

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

PRAHA 2009

Žaneta Růžičková

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra buněčné biologie**

**Vliv imunologických faktorů na úspěšnost
IVF/ET**

Diplomová práce



Žaneta Růžičková

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Jindřich Madar, CSc.

Konzultant:

MUDr. A. Fišerová, CSc.

Vypracováno na oddělení imunologie a gnotobiologie MBÚ AV ČR

Praha 2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů MUDr. Jindřicha Madara, CSc. a konzultanta MUDr. Anny Fišerové, CSc. v laboratoři přirozené buněčné imunity, oddělení imunologie a gnotobiologie MBÚ AV ČR za použití uvedené literatury a souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 2009

.....

Žaneta Růžičková

Tímto bych chtěla velmi poděkovat MUDr. Jindřichu Madarovi za vedení této práce a odborné konzultace. Mé poděkování také patří MUDr. Anně Fišerové za odborné konzultace a za vřelé přijetí do laboratoře přirozené buněčné imunity, oddělení imunologie a gnotobiologie MBÚ AV ČR. Dále mé poděkování patří i Mgr. Janu Svobodovi za praktickou pomoc, pomoc při zpracování výsledků a za spousty trpělivosti. Mgr. Lucii Švábové děkuji za podporu. Všem pak děkuji za jejich čas a ochotu a těším se na naši další spolupráci.

V neposlední řadě děkuji i své rodině za obrovskou podporu a nekonečnou trpělivost během celého studia.

Tato práce byla řešena v rámci grantových projektů IGA Grant NR/9135-3, Ministerstva zdravotnictví ČR a GA ASCR - IAA500200509.

Abstrakt

Cílem této práce bylo zjistit přítomnost receptorů (CD16, CD161, NKG2D, KIR2DL4 a CD85j) na povrchu imunokompetentních buněk, a zda má přítomnost těchto receptorů nějakou souvislost s úspěšností *in vitro* fertilizace (IVF) a následného embryotransferu (ET).

Pozorovali jsme signifikantní rozdíl ve věku úspěšných proti neúspěšným pacientkám. Tento rozdíl pozorovaný v naší studii potvrzuje dříve studovaný jev závislosti věku na úspěšnosti IVF. Výsledek cytotoxické eseje nám potvrdil, že ani stimulační protokol, ani zdroj PBMC nemá vliv na cytotoxickou efektorovou funkci izolovaných buněk. Poté jsme provedli rozsáhlou analýzu povrchových znaků odlišných buněčných subpopulací. V první řadě bylo podstatné srovnání pacientek se zdravými dárkyněmi. Buňky nesoucí HLA-G vázající receptory KIR2DL4 i CD85j na které jsme se v této studii zaměřili, se u obou skupin pacientek vyskytují ve snížené míře. Dále jsme pozorovali rozdíly v expresi KIR2DL4 a CD85j na povrchu různých buněčných subpopulací (CD56^{dim}, CD56^{bright}, T buněk, cytotoxických T buněk) a v jejich zastoupení. Zde jsme pak pozorovali rozdíly v povrchové expresi CD56 na CD56^{bright} NK buňkách, výskyt CD56^{dim} NK buněk v PBMC (exprese CD16 na této subpopulaci), výskyt CD56^{dim} NK buněk v FFMC. Dále jsme u pacientek pozorovali posun v zastoupení T buněk značně ve prospěch CTL v PBMC a také FFMC.

Další krokem bylo srovnání zastoupení buněčných subpopulací u úspěšných a neúspěšných pacientek. Pozorována byla zvýšená povrchová exprese KIR2DL4 na lymfocytárních PBMC u neúspěšných pacientek vůči úspěšným pacientkám i zdravým dárkyním. Tato zvýšená exprese je dále vysledována na povrch CTL. Dále jsme pozorovali zvýšenou povrchovou expresi CD85j na povrchu lymfocytárních PBMC neúspěšných pacientek. Úspěšné pacientky měly na druhou stranu nižší povrchovou expresi CD85j na ryzích Th buňkách. Dále měly úspěšné pacientky snížený výskyt částečně aktivovaných CD56^{bright} NK buněk i plně aktivovaných CD56^{dim} NK buněk v PBMC. Ve folikulárních tekutinách pacientek byl pozorován rozdíl pouze u povrchové exprese aktivačního CD161 na monocytárních/granulocytárních CD56^{bright} NK buňkách. Dále byla zjištěna zvýšená exprese NKG-2D aktivačního receptoru na povrchu CD4-/CD8- negativních buněk u FFMC neúspěšných pacientek.

V této práci jsme identifikovali několik buněčných subpopulací zapojených v konečné úspěšnosti IVF. Potvrdili jsme vliv HLA-G vázajících receptorů KIR2DL4 a CD85j a jejich zapojení v imunologických mechanismech doprovázejících úspěšnost IVF a poukázali na značný vliv stimulačních protokolů na složení a funkci imunitního systému pacientek.

Klíčová slova: HLA-G, IVF, NK buňky, Imunita

Abstract

The aim of this study was to evaluate the presence of receptors (CD16, CD161, NKG2D, KIR2DL4 and CD85j) on the surface of immunocompetent cells and whether their presence is involved in the *in vitro* fertilization (IVF) and following embryotransfer (ET) success.

We observed significant difference in the age of successful versus unsuccessful patients, which is confirmed by former studies on age-dependence of IVF success. The result from cytotoxic assay confirmed, that neither the stimulation protocol, nor the PBMC source have any effect on effector function. Afterwards, we performed a large-scale analysis of surface markers, starting with healthy donors, compared to patients. Both groups of patients have lower counts of HLA-G binding KIR2DL4 or CD85j receptors bearing cells. Next we observed the expression of these two receptors on various subpopulations of cells (CD56^{dim}, CD56^{bright}, T helpers and cytotoxic T cells) and their counts. Here we observed differences in CD56 surface expression on CD56^{bright} NK cells, the levels of CD56^{dim} NK cells in PBMC (CD16 expression on this population), levels of CD56^{dim} NK cells in FFMC. Next we observed a shift in T cell distribution strongly favoring the CTL in PBMC and in FFMC.

Next step was to compare the levels of cell populations between the successful and unsuccessful patients. We observed an increased surface expression of KIR2DL4 on lymphocytary PBMC of unsuccessful patients compared to both successful patients and healthy donors. This increased expression was further tracked to CTL surface. Then we observed increased surface expression of CD85j on unsuccessful patients PBMC. Successful patients on the other hand had lower CD85j surface expression on pure Th cells. Moreover, the successful patients had lower levels of partially activated CD56^{bright} NK cells and of fully active CD56^{dim} NK cells in their PBMC, when compared to unsuccessful patients. In the follicular fluids of patients we only observed a significant difference in the surface expression of CD161 on monocyte/granulocyte morphology of CD56^{dim} NK cells. Lastly, we observed increased NKG2D expression on the surface of CD4-/CD8- double negative T cells in the FFMC of successful patients.

In this study, we identified several cell populations involved in the final successfulness of IVF. We confirmed the influence of HLA-G binding receptors KIR2DL4 and CD85j and their involvement in immunological mechanisms, accompanying the IVF successfulness and we pointed out the vast influence of stimulation protocols on the composition and function of the immune system of the patients.

Key words: HLA-G, IVF, NK cells, Immunity

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Neplodnost.....	10
2.1.1	Neplodnost jako důsledek autoimunitních procesů u mužů.....	12
2.1.2	Neplodnost jako důsledek autoimunitních procesů u žen.....	12
2.2	Léčba neplodnosti.....	13
2.2.1	Metody asistované reprodukce.....	14
2.3	Imunologie v těhotenství.....	16
2.3.1	Plod jako alogenní transplantát.....	17
2.3.2	Přesmyk imunitní odpovědi ve směru Th2 odpovědi.....	17
2.3.3	Funkce monocytů a makrofágů.....	18
2.3.4	Přítomnost dNK buněk na feto-maternální rozhraní.....	18
2.3.5	Imunoregulační účinky progesteronu a estrogeneru.....	19
2.3.6	Úloha trofoblastu.....	20
2.3.7	Ochranné mechanismy zárodku.....	21
2.4	NK buňky.....	21
2.4.1	Identifikace NK buněk.....	22
2.4.2	Mechanismus rozpoznání cílové buňky.....	22
2.4.3	Cytotoxické mechanismy NK buněk.....	23
2.5	NKT-buňky.....	24
2.6	Receptory.....	25
2.6.1	Aktivační receptory.....	25
2.6.2	Inhibiční receptory.....	26
3	Experimentální část.....	30
3.1	Materiál a metody.....	30
3.1.1	Materiál.....	30
3.1.2	Metody.....	37
4	Výsledky.....	47
4.1	Závislost věku pacientek na úspěšnosti IVF.....	47
4.2	Cytotoxicita v krvi zdravých dárcyň a pacientek.....	47
4.3	Porovnání krví zdravých dárcyň, úspěšných a neúspěšných pacientek.....	48
4.4	Porovnání úspěšných a neúspěšných pacientek.....	56
4.5	Porovnání krví a folikulárních tekutin u úspěšných a neúspěšných pacientek.....	60
5	Diskuze.....	67
6	Závěr.....	70

Seznam použitých zkratek

ADCC	na protilátkách závislá cytotoxická reakce (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
APC	antigen prezentující buňky
ASA	protilátky proti spermiím (anti-sperm antibodies)
BL	periferní krev (peripheral blood)
CD94	receptor-KLRD1 (killer cell lectin-like receptor subfamily D, člen 1)
CML	chronická myelogenní leukémie
Cpm	míra radioaktivity (count per minute)
CSF-1	kolonie stimulující faktor-1 (colony stimulating factor-1)
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
Ctx	cytotoxicita
DAPI10	protein aktivován skrze interakci MICA a NKG2D
DAP-12	protein zprostředkující aktivační signál
dNK	deciduální NK buňky
EPF	faktor časného těhotenství
ET	embryo transfer
F	žena (female)
FACS	průtoková cytometrie (flow cytometry)
Fc	fragment Fc vážící se na Fc-receptory
FcγRIII	CD16 (nízkoafinní receptor pro Fc fragment IgG)
FF	folikulární tekutina (follicular fluid)
FFMC	mononukleární buňky z folikulární tekutiny
FSC	forward scatter
FSH	folikuly stimulující faktor
GM-CSF	granulocyty-monocyty kolonie stimulující faktor (granulocyt-monocyt colony stimulating factor)
GnRH	gonadotropin-uvolňující hormon
hCG	lidský choriový gonadotropin (human chorionic gonadotropin)
HD	zdravá dárkyně (healthy donor)
HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
IBL	imunobiologická laboratoř
ICSI	injekce spermie do cytoplasmy oocyty mikropipetou
IFNγ	interferon γ
IgG	imunoglobulin třídy G
IL-8	interleukin 8
IL-15	interleukin 15
IL-18	interleukin 18
ILT2	CD85j (imunoglobulin like transcript)
ITIM	inhibiční motiv (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
IUI	intrauterinní inseminace
IVF	in vitro fertilizace (oplození ve zkumavce)
KIR	rodina receptorů-killer cell Immunoglobulin-like receptors
KIR2DL4	CD158d
LGL	velké granulární lymfocyty
LH	luteinizační hormon
LIF	leukemii inhibující faktor (leukaemia inhibitory factor)
LILR	rodina receptorů-leukocyte Ig-like receptor
LILRB-1	CD85j

LRC	leukocytový genový komplex
MAC	komplex proteinů (membrane attack complex)
MESA	metoda odebrání spermií z kanálků nadvarlete (micro epididymal sperm aspiration)
MFI	hustota exprese na povrchu buňky (mean fluorescence intensity)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility komplex)
MICA	MHC I třídy polypeptid příbuzná sekvence A (MHC class I polypeptide-related sequence A)
NCAM-1	CD56 (neural cellular adhesion molecule-1)
NK buňky	přirozené zabíječské buňky (natural killers cells)
NKC	NK genový komplex
NKG-2D	CD314 (Killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1)
NKRP-1	CD161
NKT	přirozené zabíječské T buňky
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky
PDG	preimplantační genetická diagnostika
PI3-K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIBF	faktor blokující produkci progesteronu (progesterone induced blocking factor)
PLGF	placentální růstový faktor (placental growth factor)
sHLA-G	solubilní lidský leukocytární antigen
SSC	side scatter
Tc lymfocyty	cytotoxické T-lymfocyty
TESE	metoda odebrání spermií z tkáně varlete (testicular sperm extraction)
TGFβ	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
Th lymfocyty	pomocné T-lymfocyty
TNFα	nádory nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
uNK	uterinní NK buňky
ÚPMD	Ústav péče pro matku a dítě
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

1 Úvod

Neplodnost je onemocnění, které trápilo, trápí a bude trápit partnerské dvojice na celém světě. Ve vyspělých zemích je přibližně každé 7. manželství nechtěně bezdětné a předpokládá se další pomalý nárůst. Asistovaná reprodukce je označení pro lékařské postupy a metody, při kterých dochází k manipulaci se zárodečnými buňkami nebo s embryi, včetně jejich uchovávání, a to za účelem léčby neplodnosti ženy nebo muže. Metody asistované reprodukce daly šanci i partnerským dvojicím, které by dříve geneticky vlastní děti mít nemohly. O jejím zásadním významu svědčí i to, že jen v naší republice jsou takřka 3% všech narozených dětí počata právě tímto způsobem. Dokonalejší techniky asistované reprodukce, kvalitnější přístroje, laboratorní vybavení a v neposlední řadě účinnější hormonální přípravky nezbytné k navození růstu a zrání vajíček ve vaječnicích ženy, to vše se podílí na zvyšující se úspěšnosti léčby neplodnosti.

Celý proces těhotenství je imunologicky podmíněným dějem, při kterém dochází k toleranci a vývoji plodu. V poslední době došlo k velkému rozvoji poznatků o imunologických mechanismech umožňujících průběh těhotenství. Předpokládá se, že mají zásadní význam pro zdárný průběh celého procesu. Detailní znalosti imunitních pochodů v těhotenství a buněčných populací v nich zapojených umožní lépe diagnostikovat a léčit imunopatologické stavy spojené s těhotenstvím.

Touto prací bych chtěla upozornit na zvyšující se výskyt neplodnosti, nastínit možnosti léčby a shrnout imunitní mechanismy uplatňující se v průběhu těhotenství. Cílem této práce bylo zjistit přítomnost receptorů (CD16, CD161, NKG2D, KIR2DL4 a CD85j) na povrchu imunokompetentních buněk, a zda má přítomnost těchto receptorů nějakou souvislost s úspěšností in vitro fertilizace a následného embryotransferu.

2 Literární přehled

2.1 Neplodnost

Lidská neplodnost je vážný, i když ne fatální problém, se kterým se potýká řada manželských párů. Podle světové zdravotnické organizace definice neplodnosti páru je neschopnost počít dítě po ročním pravidelném nechráněném sexuálním styku. Neplodností ve světě i u nás trpí v současné době 10-15% párů, přičemž z 30-40% se na sterilitě podílí žena, z 10-30% muž a z 15-30% se podílí oba. Hrubé odhady Světové zdravotnické organizace uvádí, že problémy s plodností se objevují nově asi u 2 miliónů párů ročně. Toto přibývání neplodnosti souvisí jednak s odkládáním otěhotnění, kontracepcí a pohlavními chorobami, svůj podíl jistě mají i genotoxické faktory životního prostředí. Se zvyšující se incidencí roste i zájem o odborné vyšetření a léčbu. Úspěšnost léčby je 50-60%. Příčin neplodnosti může být více.

Tab. 1: Příčiny neplodnosti mužů

• Genetické	10–15 %
<i>abnormality chromozomů, zvláště mikrolece Y, Klinefelterův sy, kryptorchismus</i>	
• Anatomické	30–35 %
<i>mikroorchismus, atrezie vas deferens, varikokéla, komprese gonád</i>	
• Poruchy funkce gonád	10–15 %
<i>vyšší vazba ubikvitinu, poruchy proteasomu – odbourávání sp. mitochondrií, fragmentace sp. DNA (test integrity spermií)</i>	
• Hormonální	2–5 %
<i>hyposekrece gonadotropinů a pohlavních hormonů, hyperprolaktinémie</i>	
• Zánětlivé	
<i>epididimitidy, vezikulitidy, prostatitidy</i>	
• Imunologické	10–15 %
<i>autoprotilátky a autoCMI proti spermiím, ženiny protilátky a CMI proti spermiím</i>	
• Neobjasněno	30–35 %
Funkční následky	poruchy spermiogenezy; vadný přestup spermií hrdlem, zonou pellucidou, vejcovodem
CMI = cell-mediated immunity (buněčná – buňkami zprostředkovaná – imunita)	

(Zdroj: Nouza¹ et al., 2007)

Tab. 2: Příčiny neplodnosti žen

• Genetické	10–15 %
<i>Turnerův syndrom, polycystická ovaria, předčasné ovariální selhání</i>	
• Anatomické	20–25 %
<i>vývojové vady dělohy, ovaria a oocytogenezy</i>	
• Poruchy funkce gonád	20–40 %
<i>vyšší vazba ubiquitinu, poruchy proteasomu – odbourávání sp. mitochondrií, fragmentace sp. DNA (test integrity spermií)</i>	
• Hormonální	20–30 %
<i>dysfunkce hypothalamu, hypoprolaktemie</i>	
• Zánětlivé	
<i>kolpity, cervicitidy, adnexitidy</i>	
• Imunologické	15 %
<i>autoprotilátky a autoCMI proti ovariu, vajíčku a zona pellucida, protilátky a CMI proti spermiím</i>	
• Neobjasněno	10–20 %
Funkční následky	poruchy oocytogenezy; vadný přestup spermií děložním hrdlem, dělohou, vejcovody a zonou pellucidou
CMI = cell-mediated immunity (buněčná – buňkami zprostředkovaná – imunita)	

(Zdroj: Nouza¹ et al., 2007)

U muže bývá nejčastější příčina neplodnosti špatná kvalita spermatu charakterizovaná nedostatečným počtem spermií, poruchami jejich motility a morfologie. U ženy zahrnuje infertilita řadu faktorů, mezi nimi na-př. poruchy ovulace, neprůchodnost vejcovodů, endometriózu, špatnou kvalitu cervikálního hlenu a další. Navíc u obou pohlaví hrají úlohu imunologické faktory, mezi něž patří například přítomnost antispermatozoálních protilátek. Obecně platí, že poruchy plodnosti mají zřídka pouze jednu příčinu – většinou jde o výslednici působení několika faktorů, zasahujících často oba partnery. Podíl imunologických příčin může být různý, od patogeneticky málo významného spolupůsobení až po klíčovou roli. Imunologickou neplodnost čistou nebo sdruženou s jinými příčinami dnes tvoří 10-15% všech sterilit. Řada případů neplodnosti obou pohlaví však zůstává nevysvětlena.

2.1.1 Neplodnost jako důsledek autoimunitních procesů u mužů

U orgánově specifických autoimunitních onemocnění vedou k poškození obvykle cytotoxické mechanismy zprostředkované autoprotilátkami nebo autoreaktivními cytotoxickými lymfocyty (Tc, NK...) a jejich produkty (cytokiny). Část orgánově specifických autoimunitních onemocnění je způsobena přítomností antireceptorových protilátek. U mužů se gamety vyvíjejí postnatálně. Varle je z imunologického hlediska zcela výsadním orgánem, histologická struktura varlete omezuje přímý kontakt buněk zúčastněných ve spermatogeneze s krevními elementy ("hematotestikulární bariéra"). Proto, a také díky velmi omezené mízní drenáži, v něm nedochází za normálních okolností k přímé imunologické reakci proti spermii. V podpůrné tkáni varlete se nalézají pouze makrofágy, které chrání varle před infekcí. V nadvarletí jsou kromě makrofágů i další buňky – lymfocyty a granulocyty, které se do ejakulátu dostanou z krve nadvarlete. Jejich množství za normálních okolností kolísá.

Zevní membrána spermie se skládá z glykoproteinů, lipoproteinů a enzymů, které za některých okolností navozují tvorbu protilátek. K imunologické reakci dochází při porušení bariéry krev–varle ("hematotestikulární bariéry"). Toto porušení umožní přístup bílým krvinkám ke spermatocytům, jejichž povrchové antigeny jsou rozpoznány jako cizí a tělo si vytvoří autoprotilátky. Nejčastěji se to stává při poraněních, zánětech, operačních výkonech, nádorech, vrozených vadách, ale i z neznámých příčin. Protilátky proti spermii se pak objeví nejen v seminální plazmě, ale někdy i v séru. Ne všechny antigeny jsou však za normálních okolností před imunitním systémem chráněny, některé mohou být přítomné v semenných kanálcích. Zde se potom musí uplatnit některé lokální imunoregulační mechanismy.

2.1.2 Neplodnost jako důsledek autoimunitních procesů u žen

Primordiální folikuly u plodů ženského pohlaví se formují již v době pohlavní diferenciacie embrya, a proto jsou povrchové antigeny oocyty vnímány imunitním systémem ženy jako vlastní. Ale u dalších struktur ovaria, zejména u zrajících folikulů, může vzniknout autoimunitní reakce, protože dozrávají až později v období kolem puberty. Tato autoimunita může ovlivnit další vývoj a funkci ovaria. Začínají se objevovat i nové poznatky, že ve vaječnicích se uplatňují imunoregulační mechanismy-tlumivé buňky a humorální faktory.

Například zastoupení a složení imunitních buněk a jejich faktorů se výrazně mění během procesů zrání oocytů i rozvoje a zániku žlutého tělíska, což ukázaly studie provedené v Imunobiologické laboratoři Ústavu pro péči o matku a dítě (IBL ÚPMD) (Petrovská² et al., 1992).

Imunitní systém ženského pohlavního ústrojí však přichází do kontaktu i se spermii, které jsou pro ženu antigenně i geneticky zcela cizí. Na rozdíl od člověka se samice všech živočichů běžně páří jen v době ovulace (říje). V té době je hlen uzavírající děložní hrdlo čirý a pro spermie prostupný. Mimo ovulaci je v něm mnoho lymfocytů - imunologických "strážců", bránících průniku infekce. Lymfocyty registrují jako vetřelce i spermie, které se v pochvě octnou v době mimo ovulaci. Situaci může ještě zhoršit zánět, který současně probíhá v pochvě nebo na děložním čípku, například běžná mykóza. Tehdy je obranný systém pohlavního ústrojí ženy zvláště přecitlivělý, může proti spermiiim zaútočit a poněvadž existuje imunologická paměť, může reaktivita přetrvávat. Proto opakovaná expozice spermatických antigenů umocňuje negativní vliv na plodnost.

2.2 Léčba neplodnosti

Při léčbě neplodnosti jsou nejprve doporučeny a použity jednodušší postupy a dále se pak podle zjištěných výsledků přechází k postupům složitějším. Možností je celá řada a záleží vždy na diagnóze a zjištěném typu neplodnosti. Testy potřebné k určení příčiny zahrnují u žen zjištění ovulace, kvality vejcovodů a hormonální hladiny, u mužů pak vyšetření spermioqramu (počet, pohyblivost a tvar spermií). Ideální je, může-li být pár postižený nevysvětlitelnou neplodností nebo opakovaným neúspěchem IVF (oploďněním ve zkumavce) vyšetřen na specializovaném pracovišti reprodukční imunologie. Potvrdí-li se imunologická příčina, je většinou možné léčebně zasáhnout.

Jsou dvě možnosti: Imunitu vyléčit nebo ji obejít. Tam, kde imunita brání usazení embrya v děloze, nepomůže asistovaná reprodukce. V tomto případě musíme imunitu utlumit. Nejprve zamezit dráždění pohlavního ústrojí ženy cizorodými látkami, proto je třeba vyléčit všechny záněty pochvy, čípku, dělohy, vejcovodů, vaječnicků i případná endometrióza dráždí imunitní systém. Dalším logickým krokem je dočasně zamezit styku ženina genitálu s cizorodými antigeny - spermiiemi partnera. Doporučuje se důsledné používání kondomu (tzv. kondomová terapie). K urychlení tohoto procesu se pomáhá podáváním malých dávek imunopresivních léků (např. Prednison, který lze velmi přesně a minimálně dávkovat).

Většinou se nález do tří měsíců upraví. Pak je možno pokusit se o otěhotnění: ať už přirozenou cestou nebo pomocí IVF. Pokud dojde k úspěšnému otěhotnění, je ženě podáván Prednison i v raných stádiích těhotenství a zároveň ještě v těchto stádiích je doporučen kondomový styk. Dříve byla snaha imunitní reakci proti spermiím léčit, ale dnes je jednodušší tento problém obejít technikami asistované reprodukce např. IUI, IVF, ICSI. Avšak mnoho dostupných technik má vedlejší účinky, jsou invazní a drahé, mají nízkou účinnost nebo poskytují protichůdné výsledky.

2.2.1 Metody asistované reprodukce

Léčba neplodnosti pomocí metod asistované reprodukce je jednou z nejprogresivnějších oblastí moderní medicíny. Od narození prvního dítěte “ze zkumavky“ uběhlo již více než čtvrt století. V roce 1978 se v Anglii, díky péči průkopníků reprodukční medicíny MUDr. Edwardse a MUDr. Steptoea, narodila Louise Brownová. V České republice bylo první úspěšné IVF provedeno v roce 1982 v Brně a velkou zásluhu na tom měl prof. Ladislav Pilka. Od té doby došlo v oblasti výzkumu, diagnostiky a léčby neplodností k obrovským pokrokům.

2.2.1.1 IUI–Intrauterinní inseminace

Tato metoda se obvykle volí u mužského faktoru neplodnosti, protože k oplodnění dochází v přirozeném prostředí pohlavního ústrojí ženy. Hlavní podmínkou pro použití této metody zůstává, aby spermioqram partnera byl v mezích normálních hodnot a vejcovody partnerky byly v pořádku. IUI se užívá společně s indukcí ovulace pro zvýšení úspěšnosti početí. Hormonální léčba vyvolá dozrání maximálně tří vajíček. Odběr spermatu je prováděn ráno v den ovulace. Při IUI jsou spermie odděleny od seminální plazmy a jsou speciálně upraveny-opakovaně promyty, koncentrovány a poté pomocí ultrahebného katetru přeneseny do hrdla nebo vysoko do děložní dutiny ženy. Teoreticky u IUI je obcházen problém týkající se transportu spermií genitálním traktem ženy, zejména hrdlem děložním s ovulačním hlenem.

Úspěšnost jednotlivé IUI po stimulaci vaječnicků bývá mezi 10-15% na cyklus, ale po několika pokusech během jednoho roku může vzrůst až na 50%. Obvykle jsou provedeny 3-4 cykly IUI a pokud jsou neúspěšné, je doporučena jiná efektivnější metoda.

2.2.1.2 IVF–Oplodnění ve zkumavce (in vitro fertilizace)

IVF je pravděpodobně nejrozšířenější metoda asistované reprodukce na světě. Tato technika se provádí v laboratoři. Kvůli větší pravděpodobnosti úspěšného výsledku se pomocí hormonálních léků stimuluje činnost vaječnicků tak, aby najednou dozrálo více oocytů. Když oocyty dozrají, jsou odsáta pod kontrolou ultrazvuku jehlou zavedenou přes poševní stěnu a přemístěna do speciálních živných roztoků. Odebrané oocyty z vaječnicků jsou smíchány se spermii partnera v malém prostoru ve speciální plastické nádobce, čímž se zvýší šance na oplození. Po oplodnění jsou embrya ještě po určitou dobu kultivována. Po dvou až pěti dnech jsou vzniklá embrya zavedena tenkým katetrem pochvou a děložním čípkem do dělohy, tzv. embryotransfer (ET). Zpravidla jsou přenášena do dělohy jeden nebo dva zárodky. IVF neřeší problém týkající se spermii.

Úspěšnost této metody je 30% na jeden cyklus léčby a pravděpodobnost donošení je o něco málo nižší. Celková průměrná úspěšnost po IVF se nijak výrazně neliší od přirozené naděje na početí u normálně plodných párů. Rozdíl v naději na těhotenství je prokázán u žen po 35 letech věku, proto mnoho odborníků doporučuje neváhat s léčbou u párů, kdy je ženě okolo třiceti let. Těhotenství u žen nad 35 let je asociováno s vyšší maternální a perinatální mortalitou (Katwijk³, Peeters 1998). U těchto žen je zvýšené riziko výskytu komplikací způsobených s věkem sdruženými faktory – leiomyomata, diabetes II. typu, hypertenze a multiparita. Je zde i vyšší pravděpodobnost porodu císařským řezem.

2.2.1.3 ICSI – injekce spermie do cytoplasmy oocytu mikropipetou

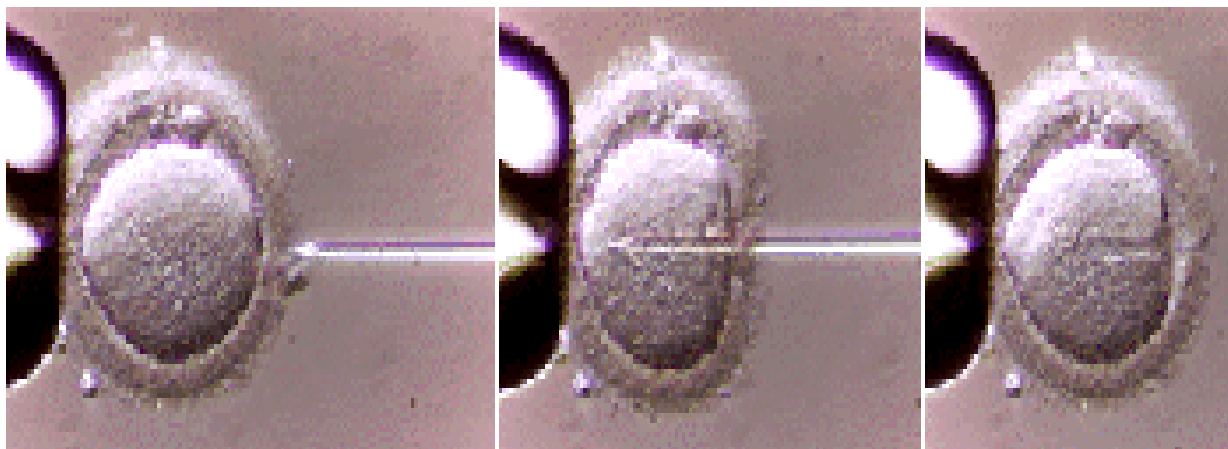
V některých případech je vhodné pro zvýšení úspěšnosti při mimotělním oplození užít speciální, tzv. mikromanipulační techniky. ICSI řeší problémy týkající se právě spermii, stačí pouze jedna spermie, která je injikována přímo do cytoplasmy oocytu mikropipetou.

Přesto tato metoda, navzdory jejímu velkému přínosu a úspěšnosti, je stále ještě poměrně krátce prováděna, a proto je nutné důkladně zvážit indikace k jejímu provedení. Měla by být užita jen ze specifické indikace. To zahrnuje případ vzorků spermatu s výrazně malým počtem spermii, vysoké titry protilátek proti spermii-ASA (anti-sperm antibodies), či předchozí neúspěšné IVF. Absolutní indikací jsou předchozí dva předchozí neúspěšné pokusy v konvenčním IVF, užití epididymálních (získaných metodou MESA-micro epididymal sperm aspiration) nebo testikulárních (získaných metodou TESE-testicular sperm

extraction) vzorků spermatu, nepohyblivých spermií, spermií bez akrosomu. Další absolutní indikací je oplodnění vajíčka před preimplantační genetickou diagnostikou-PGD (Hamberger⁴ et al., 1998). PGD umožňuje genetickým vyšetřením jedné nebo dvou buněk (blastomer) odebraných z vyvíjejícího se embrya odhalit genetické abnormality budoucího plodu. Po tomto vyšetření lze k transferu do dělohy vybrat pouze embrya bez genetické zátěže.

Samozřejmě i při ICSI musí partnerka podstoupit proceduru řízené ovariální hyperstimulace s odběrem vajíček a partner musí dodat vzorek spermatu, vzorek může být získán z ejakulovaných spermií, po odsátí z nadvarlat (MESA) nebo odebráním z tkáně varlat (TESE). Velmi důležitou etapou této metody je příprava a výběr spermií, který je prováděn procesem promývání a třídění. Poté je do jednoho vajíčka aktivně mikropipetou zavedena jediná spermie. Po dvou až pěti dnech následuje embryotransfer (ET).

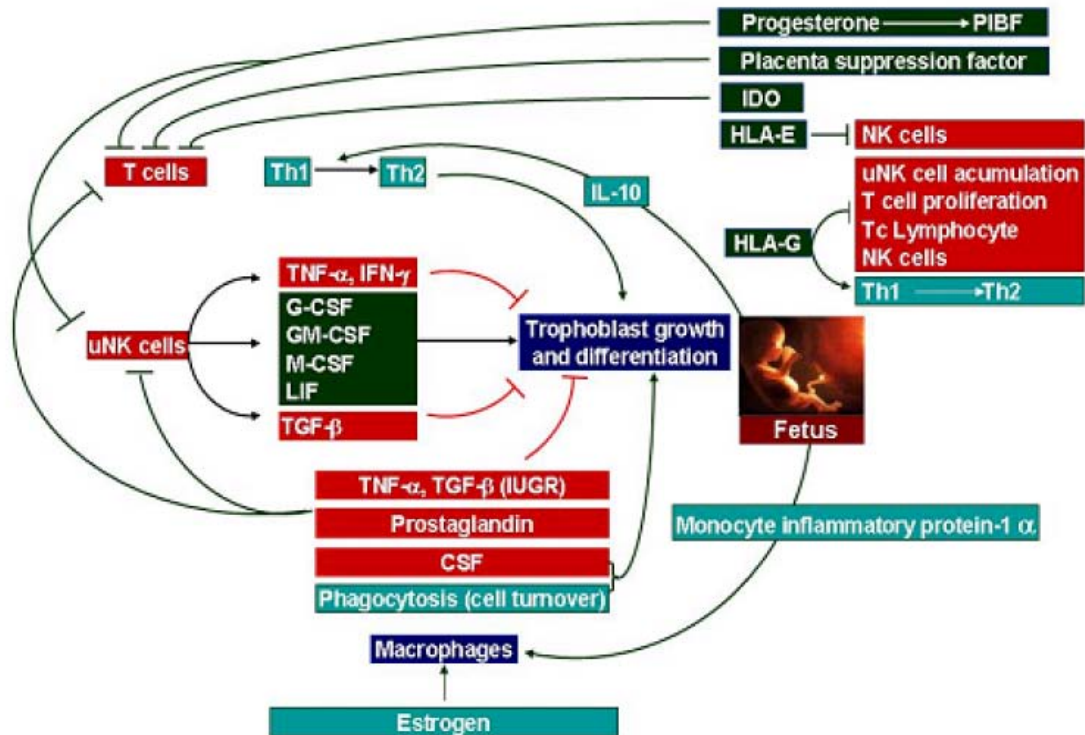
Poměr otěhotnění a porodů bývá stejně vysoký jako u metody IVF a někdy dokonce i vyšší. Metoda ICSI je v České republice nehrazenou nadstandardní metodou a proto rozhodnutí o jejím provedení záleží na pacientce.



*Obr. 1.: Spermie přítomná v tenké jehle se injektuje do cytoplazmy vajíčka
(zdroj: www.sanatoriumhelios.cz)*

2.3 Imunologie v těhotenství

Těhotenství je procesem tolerance a vývoje plodu. Při tomto procesu se uplatňují imunitní mechanismy, které mají zásadní význam pro jeho zdárný průběh.



*Obr. 2.: Imunologické mechanismy během normálního těhotenství
(Zdroj: Piyush Tripathi⁵ et al., 2007)*

2.3.1 Plod jako alogenní transplantát

Plod je pro matku z poloviny “cizího“ původu a lze ho tedy považovat za semialogenní transplantát (tedy z části tkáň pocházející od jedince stejného druhu, ale rozdílné genetické výbavy) nesoucí antigeny rozdílné od mateřského organismu. Medawar byl prvním, kdo koncept plodu jako alogenního transplantátu předpokládal (Medawar⁶, 1953). Jeho domněnka anatomické separace mezi matkou a plodem však nebyla potvrzena, dnes už je nám známo, že některé buňky plodu (např. trofoblast) přichází do těsného kontaktu s maternálním imunitním systémem. Buňky fetálního původu byly prokázány i v krevním oběhu matky a vyskytovali se zde i po porodu (Bonney⁷, Matzinger 1997).

2.3.2 Přesmyk imunitní odpovědi ve směru Th2 odpovědi

K aktivaci imunitních mechanismů matky dochází po přichycení blastocysty do děložní sliznice a v počátečních fázích formování placenty. Klinické studie u pacientek trpících rheumatoidní artritidou (Da Silva⁸, Spector 1992) a systémovým lupus erythematoses (Varner⁹ 1991) ukazují změny imunitní odpovědi v průběhu těhotenství.

U těhotných pacientek s reumatoidní artritidou dochází k dočasné remisi tohoto onemocnění, naopak u pacientek se systémovým lupus erythematoses dochází ke zhoršení onemocnění, což podporuje koncept, že u těhotných žen je výrazná převaha Th2 reakce (Wegmann¹⁰ et al. 1993), která směřuje k produkci protilátek. Přesmyk imunitní reakce ve směru Th2 odpovědi vede k potlačení cytotoxických reakcí a produkce Th1 cytokinů (např. IFN γ -interferon γ a TNF α -tumor necrosis factor α), jež mohou inhibovat vývoj plodu (Chaouat¹¹ et al., 1990; Haimovici¹² et al., 1991). TNF α a IFN γ inhibují invazi trofoblastu a stimulují makrofágy v decidue k produkci faktorů, jež mohou poškodit embryo (Baines¹³ et al., 1997, Haddad et al., 1997 a¹⁴; b¹⁵). TNF α a IFN γ mohou ovlivnit růst plodu i jinou cestou a to aktivací protrombináz, které generují trombin. Aktivace trombinu vede k tvorbě sraženin a produkci IL-8. Tento chemokin stimuluje granulocyty a endoteliální buňky k ukončení krevního zásobení placenty (Clark¹⁶ et al., 2001).

2.3.3 Funkce monocytů a makrofágů

Po implantaci blastocysty dochází v přilehlé oblasti deciduy ke zmnožování monocytů a makrofágů; jejich fagocytární aktivita je však snížena a stávají se producenty imunopresivních faktorů-např.: prostaglandiny, jež potlačují funkci Tc lymfocytů a uNK buněk (Parhar¹⁷ et al. 1989). Makrofágy se také uplatňují u odstranění apoptotických buněk, které vznikají v důsledku růstu a funkce placenty, a tím brání k rozvoji zánětu a následné rejekce plodu.

2.3.4 Přítomnost dNK buněk na fetu-maternální rozhraní

Kolem 70% leukocytů v decidue tvoří dNK buňky, jež se z hlediska genové exprese, fenotypu i funkce odlišují od NK buněk z periferní krve (Koopman¹⁸ et al., 2003). Počet těchto buněk se výrazně zvyšuje během prvních stádií těhotenství (Moffett-King¹⁹, 2002). dNK jsou v těsném kontaktu s trofoblastem, což vede k hypotéze, že mohou mít velký význam při regulaci invaze trofoblastu.

V periferní krvi byly nalezeny dvě subpopulace NK buněk. Jedna subpopulace je CD56^{dim}CD16+, tvoří 90-95% populace NK buněk a je považována za mnohem více cytotoxickou než subpopulace CD56^{bright}CD16-, která tvoří 10% populace NK buněk. Předpokládá se, že hlavní funkcí subpopulace CD56^{bright}/CD16- je produkce cytokinů

(Cooper²⁰ et al., 2001). Tyto dvě subpopulace se nacházejí také v decidue, ale téměř v opačném poměru, kdy cytotoxická subpopulace zaujímá 5% a cytokiny sekretující subpopulace 95% (Tabiasco²¹ et al., 2006). Produkce cytokinů může být ještě zvýšena *in vitro* přidáním IL-15 nebo IL-18, jenž jsou oba za normálních podmínek přítomné v těhotném endometriu (Laskarin²² et al. 2005). dNK buňky produkují řadu cytokinů ovlivňujících více procesů.

Za prvé mohou ovlivňovat invazi trofoblastu, protože na trofoblastu byla prokázána přítomnost receptorů pro cytokiny, které jsou sekretované dNK buňkami: GM-CSF (granulocyt-monocyt colony stimulating factor), CSF-1 (colony stimulating factor-1), $INF\gamma$ a $TNF\alpha$ (Johki²³ et al., 1994). CSFs podporují proliferaci a diferenciaci trofoblastu $TGF\beta$ (transforming growth factor β) na druhé straně inhibuje proliferaci a diferenciaci trofoblastu. Jak už bylo zmíněno výše $INF\gamma$ a $TNF\alpha$ mají negativní vliv na implantaci a invazi trofoblastu.

Za druhé dNK produkují pro angiogenezi důležité faktory: VEGF (vascular endothelial growth factor) a PLGF (placental growth factor). Oba tyto faktory podporují tvorbu cév v decidue (Hanna²⁴ et al. 2006). Za třetí svými produkty mohou lokálně modulovat aktivitu dendritických buněk a T-buněk (Hanna²⁵ et al., 2005).

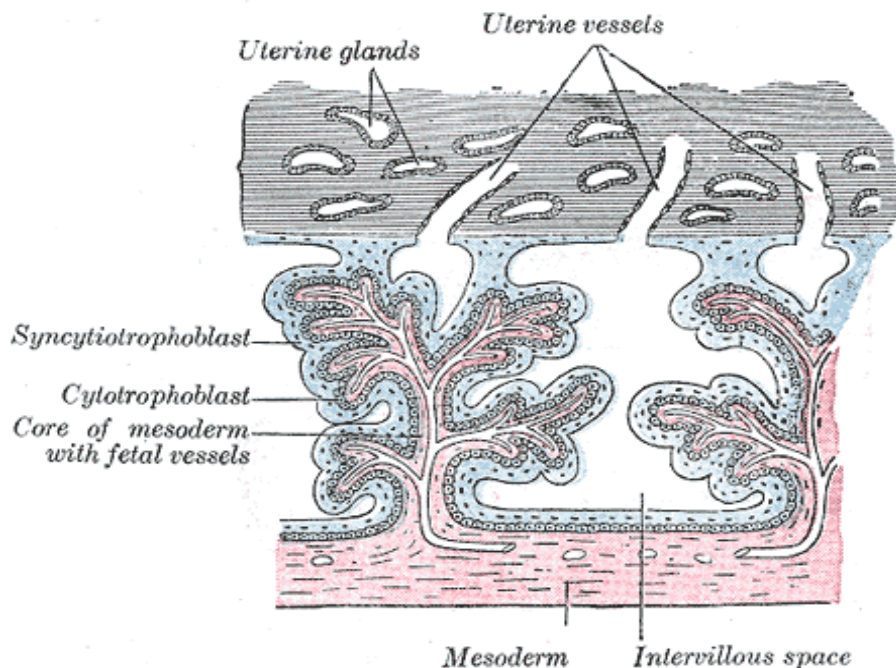
Za čtvrté mohou chránit uterus a plod před šířením virové infekce, protože produkují větší množství $INF\gamma$ (Cooper²⁶ et al., 2001). Avšak $INF\gamma$ může i negativně ovlivnit růst, jak bylo zmíněno výše. Dále pak dNK buňky produkují LIF (leukaemia inhibitory factor), který stimuluje implantaci.

2.3.5 Imunoregulační účinky progesteronu a estrogeneru

Významné imunoregulační úlohy jsou připisovány i progesteronu a estrogenům, které se v hraniční oblasti mezi matkou a plodem hromadí a dosahují vysokých koncentrací. Progesteron vyvolává produkci PIBF (progesterone induced blocking factor) u T lymfocytů. Tento faktor produkovaný T buňkami potlačuje proliferaci NK buněk a produkci TNF NK buňkami. Estrogeny jsou produkovány placentou, regulují produkci progesteronu a ovlivňují vývoj některých orgánů plodu. Další funkce je modulace makrofágů, které exprimují receptor pro estrogeny.

2.3.6 Úloha trofoblastu

Klíčové úlohy plní trofoblast. Trofoblast (zevní masa buněk) je obal savčího embrya a stěna blastocysty. Buňky trofoblastu slouží především k výživě (poskytování živin) embrya a také se z nich vyvíjí velká část placenty. Dále pak buňky trofoblastu zajišťují implantaci (nidaci) plodu do děložní sliznice, a proto jsou to jedny z prvních diferenciovaných buněk dělicího se oplozeného vajíčka. Vnitřní vrstva trofoblastu se později rozliší na cytotrofoblast, vnější na syncytiotrofoblast.



Obr. 3.: Cytotrofoblast a syncytiotrofoblast
(Zdroj: en.wikipedia.org)

Dlouho se věřilo v existenci povrchové izolační blanky sialomucinové povahy, zabraňující výměně makromolekul mezi matkou a plodem. Tato bariéra však není dokonalá. Významnější je nízce imunogenní povrchová výbava trofoblastových buněk a jejich vysoká odolnost proti matčině imunitní reakci. Na syncytiotrofoblastu nejsou exprimovány MHC (major histocompatibility komplex) glykoproteiny I. třídy - HLA-A a HLA-B molekuly (Faulket²⁷ al. 1976) a MHC glykoproteiny II. třídy.

Místo nich jsou vyjádřeny HLA-C (King²⁸ et al. 2000) a neklasické HLA molekuly I. třídy HLA-G (McMaster²⁹ et al. 1995), HLA-E (King³⁰ et al. 2000) a HLA-F (Shobu³¹ et al. 2006). HLA-C a HLA-E jsou rozeznávány inhibičními KIR a CD94/NKG2A receptory,

kteřé se nacházejí na NK buňkách (Lopez-Botet³² et al. 2000). Funkce HLA-F není dosud známa.

O HLA-G je poměrně dlouho známo, že je exprimováno výhradně buňkami trofoblastu. Jeho funkce na materno-fetálním rozhraní však není pořád zcela objasněna. Poslední studie (Rajagopalan³³ et al. 2006, Hanna³⁴ et al. 2006, van der Meer³⁵ et al. 2007, Miah³⁶ et al. 2008) se domnívají, že jednou z jeho funkcí je modulace sekrece cytokinů u deciduálních leukocytů, čímž navozuje toleranci imunitního systému k plodu, dále pak kontroluje invazi trofoblastu a také se podílí na přestavbě spirálních arterií nutných pro úspěšnou implantaci embrya a pro zdárný průběh těhotenství. Bylo popsáno i solubilní HLA-G (sHLA-G), které je produkováno fetální placentou a uvolňováno do maternálního séra (Blaschitz³⁷ et al. 2005). Jeho funkcí může být stimulace periferních NK buněk k produkci faktorů příznivě ovlivňujících těhotenství (Rajagopalan³³ et al. 2006).

Na cytotrofoblastu chybějí HLA molekuly II. třídy nezbytné pro funkce APC a pro aktivaci imunitních buněk. Přítomné specifické diferenciacní znaky na trofoblastu jsou slabě imunogenní a prezentovány v tolerogenní formě.

2.3.7 Ochranné mechanismy zárodku

Sám zárodek je pro úspěšný vývoj vybaven řadou ochranných a podpůrných mechanismů. Významný je např. EPF – faktor časného těhotenství, alfa-fetoprotein, hCG (lidský choriový gonadotropin) a GM-CSF. Všechny tyto (a další) molekuly omezují množení a aktivaci matčinyých imunitních buněk a faktorů a stupňují odolnost buněk fétu na jejich působení.

2.4 NK buňky

NK buňky se morfolořicky jeví jako větší granulární lymfocyty (Yokoyama³⁸ et al., 2004), tj. lymfoidní buňky s bohatší cytoplazmou, ve které se nacházejí azurofilní granula (Timonen³⁹ et al., 1981) obsahující perforin a granzymy. Pro svou morfolořii jsou zralé a plně diferenciované NK buňky nazývány velké granulární lymfocyty (LGL; Herberman⁴⁰, Ortaldo, 1981). Patří do přirozené imunity, působí absolutně samostatně a pro svoji činnost nepotřebují dostávat kostimulační signály od jiných imunitních buněk. Zabíjejí buňky, které se snaží uniknout cytotořickým T-buňkám tím, že potlačují expresi MHC-glykoproteinů na svém

povrchu. Zdá se, že exprese MHC molekul I. třídy má protektivní účinek proti lyzi NK buňkami *in vitro* (Quille⁴¹ et al., 1988, Hoglund⁴² et al., 1991). NK-buňky se účastní obrany organismu proti virům a také se uplatňují v protinádorovém dozoru. Tyto buňky se účastní také reakce při odmítnutí štěpu při transplantaci kostní dřeně.

2.4.1 Identifikace NK buněk

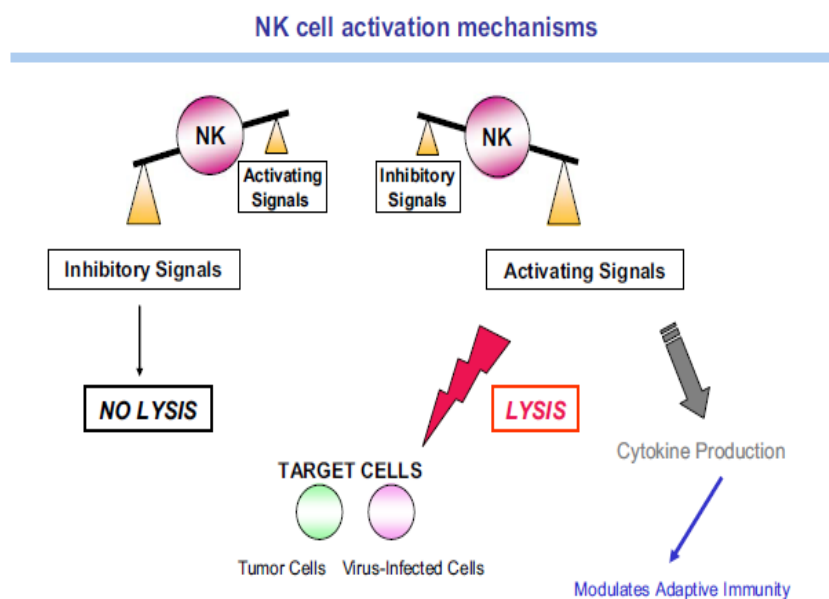
Nejpřesnější identifikaci NK buněk umožňuje průkaz jejich specifických membránových molekul. Z nich zřejmě nejdůležitější je molekula CD56 (Hercend⁴³ et al., 1985, Lanier⁴⁴ et al., 1989, Lanier⁴⁵ et al., 1986), která je exprimována na NK buňkách a částečně také na T lymfocytech. Molekula CD56 slouží jako adhezní molekula v homotypických adhezních interakcích (Cunningham⁴⁶ et al., 1987). Mimo hematopoetickou tkáň je bohatě vyjádřena v nervové tkáni a je označována jako NCAM-1 (neural cellular adhesion molecule-1). Pro praktický průkaz je používána kombinace 3 znaků a to CD3, CD56 a CD16, který představuje nízkoafinní receptor pro Fc fragment IgG. Buňky, které jsou CD56+/CD16+/CD3-, jsou považovány za NK buňky.

2.4.2 Mechanismus rozpoznání cílové buňky

Již výše byla zmíněna existence dvou subpopulací NK buněk v periferní krvi. Jedna subpopulace je CD56^{dim}/CD16+, tvoří 90-95% populace NK buněk a je považována za mnohem více cytotoxickou než subpopulace CD56^{bright}/CD16-, která tvoří 10% populace NK buněk a její funkcí je produkce cytokinů (Cooper²⁰ et al., 2001). Tyto dvě subpopulace se dále pak liší odlišnou proliferací po působení IL-2, expresí NK receptorů, chemokinových receptorů a adhezivních molekul (Eriksson⁴⁷ et al., 2004; Voss⁴⁸ et al., 1998; Nagler⁴⁹ et al., 1990; Matos⁵⁰ et al., 1993; Hanna⁵¹ et al., 2003).

K zásadnímu průlomů v chápání mechanismů, prostřednictvím kterých NK buňka interaguje s cílovou buňkou, došlo až v několika posledních letech. Jedná se o mnohočetné vzájemné interakce několika skupin receptorových molekul na NK buňkách a jejich ligandů na cílové buňce. Tyto interakce mají pro NK buňku buď aktivační význam, který vede k nastartování cytotoxické reaktivity NK buněk, nebo naopak interakce mezi receptorem na NK buňce a ligandem na cílové buňce může inhibovat cytotoxickou aktivitu NK buněk.

Spuštění cytotoxické kaskády je potom dáno sumací proaktivačních a inhibičních signálů, které zprostředkovávají vzájemné interakce mezi NK buňkou a buňkou cílovou.



Obr. 4: Výsledná efektorová funkce NK buněk je závislá na rovnováze mezi aktivačními a inhibičními signály
(Zdroj: Tabiasco²¹ et al., 2006)

2.4.3 Cytotoxické mechanismy NK buněk

Jestliže po vyhodnocení interakcí mezi NK buňkou a buňkou cílovou převáží proaktivační signály, je nastartována cytotoxická funkce NK buněk. Tuto aktivitu lze členit na ty mechanismy, které poškozují cytoplazmatickou membránu cílové buňky a mechanismy, které indukují apoptózu v cílové buňce (Henkart⁵², 1994).

K poškození membrány cílové buňky dochází vlivem molekul (lysozomy, granzymy a perforiny) uvolněných z granulí exocytózou (Clark⁵³ et al., 2003). Perforiny se vmezeřují do cytoplazmatické membrány cílové buňky, kde polymerují a vytvářejí otvor, kterým dochází ke zhroucení vnitřního prostředí cílové buňky. Mechanismus působení perforinu je velmi blízký působení MAC komplexu (membrane attack complex) komplementového systému.

Mechanismus apoptózy je indukován působením membránových interakcí mezi NK buňkou a buňkou cílovou nebo uvolněním proapoptotických faktorů z NK buňky. Při interakci mezi NK buňkou a buňkou cílovou se uplatňují receptory TNF (tumor necrosis

factor) rodiny (Screpanti⁵⁴ et al., 2001, Takeda⁵⁵ et al., 2001), například Fas receptor (Montel⁵⁶ et al., 1995, Lee⁵⁷ et al., 1996, Arase⁵⁸ et al., 1995, Oshimi⁵⁹ et al., 1996).

2.5 NKT-buňky

V roce 1995 byl poprvé publikován termín “NKT buňky“ (Makino⁶⁰ et al., 1995), který označoval podskupinu T lymfocytů u myši. Tyto NKT buňky sdílely některé charakteristiky s NK buňkami, zejména se jednalo o expresi NK1.1 znaku (NKR-P1c nebo CD161c). Dnes už je tento termín aplikovaný u myši, lidí a i u jiných zvířecích druhů.

NKT-buňky mají vlastnosti NK-buněk i typických T-lymfocytů. Na rozdíl od typických NK-buněk mají NKT-buňky na svém povrchu i antigenní receptory typu TCR β . Rozpoznávají lipidové a glykolipidové antigeny původu mikrobiálního (vyskytují se např. na mykobakteriích, které vyvolávají tuberkulózu) nebo vlastního v komplexu s molekulou CD1d (Bendelac⁶¹ et al., 1995). NKT-buňky disponují celou řadou inhibičních a stimulačních receptorů, které jsou jinak charakteristické pro NK buňky. Jsou bohatým zdrojem cytokinů - INF γ , IL-4, TNF (Zlotnik⁶² et al., 1992) a s vysokou pravděpodobností mají i regulační funkce.

NKT-buňky jsou fenotypově i funkčně heterogenní (některé mají koreceptor CD4, jiné CD8, další nemají CD4 ani CD8). Jsou klasifikovány do třech podskupin (Godfrey⁶³ et al., 2004). První se nazývají NKT buňky typu 1 (klasické NKT buňky, invariantní NKT, V α 14i NKT-myši, V α 24i NKT -lidské), které jsou CD1d dependentní. Tyto klasické NKT buňky byly zřetelně identifikované kvůli schopnosti rozpoznat α -galaktosylceramidové tetramery v komplexu s CD1d (Hammond⁶⁴ et al., 2001; Matsuda⁶⁵ et al., 2000; Lee⁶⁶ et al., 2002; Benlagha⁶⁷ et al., 2000). Druhou podskupinu tvoří NKT buňky typu 2 (neklasické NKT buňky), které jsou také CD1d dependentní, ale už nerozpoznávají α -galaktosylceramidové tetramery v komplexu s CD1d. Poslední třetí skupinu tvoří NKT-podobné buňky (NK1.1⁺ T buňky, CD3⁺ CD56⁺ T buňky), které jsou CD1d independentní.

2.6 Receptory

2.6.1 Aktivační receptory

Převaha aktivačních signálů těchto receptorů, spuštěných ligandem na cílové buňce, vede k nastartování cytotoxické reaktivity NK buněk.

2.6.1.1 CD16 (FcγRIII)

První molekulárně definovanou molekulou, exprimovanou na NK buňkách s výrazným aktivačním potenciálem, je molekula CD16 (FcγRIII), která představuje nízkoafinní receptor pro Fc fragment IgG. Tato molekula je odpovědná za realizaci na protilátce závislé cytotoxické reakce ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) (Takai⁶⁸ et al., 1994, Hazenbos⁶⁹ et al., 1996).

Na NK buňkách je exprimován pouze jeden receptor z doposud známých Fc receptorů (Ravetch⁷⁰ and Kinet, 1991). U lidských NK buněk je exprimovaná transmembránová isoforma γRIII, kde u myších NK buněk je přítomna transmembránová isoforma FcγRIII (Perussia⁷¹ et al., 1989).

2.6.1.2 CD161 (NKRP-1)

Molekula, která je v současné době označována jako NKR-P1 (CD161), byla poprvé identifikována u potkanů (Chambers⁷² et al., 1989). Tato molekula je řazena mezi tzv. lektiny C-typu, jejichž C-terminální konec má charakter lektinu. Lektiny jsou velkou skupinou proteinů, které jsou schopny s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat sacharidy ať už volné, nebo vázané na glykoproteinech nebo glykolipidech. Lektiny se účastní mnoha dějů, ve kterých je nutné specifické rozpoznávání (imunologické reakce, kontakt buněk v tkáních, interakce patogenů s hostitelem, atd.). Vazebná aktivita lektinů C-typu je závislá na přítomnosti vápenatých iontů (Ca²⁺). Poprvé byl tento druh receptorů popsán u myši (Karlhofer⁷³ et al., 1992). Jsou to transmembránové receptory s topologií typu II, kdy je extracelulárně umístěn karboxylový konec, tzv. C-konec. Lektiny C-typu jsou kódovány v NK genovém komplexu (NKC).

U lidských NK buněk je vyjádřen pouze jediný gen (Nkrp1a; Lanier⁷⁴ et al., 1994). Tento receptor je řazen mezi aktivační receptory NK buněk, které jsou kódovány v NK genovém komplexu (NKC). Avšak nacházejí se zde i inhibiční formy NKRP1. Tento receptor je exprimován i NKT-lymfocyty (Bendelac⁷⁵ et al., 1997)

2.6.1.3 NKG2D

Téměř všechny NK buňky mají receptor pro MICA. MICA je protein, který je strukturně podobný MHC molekulám I. třídy, avšak ztratil schopnost vázat peptidy nebo jiné malé antigenní fragmenty. Tento protein se vyskytuje na povrchu stresovaných epiteliálních buněk, buněk infikovaných některými viry a některých nádorů. Jeho přítomnost tyto buňky označuje jako cíle pro cytotoxický zásah NK buněk.

Funkci receptoru pro MICA plní protein NKG2D (Bauer⁷⁶ et al., 1999, Cerwenka⁷⁷ et al., 2000, Diefenbach⁷⁸ et al., 2000). NKG2D se nachází na povrchu NK buněk a T-lymfocytů jako homodimer, kdy jednotlivé molekuly mezi sebou interagují pomocí disulfidických můstků. Tímto se liší od ostatních členů NKG2 rodiny, které heterodimerizují s CD94. Dále má tato molekula omezenou částečnou sekvenční homologii s ostatními členy NKG2 rodiny.

Interakce mezi NKG2D a MICA aktivuje skrze protein DAP10 NK buňky ke zničení buňky. DAP10 obsahuje YxxM motiv (kde x je jakákoli aminokyselina), který je důležitý pro přístup podjednotky fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3-K) (Wu⁷⁹ et al., 1999). Tato kináza spouští signalizační kaskádu vedoucí přes další tyrosinkinázy. MICA-NKG2D-DAP10 komplex je velmi významný pro aktivaci NK buněk a uplatňuje se hlavně v obraně proti intracelulárním infekcím.

2.6.2 Inhibiční receptory

Skupina receptorů NK buněk, které zajišťují vazbou na patřičný ligand inhibiční signály pro NK buňku, se velmi rychle rozšiřuje. Inhibiční receptory specifické pro MHC molekuly I. třídy lze rozdělit do dvou strukturních skupin (Yokoyama⁸⁰, 1995).

První strukturní skupinu tvoří lektiny C-typu viz výše a druhou strukturní skupinu tvoří molekuly imunoglobulinové rodiny, které jsou u člověka označovány jako KIRs (killer cell Immunoglobulin-like receptors) neboli CD158 (Moretta⁸¹ et al., 1997). Tyto molekuly o rozdílné molekulové hmotnosti obsahují jednu nebo několik domén podobných

charakteristickým imunoglobulinovým doménám. Jsou to transmembránové receptory s topologií typu I, kdy je C-konec umístěn intracelulárně. Jsou kódované v leukocytovém genovém komplexu (LRC) a byly poprvé popsány u člověka.

Bez ohledu na strukturu, obě skupiny receptorů realizují svůj inhibiční účinek po vazbě na ligandy cílové buňky, které jsou představovány molekulami MHC I. třídy-klasickými (Ia) i neklasickými (Ib). Tyto molekuly mají ve své cytoplazmatické části molekulové motivy, označované jako ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Tento motiv je tvořen tímto aminokyselinovým kódem V/I/L/SxYxxL/V, kde x představuje jakoukoli aminokyselinu (Long⁸², 1999).

Receptory prostřednictvím těchto motivů vykazují inhibiční účinky na aktivitu NK buněk tak, že aktivují cytoplazmatické fosfatázy, které přeruší signalizační dráhy aktivované aktivačními receptory (spojené s proteinkinázami). Převážnou část MHC-specifických inhibičních receptorů u myši tvoří první skupina, lektiny C-typu, kdežto u člověka zase převažují KIR receptory.

2.6.2.1 KIR komplex

KIR komplex zahrnuje 15 genů (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3 a KIR3DS1) a dva pseudogeny (KIR2DP1 a KIR3DP1). Zaujímá 100-200Kb regionu LRC lokalizovaného na chromosomu 19 (Trowsdale⁸³, 2001).

2.6.2.2 Nomenklatura KIR receptorů

Podle přítomnosti dvou nebo tří extracelulárních imunoglobulinových domén jsou tyto receptory děleny na KIR2D a KIR3D. Označení KIRDS nebo KIRDL závisí na přítomnosti dlouhé či krátké cytoplazmatické části. KIR receptory s dlouhou cytoplazmatickou částí obsahují ITIM motiv, který zprostředkovává inhibiční signál. Naopak KIR receptory s krátkou cytoplazmatickou částí obsahují v transmembránové části nabitě aminokyseliny, které mohou interagovat s DAP-12 a tak zprostředkují aktivační signál.

2.6.2.2.1 KIR2DL4 (CD158d)

KIR2DL4 (CD158d) byl funkčně popsán jako inhibiční receptor NK buněk. Vazebným ligandem tohoto receptoru je HLA-G, které je exprimováno buňkami trofoblastu.

Objevují se nové poznatky, ve kterých má KIR2DL4 i aktivační potenciál. Je to dáno jeho velmi zajímavou strukturou. Tento receptor nese ve své cytoplazmatické části jediný ITIM motiv a zároveň se v jeho transmembránové části nacházejí nabitě aminokyseliny-Arginin (Selvakumar⁸⁴ et al., 1996). Fosforylovaný ITIM motiv v cytoplazmatické části KIR2DL4 se stává vazebným místem pro SHP-2 tyrosin fosfatázu a tak zprostředkovává inhibiční signál (Yusa⁸⁵ et al., 2002). Aktivační signál u tohoto receptoru může vést k indukci sekrece některých molekul. Například vazba monoklonální protilátky na tento receptor indukuje produkci IFN- γ bez cytotoxické aktivity u klidových NK buněk (Rajagopalan⁸⁶ et al., 2001).

Předpokládá se tedy, že KIR2DL4 zprostředkovává aktivační nebo inhibiční signály v závislosti na podmínkách, které se vyskytují v okolním prostředí.

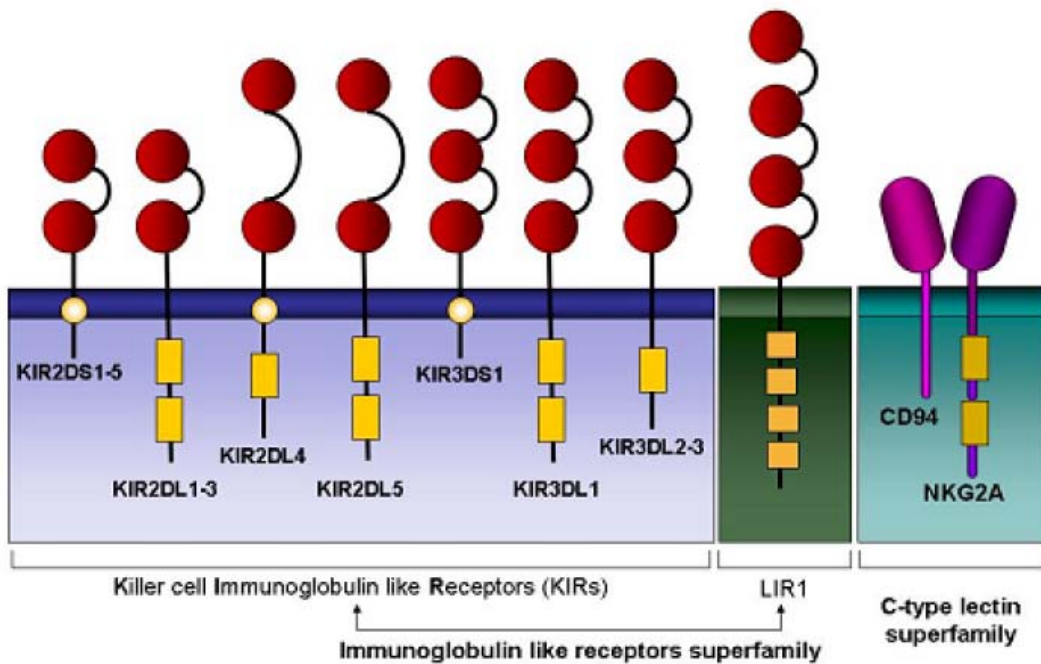
2.6.2.3 LILR (leukocyte Ig-like receptor)

V LIR oblasti se vyskytují i geny pro LILR (leukocyte Ig-like receptor), další receptory imunoglobulinové rodiny specifické pro MHC molekuly I. třídy. Tyto geny jsou méně polymorfní než KIR geny (Wilson⁸⁷ et al., 2000). Exprese receptorů LILR rodiny není vyhrazená NK a T buňkám, geny pro tyto receptory mají širší distribuci a objevují se i u jiných linií leukocytů (Colonna⁸⁸ et al., 1997; Borges⁸⁹ et al.; 1997).

2.6.2.3.1 CD85j (LILRB1)

Do LILR rodiny patří receptor CD85j (LILRB1, ILT2- imunoglobulin like transcript, LIR1-leukocyte inhibitory receptor), který je predominantně exprimován B lymfocyty, monocyty, dendritickými buňkami a v menší míře na NK buňkách a T buňkách. Jeho extracelulární část obsahuje čtyři imunoglobulinové domény a váže 3 domény většiny klasických a neklasických MHC molekul I. třídy (Chapman⁹⁰ et al., 1999). V cytoplazmatické části obsahuje ITIM motiv, který interaguje s SHP-1 (Bellon⁹¹ et al., 2002; Cosman⁹² et al., 1997), a je tedy inhibičním receptorem (Banham⁹³ et al., 1999). Bylo potvrzeno, že tento

receptor rozpoznává i HLA-G (Ponte⁹⁴ et al., 1999), který je exprimován buňkami trofoblastu. Studie užívající povrchovou plazmonovou rezonanci se domnívají, že receptor CD85j se váže ke HLA-G molekule dokonce s větší afinitou než ke klasickým MHC molekulám I.třídy (Shiroishi⁹⁵ et al., 2003). Tento receptor je schopen inhibice NK buněčné cytotoxicity (Colonna⁸⁸ et al., 1997) a dále je podle dalších studií schopen modulovat aktivaci CD4+ a CD8+ T lymfocytů (Merlo⁹⁶ et al., 2001; Saverino⁹⁷ et al., 2000; Ince⁹⁸ et al., 2004).



Obr. 5: Typy receptorů Imunoglobulinové rodiny a lektiny C-typu
(Zdroj: Piyush Tripathi⁵ et al., 2007)

V souvislosti s vazbou těchto dvou molekul na HLA-G, které se hojně vyskytuje na povrchu trofoblastu, jsme se na jejich výskyt a povrchovou expresi zaměřili.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Materiál

3.1.1.1 Seznam použitých přístrojů

- Automatické pipety (0.5-10, 2-20, 20-200, 200-1000 μ l) *Gilson, USA*
- Univerzální chlazená centrifuga Z 382 K *Hermle Labnet, Francie*
- Univerzální chlazená centrifuga Z 383 K *Hermle Labnet, Francie*
- Chladnička *Calex C-370, Itálie*
- FACS LSR II *Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA*
- Mrazící box *Sanyo-ultra low, Japonsko*
- Optický mikroskop *Carlzeiss Jena, Německo*
- Sterilní box *Gelaire flow laboratories, Itálie*
- Váhy *Kern 440-35N,*
- Vortexový mixér RAG genie *Bender and Hobein AG, Švýcarsko*
- *Scintilační počítač Microbeta (Trilux, Finsko)*

3.1.1.2 Monoklonální protilátky

- Mouse anti-human CD3-PB *Dako*
- Mouse anti-human CD4-Alexa 750 *Invitrogen, USA*
- Mouse anti-human CD8-PO *Invitrogen, USA*
- Mouse anti-human CD16-Alexa 700 *Exbio, ČR*
- Mouse anti-human CD45-PerCp *Biosciences, USA*
- Mouse anti-human CD56-PC7 *Beckman coulter, France*
- Mouse anti-human CD85j-APC *R&D systems*

- Mouse anti-human CD161-FITC *Serotec, UK*
- Mouse anti-human NKG2D-biotin *eBioscience*
- Anti-biotin Streptavidin-Qdot605 *Invitrogen, USA*
- Mouse anti-human KIR2DL4-PE *R&D systems*

3.1.1.3 Seznam použitých chemikálií

- ACK (amonium chlorid) 0.15M - *Sigma chemical Co., USA*
- Azid sodný - *Sigma chemical Co., USA*
- Ficoll 400 - *Sigma chemical Co., USA*
- Gentamycin - *Lek Pharmaceutical and
Chemical Comp., SR*
- Heparin - *Léčiva, ČR*
- KCl - *ÚMG, Praha ČR*
- KH₂PO₄ - *ÚMG, Praha ČR*
- Médium H-MEMd - *ÚMG, Praha ČR*
- NaCl - *ÚMG, Praha ČR*
- NaHCO₃ - *ÚMG, Praha ČR*
- Na₂HPO₄ - *ÚMG, Praha ČR*
- Na₂⁵¹CrO₄ - *Amersham pharmacia
biochemicals, USA*
- PI (propidium jodid) - *Molecular Probes, USA*
- Telebrix N380 - *Léčiva, ČR*
- Türkův roztok - *Sigma Chemical Co., USA*
- Scintilační roztok Supermix *Wallac, Finsko*
- Želatina - *Sigma chemical Co., USA*

(Použité chemikálie byly čistoty *p.a.*, popřípadě nejvyšší komerčně dostupné čistoty)

3.1.1.4 Použité roztoky a média

- Dělicí médium Ficoll-Telebrix (F-T): 8% Ficoll + 6,8% Telebrix v poměru 24:10
- FACS-roztok: PBS + 0,01% Na-azid + 0,2% želatina

- H-MEMd médium: H-MEMd + 50mg/l gentamycin, pH upraveno na 7,2 pomocí 7,5% NaHCO₃
- Kultivační médium RPMI 1640 s 10% FTS: RPMI 1640 + 2mmol L-glutamin + 0,011% Na-pyruvát + 20μmol β-merkapt ethanol + 20mg/l thiamutin + 25mg/l Amphotericin B + 50mg/l gentamycin + 10% FTS, pH upraveno na 7,0-7,3 pomocí 7,5% NaHCO₃
- Kultivační médium RPMI 1640 s 2.5% FTS: RPMI 1640 5x + 2mmol L-glutamin + 50mg/l gentamycin + 2.5% FTS, pH upraveno na 7,0-7,3 pomocí 7,5% NaHCO₃
- PBS: 140,0mM NaCl + 2,7mM KCl + 10,0mM Na₂HPO₄ + 1,8mM KH₂PO₄, pH=7,2
- TK H₂O: tkáňová voda - deionizace vysokoafinitními filtry (R=18MΩ)
- Türkův roztok: 3 x naředěn v TK H₂O

3.1.1.5 Spotřební materiál

- 96-ti jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem zn.TPP
- 96-ti jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem na cytotoxický test-Nunclon Roskilde, Německo
- Bürkerova komůrka (MEOPTA, ČR)
- Mikrozkuřavky Eppendorf, špičky

3.1.1.6 Pacientky

3.1.1.6.1 Studovaná populace

Tato studie probíhala od dubna 2008 do března 2009, byly do ní zařazeny pouze pacientky podstupující léčbu v Ústavu pro péči o matku a dítě, které písemně souhlasily s odběrem a použitím vzorků ve studii. Vzorky periferní krve-PBMC (2-4ml) byly odebírány v den odběru oocytů. Množství získané folikulární tekutiny bylo velmi individuální. Po těhotenském testu byly pacientky rozděleny do dvou skupin: úspěšné (s pozitivním těhotenským testem) a neúspěšné (s negativním těhotenským testem). Vzorky krve zdravých dáreků byly získány ve Fakultní Thomayerově nemocnici s poliklinikou ve formě buffy coatů..

Zdravé dárkyně	rok narození	věk
HD_F_1948_0802046	1948	61
HD_F_1951_08004603	1951	58
HD_F_1964_08002901	1964	45
HD_F_1974_08002905	1974	35
HD_F_1975_08004601	1975	34
HD_F_1977_0802109	1977	32
HD_F_1978_08002902	1978	31
HD_F_1978_08004592	1978	31
HD_F_1978_0802050	1978	31
HD_F_1983_08004604	1983	26
HD_F_1987_08005548	1987	22
HD_F_1988_08004583	1988	21
HD_F_1974_0800751	1974	35
HD_F_1968_0800750	1968	41
HD_F_1974_0800752	1974	35
HD_F_1970_0800764	1970	39
HD_F_1975_0800765	1975	34
HD_F_1981_0800766	1981	28
HD_F_1952_0800767	1952	57
HD_F_1950_08006232	1950	59
HD_F_1955_08009022	1955	54
HD_F_1956_09000851	1956	53
HD_F_1968_08006431	1968	41
HD_F_1968_08006686	1968	41
HD_F_1970_08009010	1970	39
HD_F_1970_09000849	1970	39
HD_F_1971_08006689	1971	38
HD_F_1971_08007100	1971	38
HD_F_1975_09001652	1975	34
HD_F_1976_08005749	1976	33
HD_F_1977_09001642	1977	32
HD_F_1981_08005759	1981	28
HD_F_1981_08006688	1981	28
HD_F_1982_08007094	1982	27
HD_F_1983_08007848	1983	26
HD_F_1986_08005758	1986	23
HD_F_1986_08006684	1986	23

Tab. 3: V této tabulce jsou uvedeny identifikační kódy, rok narození a věk zdravých dárekyně

Pacientky neúspěšné		rok narození	věk
BL_ICSI_242_07	FF_ICSI_242_07	1973	36
BL_ICSI_68_08	FF_ICSI_68_08	1984	25
BL_ICSI_71_08	FF_ICSI_71_08	1979	30
BL_ICSI_100_08	FF_ICSI_100_08	1975	34
BL_ICSI_195_08	FF_ICSI_195_08	1965	44
BL_ICSI_199_08	FF_ICSI_199_08	1980	29
BL_ICSI_208_08	FF_ICSI_208_08	1976	33
BL_ICSI_211_08	FF_ICSI_211_08	1972	37
BL_ICSI_218_08	FF_ICSI_218_08	1970	39
BL_ICSI_219_08	FF_ICSI_219_08	1976	33
BL_ICSI_227_08	FF_ICSI_227_08	1974	35
BL_ICSI_228_08	FF_ICSI_228_08	1971	38
BL_ICSI_24_09	FF_ICSI_24_09	1975	34
BL_ICSI_246_08	FF_ICSI_246_08	1977	32
BL_ICSI_248_08	FF_ICSI_248_08	1975	34
BL_ICSI_25_09	FF_ICSI_25_09	1974	35
BL_ICSI_255_08	FF_ICSI_255_08	1970	39
BL_ICSI_260_08	FF_ICSI_260_08	1976	33
BL_ICSI_335_08	FF_ICSI_335_08	1976	33
BL_ICSI_338_08	FF_ICSI_338_08	1975	34
BL_ICSI_44_09	FF_ICSI_44_09	1974	35
BL_ICSI_45_09	FF_ICSI_45_09	1970	39
BL_ICSI_55_09	FF_ICSI_55_09	1972	37
BL_IVF_44_08	FF_IVF_44_08	1973	36
BL_ICSI_31_08	FF_ICSI_29_08	1970	39

Tab. 4: V této tabulce jsou uvedena identifikační čísla, rok narození a věk patientek, které měly negativní těhotenský test. Je zde i poznámka jaká metodu asistované reprodukce byla u dané pacientky provedena-ICSI nebo IVF.

Pacientky úspěšné		rok narození	věk
BL_ICSI_62_08	FF_ICSI_62_08	1978	31
BL_ICSI_103_08	FF_ICSI_103_08	1974	35
BL_IVF_21_08	FF_IVF_21_08	1977	32
BL_ICSI_207_08	FF_ICSI_207_08	1976	33
BL_ICSI_212_08	FF_ICSI_212_08	1971	38
BL_ICSI_226_08	FF_ICSI_226_08	1971	38
BL_IVF_45_08	FF_IVF_45_08	1978	31
BL_ICSI_258_08	FF_ICSI_258_08	1980	29
BL_ICSI_353_08	FF_ICSI_353_08	1976	33
BL_ICSI_354_08	FF_ICSI_354_08	1975	34
BL_ICSI_369_08	FF_ICSI_369_08	1977	32
BL_ICSI_27_08	FF_ICSI_27_08	1978	31
BL_IVF_10_08	FF_IVF_10_08	1982	27
BL_IVF_11_08	FF_IVF_11_08	1979	30
BL_IVF_16_08	FF_IVF_16_08	1974	35

Tab. 5: V této tabulce jsou uvedena identifikační čísla, rok narození a věk pacientek, které měly pozitivní těhotenský test. Je zde i poznámka jaká metodu asistované reprodukce byla u dané pacientky provedena-ICSI nebo IVF.

použité zkratky:
HD-zdravý dárce (healthy donor)
F-žena (female)
BL-periferní krev (peripheral blood)
FF-folikulární tekutina (follicular fluid)
IVF-in vitro fertilizace
ICSI-injekce spermie do cytoplasmy oocytu mikropipetou

Tab. 6: V této tabulce jsou uvedeny zkratky použité v Tab.3-5.

3.1.1.6.2 Stimulační protokoly

Žena je po určitý úsek menstruačního cyklu vystavena vyšším hladinám injekčně podávaných gonadotropinů, což vede k získání vyššího počtu zralých vajíček. Růst folikulů, během podávání gonadotropinového preparátu, je monitorován pomocí ultrazvuku a hladin hormonů v krvi. V okamžiku, kdy folikul dosáhne velikosti nejméně 18 mm, je podán lidský choriový gonadotropin (hCG) - Ovitrelle, Pregnyl, aby zajistil dozrání vajíčka, které je ve folikulu obsaženo. Po 36-48 hodinách po injekci hCG se provádí odsátí folikulární tekutiny, s kterou se odsají vajíčka pro mimotělní oplodnění. K hormonální stimulaci vaječnicků pro mimotělní oplodnění je používáno několik typů protokolů, podle toho, kdy a jak dlouho se injekce s FSH (folikuly stimulující faktor) aplikují s agonisty. Agonisté GnRH (gonadotropin-uvolňující hormon) působí na vaječnky stimulačně, protože dochází ke stimulaci podvěsku mozkového a tudíž následně i k podpoře tvorby endogenního FSH, které působí na růst a zrání folikulů ve vaječnicích.

3.1.1.6.2.1 Krátký stimulační protokol

Tento protokol se používá u žen s nižší reakcí vaječnicků na hormonální léčbu. Agonisté GnRH se podávají déle současně s injekcemi gonadotropinů (FSH). Dlouhodobou aplikací agonistů GnRH dojde k útlumu funkce podvěsku mozkového a tak by nemělo dojít k předčasnému uvolnění vajíčka z folikulů. Stimulace začíná od prvního dne menstruačního cyklu podáváním nasálního spreje GnRH – Synarelu, od třetího dne menstruačního cyklu se

aplikují injekce FSH-rekombinantní (Gonal pen, Puregon pen) nebo močové preparáty (Fostimon) nebo Merional, který obsahuje FSH s LH (luteinizační hormon). Odběr oocytů probíhá přibližně 11-14tý den menstruačního cyklu.

3.1.1.6.2.2 Dlouhý stimulační protokol z folikulární fáze

První den menstruačního krvácení se aplikuje agonista GnRH v depotní formě (forma léků s velmi pomalým uvolňováním) – Zoladex dep, Decapeptyl dep. Za 14-18 dnů se provádí ultrazvukové vyšetření, při kterém se hodnotí děložní sliznice. Ta by neměla být vyšší než 4 mm a vaječníky by neměly obsahovat žádné cysty ani folikuly větší než 10 mm. Pokud jsou všechny nálezy normální, je možné začít aplikovat denně FSH, stejné preparáty viz výše. Odběr oocytů probíhá přibližně 12-20tý den od zahájení podávání FSH.

3.1.1.6.2.3 Dlouhý stimulační protokol z luteální fáze

Od předchozího se liší obdobím, kdy se začnou podávat léky. Stimulace se zahajuje GnRH agonisty 22. den přirozeného menstruačního cyklu. Po následující menstruaci se provádí ultrazvukové vyšetření pátý den a při normálním nálezu se začnou podávat injekce gonadotropinů (FSH).

3.1.1.6.2.4 Protokol s užitím antagonistů GnRH

Stimulace začíná od 2-3tího dne menstruačního cyklu podáváním injekcí FSH – stejné preparáty jako u krátkého protokolu. Sedmý den od začátku menstruace se pak provádí ultrazvukové vyšetření. Jakmile folikuly dosáhnou určité velikosti, začne se současně s gonadotropiny denně podkožně podávat antagonistu GnRH - Cetrotide, Orgalutran. Ve stimulaci se pokračuje do té doby, než jsou folikuly veliké 16-18 mm. Odběr oocytů je nejčastěji proveden 13-16tý den téhož cyklu.

3.1.2 Metody

3.1.2.1 Izolační postupy

3.1.2.1.1 Izolace leukocytů z folikulárních tekutin

Folikulární tekutiny byly centrifugovány při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, v „quick“ módu (zastavení rotoru po dosažení požadované centrifugací síly) pro oddělení nehomogenních částí. Odebraný supernatant obsahující leukocyty a erytrocyty byl centrifugován při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, po dobu 10 minut.

Po odstranění supernatantu byly sedimentované leukocyty a erytrocyty resuspendovány v 1-15ml 0.15M ACK (amonium chlorid) v závislosti na obsahu erytrocytů. Následovalo pozorování, dokud vzorky v pokojové teplotě za přítomnosti ACK nezčerní, tím jsme provedly lyzi nežádoucích erytrocytů. Po té byly vzorky ihned doplněny do stejného objemu FACS roztokem a centrifugovány při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, v „quick“ módu pro oddělení nehomogenních částí. Odebraný supernatant obsahující leukocyty byl centrifugován při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byly leukocyty resuspendovány v 10ml FACS roztoku a opět centrifugovány při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, v „quick“ módu pro oddělení nehomogenních částí. Odebraný supernatant obsahující leukocyty byl centrifugován při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byly leukocyty resuspendovány v 5ml FACS roztoku.

50μl buněčné suspenze bylo 20x naředěno v Türkově roztoku a leukocyty byly spočítány pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Příslušný počet buněk ($1 \cdot 10^6$ buněk) byl poté oddělen pro FACS analýzu.

3.1.2.1.2 Izolace leukocytů z krve

Krevní vzorky pacientek a zdravých dárců byly sterilně přeneseny do zkumavek a ředěny v H-MEMd médiu s heparinem v poměru 1:2. Vzorky byly následně vrstveny po 10 ml na vrstvu 2.5-3 ml dělicího média Ficoll Telebrix a centrifugovány při 400x g, teplotě 22°C, zrychlení 4, po dobu 45 minut. Poté jsme odebrali prstence vzniklé na rozhraní F-T a H-MEMd média do zkumavek, které jsme doplnili do stejného objemu H-MEMd médiem. Tyto zkumavky byly centrifugovány při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, po dobu

10 minut. Supernatant jsme odlili, vzniklý pelet roztřepali, zkumavky doplnili do 5 ml H-MEMd médiem a centrifugovali při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, po dobu 10 minut. Supernatant byl opět odlit, pelet roztřepán a zkumavky doplněny do 5 ml H-MEMd médiem.

Vzorky jsme řádně promíchali pipetou, odebrali 50 buněčné suspenze, které jsme 20x naředili v Türkově roztoku a leukocyty byly spočítány pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Příslušný počet buněk byl poté oddělen pro FACS analýzu.

3.1.2.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda, která umožňuje současné měření řady parametrů na velkém množství částic v suspenzi. Je využitelná v mnoha vědeckých disciplínách, avšak největší uplatnění našla v medicíně a biologii. Umožňuje měřit mnohé fyzikální, chemické a morfologické vlastnosti buněčných suspenzí.

Nejčastěji měřenými parametry jsou rozptyl světla v malém úhlu, tzv. forward scatter (FSC), který je přímo úměrný velikosti buněk. Dalším důležitým parametrem je rozptyl světla v 90°úhlu, tzv. side scatter (SSC), který je hlavně ovlivněn vnitřní komplexitou částic. Třetím základním parametrem je fluorescence různé vlnové délky.

Buňky zpravidla obarvené různými fluorochromy (značené protilátky, barviva vážící se na nukleové kyseliny či jiné součásti buněk) jsou unášeny laminárním proudem nosné kapaliny. Jednotlivé buňky jsou vstřikovány tenkou tryskou do kapiláry, kterou proudí nosná kapalina. Toto usměrní buňky do tenkého proudu, kde prochází průtokovou komůrkou a v ní protínají laserový paprsek, který excituje fluorescenci o určité vlnové délce. Tento jev je nazýván jako 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. Základními prvky optické soustavy průtokových cytometrů jsou long pass filtry – propouštějí světlo vyšší vlnové délky, short pass filtry – propouštějí světlo nižší vlnové délky a band pass filtry – propouštějí světlo pouze v určitém rozsahu vlnových délek (např. 520-540 nm).

Jednotlivé světelné signály jsou převedeny na elektrické impulsy a zesíleny fotonásobičem. Zesílení se provádí lineárně nebo logaritmicky. Výhodou logaritmické

transformace je zvýšení senzitivity fluorescencí o nižší intenzitě a větší míře rozsahu detekce fluorescence. Lineární zesílení zase měří přesněji menší rozdíly ve vazbě fluorochromů.

Takto vzniklé a zpracované elektrické signály, které charakterizují každou jednotlivou buňku řadou parametrů, jsou předávány do počítače. Počítačově zpracování jednotlivých dat umožňuje získávat údaje o subpopulacích buněk charakterizovaných na základě jiných znaků.

Vlastním pokusům předcházela dlouhodobá, důkladná optimalizace multiparametrického značení fluorescenčními markery, zajišťující bezproblémový chod s minimálním rizikem vzniku artefaktů vlivem spektrálního překryvu sousedních fluorochromů (Obr. 6.).

3.1.2.2.1 Značení buněk pro určení povrchových znaků

Značení a promývání buněk bylo prováděno v 96-ti jamkových destičkách s kulatým dnem (zn. TPP). Každý vzorek (jamka) obsahoval $5 \cdot 10^5$ izolovaných buněk. Centrifugace buněk (v destičce) byla prováděna při 550x g, 4°C, zrychlení 9, 2 minuty.

Jednotlivé vzorky byly nanесeny na destičku podle příslušného protokolu v množství $5 \cdot 10^5$ buněk na jamku. Destička byla centrifugována (viz. výše), supernatant byl rychlým vyklepnutím odstraněn, pelety roztřepány (Vortex mixer) a resuspendovány ve 200μl (na vzorek) chlazeného FACS roztoku. Následovala opět centrifugace a další promytí 200μl chlazeného FACS roztoku.

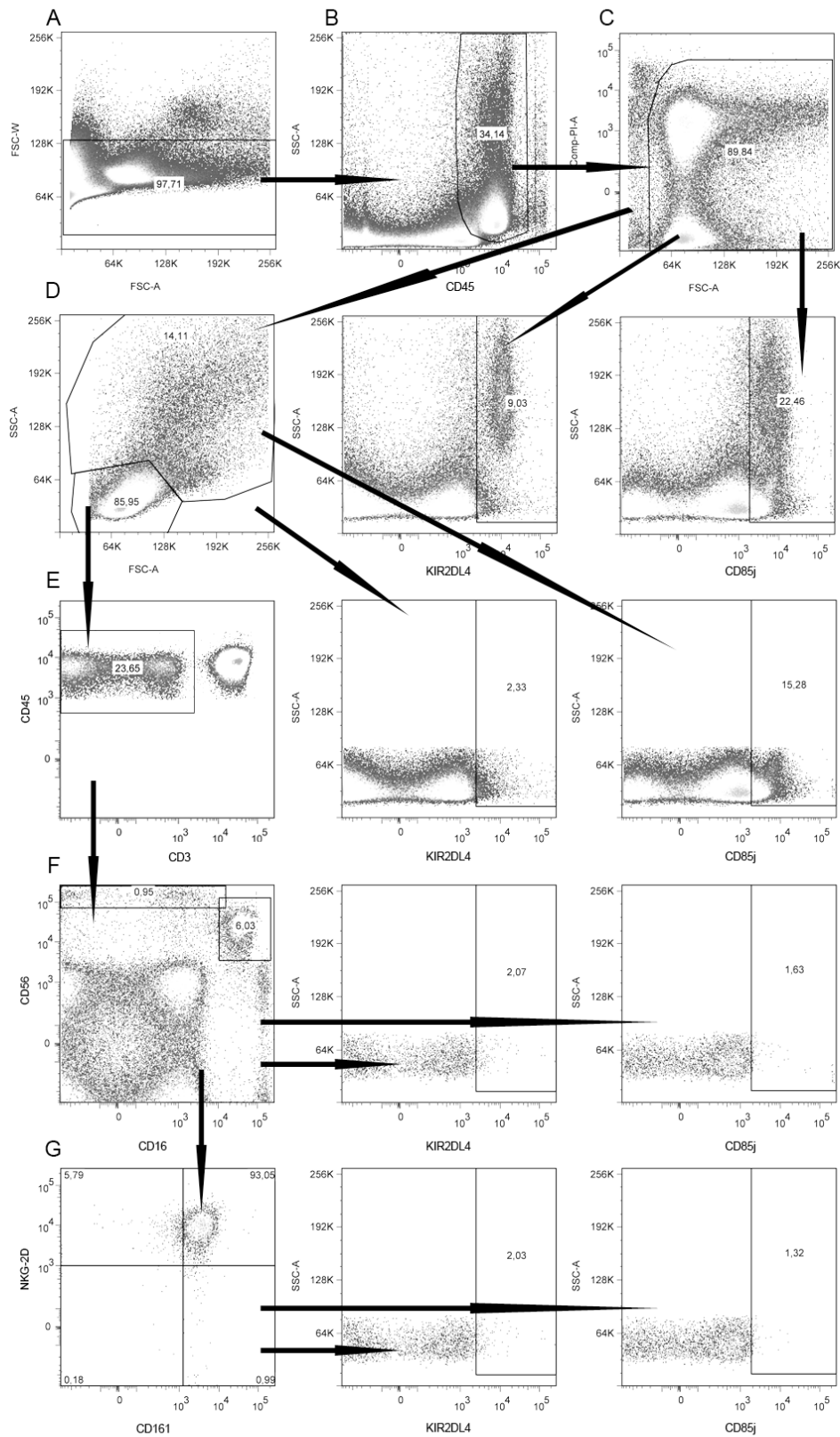
Takto promyté buňky, zbavené supernatantu, byly inkubovány s 10μl značené primární protilátky za tmy, při -4°C, 30 minut. Po skončení inkubace byly vzorky 3x promyty 200μl chlazeného FACS roztoku (centrifugace viz. výše). V případě použití primární protilátky konjugované pouze s biotinem, byly vzorky opět inkubovány s 10μl sekundární protilátky za tmy, při -4°C, 25 minut a opět 3x promyty 200μl chlazeného FACS roztoku.

Po promytí byly buňky resuspendovány v 100μl chlazeného FACS roztoku. Před vlastním měřením bylo ke každému vzorku přidáno 10μl reagentie propidium jodid pro odlišení mrtvých a umírajících buněk. Dále následovalo vyhodnocení na živých lymfocytech programem FlowJo.



Obr. 6.: Na tomtoobrázku je vyobrazena kompletní mapa fluorescencí po kompenzaci přesvitů do ostatních kanálů. Důkladná optimalizace značícího protokolu zajistila bezproblémový chod 11kanálového značení s minimálním rizikem vzniku artefaktů.

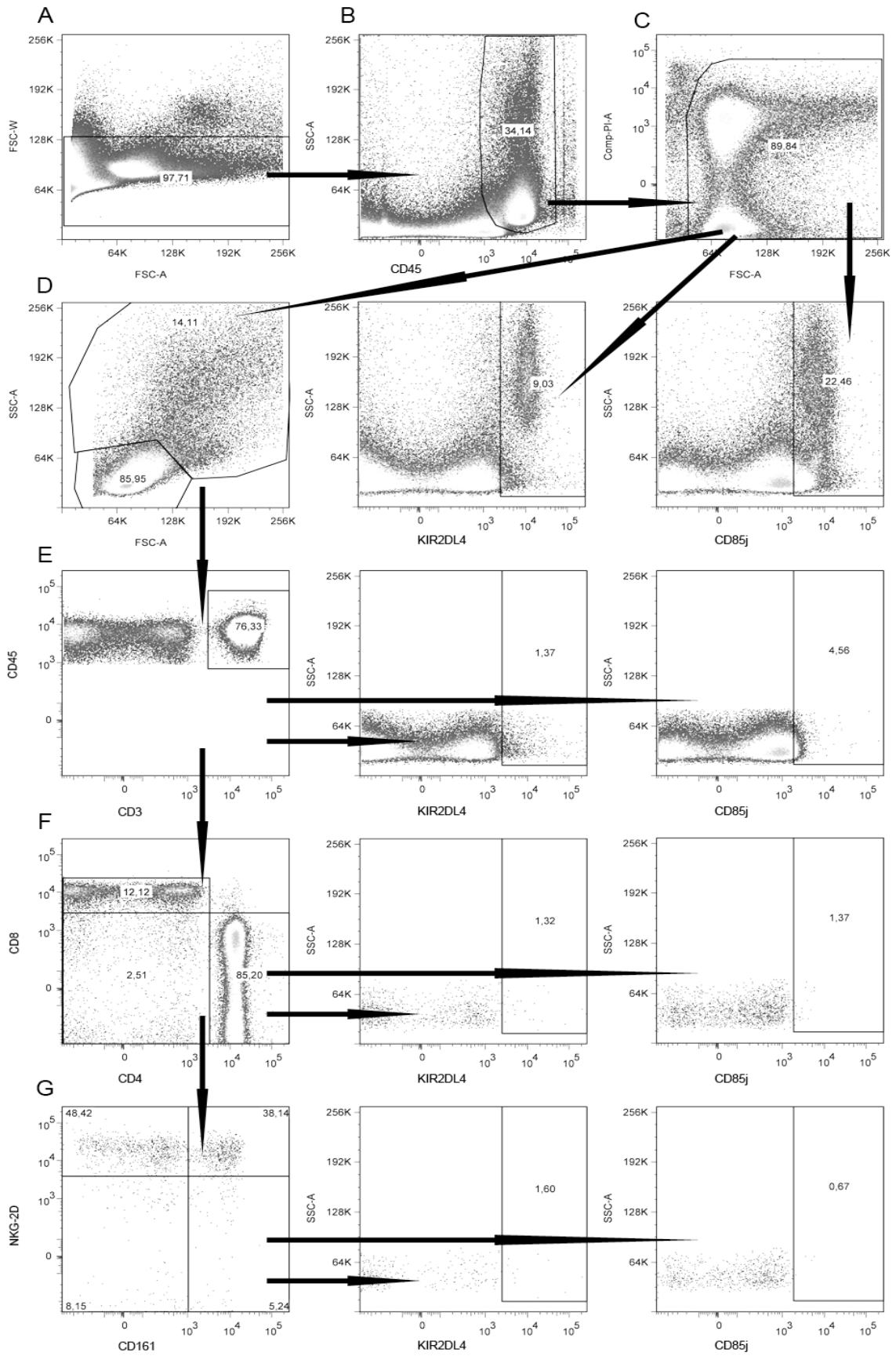
3.1.2.2.2 Vyhodnocovací strom pro NK buňky



Obr.7 .: Na tomto obrázku jsou dot bloty získané v programu FlowJo. Šipky ukazují směr postupu při geteování. A) Na tomto dot blotu jsou v geteu odděleny samotné buňky

(tzv. singlety). B) V gateu se nacházejí CD45 pozitivní leukocyty (CD45 je transmembránový protein-membránová fosfatáza, který se v imunologii nazývá jako leukocyte common antigen). C) Zde jsou odděleny živé buňky (v gateu) od mrtvých pomocí propidium jodidu. Na dalších dvou dot blotech (směrem doprava) jsou gateovány KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky ze všech živých buněk. D) Na tomto dot blotu jsou gateovány dvě oblasti, menší je lymfocytární gate a větší mono/granulocytární gate. Dot bloty směrem doprava zachycují v gejtů KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky, to bylo provedeno jak v lymfocytárním gateu tak v mono/granulocytárním. E) Zde se nacházejí zagateovány CD3-/CD45+ buňky. Z této populace jsou gateovány dvě populace buněk. První (vlevo) je CD56^{bright}/CD16- a druhá (vpravo) je CD56^{dim}/CD16+. F) Zde se nacházejí zagateovány dvě populace buněk. První (vlevo) je CD56^{bright}/CD16- a druhá (vpravo) je CD56^{dim}/CD16+. Z obou populací byly opět provedeny dot bloty, ve kterých byly gateovány KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky. G) Na tomto dot blotu je vidět kvadrant CD161-/NKG2D-; CD161+/NKG2D-; CD161+/NKG2D+; CD161-/NKG2D+. Ze všech těchto gateů byly opět na dalších dot blotech gateovány KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky.

3.1.2.2.3 Vyhodnocovací strom pro T-lymfocyty a NKT-buňky



Obr. 8.: Na tomto obrázku jsou dot bloty získané v programu FlowJo. Šipky ukazují směr postupu při gateování. A) Na tomto dot blotu jsou v gateu odděleny samotné buňky (tzv. singlety). B) V gateu se nacházejí CD45 pozitivní leukocyty (CD45 je transmembránový protein-membránová fosfatáza, který se v imunologii nazývá jako leukocyte common antigen). C) Zde jsou odděleny živé buňky (v gateu) od mrtvých pomocí propidium jodidu. Na dalších dvou dot blotech (směrem dolů) jsou gateovány KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky ze všech živých buněk. D) Na tomto dot blotu jsou gateovány dvě oblasti, menší je lymfocytární gate a větší mono/granulocytární gate. E) Zde se nacházejí zagateovány CD3+/CD45+ buňky. I z této populace jsou vedle gateovány KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky. F) Zde se nacházejí zagateovány dvě populace buněk. První (vlevo) je CD4-/CD8+ a druhá (vpravo) je CD4+/CD8-. Z obou populací byly opět provedeny dot bloty, ve kterých byly gateovány KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky. F) Na tomto dot blotu je vidět kvadrant CD161-/NKG2D-; CD161+/NKG2D-; CD161+/NKG2D+; CD161-/NKG2D+. Ze všech těchto gateů byly opět na dalších dot blotech gateovány KIR2DL4 (na druhém) a CD85j (na třetím) pozitivní buňky.

3.1.2.3 Buněčná kultura

Erytroleukemická buněčná linie K562 je první lidská imortalizovaná myelogenní linie, která byla získána od pacientky s chronickou myelogenní leukémií-CML v blastické krizi (Lozzio⁹⁹ & Lozzio, 1975; Drexler¹⁰⁰, 2000). Recentní studie prokázaly, že tyto buňky jsou multipotentní, hematopoetické maligní buňky, které spontánně diferencují v rozpoznatelné progenitory erytrocytů, granulocytů a monocytů. Tato linie je tedy využívána pro syntézu hemoglobinu, při protinádorovém testování, tvorbě nádorů, diferenciaci, farmakodynamice, klonování, cytotoxicitě, v buněčné biologii a testech NK buněk.

Získaná buněčná linie K562 byla kultivována v RPMI-1640 médiu s 10% teplem inaktivovaným fetálním telecím sérem-FTS. Cytotoxická esej aktivity efektorových buněk periferní krve (PBMC-peripheral blood mononuclear cells - periferní krevní mononukleární buňky) byla provedena v RPMI- 1640 s 2.5% FTS stejně jako v dřívějších pracích (Fišerová¹⁰¹ et al., 2002). Inkubace byla provedena v CO₂ inkubátoru při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂.

3.1.2.4 Cytotoxická esej

Buňkami zprostředkovaná cytotoxicita byla hodnocena *ex vivo* za použití ^{51}Cr -uvolňující esej. PBMC získané od pacientek nebo zdravých dárcyň jsou v této esej efektorovými buňkami. Jako cílové buňky byla použita buněčná linie K562. Tato linie byla značena inkubací s $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ v 96-jamkových mikrotitračních destičkách s kulatým dnem (NUNC, Roskilde, Německo) po dobu 60min, při teplotě 37°C a zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO_2 .

Po skončení inkubace byly buňky 3x promyty (promývání a centrifugace viz. výše) kultivačním médiem RPMI 1640 s 2,5% FTS, spočítány a naředěny v médiu RPMI 1640 s 2,5% FTS. Do každé jamky 96-ti jamkové destičky s kulatými dny bylo nanášeno 100 buněčné suspenze efektorových buněk (izolované lymfocyty), 100 buněčné suspenze cílových buněk (značených ^{51}Cr) a 50 μl média RPMI 1640 s 2,5% FTS. Do jamek určených pro měření spontánního rozpadu bylo nanášeno 100 buněčné suspenze cílových buněk a 150 μl média RPMI 1640 s 2,5% FTS. Do jamek určených pro měření maximálního rozpadu bylo nanášeno 100 μl buněčné suspenze cílových buněk, 100 μl média RPMI 1640 s 2,5% FTS a 50 μl 10% reagentie Triton X-100.

Vyhodnocení lytické aktivity efektorových buněk proti 1×10^4 cílovým buňkám bylo stanoveno po 3,5 a 18 hodinách inkubace popsané dříve (Fišerová¹⁰² et al., 1997). K odebranému supernatantu (25 μl /vzorek) bylo přidáno 100 μl scintilačního roztoku. Radioaktivita byla měřena na scintilačním počítači Microbeta Trilux. Výsledek v procentech je získán po dosažení do rovnice:

$$\% \text{ ctx} = \frac{(\text{experimentální cpm} - \text{spontánní cpm})}{(\text{maximální cpm} - \text{spontánní cpm})} * 100$$

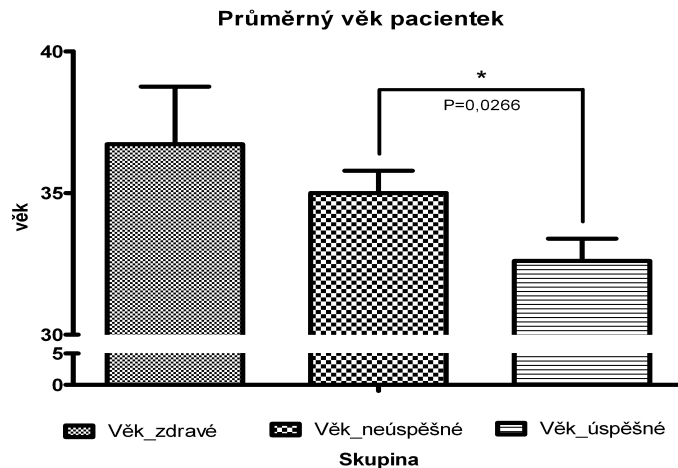
popsané dříve ((Fišerova et al. 2002). Cpm (counts per minute) je míra radioaktivity (uvolněný chroman z cílových = lyzovaných buněk), tedy počet částic uvolněných ze scintilačního koktejlu za minutu (v jamce). Experimentální cpm = radioaktivita uvolněná po setkání cílových buněk s efektor. Spontánní cpm jsou samovolně lyzované cílové buňky (bez efektorů). Maximální cpm jsou detergentem (Tritonem X-100) lyzované značené cílové buňky.

3.1.2.5 Statistika

K vyhodnocení rozdílů mezi skupinami zdravých dárcyň, úspěšných a neúspěšných pacientek jsme podle charakteru sledovaných parametrů užíli Mann-Whitney U test. Tento test podává výpověď o tom, zda odlišnost vždy mezi dvěma skupinami je statisticky významná. Mann-Whitney U test je neparametrický test, který je používán k vyhodnocení dvou nezávislých vzorků pocházejících ze stejné distribuce. Je to jeden z neznámějších testů neparametrické významnosti (patří mezi obdoby t-testů). Tento test může být použit i při různých distribucích. Pokud je ale distribuce dvou vzorků velmi odlišná, může nám podat chybné signifikantní výsledky. Vzhledem k možné odlišnosti v distribuci v rámci skupiny (ne—Gaussovské rozložení) byl použit právě tento test na místo Studentova T-testu.

4 Výsledky

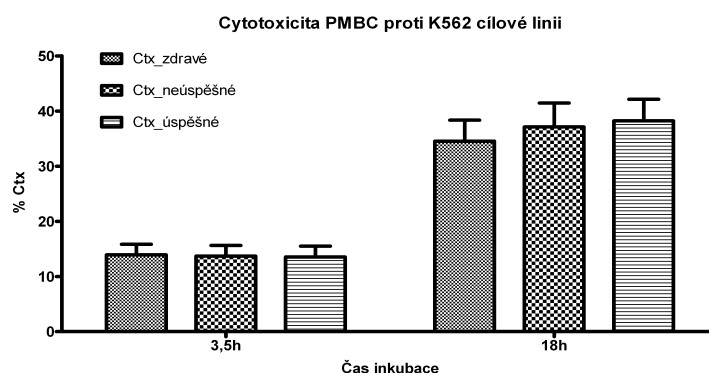
4.1 Závislost věku patientek na úspěšnosti IVF



Obr. 9.: Tento sloupcový graf vyjadřuje věk zdravých dárkyň, neúspěšných a úspěšných patientek.

Z obrázku (Obr. 9.) je patrné, že patientky byly věkově srovnatelné se zdravými dárkyněmi (žádná signifikance rozdílu mezi zdravými dárkyněmi a negativními/pozitivními patientkami). Dále je pak patrné, že úspěšnost fertilizace je závislá na věku – i přes nízkou signifikanci ($P = \text{cca } 0,02$).

4.2 Cytotoxicita v krvi zdravých dárkyň a patientek

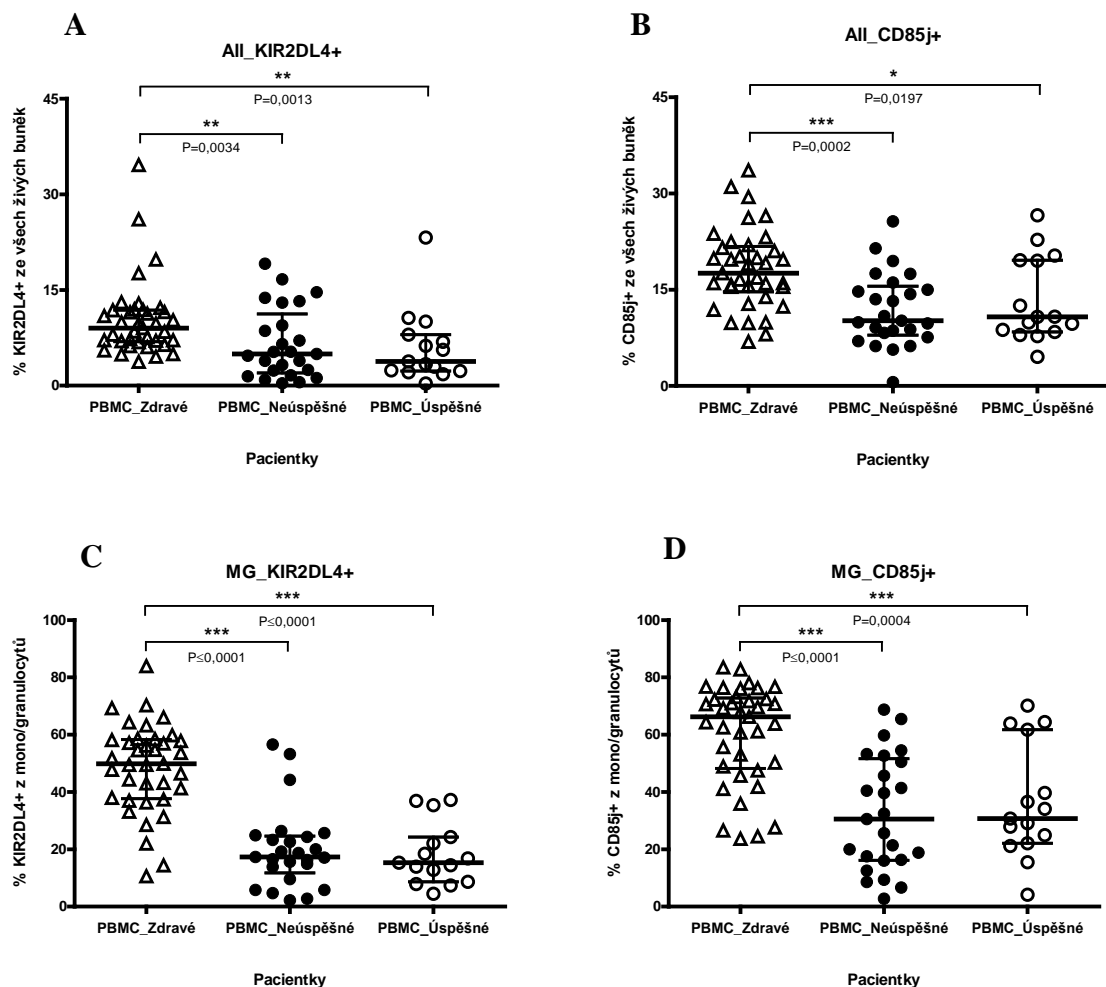


Obr. 10.: Tento sloupcový graf zobrazuje cytotoxickou aktivitu lymfocytů z periferní krve zdravých dárkyň, úspěšných a neúspěšných patientek proti cílovým buňkám-buněčná linie K562. Vyhodnocení lytické aktivity efektorových buněk bylo stanoveno po 3.5 a po 18 hodinách inkubace.

Z obrázku (Obr. 10.) je patrné, že lymfocyty z periferní krve úspěšných a neúspěšných pacientek mají srovnatelnou cytotoxickou aktivitu jako lymfocyty z periferní krve zdravých dárcyň, bez ohledu na změny exprese některých znaků.

4.3 Porovnání krví zdravých dárcyň, úspěšných a neúspěšných pacientek

Pro stanovení vlivu stimulačního protokolu a rozdílů ve zdrojích periferních krevních mononukleárních buněk (buffy coat versus celá krev) jsme porovnávali PBMC zdravých dárcyň s PMBC pacientek. V první řadě jsme se zaměřili na expresi inhibičních receptorů, jejichž vazebným ligandem je HLA-G molekula.

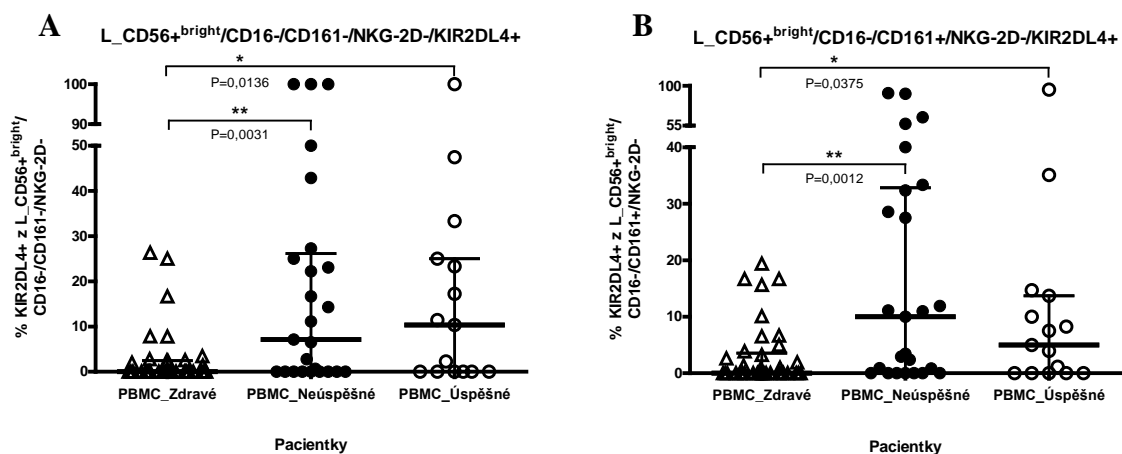


Obr. 11.: Exprese KIR2DL4 (A, C) a CD85j (B, D) inhibičních receptorů, jejichž vazebným ligandem je HLA-G molekula, na všech živých buňkách (A, B) a na buňkách s monocytární/granulocytární morfolozií (C, D). Signifikantní snížení v počtech buněk nesoucích KIR2DL4 nebo CD85j receptory je viditelné ve všech populacích (A, B, C, D) z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných

(prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojniciemi. Procenta jsou chápána vždy jako podíl mateřské populace (t.j.: populace, která je právě nadřazená oné výsledné). Tedy 10% KIR2DL4+ ze všech živých buněk na grafu A u zdravých dárcyň znamená, že 10% ze všech živých buněk nese na svém povrchu receptor KIR2DL4.

Z Obr. 11. je dobře viditelné signifikantní snížení v počtech buněk nesoucích na svém povrchu KIR2DL4 nebo CD85j receptory (Obr. 11.: A, B) u obou skupin pacientek. Toto téměř dvojnásobné snížení je velmi zřetelné u buněk s monocytární/granulocytární morfologií (Obr. 11.: C, D).

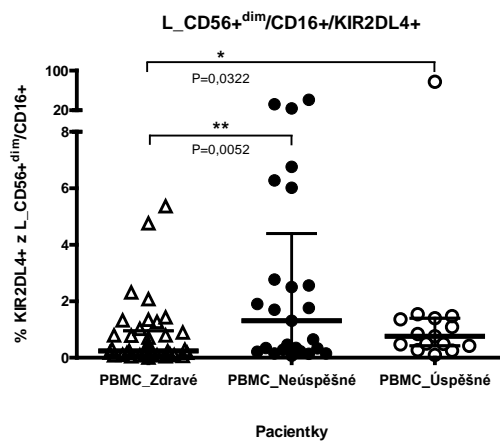
Dále jsme se zaměřili na individuální receptory a populace, které tyto receptory exprimují, abychom zjistili, zda je toto snížení specifické či nespecifické pro určité typy buněk. KIR2DL4 pozitivní populace, které vykazovaly signifikantní změny v číslech, byly CD56+^{bright}/CD16-:



Obr. 12.: Exprese KIR2DL4 inhibičního receptoru, jehož vazebným ligandem je HLA-G molekula, na inaktivovaných CD56+^{bright} NK buňkách (A) a na částečně aktivovaných CD56+^{bright} NK buňkách (B) z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojniciemi.

Jak můžeme vidět (Obr. 12.), i přes nesignifikantní změnu v počtech buněk nesoucích na svém povrchu KIR2DL4 receptor s lymfocytární morfologií (data nejsou ukázána) je zde zvýšení v KIR2DL4 pozitivních CD56+^{bright}/CD16- populacích, jak u aktivovaných (CD161+: Obr. 12.; B) tak u neaktivovaných (CD161-/NKG2D-: Obr. 12.; A)

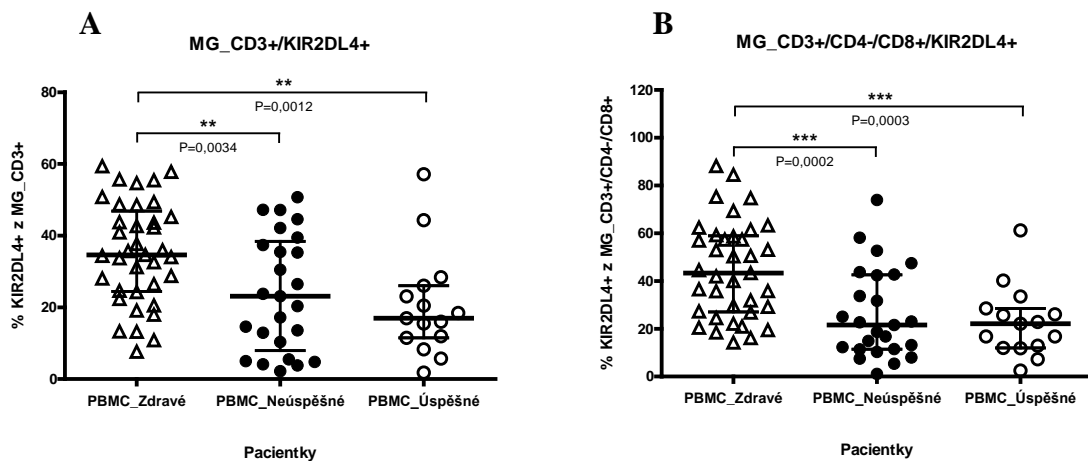
Poslední změna KIR2DL4 pozitivní populace NK buněk a k tomu také s lymfocytární morfologií byla pozorována na CD56^{dim}/CD16⁺ populaci:



Obr. 13.: Expresa KIR2DL4 inhibičního receptoru, jehož vazebným ligandem je HLA-G molekula, na CD56^{dim} NK buňkách z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnícemi.

Protože žádná specifická populace (exprimující CD161 nebo NKG2D) z CD56^{dim} NK buněk nevykazovala signifikantní změny po srovnání se zdravými dárcyněmi, předpokládáme obdobné zvýšení exprese KIR2DL4 u neaktivovaných a aktivovaných (exprimujících CD161 a/nebo NKG2D) populací z CD56^{dim} NK buněk.

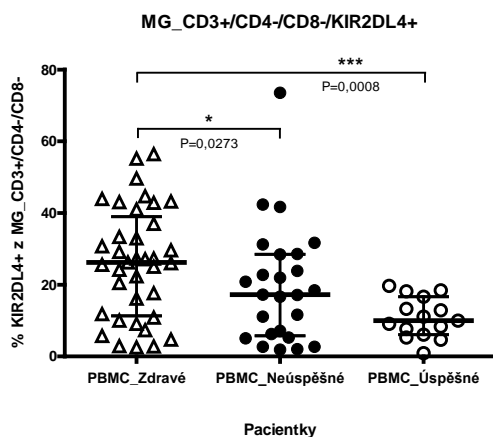
Kromě změn u NK buněk, byly pozorovány změny v počtech KIR2DL4 pozitivních buněk i u T buněk monocytární/granulocytární morfologie:



Obr. 14.: Expresa KIR2DL4 inhibičního receptoru, jehož vazebným ligandem je HLA-G molekula, na T buňkách obecně (A) a na CTL-cytotoxických T buňkách (B) s monocytární/grnulocytární morfologií z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnicemi.

Z Obr. 14. je patrné signifikantní snížení KIR2DL4 pozitivních T buněk (Obr. 14.; A), zejména u CD8+ T buněk (CTL; Obr. 14.; B). CD4+ T buňky (Th) nesoucí KIR2DL4 receptor na svém povrchu byly neovlivněny (data nejsou ukázána).

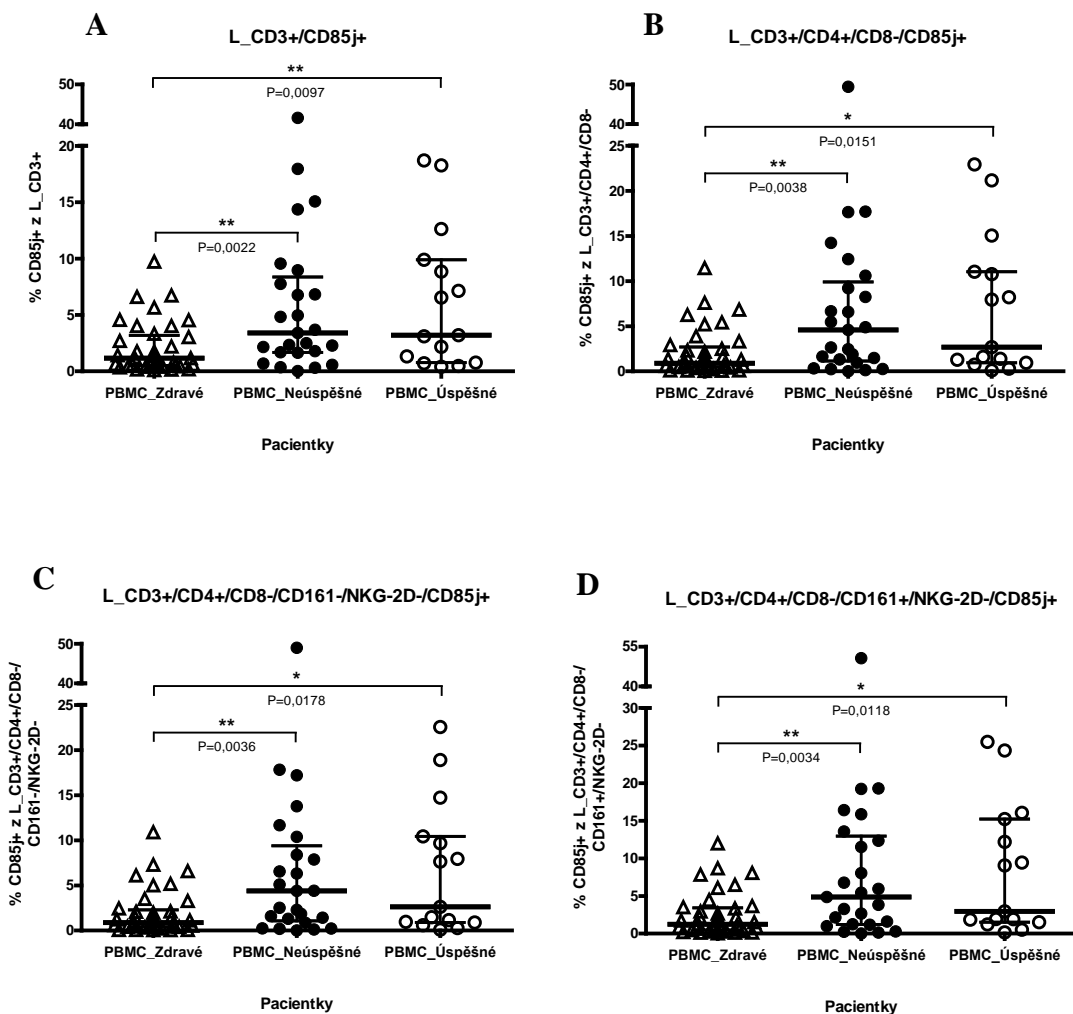
Poslední signifikantní změna u populací exprimujících KIR2DL4 receptor byla v populaci CD4-/CD8- (double negativních) CD3+ T buněk (pravděpodobně NKT buněk):



Obr. 15.: Expresa KIR2DL4 inhibičního receptoru, jehož vazebným ligandem je HLA-G molekula, na CD4-/CD8- (double negativních) T buňkách obecně s monocytární/grnulocytární morfologií z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnicemi.

Toto snížení je podobné tomu pozorovanému u CD8+ T buněk (Obr. 15.; B) a přispívá k celkovému snížení KIR2DL4 pozitivní CD3+ populace s monocytární/granulocytární morfologií v PBMC ve srovnání se zdravými dárcyněmi.

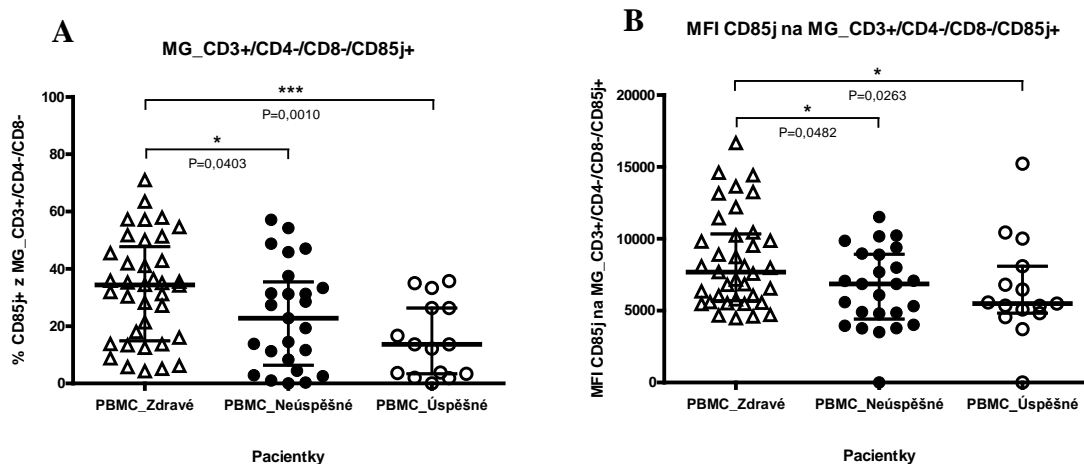
Změny u subpopulací v expresi receptoru CD85j byly výhradně u T buněk:



Obr. 16.: *Expresa CD85j inhibičního receptoru, jehož vazebným ligandem je HLA-G molekula, na T buňkách obecně (A), čistých Th buňkách (C) a CD161+ Th buňkách (NKT buňky, D) s lymfocytární morfologií z PBMC zdravých dárkyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnícemi.*

Jelikož všechny subpopulace CD3+ T buněk (Obr. 16.; B, C, D) vykazují velmi podobné zvýšení počtu buněk nesoucích na svém povrchu CD85j receptor, můžeme se domnívat, že tím všechny přispívají k celkovému zvýšení CD85j pozitivních T buněk (Obr. 16.; A).

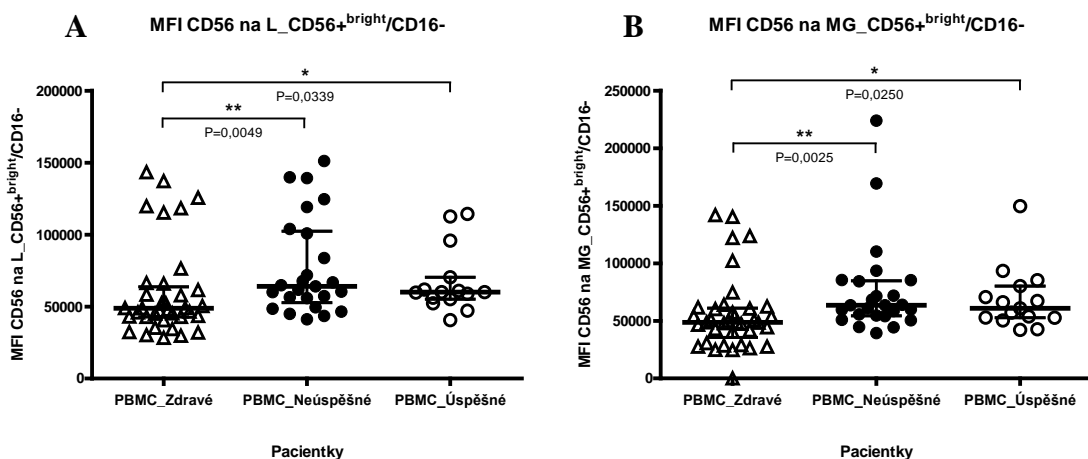
Tak jako v případě KIR2DL4, i u CD85j pozitivních CD4-/CD8- (double negativní) CD3+ T buněk s monocytární/granulocytární morfologií jsme zpozorovali změny v počtech:



Obr. 17.: *Expresa CD85j inhibičního receptoru, jehož vazebným ligandem je HLA-G molekula, na CD4-/CD8- (double negativních) T buňkách (A) a hustota povrchové exprese receptoru CD85j na těchto buňkách (Mean Fluorescence Intensity = MFI, což je množství/hustota receptoru na povrchu buňky, MFI receptoru CD85j; B) s monocytární/granulocytární morfolozií z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnícemi.*

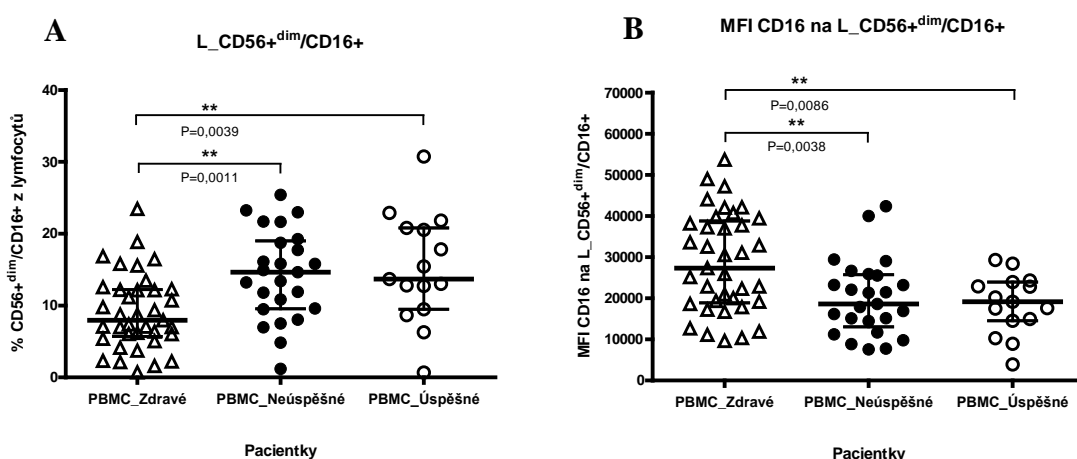
Z tohoto obrázku (Obr. 17.) můžeme vidět stejně jako na Obr. 15, že CD4-/CD8- (double negativní) CD3+ T buněčné populace vykazují nižší počty jak KIR2DL4 nebo CD85j pozitivních buněk s monocytární/granulocytární morfolozií ve srovnání se zdravými dárcyňmi.

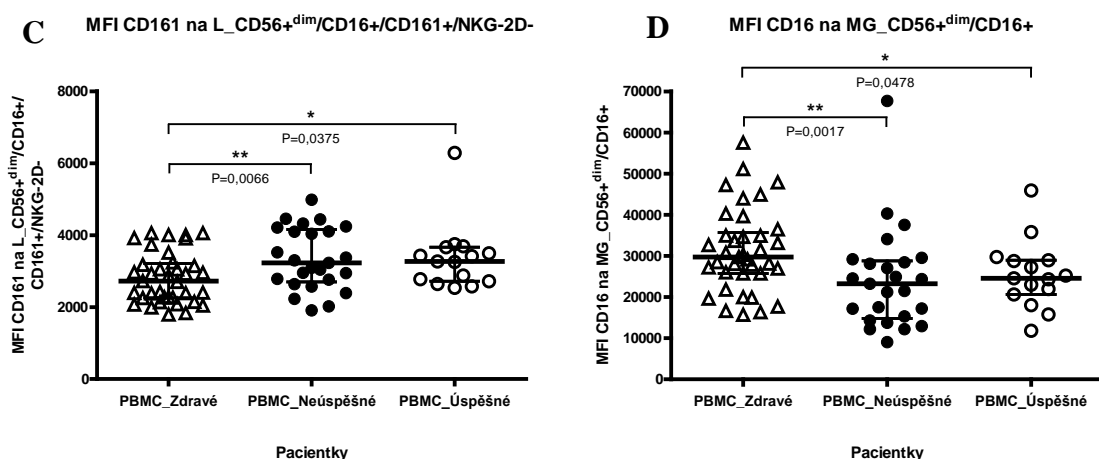
Protože žádná další buněčná populace nevykazovala signifikantní změny v počtech nebo v MFI (Mean fluorescence Intensity – vyjadřuje hustotu exprese receptoru na povrchu buněk) receptoru KIR2DL4 nebo CD85j ve srovnání se zdravými dárcyňmi, zaměřili jsme se na zastoupení studovaných subpopulací:



Obr. 18.: Povrchová exprese molekuly CD56 na subpopulaci CD56+^{bright}/CD16- (MFI CD85j; A, B) s lymfocytární (A) a monocytyární/granulocytyární (B) morfologií z PBMC zdravých dárců (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnici.

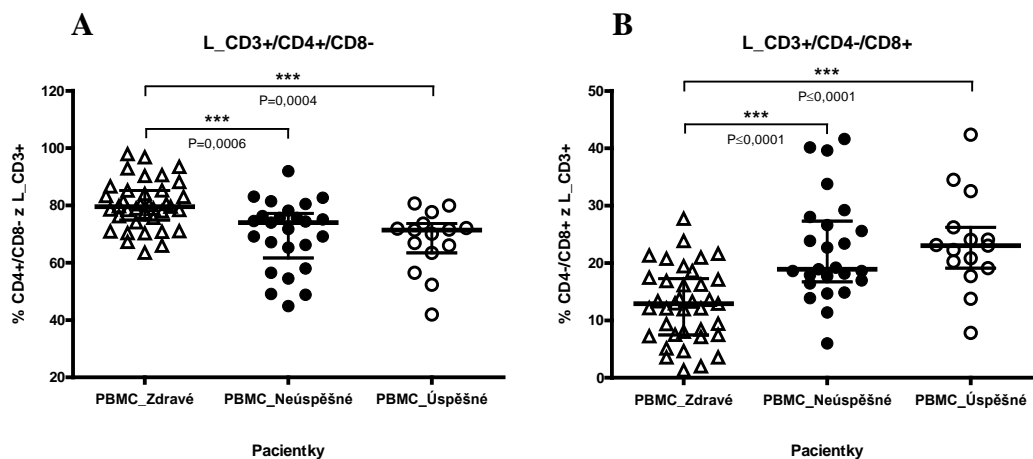
Zatímco počty CD56+^{bright}/CD16- NK buněk jsou stejné jako u PBMC zdravých dárců (data nejsou ukázána), povrchová exprese molekuly CD56 na těchto buňkách se signifikantně zvýšila u obou skupin pacientek (Obr. 18.; A, B).

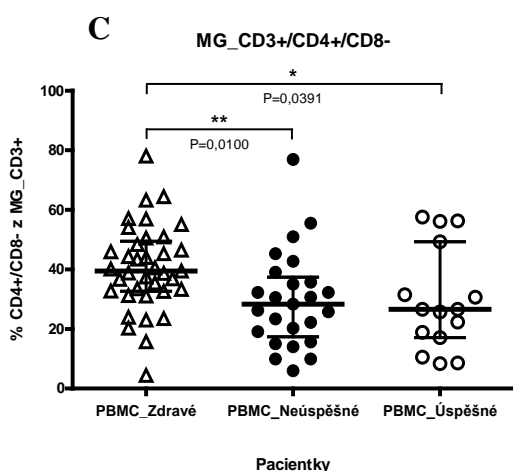




Obr. 19.: Zastoupení populace $CD56^{dim}/CD16^{+}$ NK buněk (A), povrchová exprese receptoru CD16 na této subpopulaci (MFI CD16; B, D) a povrchová exprese aktivačního receptoru CD161 (MFI CD161) na této subpopulaci (C) s lymfocytární (A, B, C) a monocytární/granulocytární (D) morfologií z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdna kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnícemi.

Zde můžeme vidět, že počty $CD56^{dim}/CD16^{+}$ NK buněk jsou vyšší v PBMC pacientek (Obr. 19.; A), navzdory skutečnosti, že exprese jejich povrchového receptoru CD16 se snížila bez ohledu na jejich morfologii (Obr. 19.; B, D). U těchto NK buněk došlo také ke zvýšení povrchové exprese receptoru CD161 v PBMC pacientek (Obr. 19.; C).



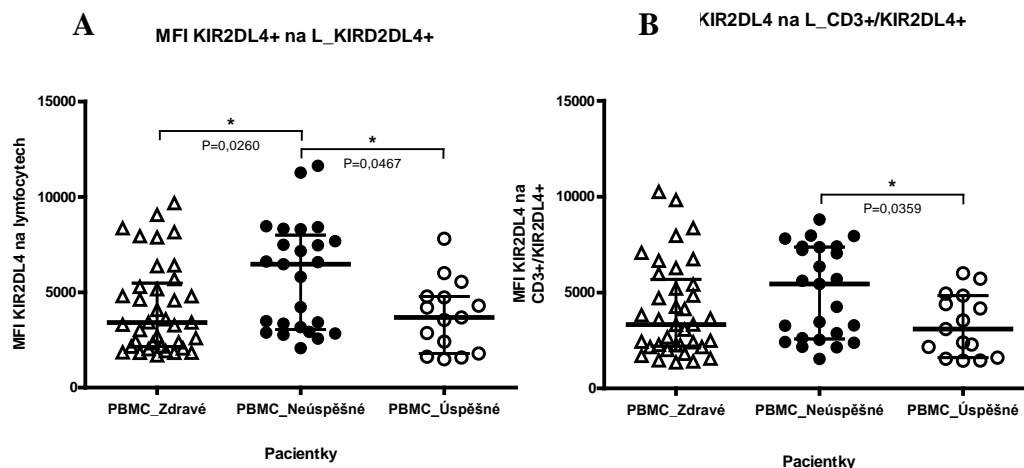


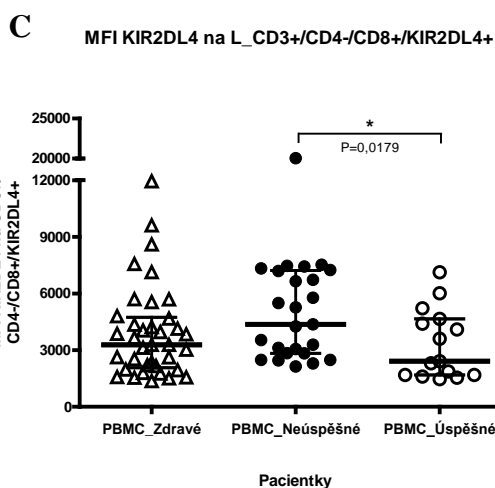
Obr. 20.: Zastoupení Th ($CD3+/CD4+$) buněčné populace (A, C) a CTL ($CD3+/CD8+$) buněk s lymfocytární (A, B) a monocytární/granulocytární (C) morfolozií z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojniciemi.

Obr. 20. zobrazuje rozdíly distribucí Th a CTL populací mezi zdravými dárcyněmi a pacientkami. CTL ($CD3+/CD8+$ buňky) jsou upřednostňovány u pacientek (Obr. 20.; B) před Th populací (Obr. 20.; A, C) ve srovnání ke zdravým dárcyním.

4.4 Porovnání úspěšných a neúspěšných pacientek

Dále jsme se zaměřili na rozdíly v počtu subpopulací a v povrchové expresi receptorů mezi PBMC pacientek. Naším zájmem bylo zjistit, zda některá z těchto populací nemá spojitost s úspěšnou fertilizací. Tak jako v případě porovnání zdravých dárcyň k pacientkám, i zde jsme se nejdříve soustředili na expresi receptoru KIR2DL4 na různých populacích:



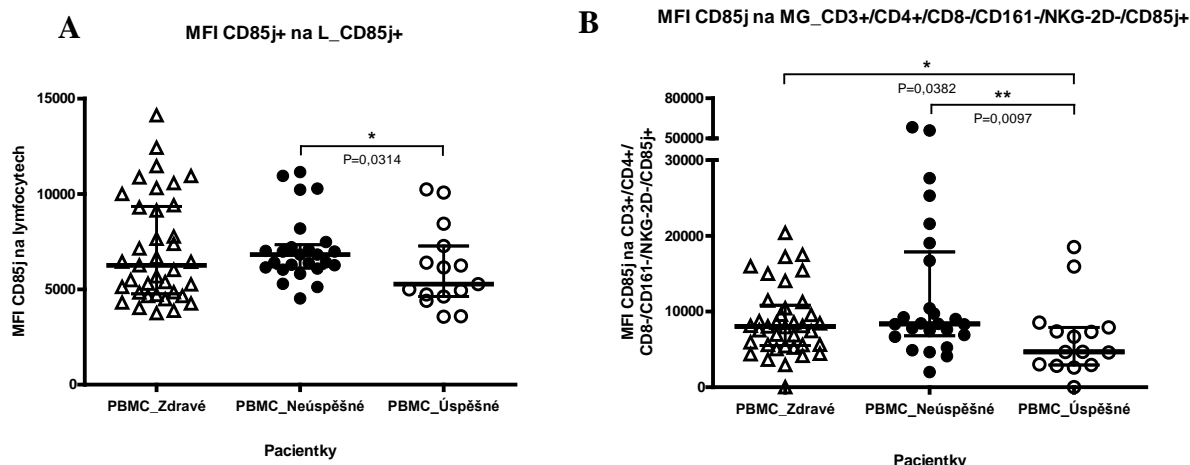


Obr. 21.: Povrchová exprese receptoru KIR2DL4 (MFI KIR2DL4) na všech lymfocytech (A), CD3+ lymfocytech (B) a CTL (CD4-/CD8+ CD3+ lymfocyty; C) z PBMC zdravých dárkyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní

($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnícemi.

Na Obr. 21. (A) můžeme vidět zvýšenou povrchovou expresi receptoru KIR2DL4 na krevních lymfocytech u neúspěšných pacientek ve srovnání jak s úspěšnými pacientkami, tak se zdravými dárkyněmi, bez rozdílu mezi těmito dvěma skupinami. Tento rozdíl je stále dobře viditelný na CD3+ T lymfocytech (Obr. 21.; B), zejména na CTL (CD3+/CD4-/CD8+ T buňky; Obr. 21.; C), i přes nedostatečnou signifikanci v rozdílu mezi neúspěšnými pacientkami a zdravými dárkyněmi (Obr. 21.; B, C).

Poté jsme zaměřili naši pozornost na populace exprimující receptor CD85j:

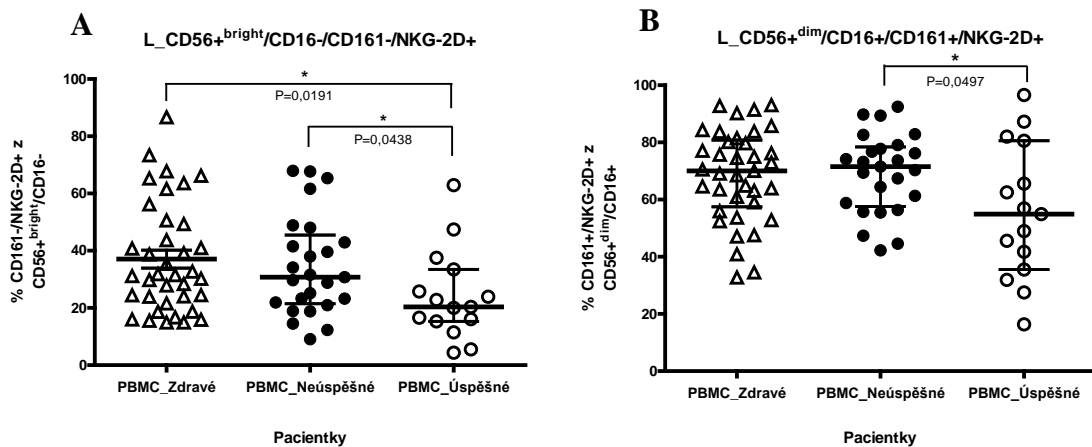


Obr. 22.: Povrchová exprese receptoru CD85j (MFI CD85j) na všech lymfocytech (A) a na ryzích Th buňkách (B) z PBMC zdravých dárkyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány

za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojniciemi.

Tak jako v případě KIR2DL4 je povrchová exprese receptoru CD85j zvýšena v PBMC neúspěšných pacientek (Obr. 22.; A) ve srovnání s úspěšnými pacientkami, signifikance v rozdílu mezi skupinami pacientek a zdravými dárkyněmi byla nedostatečná. Úspěšné pacientky měly na druhou stranu signifikantně sníženou povrchovou expresi receptoru CD85j na ryzích Th lymfocytech ve srovnání se zdravými dárkyněmi a neúspěšnými pacientkami (Obr. 22.; B).

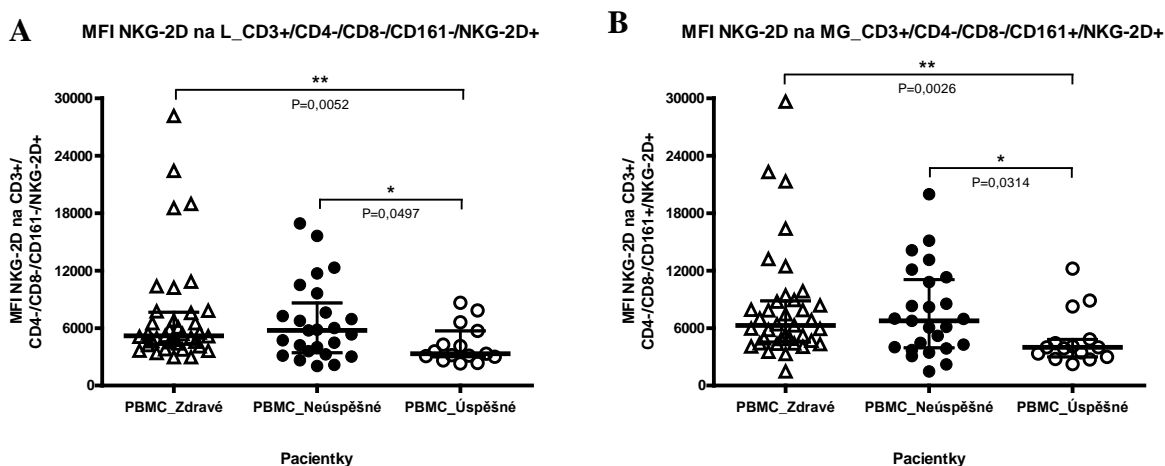
Jelikož se neobjevili další změny v počtech či v expresi receptorů KIR2DL4 a CD85j, zaměřili jsme se na distribuci studovaných subpopulací:



Obr. 23.: Distribuce $CD56^{+bright}$ (A) a $CD56^{+dim}$ (B) populací v lymfocytech zdravých dárkyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojniciemi.

Úspěšné pacientky mají signifikantně sníženy krevní počty částečně aktivovaných $CD56^{+bright}$ NK buněk (Obr. 23.; A) ve srovnání se zdravými dárkyněmi a neúspěšnými pacientkami. Snížené počty byly také zaznamenány v případě plně aktivovaných $CD56^{+dim}$ NK buněk (Obr. 23.; B), i když tento rozdíl byl signifikantní jenom ve srovnání s neúspěšnými pacientkami.

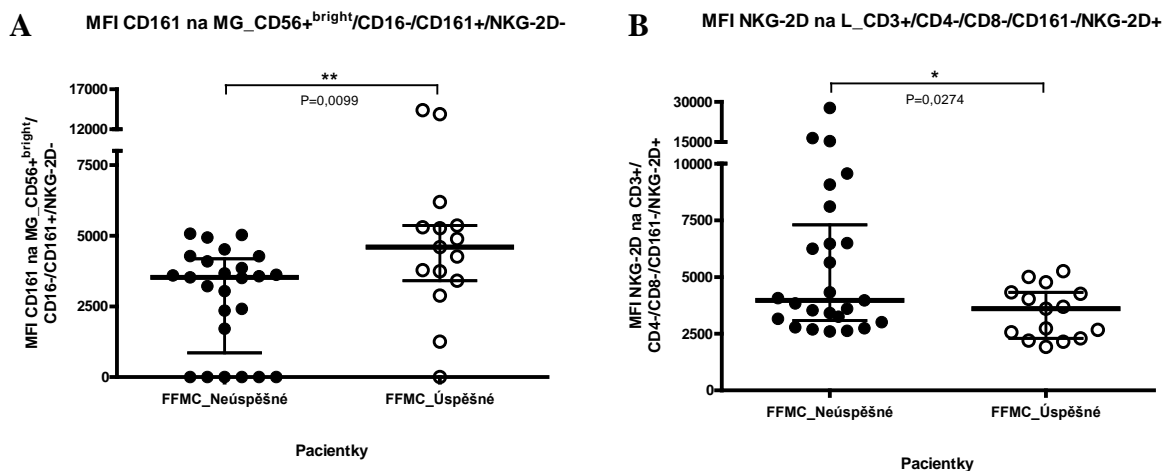
Povrchová exprese receptoru NKG2D také vykazovala rozdíly, tentokrát u $CD4^{-}/CD8^{-}$ (double negative) $CD3^{+}$ T buněk:



Obr. 24.: Povrchová exprese receptoru NKG2D (MFI NKG2D) na CD4-/CD8- (double negative) T buňkách, částečně aktivovaných (A) a také na zralých (B,) získaných z PBMC zdravých dárcyň (prázdné trojúhelníčky), neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnici.

V obou případech, jak u částečně aktivovaných (CD161-/NKG2D+) nediferencovaných (lymfocytární morfologie; Obr. 24.; A) tak u plně aktivovaných (CD161+/NKG2D+) zralých (monocytární/granulocytární morfologie; Obr. 24.; B) CD4-/CD8- (double negativní) T buněk, je povrchová exprese receptoru NKG2D signifikantně snížena u úspěšných pacientek.

Dále jsme se zaměřili na folikulární tekutiny úspěšných a neúspěšných pacientek:

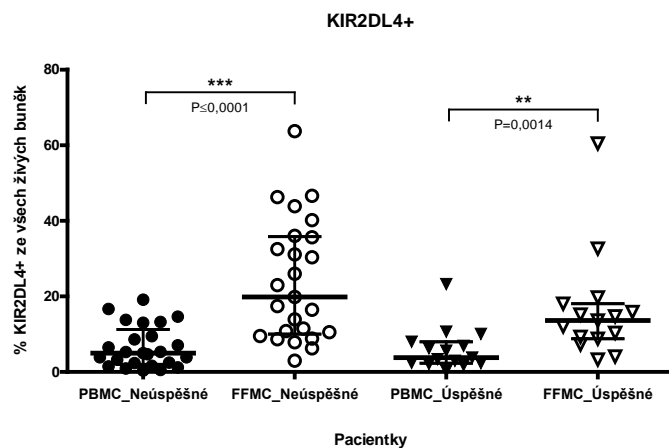


Obr. 25.: Povrchová exprese receptoru CD161 (MFI CD161) na částečně aktivovaných CD56+^{bright} NK buňkách (A) a povrchová exprese receptoru NKG2D (MFI NKG2D) na CD4-/CD8- (double negativních) a částečně aktivovaných T buňkách (B), kdy v prvním grafu se jedná o buňky s lymfocytární morfologií (A) a v druhém s monocytární/granulocytární morfologií (B), získaných z FFMC (mononukleárních buněk folikulární tekutiny) neúspěšných (plná kolečka) a úspěšných (prázdná kolečka) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnícemi.

Jediné rozdíly, zobrazené ve folikulárních tekutinách úspěšných a neúspěšných pacientek, byly zvýšená povrchová exprese receptoru CD161 na CD56+^{bright} NK buňkách u úspěšných pacientek (Obr. 25.; A) a zvýšení povrchové exprese receptoru NKG2D na CD4-/CD8- (double negativních) T buňkách u neúspěšných pacientek (Obr. 25.; B).

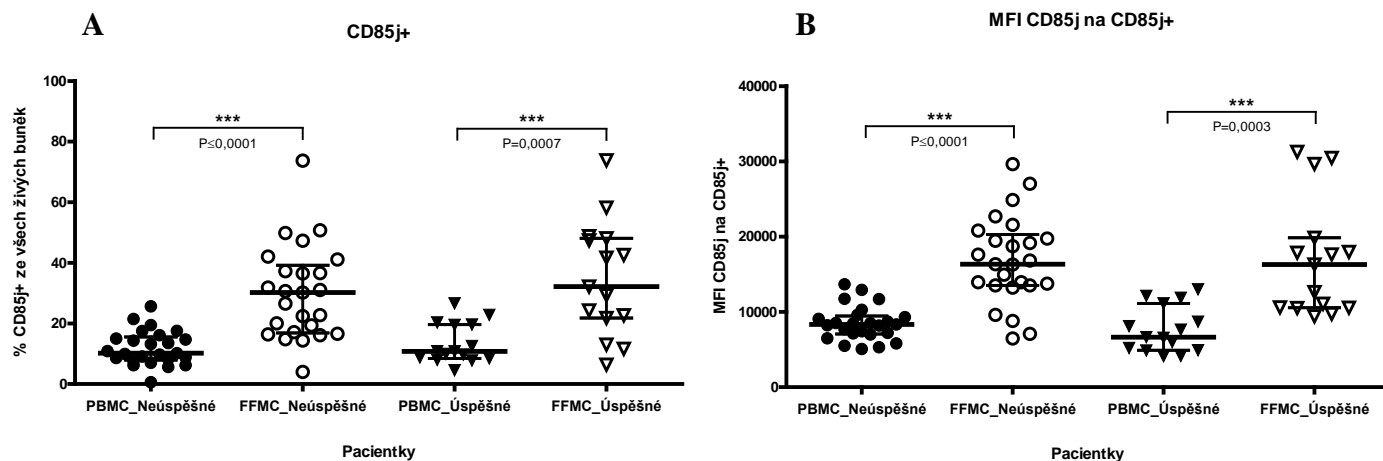
4.5 Porovnání krví a folikulárních tekutin u úspěšných a neúspěšných pacientek

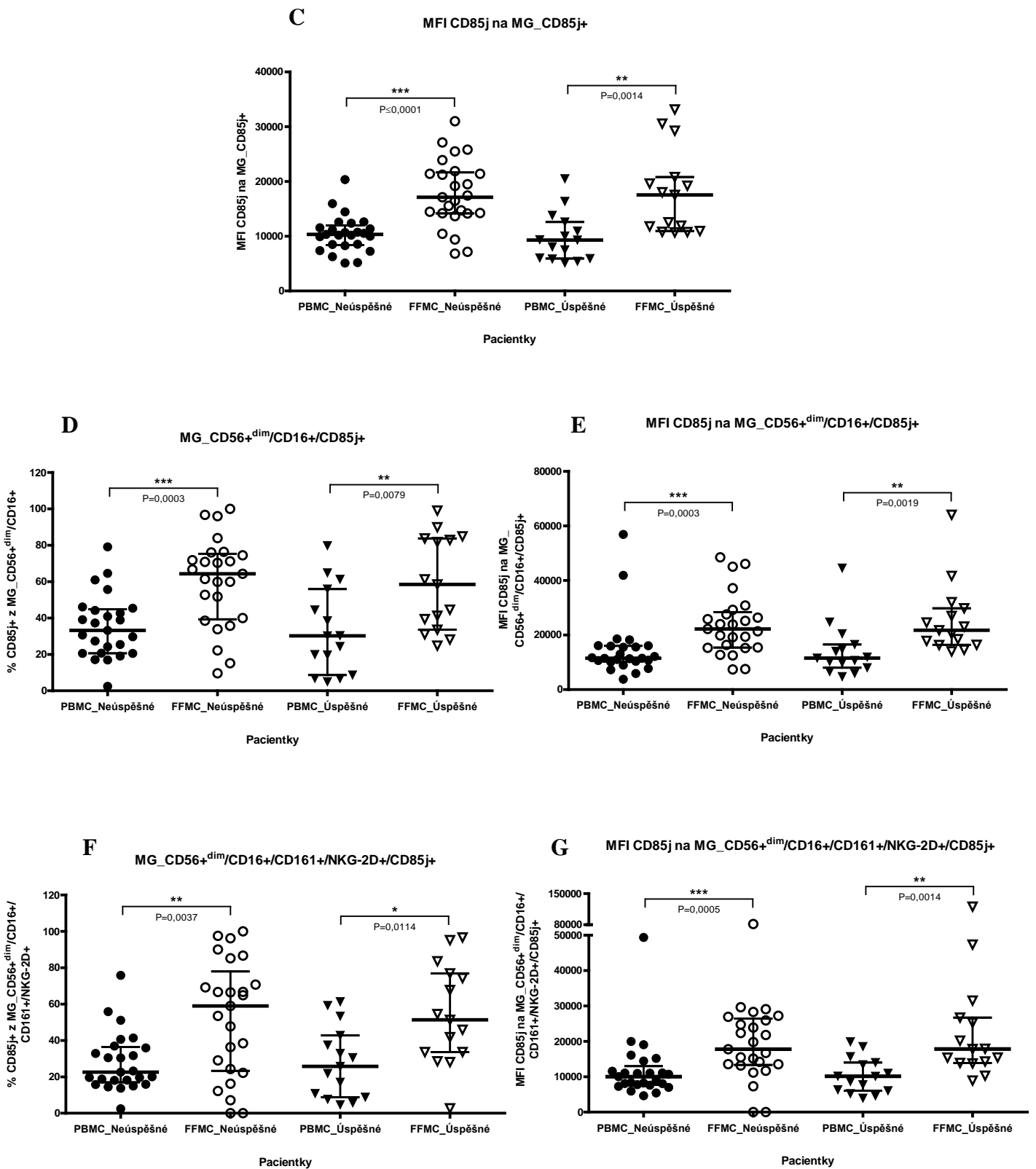
V dalším kroku jsme vyhodnocovali rozdíly mezi PBMC a FFMC pacientek pro stanovení možných subpopulací, které by se mohly uplatňovat během úspěšné fertilizace. Tak jako předtím jsme se nejdříve soustředili na receptory vázající HLA-G molekulu (KIR2DL4 a CD85j):



Obr. 26.: Počet buněk nesoucích na svém povrchu receptor *KIR2DL4* na všech živých buňkách z PBMC (plná) a FFMC (prázdná) neúspěšných (kolečka) a úspěšných (trojúhelníčky) pacientek. *P* hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnici.

Můžeme vidět zvýšené počty buněk, které nesou na svém povrchu receptor *KIR2DL4*, ve folikulárních tekutinách jak úspěšných tak neúspěšných pacientek.



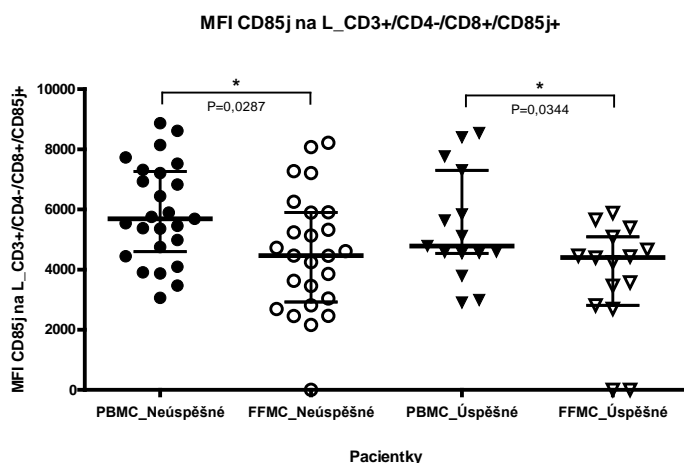


Obr. 27.: Počty buněk (A, D, F) a povrchová exprese (B, C, E, G) receptoru CD85j na všech živých buňkách (A, B), buňkách s monocytární/granulocytární morfológií obecně (C), CD56+^{dim} NK buňkách (D, E) a plně aktivovaných CD56+^{dim} NK buňkách (F, G)

s monocytární/granulocytární morfologií (C, D, E, F, G) z PBMC (plná) a FFMC (prázdná) neúspěšných (kolečka) a úspěšných (trojúhelníčky) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojniciemi.

Pozorovali jsme zvýšené počty (Obr. 27.; A, D, F) a povrchovou expresi receptoru CD85j na různých populacích v FFCM. Toto zvýšení bylo viditelné na všech živých buňkách obecně (Obr. 27.; A, B), na buňkách s monocytární/granulocytární morfologií (C), které byly CD56^{dim} NK buňky (Obr. 27.; D, E), specificky plně aktivované (CD161+/NKG2D+) CD56^{dim} NK buňky (Obr. 27.; F, G). Protože žádné další subpopulace nevykazovaly signifikantní rozdíly, předpokládáme, že pouze plně aktivované CD56^{dim} NK buňky jsou zodpovědné za obecné zvýšení hladiny CD85j nesoucích CD56^{dim} NK buněk ve folikulárních tekutinách pacientek.

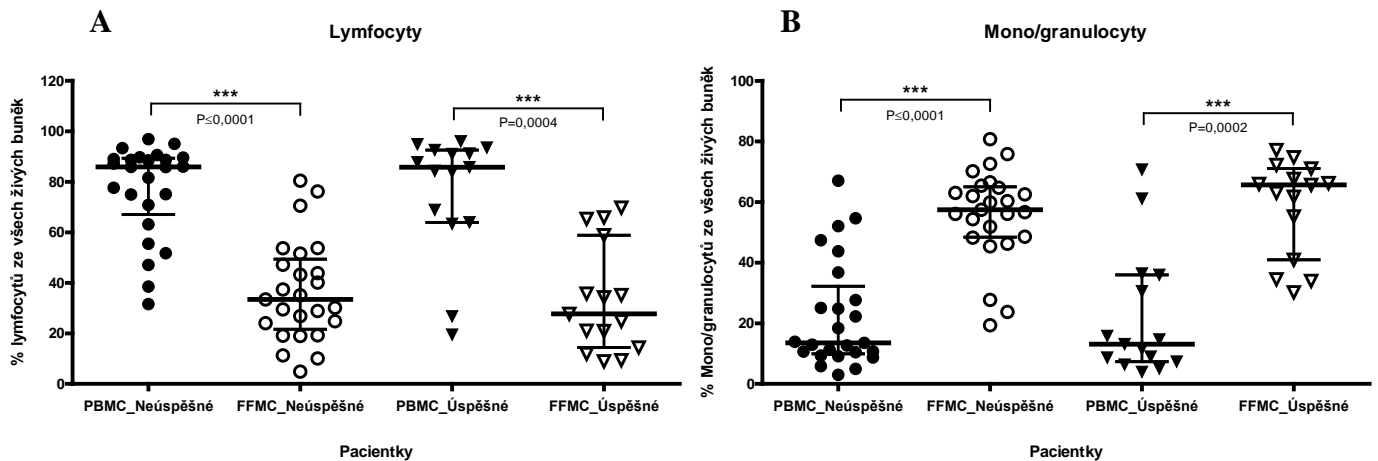
Povrchová exprese receptoru CD85j se také změnila na T buňkách:



Obr. 28.: Povrchová exprese receptoru CD85j (MFI CD85j) na CTL (CD3+/CD4-/CD8+) buňkách s lymfocytární morfologií z PBMC (plná) a FFMC (prázdná) neúspěšných (kolečka) a úspěšných (trojúhelníčky) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojniciemi.

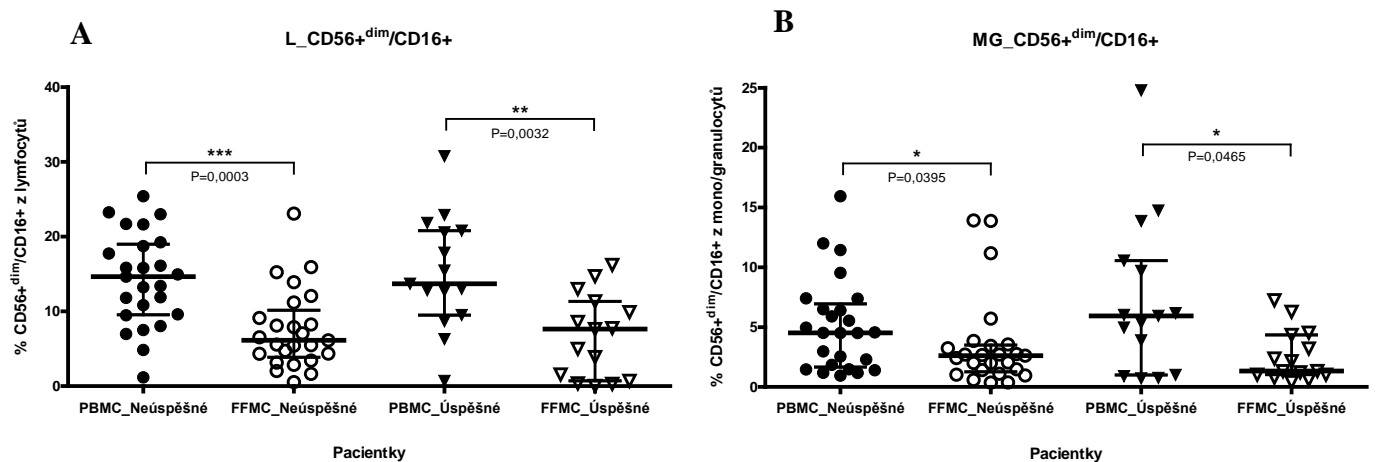
CTL (CD3+/CD4-/CD8+) buňky z FFMC obou skupin pacientek vykazují snížení povrchové exprese receptoru CD85j (Obr. 28.)

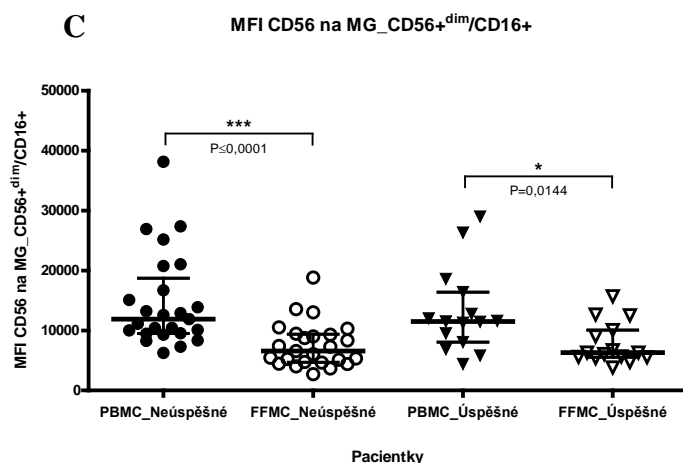
Poté jsme se opět zaměřili na studované populace:



Obr. 29.: Distribuce buněk s lymfocytární morfologií (A) nebo monocytární/granulocytární morfologií (B) z PBMC (plná) a FFMC (prázdňá) neúspěšných (kolečka) a úspěšných (trojúhelníčky) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou o značeny spojnícemi.

Z Obr. 29. můžeme vidět, že poměr lymfocytů k buňkám s monocytární/granulocytární morfologií je posunut ve prospěch velkých granulárních buněk v případě FFMC u obou skupin pacientek.

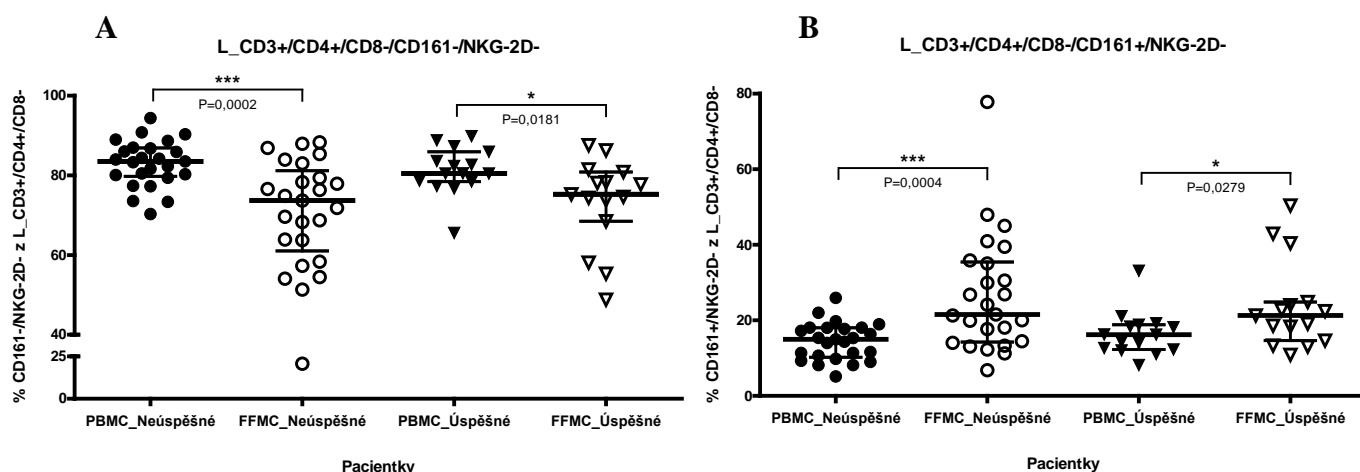




Obr. 30.: Distribuce (A, B) CD56^{dim}/CD16⁺ NK buněk s lymfocytární (A) nebo monocytární/granulocytární (B) morfologií a povrchová exprese molekuly CD56 na této populaci (C) z PBMC (plná) a FFMC (prázdná) neúspěšných (kolečka) a úspěšných (trojúhelníčky) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za významné ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdíly jsou označeny spojnici.

Zde jsme pozorovali snížení počtu cytotoxických NK buněk (CD56^{dim}/CD16⁺) u obou morfologických stádií (Obr. 30.; A, B), které bylo doprovázeno snížením povrchové exprese molekuly CD56 na této subpopulaci (Obr. 30.; C) v FFMC u obou skupin pacientek.

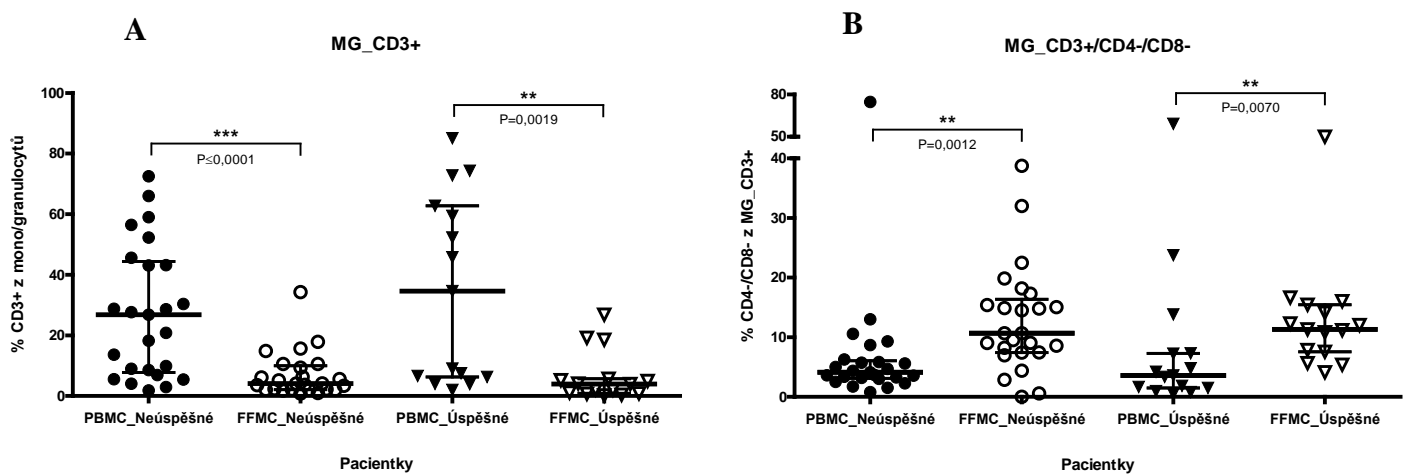
T buňky také vykazovaly určité rozdíly mezi PBMC a FFMC:



Obr. 31.: Distribuce čistých Th buněk (A) a Th buněk exprimujících receptor CD161 (B) z PBMC (plná) a FFMC (prázdná) neúspěšných (kolečka) a úspěšných

(trojúhelníčky) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdílly jsou označeny spojnicemi.

Snížený počet Th buněk (Obr. 31.; A) v FFMC pacientek a zvýšený počet Th buněk exprimujících receptor CD161 (Obr. 31.; B) s lymfocytární morfologií by mohlo znamenat pohyb CD161+ Th buněk do folikulární tekutiny nebo diferenciaci čistých Th buněk do 161+ Th buněk.



Obr. 32.: Distribuce T buněk (A) a CD4-/CD8- (double negativních) T buněk (B) s monocytární/granulocytární morfologií z PBMC (plná) a FFMC (prázdná) neúspěšných (kolečka) a úspěšných (trojúhelníčky) pacientek. P hodnoty $\leq 0,05$ byly považovány za signifikantní ($P \leq 0,05 = *$; $P \leq 0,01 = **$ a $P \leq 0,001 = ***$) a rozdílly jsou označeny spojnicemi.

V posledním obrázku je vidět snížení hladiny CD3 buněk obecně (Obr. 32.; A) se zvýšením počtu CD4-/CD8- (double negativních) CD3 buněk (Obr. 32.; B), jedná se o buňky s monocytární/granulocytární morfologií v obou případech.

5 Diskuze

V první řadě jsme se zaměřili na věk pacientek a zdravých dárkyň. Jak je patrné z Obr. 9., zdravé dárkyně byly věkově srovnatelné s oběma skupinami pacientek, i přes signifikantní rozdíl ve věku úspěšných proti neúspěšným pacientkám. Tento rozdíl pozorovaný v naší studii potvrzuje dříve studovaný jev závislosti věku na úspěšnosti IVF (Katwijk³ et al., 1998).

Dále jsme se zaměřili na efektorové funkce PBMC pacientek a zdravých dárkyň pro odlišení vlivu stimulačního protokolu či zdroje PBMC (buffy coat či celá krev). Z Obr. 10. je patrné, že všechny skupiny mají srovnatelný cytotoxický účinek na cílovou linii myeloidní leukemie K562. Tento výsledek nám potvrzuje, že ani stimulační protokol, ani zdroj PBMC nemá vliv na cytotoxickou efektorovou funkci izolovaných buněk.

Po těchto předběžných výsledcích jsme se zaměřili na rozsáhlou analýzu povrchových znaků odlišných buněčných subpopulací. V první řadě bylo podstatné srovnání pacientek se zdravými dárkyněmi. Z Obr. 11. je zřetelné, že buňky nesoucí HLA-G vázající receptory KIR2DL4 i CD85j na které jsme se v této studii zaměřili, se u obou skupin pacientek vyskytují ve snížené míře, a to především buňky s monocytární/granulocytární morfologií, která je často spojována s maturací a terminální diferenciací (Brady¹⁰³ et al., 2004). Z toho vyplývá, že PBMC pacientek mají nižší počet buněk citlivých k HLA-G v periferní krvi, snížený buďto vlivem stimulačního protokolu, ovlivněný zdrojem PBMC, nebo migrací těchto buněk do jiných kompartmentů. Jak je patrné z Obr. 26. a Obr. 27. A, tyto buňky byly pozorovány ve zvýšených hladinách ve folikulární tekutině pacientek, což potvrzuje hypotézu o migraci HLA-G rozpoznávajících buněk do folikulární tekutiny, ať už tato migrace byla vyvolána stimulačním protokolem, nebo nikoliv.

Dále jsme pozorovali rozdíly v expresi KIR2DL4 a CD85j na povrchu různých buněčných subpopulací a v jejich zastoupení. U NK buněk jsme pozorovali zvýšené zastoupení KIR2DL4 nesoucích CD56^{dim} (Obr. 13.) i CD56^{bright} (Obr. 12.) a to neaktivovaných (Obr. 12. A) i částečně aktivovaných (Obr. 12. B). Takto zvýšený výskyt napovídá zvýšené senzitivitě NK buněk k HLA-G bez ohledu na jejich funkci. Ve folikulární tekutině žádná změna v hladinách této populace pozorována nebyla. Snížený výskyt KIR2DL4 nesoucích subpopulací jsme pozorovali u maturovaných T buněk (Obr. 14. A), a to konkrétně u cytotoxických T buněk (CTL, Tc; Obr. 14. B). Tuto změnu ani opačného směru jsme nepozorovali ve folikulárních tekutinách pacientek, můžeme tudíž předpokládat stejné snížení ve FFMC. Nižší hladina HLA-G responzivních cytotoxických T buněk má za následek nižší možnost rozpoznání HLA-G nesoucích cílových buněk a tím nižší riziko

jejich cytotoxické lyze. Zde opět nemáme jistotu, zda se jedná o následek stimulačního protokolu pacientek, nebo odlišnost zdroje PBMC od zdravých dárcyň. Počty CD85j nesoucích subpopulací byly oproti zdravým dárcyním změněny výlučně na T buňkách (Obr. 16. A), konkrétně na pomocných T lymfocytech (Th, Obr. 16. B), ať už se jednalo o ryzí Th (Obr. 16. C) nebo Th nesoucí NK buněčné znaky (Obr. 16. D). Zvýšený výskyt Th buněk atenuovatelných pomocí HLA-G v periferní krvi opět snižuje riziko rozvoje reakce proti HLA-G nesoucím buňkám (Merlo⁹⁶ et al., 2001; Saverino⁹⁷ et al., 2000). Jako v případě Tc, ani zde jsme nepozorovali změnu v zastoupení této subpopulace ve folikulárních tekutinách pacientek, a můžeme usuzovat vliv stimulačního protokolu.

Poslední sada srovnání se zdravými dárcyněmi zahrnovala samotné buněčné subpopulace, jejich zastoupení a expresi povrchových znaků. Nejvýznamnějšími jsou rozdíly v povrchové expresi CD56 na CD56^{bright} NK buňkách jak lymfocytární morfologie, tak těchto buněk zvětšených se vyvýšenou vnitřní komplexitou (monocytární/granulocytární morfologie, Obr. 17. A a B). Zvýšená exprese molekuly CD56 na jejich povrchu má za následek lepší schopnost mezibuněčné adheze a potažmo lepší rozpoznávací funkci těchto NK buněk. Tato skutečnost a potvrzený výskyt chemokinových receptorů na této subpopulaci buněk (hlavně CXCR4, jehož ligand CXCL12 je exprimován na invazivním trofoblastu) implikuje migraci těchto buněk do sekundárních lymfoidních orgánů, avšak také do nelymfoidních orgánů (Hanna⁵¹ et al., 2003; Fehniger¹⁰⁴ et al., 2003). Rozdíl v expresi molekuly CD56 na této subpopulaci opět nebyl pozorován ve folikulárních tekutinách pacientek. Dále byl pozorován vyšší výskyt CD56^{dim} NK buněk v PBMC pacientek (Obr. 19. A) a snížená exprese CD16 na jejich povrchu jak u buněk lymfocytární (Obr. 19. B), tak monocytární/granulocytární morfologie (Obr. 19. D). Vyšší počet cytotoxických NK buněk spojený s jejich vyšší schopností aktivace (exprese CD161 na jejich povrchu, Obr. 19. C) je vyvážen jejich sníženou schopností provádět efektorové funkce, zejména ADCC (sníženou expresí CD16, Obr. 19. B a D). Tento jev je opačný v případě folikulárních tekutin pacientek, kde jsou počty těchto buněk nižší než v krvi (Obr. 30. A a B) a jejich schopnost adheze snížená (exprese CD56, Obr. 30. C), což indikuje protektivní účinek proti cytotoxickým NK buňkám ve folikulárních tekutinách pacientek. Dále jsme u pacientek pozorovali posun v zastoupení T buněk značně ve prospěch Tc, na úkor Th (Obr. 19. A, B a C). Pokles v zastoupení Th byl pozorován i ve folikulárních tekutinách pacientek (Obr. 31. A) společně s obecně nižším zastoupením zralých T buněk (Obr. 32. A). Toto zvýhodnění cytotoxických buněk na úkor pomocných T buněk se může projevit jako nebezpečné, vzhledem ke vztahu

matka-plod. Jakékoli cytotoxické působení vyžaduje účinnou a striktní regulaci, která je v tomto případě atenuována.

Nejpodstatnější částí studie je pak přímé srovnání zastoupení buněčných subpopulací u úspěšných a neúspěšných pacientek. Se zaměřením na HLA-G responzivní receptory je podstatná zvýšená povrchová exprese KIR2DL4 na lymfocytárních PBMC u neúspěšných pacientek vůči úspěšným pacientkám i zdravým dárkyním (Obr. 21. A). Tato zvýšená exprese je dále vysledována na povrchu T lymfocytů (Obr. 21. B), konkrétně Tc (Obr. 20 C), i když je změna signifikantní už jen vůči úspěšným pacientkám. Takto zvýšená povrchová exprese má za následek vyšší možnost rozpoznávat HLA-G nesoucí buňky Tc lymfocyty a vzhledem k amfipatickému charakteru KIR2DL4 (Faure¹⁰⁵ et al., 2002) i k jejich následnému cytopatickému poškození či lyzi. Dále jsme pozorovali zvýšenou povrchovou expresi CD85j na povrchu lymfocytárních PBMC neúspěšných pacientek (Obr. 22. A), což má za následek obecně zvýšenou možnost atenuace těchto lymfocytů pomocí HLA-G. Úspěšné pacientky měly na druhou stranu nižší povrchovou expresi CD85j na ryzích Th buňkách monocytární/granulocytární morfologie (Obr. 22. B) a to jak proti neúspěšným pacientkám, tak proti zdravým dárkyním. Takto snížená hladina CD85j na povrchu Th způsobuje vyšší odolnost těchto Th vůči atenuaci HLA-G a podtrhuje význam této subpopulace ve vztahu k úspěšnosti IVF. Dále měly úspěšné pacientky snížený výskyt částečně aktivovaných CD56^{bright} (Obr. 23. A) NK buněk i plně aktivovaných CD56^{dim} (Obr. 23. B) NK buněk v PBMC. Nižší hladiny obou druhů NK buněk opět znamenají nižší riziko jak cytotoxického (CD56^{dim}), tak cytokinového (CD56^{bright}) působení těchto buněk na ostatní složky imunitního systému. Zvýšený výskyt NK a aktivovaných NK buněk u infertilních žen ve srovnání s kontrolní skupinou byl prokázán i v dalších studiích (Fukui¹⁰⁶ et al., 1999; Kane¹⁰⁷ et al., 1996; Ntrivalas¹⁰⁸ et al., 2001), specificky aktivovaných CD56^{dim}/CD16⁺/CD161⁺ (Coulam¹⁰⁹ et al., 2003). Ve folikulárních tekutinách pacientek byl pozorován rozdíl pouze u povrchové exprese aktivačního CD161 na monocytárních/granulocytárních CD56^{bright} NK buňkách, zvyšující tak možnost cytokinového působení. Dále byla zjištěna zvýšená exprese NKG-2D aktivačního receptoru na povrchu CD4⁻/CD8⁻ negativních buněk u FFMC neúspěšných pacientek. Tato populace může reprezentovat skupinu NKT buněk, jejichž zvýšená schopnost aktivace může působit proti úspěšnosti IVF a to zvýšenou produkcí Th1 cytokinů, která byla u double negativních NKT buněk prokázána (Lee⁶⁶ et al., 2002). Tento fakt ovšem bez studia dalších povrchových znaků, které se na NKT běžně vyskytují, nemůžeme zatím prokázat.

6 Závěr

V této práci jsme potvrdili vliv věku na úspěšnost IVF a identifikovali několik buněčných subpopulací zapojených v konečné úspěšnosti IVF. Potvrdili jsme vliv HLA-G vázajících receptorů KIR2DL4 a CD85j a jejich zapojení v imunologických mechanismech doprovázejících úspěšnost IVF a poukázali na značný vliv stimulačních protokolů na složení a funkci imunitního systému pacientek.

Seznam citované literatury

- (1) Nouza, K., Madar, J., Nouza, M.: Immunology and immunopathology of reproduction I. Sterility-Alergie, 2007, 2, s.133-139
- (2) Petrovská, M., Sedlák, R., Nouza, K., Presl, J., Kinský, R.: Development and distribution of the white blood cells within variol structures of the human menstrual corpus luteum examined using an image analysis system-American Journal of Reproductive Immunology, 1992, 28, s.77-80
- (3) Katwijk, C.van, Peeters, L.L.H.: Clinical aspects of pregnancy after the age of 35 years: a review of the literature-Human reproduction, 1998, 4(2), s.185-194
- (4) Hamberger, L., Lundin, K., Sjorgen, A., Soderlund, B.: Indications for intracytoplasmic sperm injection-Human reproduction, 1998 Apr, 13(1), s.128-133
- (5) Piyush Tripathi, Sita Nalk, Suraksha Agrawal: Role of HLA-G, HLA-E and KIR2DL4 in pregnancy-International Journal of Human Genetics, 2007, 7, s.219-233
- (6) Medawar, P. D.: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates-Symposium of the Society for Experimental Biology, 1953, s. 320
- (7) Bonney, L. A., Matzinger, P.: The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells-J. Immunology, 1997, 158, s. 40-47
- (8) Da Silva, J. A., Spector, T. D.: The role of pregnancy in the course and actiology of rheumatoid arthritis-Clinical Rheumatology, 1992, 11, s.189-194
- (9) Varner, M. W.:Autoimmune disorders and pregnancy-Semin. Perinatol, 1991, 15, 238-250
- (10) Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T. R.: Bidirectional cytokune interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?-Immunology Today, 1993, 14, s.353-356
- (11) Chaouat, G., Menu, E., Clark, D. A., Dy, M., Minkowski, M. and Wegmann, T. G.:Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy-Journal of Reproduction and Fertility, 1990, 89, s.447-458
- (12) Haimovici, F, Hill, J.A., Anderson, D.J.: The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro-Biol. Reprod., 1991, 44, s.69-75
- (13) Baines, M.G., Duclos, A.J., Antecka, E., Haddad, E.K.: Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss-Am. J. Reprod. Immunol., 1997, 37, s.471-477
- (14) Haddad, E.K., Duclos, A.J., Antecka, E., Lapp, W.S., Baines, M.G.: Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss-Cell. Immunol., 1997a, 181, s.68-75
- (15) Haddad, E.K., Duclos, A.J., Lapp, W.S., Baines, M.G.: Early embryo loss is associated with the prior expression of macrophage activation markers in the decidua-J. Immunol., 1997b, 158, 4886-4892
- (16) Clark, D.A., Yu, G., Levy, G.A., Gorczynski, R.M.: Procoagulants in fetus rejection: the role of the OX-2 (CD200) tolerance signal-Semin. Immunol., 2001, 13, s.255-263
- (17) Parhar, R.S., Yagel, S., Lala, P.K.: PGE2-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential antitrophoblast activity-Cell. Immunol., 1989, 120, s.61-74
- (18) Koopman, L.A., Kocpcow, H.D., Rybalov, B., Boyson, J.E., Orange, J.S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, Ch.J., Schachter, A.D., Park, P.J., Strominger, J.L.: Human decidual natural killer cells ate a Unixe NK cell subset with immunomodulatory potential-The Journal of Experimental medicine, 2003, 198, s.1201-1212
- (19) Moffett-King, A.: Natural killer cells and pregnancy-Nat Rev Immunol, 2002, 2, s.656-663
- (20) Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A.: The biology of human natural killer-cell subsets-Trends in Immunology, 2001, 22, s.633-640

- (21) Tabiasco, J., Rabot, M., Aguerre-Girr, M., El Costa, H., Berrebi, A., Parant, O., Laskarin, G., Juretic, K., Bensussan, A., Rukavina, D., Le Bouteiller, P.: Human decidual NK cells: Unique phenotype and functional properties – A review- *Placenta*, 2006, 27, s.34-39
- (22) Laskarin, G., Strbo, N., Bogovic Crncic, T., Juretic, K., Ledee Bataille, N., Chaouat, G., Rukavina, D.: Physiological role of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal interface-*Chem Immunol Allergy*, 2005, 89, s.10-25
- (23) Jokhi, P.P., King, A., Jubinsky, P.T., Loke, Y.W.: Demonstration of the low affinity alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R alpha) on human trofoblast and uterine cells-*J Reprod Immunol*, 1994, 26, s. 147-164
- (24) Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Breenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, Y., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., Mandelboim, O.: Decidual Nk cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface-*Nature medicine*, 2006, 12, s.1065-1074
- (25) Hanna, J., Fitchett, J., Rowe, T., Daniels, M., Heller, M., Gonen-Gross, T., Manaster, E., CHo, S.Y., Labarre, M.J., Mandelboim, O.: Proteomic analysis of human natural killer cells: insights on new potential NK immune function- *Mol Immunol*, 2005, 42, s.425-431
- (26) Cooper, M., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaeheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A.: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset-*Blood*, 2001, 97, s.3146-3151
- (27) Faulk, W.P., Temple, A.: Distribution of β 2 microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae-*Nature*, 1976, 262, s.799-802
- (28) King, A., Burrows, T.D., Hiby, S.E., Bowen, J.M., Joseph, S., Verna, S., Lim, P.B., Gardner, L., Le Bouteiller, P., Ziegler, A., Uchanska-Ziegler, B., Loke, Y.W.: Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trofoblast-*Placenta*, 2000, 21, s.376-387
- (29) McMaster, M.T., Librach, C.L., Zhou, Y., Lim, K.H., Janatpour, M.J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C., Fischer, S.J.: Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts- *J. Immunol*, 1995, 154, s.3771-3778
- (30) King, A., Allan, D.S.J., Bowen, M., Powis, S.J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S.E., McMichael, A.J., Loke, Y.W., Braud, V.M.: HLA-E is expressed on trofoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells-*Eur J Immunol*, 2000, 30, s.1623-1631
- (31) Shobu, T., Sageshima, N., Tokui, H., Omura, M., Saito, K., Nagatsuka, Y., Nakanishi, M., Hayashi, Y., Hatake, K., Ishitani, A.: The surface expression of HLA-F on decidual trofoblasts increases from mid to term gestation-*J Reprod Immunol*, 2006, 72, s.18-32
- (32) Lopez-Botet, M., Bellon, T., Llano, M., Navarro, F., Garcia, P., de Miguel, M.: Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules-*Hum Immunol*, 2000, 61, s.7-17
- (33) Rajagopalan, S., Bryceson, Y.T., Kuppusamy, S.P., Geraghty, D.E., van der Meer, A., Joosten, I., Long, E.O.: Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G-*PLoS Biol*, 2006, 4:e9
- (34) Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y.: Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface-*Nat Med*, 2006, 12, s.1065-1074
- (35) van der Meer, A., Lukassen, H.G.M., van Cranenbroek, B., Weiss, E.H., Braat, D.D.M., van Lierop, M.J., Joosten, I.: Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killers cells-*Mol Hum Reprod*, 2007, 13, s.123-133
- (36) Miah, S.M., Hughes, T.L., Campbell, K.S.: KIR2DL4 defferentially signals downstream functions in human NK cells through distinct structural modules-*J Immunol*, 2008, 180, s.2922-2932
- (37) Blaschitz, A., Juch, H., Volz, A., Hutter, H., Daxboeck, C., Desoye, G., Dohr, G.: The soluble pool of HLA-G produced by human trofoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms-*Mol Hum Reprod*, 2005, 11, s.699-710
- (38) Yokoyama, W.M., Kim, S., French, A.R.: The dynamic life of natural killer cells-*Annu Rev Immunol*, 2004, 22, s.405-429

- (39) Timonen, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B.: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells-Journal of Experimental Medicine, 1981, 153, s.569-582
- (40) Herberman, R.B., Ortaldo, J.R.: Natural killer cells: their roles in defenses against disease-Science, 1981, 214, s.24-30
- (41) Quillet, A., Presse, F., Marchiol-Fournigault, C., Harel-Bellan, A., Benbunan, M., Ploegh, H., Fradelizi, D.: Increased resistance to non-MHC-restricted cytotoxicity related to HLA A, B expression. Direct demonstration using beta 2-microglobulin-transfected Daudi cells-Journal of Immunology, 1988, 141, s.17-20
- (42) Höglund, P., Ohlén, C., Carbone, E., Franksson, L., Ljunggren, H.G., Latour, A., Koller, B., Kärre, K.: Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice-Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1991, 88, s.10332-10336
- (43) Hercend, T., Griffin, J.D., Bensussan, A., Schmidt, R.E., Edson, M.A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F., Ritz, J.: Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes-Journal of Clinical Investigation, 1985, 75, s.932-943
- (44) Lanier, L.L., Testi, R., Bindl, J., Phillips, J.H.: Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule- Journal of Experimental Medicine, 1989, 169, s.2233-2238
- (45) Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., Phillips, J.H.: The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes-Journal of Immunology, 1986, 136, s.4480-4486
- (46) Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., Edelman, G.M.: Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing,-Science, 1987, 236, s.799-806
- (47) Eriksson, M., Meadows, S.K., Wira, C.R., Sentman, C.L.: Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF- β -Journal of leukocyte biology, 2004, 76, s.667-675
- (48) Voss, S.D., Daley, J., Ritz, J., Robertson, M.J.: Participation of the CD94 Receptor Complex in Costimulation of Human Natural Killer Cells-Journal of Immunology, 1998, 160, s.1618-1626
- (49) Nagler, A., Lanier, L.L., Phillips, J.H.: Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo-Journal of Experimental Medicine, 1990, 171, s.1527-1533
- (50) Matos, M.E., Schnier, G.S., Beecher, M.S., Ashman, L.K., Caligiuri, D.E.W., Caligiuri, M.A.: Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells-Journal of Experimental Medicine, 1993, 178, s.1079-1084
- (51) Hanna, J., Wald, O., Goldman-Wohl, D., Prus, D., Markel, G., Gazit, R., Katz, G., Haimov-Kochman, R., Fujii, N., Yagel, S., Peled, A., Mandelboim, O.: CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16-human natural killer cells-Blood, 2003, 102, s.1569-1577
- (52) Henkart, P.A.: Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules-Immunity, 1994, 1, s.343-346
- (53) Clark, R., Griffiths, G.M.: Lytic granules, secretory lysosomes and disease-Current Opinion in Immunology, 2003, 15, s.516-521
- (54) Screpanti, V., Wallin, R.P.A., Ljunggren, H.G., Grandien, A.: A central role for dech receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells-Journal of Immunology, 2001, 167, s.2068-2073
- (55) Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., Okumura, K.: Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells-Nature medicine, 2001, 7, s.94-100
- (56) Montel, A.H., Bochan, M.R., Hobbs, J.A., Lynch, D.H., Brahmi, Z.: Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells-Immunology, 1995, 166, s.236-246
- (57) Lee, R.K., Spielman, J., Zhao, D.Y., Olsen, K.J., Podack, E.R.: Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells-Journal of Immunology, 1996, 157, s.1919-1925

- (58) Arase, H., Arase, N., Saito, T.: Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells-Journal of experimental medicine, 1995, 181, s.1235-1238
- (59) Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S., Miyazaki, S.: Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells-Journal of Immunology, 1996, 157, s.2909-2915
- (60) Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., Taniguchi, M.: Predominant expression of invariant V α 14⁺TCR α -chain in NK1.1⁺ T cell populations-International Immunology, 1995, 7, s.1157-1161
- (61) Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M.E., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., Brutkiewicz, R.R.: CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes-Science, 1995, 268, s.863-865
- (62) Zlotnik, A., Godfrey, D.I., Fischer, M., Suda T.: Cytokine production by mature and immature CD4⁺CD8⁻ T cells. Alpha beta-T cell receptor⁺ CD4⁺ CD8⁻ T cells produce IL-4.-Journal of Immunology, 1992, 149, s.1211-1215
- (63) Godfrey, D.I., H. MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Kaer, L.V.: NKT cells: what's in a name?- Nature Reviews Immunology, 2004, 4, s.231-237
- (64) Hammond, K.J.L., Pellicci, D.G., Poulton, L.D., Naidenko, O.V., Scalzo, A.A., Baxter, A.G., Godfrey, D.I.: CD1d-Restricted NKT Cells: An Interstrain Comparison-Journal of Immunology, 2001, 167, s.1164-1173
- (65) Matsuda, J.L., Naidenko, O.V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, Ch., Koezuka, Y., Kronenberg, M.: Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using CD1d Tetramers-Journal of experimental Medicine, 2000, 192, s.741-754
- (66) Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L., Bendelac, A.: Distinct Functional Lineages of Human V α 24 Natural Killer T Cells-Journal of experimental Medicine, 2002, 195, s.637-641
- (67) Benlagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L., Bendelac, A.: In Vivo Identification of Glycolipid Antigen-specific T Cells Using Fluorescent CD1d Tetramers-Journal of experimental Medicine, 2000, 191, s.1895-1903
- (68) Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., Ravetch, J.V.: FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects-Cell, 1994, 76, s.519-529
- (69) Hazenbos, W.L.W., Gessner, J.E., Hofhuis, F.M.A., Kuipers, H., Meyer, D., Heijnen, A.F.M., Schmidt, R.E., Sandor, M., Capel, P.J.A., Daëron, M., van de Winkel, J.G.J., Verbeek, J.S.: Impaired IgG-Dependent Anaphylaxis and Arthus Reaction in Fc γ RIII (CD16) Deficient Mice-Immunity, 1996, 5, s.181-188
- (70) Ravetch, J.V., Kinet, J.P.: Fc Receptors-Annual review of Immunology, 1991, 9, s.457-492
- (71) Perussia, B., Tutt, M.M., Qiu, W.Q., Kuziel, W.A., Tucker, P.W., Trinchieri, G., Bennett, M., Ravetch, J.V., Kumar, V.: Murine natural killer cells express functional Fc γ receptor II encoded by the Fc γ R α gene-Journal of experimental Medicine, 1989, 170, s.73-86
- (72) Chambers, W.H., Vujanovic, N.L., DeLeo, A.B., Olszowy, M.W., Herberman, R.B., Hiserodt, J.C.: Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells-Journal of Experimental Medicine, 1989, 169, s.1373-1389
- (73) Karlhofer, F.M., Ribaldo, R.K., Yokoyama, W.M.: MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2-activated natural killer cells-Nature, 1992, 358, s.66-70
- (74) Lanier, L.L., Chang, C., Phillips, J.H.: Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes-Journal of Immunology, 1994, 153, s.2417-2428
- (75) Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., Roark, J.H.: Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function-Annual Review of Immunology, 1997, 15, s.535-562
- (76) Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Spies, T.: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA-Science, 1999, 285, s.727-729
- (77) Cerwenka, A., Bakker, A.B.H., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J.H., Lanier, L.L.: *Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice-Immunity*, 2000, 12, s.721-727

- (78) Diefenbach, A., Jamieson, A., Liu, S.D., Shastri, N., Raulet, D.H.: Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages-Nature Immunology, 2000, 1, s.119-126
- (79) Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B.H., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., Phillips, J.H.: An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10-Science, 1999, 285, s.730-732
- (80) Yokoyama, W.M.: Natural killer cells. Right-side-up and up-side-down NK-cell receptors.-Current Biology, 1995, 5, s.982-985
- (81) Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Pende, D., Virale, M., Poggi, A., Mingari, M.C., Moretta, L.: Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes-Immunological Reviews, 1997, 155, s.105-117
- (82) Long, E.O.: Regulation of immune responses through inhibitory receptors-Annual Review of Immunology, 1999, 17, s.875-904
- (83) Trowsdale, J.: Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes-Immunity, 2001, 15, s.363-374
- (84) Selvakumar, A., Steffens, U., Dupont, B.: NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains-Tissue Antigens, 1996, 48, s.285-295
- (85) Yusa, S., Catina, T.L., Cambell, K.S.: SHP-1- and Phosphotyrosine-Independent Inhibitory Signaling by a Killer Cell Ig-Like Receptor Cytoplasmic Domain in Human NK Cells-Journal of Immunology, 2002, 168, s.5047-5057
- (86) Rajagopalan, S., Fu, J., Long, E.O.: Cutting Edge: Induction of IFN- γ Production but Not Cytotoxicity by the Killer Cell Ig-Like Receptor KIR2DL4 (CD158d) in Resting NK Cells-Journal of Immunology, 2001, 167, s.1877-1881
- (87) Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., Trowsdale, J.: Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families-Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2000, 97, s.4778-4783
- (88) Colonna, M., Navarro, F., Bellón, T., Llano, M., García, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., López-Botet, M.: A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells- Journal of Experimental Medicine, 1997, 186, s.1809-1818
- (89) Borges, L., Hsu, M.L., Kubin, M., Cosman, D.: A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules-Journal of Immunology, 1997, 159, s.5192-5196
- (90) Chapman, T.L., Heikeman, A.P., Bjorkman, P.J.: The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18-Immunity, 1999, 11, s.603-613
- (91) Bellón, T., Kitzig, F., Sayós, J., López-Botet, M.: Mutational Analysis of Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motifs of the Ig-Like Transcript 2 (CD85j) Leukocyte Receptor-Journal of Immunology, 2002, 168, s.3351-3359
- (92) Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., Hsu, M.L.: A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules-Immunity, 1997, 7, s.273-282
- (93) Banham, A.H., Colonna, M., Cella, M., Micklem, K.J., Pulford, K., Willis, A.C., Mason, D.Y.: Identification of the CD85 antigen as ILT2, an inhibitory MHCclass I receptor of the immunoglobulin superfamily-Journal of Leukocyte Biology, 1999, 65, s.841-845
- (94) Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L., Mingari, M.C.: Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: Decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor- Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1999, 96, s.5674-5679
- (95) Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Jones, E.Y., van der Merwe, P.A., Kumaqai, I., Maenaka, K.: Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G-Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 2003, 100, s.8856-8861

- (96) Merlo, A., Saverino, D., Tenca, C., Grossi, C.E., Bruno, S., Ciccone, E.: CD85/LIR-1/ILT2 and CD152 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) Inhibitory Molecules Down-Regulate the Cytolytic Activity of Human CD4+ T-Cell Clones Specific for Mycobacterium tuberculosis-Infection and Immunity, 2001, 69, s.6022-6029
- (97) Saverino, D., Fabbi, M., Ghiotto, F., Merlo, A., Bruno, S., Zarcone, D., Tenca, C., Tiso, M., Santoro, G., Anastasi, G., Cosman, D., Grossi, C.E., Ciccone, E.: The CD85/LIR-1/ILT2 Inhibitory Receptor Is Expressed by All Human T Lymphocytes and Down-Regulates Their Functions-Journal of Immunology, 2000, 165, s.3742-3755
- (98) Ince, M.N., Harnisch, B., Xu, Z., Lee, S.K., Lange, C., Moretta, L., Lederman, M., Lieberman, J.: Increased expression of the natural killer cell inhibitory receptor CD85j/ILT2 on antigen-specific effector CD8 T cells and its impact on CD8 T-cell function-Immunology, 2004, 112, s.531-542
- (99) Lozzio, C.B., Lozzio, B.B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome-Blood, 1975, 45, s.321-334.
- (100) Drexler, H.G.: The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook-San Diego: Academic Press, 2000
- (101) Fišerová, A., Starec, M., Kuldová, M., Kovářů, H., Páv, M., Vannucci, L., Pospíšil M.: Effects of D2-dopamine and alpha-adrenoceptor antagonists in stress induced changes on immune responsiveness of mice.-J Neuroimmunol. 2002;130(1-2), s.55-65
- (102) Fišerová, A., Kovářů, H., Hajduová, Z., Mareš, V., Starec, M., Křen, V., Flieger, M., Pospíšil, M.: Neuroimmunomodulation of natural killer (NK) cells by ergot alkaloid derivatives-Physiol. Research, 1997, 46, s. 119-125
- (103) Brady J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Nutt, S.L.: IL-21 Induces the Functional Maturation of Murine NK cells-Journal of Immunology, 2004, 172, s.2048-2058
- (104) Fehniger, T.A., Cooper, A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., Caligiuri, M.A.: CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity-Blood, 2003, 101, s.3052-3057
- (105) Faure, M., Long, E.O.: KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory potential-Journal of Immunology, 2002, 168, s.6208-6214
- (106) Fukui, A., Fujii, S., Yamaguchi, E., Kimura, H., Sato, S., Saito, Y.: Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing in vitro fertilization- American journal of reproductive immunology, 1999, 41, s.413-422
- (107) Kane, K.L., Ashton, F.A., Schmitz, J.L., Folds, J.D.: Determination of natural killer cell function by flow cytometry-Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 3, s.295-300
- (108) Ntrivalas, E.I., Kwak-Kim, J.Y.H., Gilman-Sachs, A., Chung-Bang, H., Ng, S.C., Beaman, K.D., Mantouvalos, H.P., Beer, A.E.: Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown etiology-Human reproduction, 2001, 16, s.855-861
- (109) Coulam, C.B., Roussev, R.: Correlation of NK Cell Activation and Inhibition Markers with NK Cytotoxicity Among Women Experiencing Immunologic Implantation Failure After In Vitro Fertilization and Embryo Transfer- Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2003, 20, s.58-62