují s CD8+ lymfocyty. HLA–II nalézáme na povrchu antigen-prezentujících buněk, jako jsou dendritické buňky, makrofágy, B–lymfocyty a spolupracují s CD4+ lymfocyty. (Jílek, 2019, s. 35-39) Lidské embryo má polovinu genetické výbavy od matky a polovinu od otce. V období těhotenství nahrazují polymorfní HLA třídy I a II nepolymorfní HLA-G molekuly, které kooperují s KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors) na NK buňkách (natural killer cells). Pokud se KIR a HLA-G navzájem váží, uterinní NK buňky produkují embryoprotektivní cytokiny, které podporují imunitní toleranci. Ani tento proces kvůli různým formám alel nemusí být efektivní. Předpokládá se, že takto změněné kombinace mohou být důvodem pro sterilitu párů, kteří mají potomky z předchozích vztahů. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 50-51)

3.2 Poruchy buněčné složky imunitního systému

T a B lymfocyty jsou základní buněčné komponenty specifické imunity. Jedná se o specializované bílé krvinky, které hrají důležitou roli v imunitním systému organismu. T lymfocyty vznikají v brzlíku a putují do lymfatických uzlin, sleziny a mízních uzlin. (Jílek, 2019) Jejich hlavní úkol je aktivovat a regulovat buněčnou imunitu. B lymfocyty vznikají v kostní dřeni a po přeměně na plazmatické buňky jsou zodpovědné za tvorbu protilátek. Obě tyto složky mezi sebou vzájemně interagují. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 20)

3.2.1 Populace T lymfocytů

Imunologická odpověď známá jako "imunita zprostředkovaná buňkami" je taková, při níž se aktivují NK buňky, makrofágy a T lymfocyty. (Shakerian et al., 2022) T lymfocyty se skládají ze subpopulací, mající odlišné funkční vlastnosti a fenotyp. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 20) T lymfocyty mají na svém povrchu TCR neboli T–buněčný receptor (z angl. T–cell receptor). T lymfocyty dělíme na dvě skupiny: 1) cytotoxické CD8⁺ (T_C) lymfocyty a 2) CD4⁺ (T_H) pomocné lymfocyty (z angl. T_H–helper). (Jílek, 2019, s. 58) Další dělení T_H buněk je na 1) T_H1 buňky, které generují interferon-gama (IFN γ) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), 2) T_H2 buňky, které generují IL-4, IL-5 a IL-13 a 3) T_H17, které uvolňují IL-17. (Shakerian et al., 2022) Dalším typem subpopulace jsou tzv. Tregs (regulační lymfocyty), které tlumí imunitní reakce. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 20)

Pomocné T_H-helper a T–regulační lymfocyty

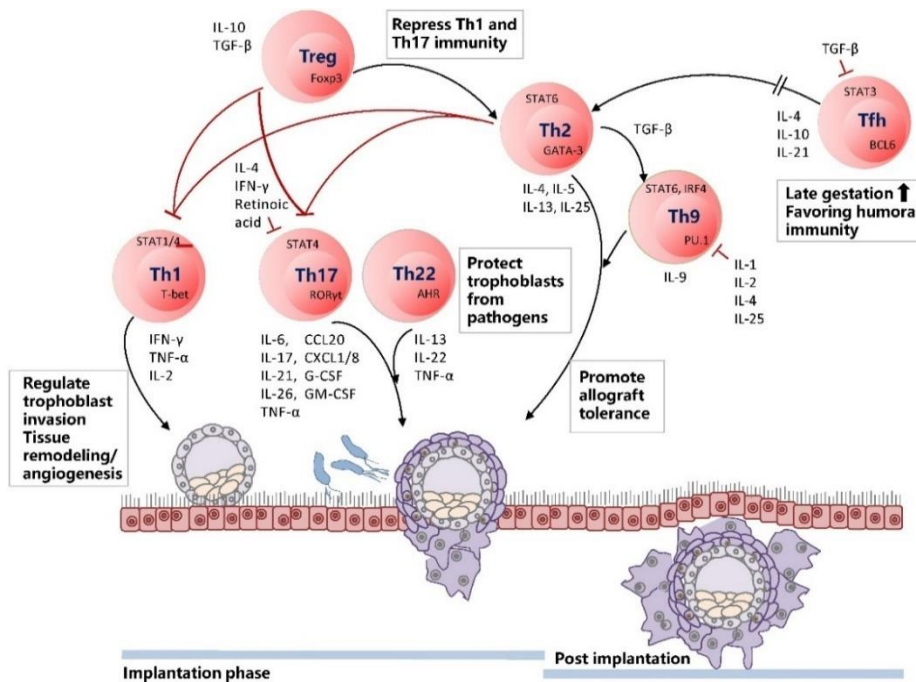
Vyšetření může být nabídnuto ženám s RPL, u kterých je nezbytné provést diagnostiku s cílem objasnit případné poruchy imunitní tolerance k plodu a vyloučit trombofilní dispozice. (GENNET, 2023) V období těhotenství hrají roli různé podskupiny T lymfocytů. V časně fázi implantace převládá imunita typu Th1, po placenci imunita typu Th2. Počet Th17 je v děloze vyšší nežli v periferní krvi a tyto buňky hrají roli při implantaci oplodněného vajíčka (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 138) Avšak i přes tuto ochranou funkci Th17 může dojít k nekontrolovatelné aktivaci, vedoucí k nadměrnému zánětu, který potencionálně může poškodit plod (Wang et al., 2020). Pokud převažuje Th1 imunitní prostředí a zvýší se počet buněk Th17 a IL-17 v krvi a děloze, může docházet k selhání implantace a opakovaným potratům (Koubková, 2023). Detekce buněk Th17 v krvi je u zdravých jedinců výjimečná. Fyziologické těhotenství je charakterizováno převládající imunitou typu Th2, zatímco u žen, které opakovaně potratily, byla zjištěna převládající imunita typu Th1. U pacientek podstupujících IVF je přechod Th1 imunity na typ Th2 spojován s úspěšným těhotenstvím (**Obrázek 1**). (Ali et al., 2018)

Udává se, že počet CD4⁺ buněk je v těhotenství z 10–30 % tvořen právě Tregs lymfocyty. Tregs vykonávají v decidui řadu funkcí k utlumení efektorové imunity. Kontrolují nežádoucí zánětlivou reakci a podporují tvorbu cévního systému, který je nezbytný pro výživu plodu. V proliferační fázi menstruačního cyklu se Tregs začínají shlukovat v děloze (Moldenhauer et al., 2022). Ve svém přehledu Wang et al. (2020) popisuje, že u žen s uRPL (unexplained recurrent pregnancy loss) se v krvi nacházelo více Th17 buněk a méně Tregs během proliferační a sekreční fáze ovulačního cyklu oproti zdravé kontrolní skupině žen. Uvádí se také, že hormony estrogen a testosteron mohou hrát roli v patogenezi RPL. To je příležitost pro aktivaci

odpovědi T lymfocytů na antigeny partnera, podané v semenné tekutině, která je nezbytná pro tvorbu rezervoáru Tregs. V semenné tekutině se totiž nacházejí silné imunoregulační a toleranci indukující látky. Ty následně stimulují epitel děložního hrdla k produkci cytokinů a chemokinů během pohlavního styku. Tato reakce se podobá zánětu a vtahuje do traktu buňky vrozené i adaptivní imunity. Antigeny v semenné tekutině jsou vychytávány děložními makrofágy a ty pak putují do lymfatických uzlin. Tam jsou T lymfocyty stimulovány ke tvorbě Tregs. Vytvořené Tregs jsou transportovány periferní krví do endometria, kde mají za úkol kontrolovat zánět, podporovat receptivitu dělohy k implantaci a stimulovat cévní změny pro podporu placentace. Studie naznačuje, že progesteron a faktory semenné tekutiny mohou hrát roli v regulaci funkce Tregs během těhotenství. Tyto faktory mohou pomoci Tregs udržet si jejich charakteristické vlastnosti, které zvyšují jejich schopnost potlačit imunitní reakci. (Moldenhauer et al., 2022)

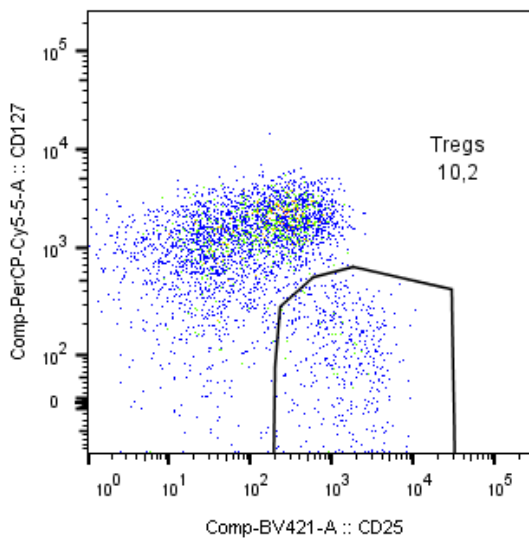
Obezita, diabetes 2. typu a hyperglykémie se v posledních desetiletích celosvětově dramaticky zvýšily. Je tak možné, že u některých žen je nedostatek Tregs důsledkem špatné regulace glykémie. Inzulínová rezistence, která má za následek hyperglykémii, může ovlivnit přísun energie, která pohání zásoby T buněk, a posunout tak poměr Th17/Treg buněk ve prospěch prozánětlivých T lymfocytů. Následně u žen s gestačním diabetem je funkce protizánětlivých Tregs buněk inhibována a tvorba prozánětlivých Th1 a Th17 je podporována, což může vést k potratům, předčasným porodům, a těhotenským komplikacím. Tato informace vyplývá z metaanalýzy 91 studií, která jasně potvrdila prozánětlivý stav se sníženým počtem Treg buněk u diabetiků 2. typu a pacientů s rezistencí na inzulín. (Moldenhauer et al., 2022)

Počty Tregs se v krvi během prvního a druhého trimestru těhotenství zvyšují a hromadí se v decidui. Tregs jsou charakteristické faktorem FoxP3, který zajišťuje jejich vývoj a funkci. (Kwak-Kim et al., 2022) Fyziologické hodnoty Tregs se pohybují v rozmezí 5-10 % v periferní krvi (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 137) a stanovují se pomocí průtokové cytometrie (**Obrázek 2**).



Obrázek 1 Přesmyk imunitní rovnováhy během implantace a těhotenství (Wang et al., 2020)

Další studie porovnávala hodnoty CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů v periferní krvi u 151 žen s primární infertilitou (PI) a kontrolní skupinou 46 plodných žen, všechny ženy byly ve věku od 20-44 let. Tato studie odhalila snížení počtu CD8⁺ T lymfocytů u žen s PI ve srovnání s kontrolní skupinou, přesto nedoporučuje zařazení vyšetřování T lymfocytů v periferní krvi jako screeningový diagnostický postup u žen s PI. (Shakerian et al., 2022) Jiná práce neprokázala rozdíly v počtu CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů mezi ženami plodnými a léčenými pro infertilitu. (Baczkowski, Kurzawa, 2007) Další studie (Chernyshov et al., 2019) udává, že nebyly zjištěny rozdíly v počtu CD8⁺ T lymfocytů mezi endometriální a periferní krví. Podle (Lachapelle et al., 1996) měly ženy, které opakovaně potratily, výrazně nižší procento endometriálních CD8⁺ T lymfocytů. Jiná studie tvrdí, že vyšetření Th1, Th2, Tregs a Th17 by bylo prospěšné rutinně zařadit pro hodnocení tolerogenních stavů RIF a RPL. (Ali et al., 2018) Stejný názor na tuto problematiku sdílí i další autoři (Luu et al., 2022), kteří prokázali, že kombinace více biomarkerů má přínos pro prognózu úspěšnosti těhotenství.



Obrázek 2 Gatování Tregs populace na průtokovém cytometru. Laboratoř školitele, 2023

3.2.2 NK buňky (Natural killer cells)

Jedná se o tzv. přirozené zabíječe, uplatňující se zejména v časném stádiu těhotenství. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 138) Při uhníždění embrya, v luteální fázi ovariálního cyklu, dochází ke zvýšení počtu uterinních NK buněk. Jejich hodnota v děloze narůstá kvůli působícímu progesteronu a IL-15, které jsou vyplavovány v čas implantace. (Ali et al., 2018) Jejich počet je tak významný, že představují největší skupinu uterinních leukocytů při tomto procesu a jsou dominantními buňkami pro I. trimestr gravidity. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 138-139) NK buňky upravují děložní prostředí tak, aby bylo vhodné pro růst a vývoj embrya. To zahrnuje angiogenezi, regulaci trofoblastu a stimulaci uvolňování cytokinů. (Ali et al., 2018) Silná aktivace uterinních NK buněk po interakci se spermii nebo trofoblastem poukazuje na jejich agresivnější chování vůči antigenům partnera nebo plodu. Zvýšené počty NK buněk mohou ztěžovat početí a zvyšovat pravděpodobnost potratu. (GENNET, 2023) Pokud v imunitním systému těhotné ženy nedojde k přesmyku imunitního typu na TH2, může se stát, že NK buňky v děloze využijí svých cytotoxických vlastností. Klíčovými a specifickými znaky NK buněk jsou molekuly CD16 a CD56, které se na jiných lymfocytech nevyskytují. Právě přítomnost CD16 a CD56 slouží k identifikaci NK buněk. CD16 je Fc receptor, který váže fragmenty IgG protilátek a zprostředkovává ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity). Díky tomu mohou NK buňky zabít cílové buňky opsonizované protilátkami. CD56 je molekula způsobující adhezi buněk. V lidském těle se vyskytují NK buňky ve dvou podobách. Téměř všechny NK buňky jsou tvořeny typem CD56^{low} (CD56^{dim}) exprimujícím cytotoxickou

molekulu CD16 a zhruba 10 % NK buněk je typu CD56^{high} (CD56^{bright}), který má výraznou expresi molekuly CD56. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 139)

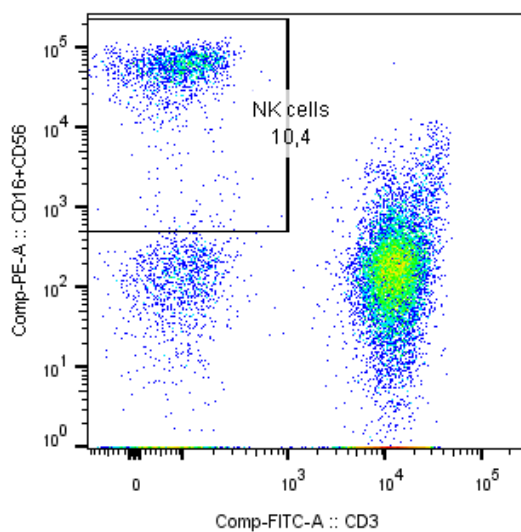
Ali et al., (2018) shrnul nesrovnalosti v testování uterinních a periferních NK. Pokud jsou tyto parametry hodnoceny procentuálně, metaanalýza neshledala rozdíly u žen neplodných a plodných. Pokud byly periferní NK měřeny jako absolutní čísla, vykazují u neplodných žen vyšší hodnoty NK buněk než u kontrolní skupiny. (Ali et al., 2018) Také další studie naznačuje, že počty NK buněk jsou u žen s diagnózou RPL či neplodností neinformativní. (Kwak-Kim et al., 2022) Do roku 2015 nebyl dohodnut jednotný způsob, jak měřit počet NK buněk a analyzovat jejich funkci v kontextu reprodukční imunologie. Hlavním problémem je, že vlastnosti periferních NK buněk nemusí přesně odpovídat vlastnostem uterinních NK buněk, které se nacházejí ve tkáních. Dle některých prací má měření uterinních NK buněk u žen s PI vyšší výpovědní hodnotu než periferní NK buňky. (Chernyshov et al., 2019) (Shakerian et al., 2022) Vzhledem k hormonálním změnám v populaci uterinních NK buněk a invazivní povaze biopsie endometria je nutné stanovit jednotný závěr ohledně normálního počtu nebo procenta stromálních buněk u zdravých kontrol. (Ali et al., 2018) Tento problém vyřešilo zasedání multicentrické skupiny v roce 2016, která standardizovala laboratorní techniky pro měření a vykazování počtu uterinních NK buněk. Dle doporučeného postupu ESHRE s aktualizací v roce 2022, jsou tyto standardy stále hodnoceny jako nedostatečné. (Goddijn et al., 2017) Dle nedávné studie, pro standardizaci referenčního rozmezí uterinních NK buněk, (Lash et al., 2016) bylo prokázáno, že ženy, které opakovaně potratily, skutečně vykazují významné zvýšení počtu uterinních NK buněk. (Chen et al., 2017) Studie však neprokázala shodu výsledků mezi centry a jejich vzorky. Stále je tedy nutné další zdokonalení a validace tohoto protokolu. (Lash et al., 2016)

Imunologická ambulance pro léčbu neplodnosti GENNET představila retrospektivní studii týkající se rozboru léčby pomocí technik asistované reprodukce u 95 žen, která probíhala od roku 2021 do roku 2022. (Černá et al., 2023) V této studii byl zkoumán význam typizace uterinních NK buněk u žen podstupujících léčbu asistované reprodukce. Některé vyšetřované ženy již v minulosti podstoupily IVF cykly pomocí různých typů stimulace, či stimulovány nebyly vůbec. Všechny však podstoupily přenos embrya, a to s maximem 21 transferů. Cílem studie bylo zdůraznit důležitost typizace uterinních NK buněk pro optimalizaci a individualizaci léčby neplodnosti. Mezi patologické nálezy byl zařazen nedostatečně aktivovaný imunitní typ („low-immune“) a na druhé straně až příliš aktivní, cytotoxický typ („over-immune“), kde dominuje cytotoxický fenotyp uterinních NK buněk. Dále byl popsán tzv. smíšený typ, který sestává z převahy cytotoxických uterinních NK buněk nad regulačními

uterinními NK buňkami a nízkých hodnot uterinních NK buněk. U 24,2 % žen byl zjištěn normální imunofenotyp uterinních NK, a proto u nich nebyl v rámci léčby IVF následný imunologický zásah nutný. Úspěšný přenos embrya proběhl u 13 % pacientek. 8,4 % žen, u kterých byl detekován nízký imunitní profil uterinních NK, byla doporučena intervence s cílem zvýšit šanci na úspěšné těhotenství, a to podpora luteální fáze hCG (těhotenský hormon choriový gonadotropin) a vystavení se seminální plazmě před a po preferovaném kryoembryotransferu. V této skupině mělo 25 % žen pozitivní těhotenský test. Další skupinu vyšetřovaných tvořily ženy (44,2 %), u nichž byl zjištěn příliš aktivovaný imunitní systém uterinních NK buněk. Tato skupina podstupovala IVF léčbu, při které byly podávány léky na potlačení imunitní reakce (kortikosteroidy a intralipidy) a zároveň ženy užívaly antioxidanty a vaginálně zaváděný progesteron. Párům s touto diagnózou bylo doporučeno užívání bariérové ochrany, konkrétně kondomu, při pohlavním styku. Tato skupina měla největší procentuální úspěšnost přenosu embrya (69 %). Poslední skupina byla tvořena vyšetřovanými se smíšeným typem uterinních NK buněk (23,2 %). Skupina byla léčena pomocí intralipidů podávaných do žíly a u 50 % žen došlo k otěhotnění. (Černá et al., 2023)

U NK buněk se pro neplodnost a RPL udávají počty nad 18 %, přičemž fyziologické hodnoty NK buněk v periferní krvi jsou v rozmezí 5-15 %. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 139) Stanovení počtu NK buněk je často vyšetřováno z biopticky odebrané tkáně endometria. Takový odběr probíhá v období kolem možné nidace, zhruba mezi 21.-23. dnem menstruačního cyklu. (Tibenská et al., 2023, s. 43-44) Toto načasování je pro určení správného počtu NK buněk velice významné, stejně tak jako výběr plochy endometria. (Kwak-Kim et al., 2022) Ženy léčené progesteronem odběr podstupují 6. den jeho užívání. Pro určení počtu NK buněk je využívána imunohistochemická či průtoková cytometrie (**Obrázek 3**). Průtoková cytometrie umožňuje detailní analýzu NK buněk, včetně rozlišení jejich subpopulací. Stinnou stránkou je obtížné stanovení jejich kvantity na některých cytometrech. (Tibenská et al., 2023, s. 43-44)

Závěrem lze říct, že neexistuje dostatek údajů, které by podporovaly doporučení, aby ženy s RPL podstoupily testování NK buněk v endometriální tkáni nebo periferní krvi. (Goddijn et al., 2017) Také nedávná metaanalýza poukazuje na nedostatečnou znalost funkce uterinních NK buněk a neprokázala vztah mezi hladinami periferních a uterinních NK buněk u žen s RPL/RIF. Udává, že vodítkem pro cílenou imunoterapii by mělo být až dokonalé prozkoumání účinků těchto buněk. (Von Woon et al., 2022)

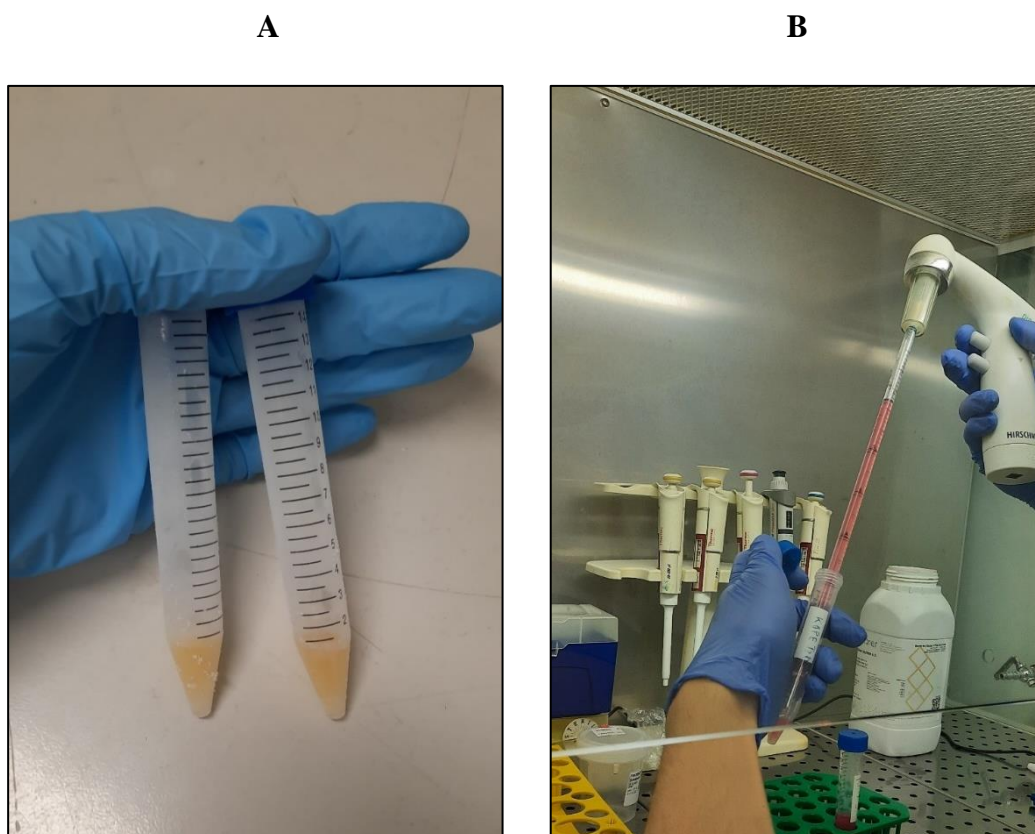


Obrázek 3 Gatování NK buněk na průtokovém cytometru. Laboratoř školitele, 2023

NK buňky v mužském pohlavním traktu

V mužském reprodukčním traktu se také vyskytují NK buňky. Nejčastěji jsou tyto buňky nacházeny v ejakulátu u mužů (**Obrázek 4**), jejichž pohlavní orgány jsou napadeny zánětem. Jako hlavní příčina mužské neplodnosti jsou sledovány právě infekce a záněty mužských pohlavních orgánů. Andrologické ambulance podávají informaci, že prevalence mužské neplodnosti způsobené infekcí se pohybuje od 6 % do 15 %. Bylo zjištěno, že počet spermií, jejich pohyblivost a vitalita negativně korelují s podílem invariantních NKT buněk (iNKT), podtypu tradičních NKT buněk. (Duan et al., 2020)

Závěrem lze říct, že kvalita spermií může být ovlivněna proliferační reakcí iNKT buněk, která může probíhat současně se zánětlivou reakcí na spermie. (Duan et al., 2020)



Obrázek 4 Ukázka laboratorního zpracování NK buněk **A)** Zmražené spermie pro stanovení aktivace NK buněk. **B)** Proces odstranění supernatantu pro stanovení aktivace NK buněk. Fotografie autora, Imunologická laboratoř FNOL, 2023

3.3 Poruchy humorální složky imunitního systému

Humorální imunita zahrnuje především protilátky, které se specificky vážou na antigen a neutralizují jej. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 20) Další důležitou humorální složku imunitního systému tvoří komplement, který je součástí vrozené imunity a je složen z proteinů nacházejících se v krvi. (Berg et al., 2017, s. 399-400)

3.4 Autoimunitní reakce v reprodukčním systému

Pokud náš imunitní systém není schopen tolerovat vlastní antigeny, může dojít k rozvoji autoimunitních onemocnění. U mužů shledáváme autoimunitu v menší míře než u žen. Protože imunitní systém žen má potenciál ovlivnit klíčové procesy od ovulace až po implantaci, může imunitní systém ženy rozhodnout o úspěchu či neúspěchu těhotenství. Z tohoto důvodu má autoimunita u neplodných žen zásadní význam. Některé příčiny ženské subfertility, včetně RPL, RIF po opakovaných pokusech pomocí asistované reprodukce a také UEI, lze vysvětlit autoimunitními mechanismy a zvýšenou produkcí autoprotiáték. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 34)

3.4.1 Protilátky proti spermiím (ASA)

Protilátky proti spermiím (ASA) byly objeveny již v roce 1954 jako jeden z aspektů mužské neplodnosti. (Gupta et al., 2022) Historie této problematiky však sahá hlouběji již do doby, kdy vědci byli obeznámeni s antigenností spermií. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 32) Ukazuje se však, že v neplodnosti hrají klíčovou roli především ASA u žen.

ASA u žen

V ženském pohlavním ústrojí musí lidské spermie splnit řadu náročných úkolů, včetně lokalizace vajíčka, proniknutí jeho ochrannými vrstvami a procesu akrozomální exocytózy. (World Health Organization, 2021, s. 139) U žen s UEI je udáván výskyt ASA v 15-20 %. Pokud jsou spermie vystaveny imunitnímu systému ženy, ASA jsou u žen produkovány v cervikálním hlenu či séru. Následně ovlivňují proces oplodnění tím, že mění kapacitu spermií a akrozomální reaktivitu, narušují pohyblivost spermií v celé míře reprodukčního systému ženy, a nakonec brání časné implantaci embrya. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 5) Ambulance pro léčbu neplodnosti uvádějí u žen výskyt protilátek imobilizujících spermie v séru okolo 3 %. (Shibahara et al., 2021, s. 3) Jedná se o imunoglobuliny, které jsou prakticky výhradně třídy IgG a IgA, a jsou zaměřeny na spermatickou buňku. V krvi převládá imunoglobulin IgG, zatímco v sekretech převažuje imunoglobulin IgA. (Silva et al., 2021, s. 57) Zevní membrána spermií, známá také jako akrozom, hraje klíčovou úlohu při ochraně spermie během průchodu reprodukčním traktem ženy. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 32)

ASA u mužů

V mužském těle je varle velmi unikátní orgán. Díky svému uložení mimo přímý krevní oběh v něm za běžných okolností nedochází k aktivaci imunitní reakce (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 32), neboť se zralé spermie nacházejí za bariérou mezi krví a varlaty. Spermie jsou proto fyziologicky izolovány od mužského imunitního systému. (Gupta et al., 2022) Vůči možnému napadení patogeny, je varle chráněno nadvarletem, které obsahuje makrofágy a jiné obranné imunitní buňky. Ty jsou detekovatelné v mužském ejakulátu, kam jsou exportovány krevním řečištěm nadvarlete. Pomocí hematotestikulární bariéry je tak vývoj spermií chráněn před imunitní systémem. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 32) Tu vytvářejí Sertoliho buňky. (Gupta et al., 2022) Bariéra obsahuje různé proteiny, včetně imunologicky relevantních antigenů. Vyvinuté pohlavní buňky (nositelé antigenu) mohou být vystaveny imunitnímu systému ve chvíli, kdy dojde k narušení bariéry mezi krví a varlaty. (Gupta et al., 2022) U mužů se s tímto důsledkem nejčastěji setkáváme při zánětech, u velkých poranění mužského reprodukčního traktu, obstrukci vývodných cest, autoimunitních reakcích nebo u nádorových onemocnění. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 32) U mužského faktoru neplodnosti sterilních

párů můžeme pozorovat přítomnost antispermatozoálních protilátek u 30-50 % mužů. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 32) ASA jsou přítomny u 70-100 % mužů po chirurgickém přerušení chámovodů a úzce tak souvisí s obstrukční azoospermií. Muži s diagnózou chronické prostatitidy jsou na vzniku ASA ohroženi 3x více oproti jedincům bez tohoto onemocnění. Důvod není přesně znám, ale spojitosti poukazují na zánětlivé procesy vedoucí k autoimunitním reakcím vůči spermiím. Objasněním produkce těchto protilátek by mohly být patogeny, jako jsou bakterie, viry, či houby. Také se diskutuje o infekci lidským papilomavirem, která může negativně přispívat k rozvoji ASA. (Gupta et al., 2022) Jejich výskyt je u mužů soustředěn na semennou plazmu a krevní sérum, zatímco u žen jsou včetně séra detekovatelné v hlenu děložního čípku. (Silva et al., 2021, s. 57)

Aby se mohlo hovořit o imunologickém aspektu neplodnosti, diagnóza ASA musí být podmíněna průkazem změněné funkční schopnosti spermií. (Gupta et al., 2022) Hlavním problémem výzkumů je identifikace specifických antigenů, které ASA účinně blokují v celé buňce, což nakonec může být příčinou poškození pohyblivosti spermií, kapacity, akrozomální reakce a kontaktu spermie s vajíčkem. (Silva et al., 2021, s. 64) Světová zdravotnická organizace doporučila testování protilátek proti spermiím jako standardní postup, odkazující na aglutinaci spermií. I když aglutinace může signalizovat přítomnost ASA, existují i jiné faktory, které ji způsobují. Naopak ASA se můžou vyskytovat i bez aglutinace. (Silva et al., 2021, s. 57) Mezi další indikační kritéria tohoto reprodukčně-imunologického vyšetření, patří astenozoospermie či neúspěšné IVF/IUI cykly. (Gupta et al., 2022) WHO doporučuje k průkazu imunoglobulinů jak přímé, tak nepřímé testy. Smíšená antiglobulinová reakce (MAR) a detekce pomocí immunobeads (IB) jsou dva běžně používané přímé postupy, které identifikují ASA na povrchu pohyblivých spermií. Zatímco test IB využívá promyté spermie, test MAR používá čerstvý vzorek spermatu. Pro obě vyšetření se vzorky kontrolují pod mikroskopem, i když se experimentální postupy pro každý test liší. Při MAR se uvádí podíl pohyblivých spermií s navázanými kuličkami. Průkazem jsou kuličky, které se přilepí na nepohyblivé a pohyblivé spermie, které mají na povrchu navázané protilátky. Tekutiny bez spermatu se zkoumají nepřímým testem. (World Health Organization, 2021, s. 119) Ten je také vhodný, pokud ejakulát obsahuje příliš mnoho spermií s nízkou motilitou. (Silva et al., 2021, s. 57) Při těchto testech se dárcovské spermie, které byly očištěny od semenné tekutiny a jsou zbaveny protilátek, kultivují ve zředěné, tepelně inaktivované tekutině, u níž je podezření na přítomnost ASA. Spermie se navážou pouze na protilátky přítomné v podezřelé tekutině, poté se výsledek vyhodnotí pomocí přímého testu. Pro správné provedení jsou potřebné pohyblivé spermie. (World Health Organization, 2021, s. 119) Nejčastěji používaným testem v andrologických

laboratořích je uváděn test MAR. Ve své retrospektivní kohortové studii vědci definují velmi silnou autoimunitu spermií, jako 100% pozitivitu tohoto IgG-MAR testu. (Gatimel et al., 2018) V kontrastu s tím, páry, které dosahovaly vyšší úspěšnost těhotenství (LBR 30 %), naopak projevovaly autoimunitu spermií nižší nežli 100 %. Klinické charakteristiky obou skupin byly srovnatelné a ukazují tak, že autoimunita spermií je hlavním faktorem ovlivňujícím přirozené početí. Zajímavým aspektem bylo, že u páru s vysokou autoimunitou spermií došlo k pouhým dvěma spontánním těhotenstvím až po čtyřech a sedmi letech od zařazení do výzkumu. Tyto výsledky naznačují, že i u párů s těžkou autoimunitou spermií je možné spontánní početí, ale je méně pravděpodobné, a také může trvat déle. (Silva et al., 2021, s. 64) Zásadní je také skutečnost, že výrobce snížil dostupnost testu IB a předpokládá se, že jej postupně nahradí nový imunoférický test (IS). (Silva et al., 2021, s. 57) Kromě výše zmíněných nepřímých testů, je díky svojí jednoduchosti a rychlosti využíván také sérologický test ELISA (**Obrázek 5**), který vyšetřuje krevní sérum. Existují však i jiné, dnes nepříliš populární, nepřímé metody jako je aglutinační test (TAT), želatinový aglutinační test (GAT) a imobilizační test spermií (SIT). (Silva et al., 2021, s. 57-58) Navzdory významnému technologickému pokroku v oblasti detekce a analýzy biologických molekul se jen málo výzkumů pokoušelo o pokrok v oblasti ASA. V nedávné studii, která využila proteomickou analýzu proteinů lidského spermatu, bylo identifikováno 32 antigenů, které byly nalezeny pouze v sérech ASA pozitivních jedinců. Tyto antigeny mohou být příčinou imunologické neplodnosti. Jedná se především o 12 důležitých antigenů, které se významně podílejí na celém procesu oplodnění. (Silva et al., 2021, s. 64) Sérové protilátky proti proteinu ACTL7A, který se nachází v akrozomu a ocasu zralých spermií, jsou jednou z nejnovějších metod detekce. (Gupta et al., 2022) U muže neplodného páru je další možností vyšetření akrozomální integrity. Někteří muži mohou mít normální výsledky základního vyšetření spermií, ale problém může být v poruše akrozomu nebo akrozomální reakci. (World Health Organization, 2021, s. 144) Autoimunitu spermií nelze diagnostikovat pouze na základě přítomnosti protilátek proti spermiím. Je třeba prokázat, že protilátky významně zhoršují jejich funkci. K tomu se obvykle používá test průniku spermií do cervikálního hlenu. (World Health Organization, 2021, s. 119) Hranice pro klasifikaci hladiny ASA jako patologické je udáváno 50 % pohyblivých spermií s adherentními částicemi. (Regan et al., 2023) V naprosté většině případů pozitivních testů na ASA, které se vážou na hlavičku spermie, bylo v rámci léčby asistované reprodukce, doporučeno postupovat metodou intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI). (Gupta et al., 2022) Přesto nebylo dosud spolehlivě prokázáno, že by u párů s RPL byl detekovatelný vyšší výskyt těchto protilátek. (Regan et al., 2023) Stejný závěr v této problematice popisuje doporučený postup ESHRE.

(Goddijn et al., 2017) Test ASA je podle více než 70 % odborníků užitečným screeningovým nástrojem pro imunologickou mužskou neplodnost a je běžně využíván v klinické praxi. (Gupta et al., 2022)

3.4.2 Antiovariální protilátky (AOA)

Vaječníky jsou často terčem autoimunitních reakcí. To způsobuje jejich dysfunkci v podobě zánětů, insuficience žlutého tělíska nebo nedokonalého vývoje folikulů. Výsledkem je pak snížená plodnost či selhání implantace. Etiopatogeneze ovariální autoimunity (AOA) může zahrnovat jak humorální, tak buněčnou autoimunitní odpověď. (Wu et al., 2022, s. 333–350) Jedná se o heterogenní protilátky, které mají za cíl mířit proti různým antigenům. Nejčastěji jsou napadány folikulární struktury jako membrana granulosa, vrstvy theca folliculi interna, ooplazma a proteiny zona pellucida. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 5) Do skupiny AOA proto patří protilátky proti folikuly stimulujícímu hormonu (anti-FSH), protilátky proti luteinizačnímu hormonu, protilátky proti lidskému choriovému gonadotropinu (anti-hCG), protilátky proti oocytům a protilátky proti zona pellucida (AZPA). (Shen et al., 2021) Studie naznačují, že by AOA mohlo být využito jako biomarker předčasného ovariálního selhání. (Huang et al., 2023) U těchto žen jsou detekovány v 10-30 % případů. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 127) Termín ovariálního selhání zahrnuje předčasnou ovariální insuficienci (POI), syndrom polycystických vaječníků (PCOS), endometriózu, selhání implantace po oplodnění IVF a Hashimotovu tyroiditidu (HT). (Huang et al., 2023) Teorií o poruše autotolerance vaječníků a jejich imunologické bariéry existuje několik. Jednou z nich je hormonální nerovnováha. Příčinou této dysbalance může být nedostatečná aktivace centrálních řídicích center, což vede k nedostatečné produkci hormonů, nebo k jejich blokadě. Další názory uvádí přímé poškození vaječníků v důsledku odběru oocytů během léčby metodou IVF. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 34) Samotná přítomnost AOA může být jen okolností a nemusí vykazovat negativní důsledky, proto není důvodem pro zahájení imunoterapie. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 127) Předčasná ovariální insuficience, předčasné ovariální selhání a neplodnost bez zjevné příčiny jsou hlavní stavy spojené s antiovariálními protilátkami. (Wu et al., 2022)

Kritickou rolí ve vyšetřování neplodnosti hrají AZPA (Shen et al., 2021), které se vyšetřují jako jeden z prvních kroků při imunologickém vyšetření u žen s primární sterilitou. Hladina protilátek je vyšetřována metodou ELISA a jako pozitivní nález je uváděna hodnota >10 IU/ml. (Čížková, Trnková, 2019) Využívá se však i aglutinačních metod, méně často pak metody nepřímé imunofluorescence. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 127) Zona pellucida chrání oocyt a skládá ze tří glykoproteinů. ZP3 se chová jako antigen a má velký vliv na vývoj

oocyty. Stimuluje produkci AZPA, které brání spermiím ve vniknutí do zony pellucidy. Do budoucna by díky své inhibiční vlastnosti, mohla mít imunizace ZP3 velký přínos pro vývoj antikoncepční vakcíny. Pomocí asistované reprodukční technologie dnes lze dobře detekovat přítomnost AOA. (Shen et al., 2021) Diskutuje se o prozánětlivé imunitní odpovědi u žen podstupujících cykly asistované reprodukce. (Huang et al., 2023) U žen s neúspěšnými cykly IVF byly shledány nízké počty embryí ve spojení s vysokými hladinami AOA. Pravděpodobnost vyšších hodnot AOA stoupá při opakované snaze indukce ovulace bez zásahu IVF. (Shen et al., 2021) Další názory potvrzují zvýšenou prevalenci AZPA u žen, které byly opakovaně podrobeny ovariální hyperstimulaci a následné punkci ovariálních folikulů. Avšak vyšší úroveň těchto protilátek byla detekována u žen trpících endometriózou s postižením ovarií. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 127) Zároveň jsou pozitivní AZPA indikací k ICSI. Tento názor vybízí k zahájení imunoterapie a snížení hladiny těchto protilátek. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 127)

Retrospektivní kohortová studie z roku 2019 sledovala celkem 248 žen, které podstoupily léčbu asistované reprodukce. Cílem studie bylo objasnit asociaci AOA s nedostatečnou ovariální odpovědí (POR). Ženy byly rozděleny do 4 skupin dle přítomnosti AOA/POR. Největší zastoupení tvořila skupina 148 pacientek bez AOA i POR. 34 účastnicím byly detekovány AOA bez přítomnosti POR. Naopak 44 žen mělo nedostatečnou ovariální odpověď, ale bez přítomnosti protilátek. Poslední vyšetřovaná skupina žen (22) měla přítomny AOA i POR. Diagnóza nedostatečné ovariální odpovědi je stanovena, pokud jsou splněna alespoň 2 z následujících kritérií: „i) vysoký věk matky (≥ 40 let) nebo přítomnost jiného rizikového faktoru pro POR; ii) historie předchozí POR (≤ 3 oocyty při konvenční stimulaci) a iii) abnormální výsledky testů ovariální rezervy (AFC, 5–7 folikulů nebo AMH, 0,5–1,1 ng/ml)“. (Huang et al., 2023, s. 2) Výsledky studie ukázaly vysokou prevalenci přítomnosti AOA u žen s nedostatečnou ovariální odpovědí, nežli u žen bez POR. Přítomnost AOA u žen s POR je vyšší ve věkové skupině ≥ 40 . Studie zahrnovala i další parametry jako například hladinu Anti-Mülleriánského hormonu (AMH) a Body-Mass-Index (BMI). Vyšetřované s pozitivní POR i AOA měly významně vyšší hodnoty BMI oproti ženám s negativními výsledky obou faktorů. To prokazuje fakt, že obezita a nadbytek tukových buněk negativně přispívá k rozvoji autoimunitních onemocnění, způsobuje chronický zánět a podporuje stárnutí vaječnicků. AMH byl významně nižší ($0,4 \pm 0,2$ ng/ml) u žen s pozitivními AOA i POR oproti ženám negativním. (Huang et al., 2023, s. 3) Kromě nepřítomnosti tolerance vůči buňkám ovaria je možné jeho samotné poškození. Proto je vhodné vyšetřit AMH. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 127) Jako negativní nález je uváděna hladina AOA < 15 IU/ml, která je

stanovena vyšetřovací metodou ELISA. (Čížková, Trnková, 2019) Druhou metodou detekce protilátek je nepřímá imunofluorescence na řezech opičích ovarii. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 127)

Další formou AOA je protilátka známá jako anti-FSH. Tyto protilátky jsou asociovány s tubárním faktorem neplodnosti, ale jsou shledávány u žen i u mužů. Výrazně vyšší hladiny těchto protilátek byly zaznamenány u žen podstupujících opakované cykly in vitro fertilizace. Důvodem může být skutečnost, že brání ovariální odpovědi během IVF léčby. Podobně byly vyšší hladiny anti-FSH pozorovány u mužů s oligozoospermií a astenozoospermií ve srovnání s jedinci s normální kvalitou spermií. Přítomnost anti-FSH tak může poukazovat jak na kvantitu, tak kvalitu spermií u mužů trpících idiopatickou neplodností. Včasné testování, před zahájením léčby asistovanou reprodukcí, by tak mohlo být prospěšné v průkazu schopnosti ovarii reagovat. (Shen et al., 2021)

Léčba anti-hCG přináší míru potratovosti u žen léčených IVF a není v současné literatuře doporučována. (Shen et al., 2021)

3.4.3 Antifosfolipidové protilátky a antifosfolipidový syndrom

Asociace mezi RPL a antifosfolipidovými protilátkami (aPL) je dnes jednoznačná. Studie ukazují vysoký negativní dopad na úspěšnost početí, a to i přes mírné rozlišnosti ve výsledcích různých studií. Společně s detekovanými aPL jsou tyto komplikace definovány jako antifosfolipidový syndrom (APS). (D'Ippolito et al., 2020) U APS se uvádí 0,5% výskyt v celé populaci a věk 35 let při diagnóze tohoto onemocnění. Jedná se o protrombotické autoimunitní onemocnění, které provází trombóza, opakované potraty a méně často trombocytopenie. Přítomny jsou také aPL. (Rodrigues et al., 2019) Výsledkem jejich působení je nadměrné srážení krve. (Ulčová-Gallová, Madar, 2020, s. 60) Primární APS se projevuje izolovaně, jako nezávislé onemocnění, zatímco sekundární APS je asociováno s dalšími autoimunitními onemocněními, nejčastěji se jedná o systémový lupus erythematosus a revmatoidní artritidu. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 4) Jedná se o onemocnění představující vážné porodnické komplikace, protože se často vyskytuje u žen v reprodukčním věku. (Khangura et al., 2019) U těchto žen se setkáváme s potraty u morfologicky zdravého plodu po 10. týdnu gestace včetně, RPL z nevysvětlitelných příčin a předčasným porodem v důsledku eklampsie, preeklampsie a placentární insuficience. (Rodrigues et al., 2019)

aPL jsou heterogenní skupina protilátek, která je namířena na fosfolipidy nacházející se v membránách endoteliálních buněk, krevních destiček a dalších elementů, které jsou součástí koagulační kaskády. (Rodrigues et al., 2019) Proto do této třídy patří také protilátky namířené proti plazmatickým proteinům, jako je annexin V, protein C, protein S a protrombin. Jedná se

antikardiolipinové (aCL) protilátky, včetně lupus antikoagulant (LA) a protilátky proti beta – 2glykoproteinu I (anti- β 2GPI). (Shen et al., 2021) Protilátky proti β 2GPI jsou spojeny s nejvyšším rizikem porodnických komplikací (61 %) a nejnižším počtem živě narozených dětí ve srovnání se samotnými aCL nebo LA. Protein β 2GPI váže fosfolipidy a je antigenem aPL. Tyto protilátky mohou vyvolat patologické změny, které přispívají k porodnickým komplikacím. Ačkoliv původně byla identifikována schopnost aPL vyvolávat trombotické jevy v placentě, další výzkumy naznačují jejich přímý vliv na tkáň placenty a endometria. (D'Ippolito et al., 2020) aPL společně inhibují angiogenezi v děložním endometriu a vedou k abnormálnímu vývoji spirálních arterií, váží se na trofoblast a brání jeho diferenciaci, proliferaci a indukují buněčnou apoptózu. Vliv aPL na trofoblast může ovlivňovat uvolňování hCG z placenty. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 5) Kromě toho se předpokládá, že akutní zánětlivé reakce hrají roli v poškození placenty zprostředkovaném aPL. To zahrnuje aktivaci prozánětlivých látek, jako je komplement, TNF- α a chemokiny. V konečném důsledku dochází k poškození funkce placenty, avšak nikoliv z trombotických příčin. (D'Ippolito et al., 2020) Zánětlivá reakce způsobená aktivací komplementu na povrchu trofoblastu může být jedním z důvodů nízké produkce hCG v placentě. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 4) Pro jejich asociaci s trombózou mají negativní vliv na průběh a výsledek těhotenství jako je UEI, RPL a neúspěchy při IVF-ET. (Shen et al., 2021) Trombotizaci placentární tkáně způsobuje ukládání fibrinu, které je zahájeno navázáním aPL do decidui a následné aktivaci koagulačního a zánětlivého systému. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 5)

U žen v reprodukčním věku se aPL vyskytují u méně než 10 % populace. V případě žen s opakovanými potraty v prvním trimestru těhotenství byly zjištěny u 14 % zkoumaných jedinců. Přítomnost těchto protilátek u žen s RPL a nevysvětlitelnou neplodností se pohybuje kolem 10 %. (Muhjah Falah, Al-Tuma, 2023, s. 4) Ukazuje se, že ženy s APS mají nižší počet Tregs a více aktivovaných T a B patogenních lymfocytů v porovnání se zdravými ženami. (Shen et al., 2021) U těchto žen také byly pozorovány nižší hladiny NK a NKT-buněk, které jsou důležité pro invazi trofoblastu a změny v děložních tepnách, což může zapříčinit neúspěšný proces implantace a další výsledek gravidity. (Shen et al., 2021)

Indikační kritéria a vyšetřovací metody

Aby mohly být tyto aPL ženám diagnostikovány, jsou nutné indikace k jejich vyšetření a musí splňovat alespoň jednu z klinických či laboratorních podmínek. Klinicky musí mít žena 1) trombofilní dispozice, které se mohou projevit jako trombóza malých cév, žil nebo tepen (Diagnostickým hodnocením je Dopplerovo ultrazvukové vyšetření a histopatologická analýza.), 2) RPL (alespoň 3x) před ukončením 10. týdnem gravidity, 3) po ukončením 10.

týdnu gravidity došlo k jedné nebo více ztrát s podmínkou vyloučení morfologických anomálií plodu. nebo 4) jeden nebo více předčasných porodů před dosažením 34. týdne gravidity s významnou placentární insuficiencí nebo preeklampsií. Laboratorně musí mít minimálně 2x zvýšené hladiny aCL/anti- β 2GPI/LA (IgG nebo IgM) ve středním nebo vysokém titru s odstupem 12 týdnů. Výjimkou mohou být běžně zvýšené hladiny při infektech a užívání léků, u zdravé populace. (Koubková, 2023)

Lupus antikoagulant

Podle současných názorů je nejlepším testem pro identifikaci klinicky významné aPL, lupus antikoagulans. Antikoagulační léčba u pacientů s lupusem by měla v ideálním případě vyšetření předcházet. Testování na přítomnost těchto protilátek má několik fází. Prvním krokem je sledování času srážlivosti krve, jako je aktivovaný parciální tromboplastinový čas a zředěný jed zmije řetízkové (Russell's viper venom time). Směsný test se používá k posouzení příčiny prodloužené doby srážení krve. Přítomnost lupus antikoagulantu způsobí zpoždění srážení, a to i po přidání plazmy. Pokud by prodloužená doba srážení byla způsobena chyběním faktoru, po přidání plazmy by doba srážení byla v normě. Konfirmační test s fosfolipidy pak potvrdí, zda je inhibice srážení závislá na těchto látkách. Pomocí extra fosfolipidů neutralizuje prodloužení srážení. (Khangura et al., 2019)

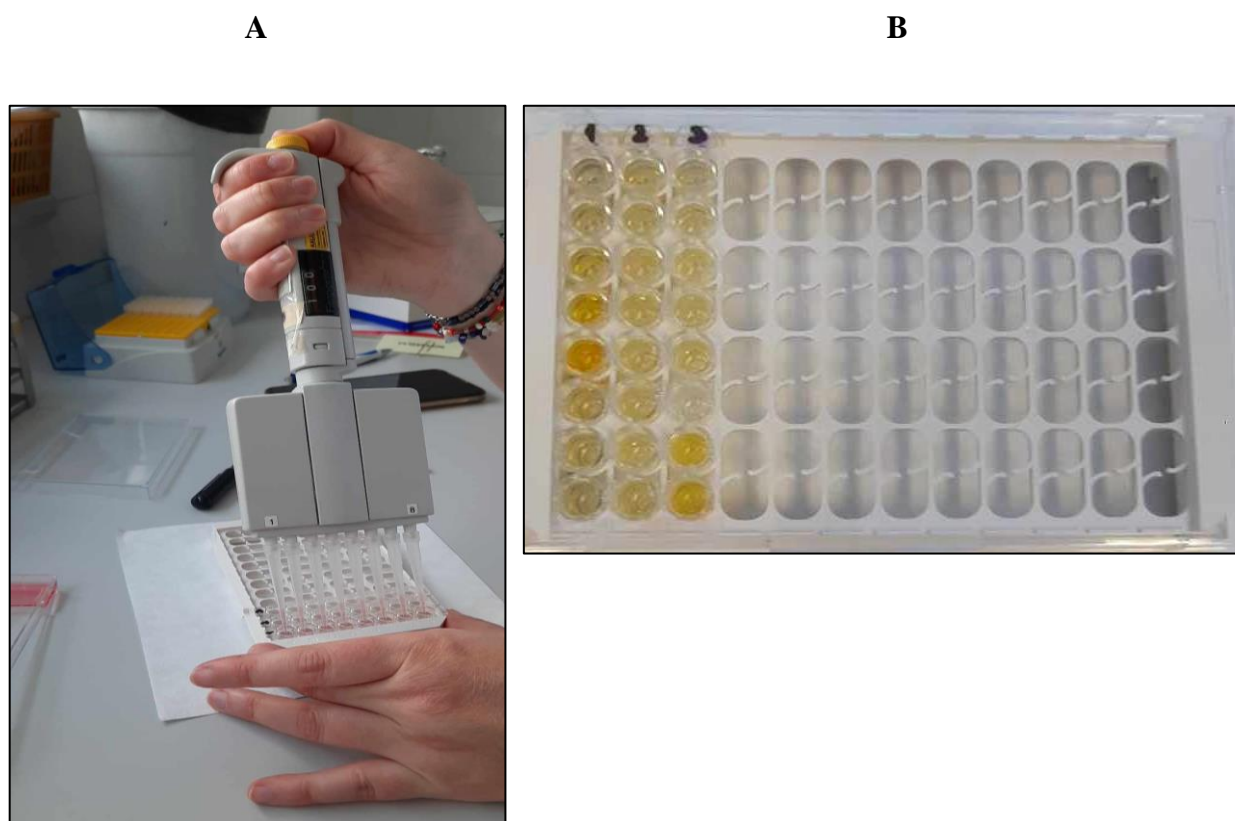
Antikardiolipinové protilátky (aCL)

Pro vyšetřování protilátek aCL je využívána metoda ELISA. Diagnostická kritéria pro APS zahrnují izotyp IgM a aCL IgG. Díky používání standardizovaných sér z Antifosfolipidové standardizační laboratoře v Atlantě, ve státě Georgia, se zvýšila shoda interpretace výsledků, která dříve byla nejasná. Pro hlášení výsledků aCL se používají mezinárodní standardní jednotky označované jako GPL (G phospholipid units) pro fosfolipid IgG a MPL (M phospholipid units) pro fosfolipid IgM. Pozitivní výsledek je podle současných klinických kritérií definován jako střední nebo vysoký titr, který odpovídá více než 40 GPL nebo MPL. (Khangura et al., 2019) V laboratořích GENNET je udávaná referenční meze protilátek proti kardiolipinu v mezích: IgM: 0–7 IU/ml / IgG: 0–10 IU/ml. (GENNET, 2023)

Protilátky proti beta-2glykoproteinu I (anti- β 2GPI)

Protilátky proti β 2GPI jsou vyšetřovány pomocí metody ELISA, která identifikuje specifické IgG a IgM. Tento stav je spojen s rizikovými faktory trombózy a těhotenskými komplikacemi. Jako pozitivní výsledek testu je udáván titr s percentilem vyšším než 99. (Khangura et al., 2019) Laboratoř GENNET udává referenční rozmezí pro toto vyšetření 0–5 U/ml. (GENNET, 2023) Výsledky jsou interpretovány u pacientů s triádou primárního APS,

systémovým lupus erythematoses s trombotickými projevy a RPL spojený s trombocytopenií. U opakovaného potrácení je průkazný IgM a u trombóz je převládající IgG. (Synlab, 2024)



Obrázek 5 Proces testování vyšetřovací metodou ELISA. **A)** Nanášení vzorků do mikrotitrační destičky, **B)** Odečítání výsledku testování vyšetřovací metodou ELISA k následné interpretaci. Fotografie autora, Imunologická laboratoř FNOL, 2023

Přibližně 80 % těhotenství s APS končí porodem živého dítěte, ale tato těhotenství s sebou nesou vyšší riziko vzniku preeklampsie (18 až 40 %), vyšší riziko omezení nitroděložního růstu (5 až 15 %), a vyšší riziko předčasného porodu. Primárním cílem léčby tohoto syndromu je zabránit vzniku trombózy, ale její úspěšnost je jen částečná. (Rodrigues et al., 2019) Standardní léčba zahrnuje kombinovanou terapii heparinem a nízkými dávkami aspirinu během gravidity, avšak existuje podskupina žen (20 %) s APS, které na tuto léčbu nereagují. Studie na zvířatech naznačují, že syntetický peptid TIFI, který simuluje vazebné místo β 2GPI, může poskytnout ochranu před ztrátou plodu způsobenou působením aPL. Další výzkum a testování nových terapeutických strategií je nezbytné, zejména u žen s refrakterní formou této poruchy. (D'Ippolito et al., 2020)

4 VÝZNAM A LIMITACE DOHLEDANÝCH POZNATKŮ

S narůstajícím povědomím o imunologických faktorech ovlivňujících plodnost a těhotenství se stává začlenění metod reprodukční imunologie do diagnostických postupů péče o neplodné páry stále důležitějším. Současná literatura poukazuje na potřebu identifikace nových biomarkerů pro hodnocení a předpověď výsledků těhotenství. Význam tématu imunologických vyšetřovacích metod neplodných párů z pohledu buněčné a humorální imunity spočívá v identifikaci potenciálních imunitních faktorů ovlivňujících plodnost a těhotenství. Tyto vyšetřovací metody umožňují detailní posouzení imunitního prostředí ženy a muže a identifikaci případných imunitních dysbalancí. Porozumění buněčné a humorální imunitě pomáhá lépe pochopit patofyziologii neplodnosti, a také umožňuje personalizovaný přístup k léčbě, který může vést ke zvýšení šance na úspěšné těhotenství u neplodných párů. Práce může přispět ke zvýšení povědomí o reprodukční imunologii mezi zdravotnickými pracovníky, včetně porodních asistentek, a poskytnout jim ucelený pohled na problematiku neplodnosti z imunologického hlediska.

Mezi limitující faktory současných poznání v oblasti reprodukční imunologie patří rozlišnosti v závěrech studií. Některé studie naznačují, že imunologická vyšetření mají klíčový význam pro diagnostiku a léčbu neplodnosti, zatímco jiné zdůrazňují omezení těchto metod a potřebu dalšího výzkumu. Různé názory na optimální přístup k reprodukční imunologii vycházejí z konkrétních klinických situací a individuálních potřeb pacientů. Existují tak rozdílné perspektivy na vliv reprodukční imunologie na plodnost a těhotenství, s některými studii kladoucími důraz na její klíčovou úlohu a jinými upozorňujícími na genetické nebo endokrinní faktory. Byť existují rozdílné názory na to, jakým způsobem imunitní dysbalance ovlivňuje schopnost početí a udržení těhotenství, a jak by měla být diagnostikována a léčena, práce poukazují na komplexnost problematiky reprodukční imunologie a naznačují potřebu dalšího výzkumu a diskuse v této oblasti.

ZÁVĚR

Začlenění metodik reprodukční imunologie do diagnostických postupů péče o neplodné páry je stále důležitější a přináší potenciál zlepšení výsledků těhotenství pro postižené páry.

Cílem této přehledové bakalářské práce především bylo představit současné nejčastější imunologické vyšetřovací metody neplodných párů. Hlavní cíl bakalářské práce byl nadále specifikován dílčími cíli.

Prvním dílčím cílem bylo shrnout imunologické aspekty neplodnosti u ženy a muže neplodného párů. Na reprodukci se podílí jak přirozená tak adaptivní imunita. Společně mají za úkol vytvářet rovnováhu v imunitním systému a podpořit tak proces početí a udržení plodu po dobu těhotenství. Práce ukazuje, že v těle obou pohlaví může docházet k dysbalanci buněčné i humorální imunity a tento proces mohou narušit různé mechanismy. U žen může narušená imunita způsobit neúspěšnou implantaci embrya a opakované potraty. U mužů může imunitní faktor přispívat k neplodnosti, a to jak z hlediska kvality spermií, tak z hlediska interakce s imunitním systémem partnerky.

Druhým dílčím cílem bylo představit indikační kritéria k reprodukčně imunologickým vyšetřením párů s poruchami plodnosti. Faktory ovlivňující reprodukci jsou rozsáhlé, a tak je identifikace imunologických příčin často náročná a vyžaduje multioborovou spolupráci. Indikační kritéria se liší dle zvyklostí zemí a jejich doporučených postupů při vyšetřování příčin poruch plodnosti. Některá kritéria mohou být specifická pro určité skupiny pacientů a nemusí platit obecně pro všechny páry trpící neplodností.

Třetím dílčím cílem bylo představit současné možnosti imunologických laboratorních vyšetření neplodných párů. Laboratorní imunologická vyšetření poskytují důležité informace o imunologických faktorech ovlivňujících plodnost a těhotenství u neplodných párů. Díky pokroku v laboratorních technikách a diagnostice je dnes možné tyto testy provádět s větší přesností a citlivostí, což umožňuje detailní zkoumání imunitních mechanismů spojených s neplodností. Tato vyšetření jsou klíčová pro personalizovaný přístup k léčbě neplodnosti a identifikaci příčin imunitních dysbalancí, což umožňuje tyto stavy léčit a obnovit správnou funkci imunitního systému.

Dohledané poznatky by mohly sloužit jako vzdělávací materiál pro studenty lékařských fakult, postgraduální studenty a odborníky v oblasti reprodukční medicíny. Především by práce mohla být užitečným zdrojem pro páry s poruchou plodnosti, kteří hledají informace o imunologických aspektech neplodnosti. Dále by práce mohla poskytnout cenné informace

porodním asistentkám, což může přispět k jejich profesnímu rozvoji a schopnosti poskytovat kvalitní péči ženám s poruchami plodnosti.

REFERENČNÍ SEZNAM

1. ALI, Syed B.; JEELALL, Yogesh; PENNELL, Craig E.; HART, Roger; MCLEAN-TOOKE, Andrew et al., 2018. The role of immunological testing and intervention in reproductive medicine: A fertile collaboration? Online. American Journal of Reproductive Immunology. Roč. 79, č. 3. ISSN 1046-7408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/aji.12784>. [cit. 2024-02-07].
2. BACZKOWSKI, Tomasz a KURZAWA, Rafał, 2007. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes on the day of embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization. Online. Folia Histochem Cytobiol. 1. Roč. 45, č. 1, s. 73-77. Dostupné z: https://journals.viamedica.pl/fovia_histochemica_cytobiologica/article/view/4491. [cit. 2024-04-18].
3. BERG, Leslie; CHAPLIN, David a WEAVER, Casey, 2017. Janeway's immunobiology. Online. 9th edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4551-0. Dostupné z: https://immunologos.files.wordpress.com/2020/08/janeways-immunobiology-9th-ed_booksmedicos.org_.pdf. [cit. 2024-02-22].
4. BERGENDIOVÁ, Katarína a TIBENSKÁ, Elena, 2023. Obezita, zápal a reprodukcia. Klinická Imunológia a Alergológia. Č. 3, s. 10.
5. ČERNÁ, Karin; LUXOVÁ, Štěpánka; SEDLÁČKOVÁ, Lenka a PRAHA, GENNET, 2023. Imunofenotypizace uterinních NK lymfocytů u pacientek s opakovaným selháním implantace embrya – pilotní výsledky terciárního klinického centra. Klinická imunológia a alergológia. Č. 3, s. 13–14.
6. ČÍŽKOVÁ, Ing. Anabela a TRNKOVÁ, MUDr. Barbara, 2019. Reprodukční imunologie – laboratorní vyšetření. Online. Synlab. Dostupné z: <https://www.synlab.cz/pro-lekare/odborny-casopis-synlabianer/clanek/reprodukni-imunologie-laboratorni-vysetreni>. [cit. 2023-11-01].
7. D'IPPOLITO, Silvia; TICCONI, Carlo; TERSIGNI, Chiara; GAROFALO, Serafina; MARTINO, Carmelinda et al., 2020. The pathogenic role of autoantibodies in recurrent pregnancy loss. Online. American Journal of Reproductive Immunology. Roč. 83, č. 1. ISSN 1046-7408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/aji.13200>. [cit. 2023-11-07].
8. Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP: Diagnostika páru s poruchou plodnosti, 2021. In: Česká Gynekologická a Porodnická Společnost. S. 1-4. Dostupné také z: <https://cgps.cz/doprocene-postupy/reprodukni-medicina/>.

9. DUAN, Yong-Gang; GONG, Jialei; YEUNG, William S.B.; HAIDL, Gerhard a ALLAM, Jean-Pierre, 2020. Natural killer and NKT cells in the male reproductive tract. Online. *Journal of Reproductive Immunology*. Roč. 142. ISSN 01650378. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103178>. [cit. 2024-02-12].
10. GATIMEL, Nicolas; MOREAU, Jessika; ISUS, François; MOINARD, Nathalie; PARINAUD, Jean et al., 2018. Anti-sperm antibodies detection by a modified MAR test: Towards a better definition of its indications. Online. *Reproductive BioMedicine Online*. Roč. 37, č. 6, s. 717-723. ISSN 14726483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.09.011>. [cit. 2024-04-20].
11. GENNET, 2023. Vyšetření párů s poruchou plodnosti. Online. GENNET. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/vysetreni-paru-s-poruchou-plodnosti>. [cit. 2023-11-07].
12. GODDIJN, Mariëtte; ATIK, Ruth Bender; CHRISTIANSEN, Ole Bjarne a ELSON, Janine, 2017. Guideline on the management of recurrent pregnancy loss. Online. EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY. European Society of Human Reproduction and Embryology. 2022. Dostupné z: <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Recurrent-pregnancy-loss>. [cit. 2023-11-09].
13. GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh; AGARWAL, Ashok; BOITRELLE, Florence; FINELLI, Renata et al., 2022. Antisperm Antibody Testing: A Comprehensive Review of Its Role in the Management of Immunological Male Infertility and Results of a Global Survey of Clinical Practices. Online. *The World Journal of Men's Health*. Roč. 40, č. 3, s. 380-398. ISSN 2287-4208. Dostupné z: <https://doi.org/10.5534/wjmh.210164>. [cit. 2023-10-30].
14. HUANG, Changsheng; ALSUBKI, Lujain; YAMAYA, Ayano; SUNG, Nayoung a KWAK-KIM, Joanne, 2023. Poor ovarian response in assisted reproductive technology cycles is associated with anti-ovarian antibody and pro-inflammatory immune responses. Online. *Journal of Reproductive Immunology*. Č. 160. ISSN 01650378. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.104152>. [cit. 2024-03-28].
15. CHEN, Xiaoyan; MARIEE, Najat; JIANG, Lingming; LIU, Yingyu; WANG, Chi Chiu et al., 2017. Measurement of uterine natural killer cell percentage in the periimplantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: establishment of a reference range. Online. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Roč. 217, č. 6, s. 680.e1-680.e6. ISSN 00029378. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.09.010>. [cit. 2024-04-18].

16. CHERNYSHOV, Viktor; DONS'KOI, Boris; SUDOMA, Iryna a GONCHAROVA, Yana, 2019. Comparison of T and NK lymphocyte subsets between human endometrial tissue and peripheral blood. Online. Central European Journal of Immunology. Roč. 44, č. 3, s. 316-321. ISSN 1426-3912. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.89610>. [cit. 2024-04-18].
17. JÍLEK, Petr, 2019. Imunologie stručně, jasně, přehledně. 2., doplněné vydání. Grada. ISBN 978-80-271-0595-3.
18. KHANGURA, Raminder Kaur; COOPER, Shontreal a LUO, Guo-Yang, 2019. Antiphospholipid Antibody Syndrome: Pathogenesis, Diagnosis, and Management in Pregnancy. Online. Maternal-Fetal Medicine. Roč. 1, č. 1, s. 38-42. ISSN 2641-5895. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/FM9.000000000000007>. [cit. 2024-03-17].
19. KOUBKOVÁ, MUDr. Barbora, 2023. Reprodukční imunologie: Zahájení činnosti specializované ambulance na OAKI FN Olomouc. Online. In: . Olomouc, s. 1-23. [cit. 2024-02-01].
20. KWAK-KIM, Joanne; ALSUBKI, Lujain; LUU, Thanh; GANIEVA, Umida; THEES, Amy et al., 2022. The role of immunologic tests for subfertility in the clinical environment. Online. Fertility and Sterility. Roč. 117, č. 6, s. 1132-1143. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.04.009>. [cit. 2023-11-09].
21. LACHAPELLE, M H; HEMMING, R a ROY, D C, 1996. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. Online. Journal of Immunology. Roč. 10, č. 156, s. 4027-34. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00591.x>. [cit. 2024-04-18].
22. LASH, Gendie E.; BULMER, Judith N.; LI, Tin Chiu; INNES, Barbara A.; MARIEE, Najat et al., 2016. Standardisation of uterine natural killer (uNK) cell measurements in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. Online. Journal of Reproductive Immunology. Roč. 116, s. 50-59. ISSN 01650378. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.04.290>. [cit. 2024-04-18].
23. LUU, Thanh Vinh; THEES, Amy; GANIEVA, Umida; DAMBAEVA, Svetlana; BEAMAN, Kenneth et al., 2022. T REGULATORY, Th17, AND TREG/Th17 RATIO, IN PREGNANT WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSSES AND NORMAL PREGNANT WOMEN. Online. Fertility and Sterility. Roč. 118, č. 4, s. e179-e180. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.08.514>. [cit. 2024-02-08].

24. MOLDENHAUER, Lachlan M.; HULL, M. Louise; FOYLE, Kerrie L.; MCCORMACK, Catherine D. a ROBERTSON, Sarah A., 2022. Immune–Metabolic Interactions and T Cell Tolerance in Pregnancy. Online. *The Journal of Immunology*. 2022-10-15, roč. 209, č. 8, s. 1426-1436. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200362>. [cit. 2024-01-25].
25. MUHJAH FALAH, Hassan a AL-TUMA, Ali M. Kadim, 2023. Female Autoimmune Disorders with Infertility: A Narrative Review. Online. *Al- Anbar Medical Journal*. Roč. 1., č. 1., s. 3-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.33091/amj.2023.138475.1022>. [cit. 2023-10-30].
26. PILKA, Radovan a DOSTÁL, Jiří, 2022. Gynekologie. In: *Gynekologie*. 2. Praha: Maxdorf, s. 112-123. ISBN 978-80-7345-743-3.
27. QUENBY, Siobhan; GALLOS, Ioannis D; DHILLON-SMITH, Rima K; PODESEK, Marcelina; STEPHENSON, Mary D et al., 2021. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss. Online. *The Lancet*. Roč. 397, č. 10285, s. 1658-1667. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00682-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00682-6). [cit. 2023-11-21].
28. REGAN, Lesley; RAI, Rajendra; SARAVELLOS, Sotirios a LI, Tin-Chiu, 2023. Recurrent Miscarriage Green-top Guideline No. 17. Online. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. Roč. 130, č. 12, s. 1-31. ISSN 1470-0328. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.17515>. [cit. 2023-11-07].
29. REHMAN, Muneeb U.; ALI, Md. Niamat; ARAFAH, Azher a ALI, Shafat, 2022. A Molecular Approach to Immunogenetics. Online. Elsevier. ISBN 9780323900539. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-01781-0>. [cit. 2023-10-30].
30. RODRIGUES, Vivian de Oliveira; SOLIGO, Adriana de Góes e Silva a PANNAIN, Gabriel Duque, 2019. Antiphospholipid Antibody Syndrome and Infertility. Online. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*. 2019-10-28, roč. 41, č. 10, s. 621-627. ISSN 0100-7203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697982>. [cit. 2023-11-07].
31. ROMUALDI, D; ATA, B; BHATTACHARYA, S; BOSCH, E; COSTELLO, M et al., 2023. Evidence-based guideline: unexplained infertility. Online. *Human Reproduction*. 2023-10-01, roč. 38, č. 10, s. 1881-1890. ISSN 0268-1161. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/humrep/dead150>. [cit. 2023-11-09].
32. SHAKERIAN, Behzad; IRVANI, Sahar; MOSTAFAVI, Sara a MOGHTADERI, Mozghan, 2022. Quantitative serum determination of CD3, CD4, CD8, CD16, and

- CD56 in women with primary infertility: The role of cell-mediated immunity. Online. Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology. 2022-9-23, roč. 19, č. 3, s. 242-245. ISSN 1307-699X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4274/tjod.galenos.2022.47527>. [cit. 2023-11-08].
33. SHEN, Hui-Hui; LAI, Zhen-Zhen; YANG, Hui-Li; SHI, Jia-Wei a LI, Ming-Qing, 2021. Role of Autoantibodies in Infertility, Miscarriage, and Assisted Reproductive Technology Outcomes. Online. Reproductive and Developmental Medicine. Roč. 5, č. 3, s. 161-173. ISSN 2589-8728. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2096-2924.322829>. [cit. 2023-10-28].
34. SHIBAHARA, Hiroaki; WAKIMOTO, Yu; FUKUI, Atsushi a HASEGAWA, Akiko, 2021. Anti-sperm antibodies and reproductive failures. Online. American Journal of Reproductive Immunology. Roč. 85, č. 4, s. 1-12. ISSN 1046-7408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/aji.13337>. [cit. 2024-04-20].
35. SILVA, Andreia Filipa; RAMALHO-SANTOS, João a AMARAL, Sandra, 2021. The impact of antisperm antibodies on human male reproductive function: an update. Online. Reproduction. 2021-10-01, roč. 162, č. 4, s. R55-R71. ISSN 1470-1626. Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/REP-21-0123>. [cit. 2024-04-20].
36. SYNLAB, 2024. Anti β 2-GPI – protilátky proti beta-2 glykoproteinu I – IgG, IgM. Online. ISBN 08008002. Dostupné z: <https://www.synlab.cz/pro-lekare/humanni-medicina/laboratorni-metody/parametru/1757>. [cit. 2024-04-29].
37. TIBENSKÁ, Elena; SZABOVÁ, Kinga a BERGENDIOVÁ, Katarína, 2023. Detekcia uterinných NK buniek - aké sú naše možnosti? Klinická imunológia a alergológia. Roč. 3, s. 43-44.
38. TOMKIEWICZ, Julia a DARMOCHWAŁ-KOLARZ, Dorota, 2023. The Diagnostics and Treatment of Recurrent Pregnancy Loss. Online. Journal of Clinical Medicine. Roč. 12, č. 14, s. 1-22. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm12144768>. [cit. 2023-11-07].
39. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka a MADAR, Jindřich, 2020. Imunologie a imunopatologie lidské reprodukce. 2., přepracované a doplněné vydání. Maxdorf. ISBN 978-80-7345-648-1.
40. VON WOON, Ee; GREER, Orene; SHAH, Nishel; NIKOLAOU, Dimitrios; JOHNSON, Mark et al., 2022. Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: a systematic review and meta-analysis.

- Online. Human Reproduction Update. 2022-08-01, roč. 28, č. 4, s. 548-582. ISSN 1355-4786. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac006>. [cit. 2023-10-28].
41. WANG, Caiyun; ZHAO, Xiaodong; ZHANG, Haibin; BING, Zhitong; WU, Yu et al., 2023. Comprehensive analysis of immune-related genes associated with the microenvironment of patients with unexplained infertility. Online. Annals of Translational Medicine. Roč. 11, č. 2, s. 84-84. ISSN 23055839. Dostupné z: <https://doi.org/10.21037/atm-22-5810>. [cit. 2023-10-28].
42. WANG, Wenjuan; SUNG, Nayoung; GILMAN-SACHS, Alice a KWAK-KIM, Joanne, 2020. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. Online. Frontiers in Immunology. 2020-8-18, roč. 11. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02025>. [cit. 2024-02-08].
43. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Online. 6. Geneva: World Health Organization. ISBN 978-92-4-003078-7. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>. [cit. 2024-02-28].
44. WU, Li; FANG, Xuhui; WANG, Yanshi a KWAK-KIM, Joanne, 2022. Immunology of Recurrent Pregnancy Loss and Implantation Failure. Online. 3. Elsevier. ISBN 9780323908054. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-02333-9>. [cit. 2023-10-30].

SEZNAM ZKRATEK

aCL – protilátky proti kardiolipinu

ACTL7A – Actin-like 7A/protein podobný aktinu 7A

ADCC – antibody-dependent cell cytotoxicity/ cytotoxická aktivita závislá na protilátkách

AFC – antral follicle count/antrální folikuly

AMH – Anti-Müllerian Hormon

Anti-FSH – protilátky namířené proti folikulostimulačnímu hormonu

Anti-hCG – protilátky namířené proti chorióvému gonadotropinu

AOA – Antiovarian antigens/protilátky proti ováriím

aPL – protilátky proti fosfolipidům

APS – antifosfolipidový syndrom

ASA – antisperm antigens/protilátky proti spermiím

AZPA – anti zona pellucida antigens/protilátky namířené proti zona pellucida

BCR – B-cell receptor/B buněčný receptor

BMI – Body-Mass-Index

CD – cluster of differentiation

ČGPS ČLS JEP – Česká gynekologická a porodnická společnost České lékařské společnosti
Jana Evangelisty Purkyně

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology

GAT – želatinový aglutinační test

GPL – IgG phospholipid units

hCG – těhotenský hormon chorióvý gonadotropin

HLA – human leukocyte antigen

HT – Hashimotova tyroiditida

IB – imunobead

ICSI – intracytoplazmatická injekce spermie

IFN – interferon

Ig – imunoglobulin

IL– interleukin

iNKT – invariantní NKT

IVF – in vitro fertilizace

IVF-ET – in vitro fertilizace – embryotransfer

KIR – killer-cell immunoglobulin-like receptors
LA – lupus antikoagulant
MAR – mixed anti-globulin reaction test/smíšená aglutinová reakce
MHC – main histocompatibility complex/hlavní histokompatibilní komplex
MPL – IgM phospholipid units/IgM fosfolipidová jednotka
NK – natural killer cells/přirození zabijedči
NK buňky – natural killer cell
PI – primární infertilita
pNK – periferal natural killer cells/přirození zabijedči v periferní krvi
POR – poor ovarian response
RIF – recurrent infertility failure
RPL – recurrent pregnancy loss
SIT – imobilizační test spermií
TAT – tray agglutination test
T_C – T cytotoxické lymfocyty
TCR – T-cell receptor
TGF – transformující růstový faktor
T_H – T hellper lymfocyts/pomocné T lymfocyty
TNF – tumor nekrotizující faktor
Tregs. – Tregsulační lymfocyty
UEI – unexplained infertility/nevysvětlitelná neplodnost
uNK – uterine natural killer cells/uterinní přirození zabijedči
uRPL – unexplained recurrent pregnancy loss
β2GPI – protilátky proti beta-2glykoproteinu I

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Přesmyk imunitní rovnováhy během implantace a těhotenství

Obrázek 2 Gatování Tregs populace na průtokovém cytometru.

Obrázek 3 Gatování NK buněk na průtokovém cytometru.

Obrázek 4 Ukázka laboratorního zpracování NK buněk **A)** Zmražené spermie pro stanovení aktivace NK buněk. **B)** Proces odstranění supernatantu pro stanovení aktivace NK buněk.

Obrázek 5 Proces testování vyšetřovací metodou ELISA. **A)** Nanášení vzorků do mikrotitrační destičky, **B)** Odečítání výsledku testování vyšetřovací metodou ELISA k následné interpretaci.

Fotografie autora, Imunologická laboratoř FNOL, 2023