

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**STANOVENÍ AUTOPROTILÁTEK U ŽEN S PORUCHOU
PLODNOSTI**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Konzultant: MUDr. Karin Malíčková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

Helena Kopřivová

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

V Hradci Králové 23.3.2014

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy za vedení bakalářské práce a za humor, který vkládá do výuky svých studentů. Primářce MUDr. Karin Malíčkové z imunologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, která byla mojí velkou oporou při psaní bakalářské práce a pomohla mi nejen odbornou konzultací, ale i při statistickém zpracování dat.

Další poděkování patří Ing. Miroslavu Hindošovi a RNDr. Ivaně Janatkové z imunologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, za poskytnutý obrazový materiál a korekci mé práce a celému kolektivu laboratoře za podporu.

Také bych ráda poděkovala lékařům z Centra asistované reprodukce Gynekologicko-porodnické kliniky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty v Praze za neoblomnou snahu v boji s neplodností.

V neposlední řadě chci touto cestou poděkovat své rodině. Manželovi, který mě hlavně v posledních měsících podporoval a vzal na svá bedra chod domácnosti. Rodičům svým i manželovým, že se postarali o mé děti ve dnech, které jsem trávila ve školní lavici. A mým dětem za to, že chodily včas spát a já se mohla věnovat studiu.

ABSTRAKT

Autor: Helena Kopřivová

Název: Stanovení autoprotilátek u žen s poruchou plodnosti

Studijní obor: Zdravotní laborant, kombinovaná forma

Cíl práce:

V bakalářské práci jsem se pokusila shrnout dosavadní poznatky o souvislosti mezi přítomností autoimunitních chorob, respektive autoprotilátek a infertilitou, popř. sterilitou. Tyto poznatky jsem porovnávala s výskytem autoprotilátek a souvislostí jejich výskytu ve skupině 150 žen, odeslaných k podrobnějšímu vyšetření reprodukčním imunologem.

Hlavní poznatky:

Neplodnost trápí přibližně 10 % světové populace. U většiny těchto žen je příčina neplodnosti odhalena. U přibližně 10 % žen je infertilita začleněna do kolonky „z neznámých příčin“. U této skupiny žen je nutné vyloučit imunologický problém, který brání otěhotnění nebo vede k opakovaným potratům.

V naší skupině se jednalo o 150 pacientek. U 46 % pacientek byla diagnostikována některá z palety autoimunitních chorob ještě před návštěvou centra asistované reprodukce. V jejich případě byla včasná a řádná diagnostika autoimunity podmínkou další léčby technikami asistované reprodukce. Velmi signifikantní byla přítomnost pozitivního antinukleárního faktoru. Pozitivní protilátky proti tkáňové transglutamináze související s celiakií byly potvrzeny až u 18 % žen, které opakovaně potracely. Jasně známou skutečností je i závislost mezi přítomností antifosfolipidových protilátek a protilátek proti annexinu V a to zejména u žen s opakovanými potraty. Mezi orgánově specifickými protilátkami, jako jsou protilátky proti ovariím a zona pellucida, byla pozitivní přítomnost přibližně u 5 % žen. U 17 % žen se objevily protilátky proti spermiím a to ve skupině sterilních žen.

Závěr:

Ve své práci jsem se pokusila upozornit na kauzální asociace sterility a infertility s určitým spektrem autoprotilátek, což bylo ve studovaném souboru prokázáno zejména u antifosfolipidových protilátek, protilátek proti annexinu V, protilátek proti spermiím a protilátek stanovených při diagnostice celiakie.

ABSTRACT

Author: Helena Kopřivová

Title: Autoantibodies in women with infertility

Field of study: Medical laboratory technician, combined study form

Aim of the thesis:

In the thesis I have attempted to summarize the current knowledge on the relationship between the presence of autoimmune diseases or autoantibodies and infertility, with a focus on sterility. I compared these findings with the presence of autoantibodies and in relation to their occurrence in a group of 150 women who were referred to a detailed examination from a reproductive immunologist.

Main findings:

Infertility affects approximately 10 % of the world's population. For most of the women affected the cause of infertility is known. Approximately 10 % of women's infertility falls under the category of "unknown reasons". In a study group of 150 women it was necessary to exclude immunological problems that prevented pregnancy or led to repeated abortions.

In our study group, 46 % of the infertile women were diagnosed with any of a variety of autoimmune diseases before visiting the center for assisted reproduction. In their cases, an early and proper diagnosis of autoimmune disease was a prerequisite to subsequent treatment techniques of assisted reproduction. The presence of positive anti-nuclear factor was very significant. Testing for antibodies against tissue transglutaminase, associated with celiac disease was confirmed in 18 % of women who repeatedly miscarried. A clearly known fact is the correlation between the presence of antiphospholipid antibodies and antibodies against Annexin V, particularly in women with repeated miscarriages. Among other organ-specific antibodies, such as antibodies against ovaria and zona pellucida, was the positive presence demonstrated in approximately 5 % of women. In 17 % of the group of infertile women antibodies against sperm were discovered.

Conclusion:

In my thesis I have tried to draw attention to the causal association of sterility and infertility with a certain spectrum of autoantibodies, which was proven in a study group, especially for antiphospholipid antibodies, antibodies against Annexin V, sperm antibodies, and antibodies provided in the diagnosis of celiac disease.

Obsah

PODĚKOVÁNÍ.....	3
ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT	5
OBSAH	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ:.....	7
ČÁST I - PŘEHLED TEORETICKÝCH POZNATKŮ.....	8
1. ÚVOD	8
1.1 Sterilita	8
1.2 Infertilita.....	8
1.3 Indikace imunologického vyšetření v reprodukční medicíně	9
2. AUTOIMUNITNÍ CHOROBY U ŽEN	9
2.1 Důvody vzniku autoimunitních chorob u žen	10
2.1.1 Hormony a imunitní systém	10
2.1.2 Genetické faktory a imunitní systém	13
2.1.3 Mikrochimerismus.....	13
2.2 Autoprotilátky objevující se u pacientek se sterilitou nebo infertilitou	13
2.2.1 Orgánově specifické autoprotilátky	14
2.2.2 Orgánově nespecifické autoprotilátky	16
ČÁST II - EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE.....	23
3. PŘEDMĚT STUDIE A CÍL PRÁCE	23
3.1 Studovaná populace	23
3.2 Vyšetřované parametry	23
3.3 Formulace výzkumného problému	24
4. METODIKA.....	24
5. ANALÝZA VÝSLEDKŮ.....	26
5.1 Deskriptivní charakteristika souboru neplodných žen s autoimunitním laděním organismu	26
5.2 Vyhodnocení jednotlivých parametrů a jejich závislosti na postižení	29
5.2.1 Vyhodnocení výsledků vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze	29
5.2.2 Vyhodnocení výsledků vyšetření antifosfolipidových protilátek	30
5.2.3 Vyhodnocení výsledků autoprotilátek proti annexinu V.....	31
5.2.4 Vyhodnocení výsledků vyšetření protilátek proti ovariím, zona pellucida a spermíím	33
5.2.5 Vyhodnocení přítomnosti antinukleárních protilátek	33
6. DISKUZE	34
7. ZÁVĚR.....	36
8. SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK	37
9. LITERATURA	38

Seznam použitých zkratk a symbolů:

AANNXV	Protilátky proti annexinu V
ANA	Antinukleární protilátky
ANF	Antinukleární faktor
Anti-ENA	Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům
Anti-tTG	Protilátky proti tkáňové transglutamináze
AOVA	Antiovariální protilátky
APLA	Antifosfolipidové protilátky
APS	Antifosfolipidový syndrom (z ang. Antiphospholipid syndrome)
ARA	Antiretikulární protilátky
ASA	Antispermatozoidální protilátky
ASMA	Protilátky proti hladkému svalu
AZPA	Protilátky proti zona pellucida
CAR	Centrum asistované reprodukce
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FSH	Folikuly stimulující hormon
HLA	Human Leucocyte Antigen
IF	Imunofluorescence
IgA	Imunoglobulín A
IgG	Imunoglobulín G
IgM	Imunoglobulín M
ISCI	Injekce spermií do vajíčka (z ang. Intracytoplasmic Sperm Injection)
IVF	<i>In vitro</i> fertilizace
La	La protein (z ang. Lane)
LLA	Lupus-Like Antikoagulant
LN	Lupus nephritis
PAP	Placentární antikoagulační faktor
POF	Předčasné ovariální selhání (z ang. Premature Ovarian Failure)
RNP	Ribonucleoprotein particle
Ro	Robertsův protein
RPL	Opakované potrácení plodu (z ang. Recurrent Pregnancy Loss)
RS	Roztroušená skleróza
SLE	Systémový lupus erythematosus
Sm	Smithův antigen
SS	Sjögrenův syndrom
SSA	Solubilní substance A
SSB	Solubilní substance B
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice

STANOVENÍ AUTOPROTILÁTEK U ŽEN

S PORUCHAMI PLODNOSTI

ČÁST I - PŘEHLED TEORETICKÝCH POZNATKŮ

1. Úvod

Neplodnost párů, které chtějí počít dítě, je velmi vážným sociálním, ale i zdravotním problémem, který v dnešní době tíží naši společnost. Jedná se o stav, který byl v minulosti přehlížen a podceňován. V současné době se na jeho řešení zaměřuje stále větší pozornost, především na zdravotnické úrovni. Do budoucna bude nezbytné pohlížet na neplodnost z komplexního hlediska, protože počet neplodných párů se neustále zvyšuje.

1.1 Sterilita

Sterilita je definována jako neschopnost otěhotnět po dobu 12 měsíců pravidelného nechráněného sexuálního styku u lidí v plodném věku. V České republice je sterilních přibližně 20 %¹⁾ párů ve fertilním věku. V celosvětovém měřítku jde přibližně o 10 % párů²⁾. Příčiny tohoto stavu lze nalézt v různých odvětvích medicíny (endokrinologie, gynekologie, urologie, genetika, revmatologie, dermatovenerologie). Další příčiny zřejmě spočívají v psychogenní alteraci, ve zhoršujícím se životním prostředí a zvyšující se hladině stresu. U 20 % párů je pak příčina sterility zahrnuta pod kolonku „z neznámých příčin“. Značnou část z nich pak tvoří ty, které souvisí s imunitním systémem a jeho odchylkami.

1.2 Infertilita

Druhým velkým problémem je infertilita. Opakované potrácení plodu (Recurrent pregnancy loss - RPL) je definováno jako dva (American Fertility Society) nebo tři (European Society of Human Reproduction and Embryology and Royal College of Obstetricians and Gynaecologists) po sobě jdoucí habituální potraty plodu. Jedná se celosvětově přibližně o 1 % párů³⁾, české statistiky hovoří o 2 až 5 %. I v problému in-

fertility se objevují komplikace spojené s nemocemi imunitního systému a jeho odchylek.

Patologické chování imunitního systému ovlivňuje kvalitu zárodečných buněk, placenty a samotný proces fertilizace, nidace a vývoj plodu. Poškozuje plod a má vliv na funkci endokrinních žláz. Porucha způsobená ženským elementem je přibližně ve stejném procentuálním zastoupení jako u mužů.

1.3 Indikace imunologického vyšetření v reprodukční medicíně

Indikace imunologického vyšetření párů s poruchou plodnosti je následující⁴⁾:

- 1) Páry, kterým se nepodařilo dosáhnout těhotenství po roce pravidelného nechráněného pohlavního styku.
- 2) Ženy s opakovanými spontánními ztrátami plodu (po dvou spontánních potratech bez rozdílu věku).
- 3) Neúspěch metod asistované reprodukce (neotěhotnění, nedonošení životaschopného plodu). Indikace po dvou neúspěšných IVF (*in vitro* fertilizace IVF).

2. Autoimunitní choroby u žen

Autoimunitní choroby (Autoimmune diseases - AD) postihují okolo 5 % světové populace. Z této skupiny, celých 78 % případů představují ženy⁵⁾, viz Tabulka 1. AD vznikají souhrou genetických faktorů, vlivem životního prostředí a selháním imunitních mechanismů.

Tabulka 1: Poměr zastoupení autoimunitních chorob u mužů a žen

Autoimunitní choroba	poměr ženy:muži
Sjögrenův syndrom	9:1
Primární biliární cirhoza	9:1
Systémový lupus erythematoses	9:1
Antifosfolipidový syndrom	9:1
Autoimunitní onemocnění štítné žlázy	8:1
Roztroušená skleróza	2:1

Zdroj: K.Pollard Michael. Gender differences in autoimmunity associated with exposure to environmental factors. *Journal of Autoimmunity* 38(2012) J177-J186

2.1 Důvody vzniku autoimunitních chorob u žen

Důvody častějšího vzniku AD u žen mohou být hormonální, může se uplatnit ovlivnění genetickými faktory vázanými na X chromozom nebo tzv. mikrochimerismus. Ten je definovaný jako pohyb hematopoetických kmenových buněk krevního oběhu plodu do krevního oběhu matky, kde tyto buňky přežívají a mohou se podílet na vzniku AD.

2.1.1 Hormony a imunitní systém

Estrogeny, androgeny a prolaktin jsou hlavními skupinami hormonů, které jsou studovány ve vztahu ke vzniku AD. Ovlivňují přirozenou i získanou imunitu. Prochod imunitního systému je podstatné, aby hormony byly schopné se navázat na receptory exprimované imunokompetentními buňkami. B-lymfocyty syntetizují androgenové i estrogenové receptory. Při pokusech na myších bylo prokázáno, že CD8+ buňky mají spolu s monocyty, neutrofilami a NK buňkami estrogenové receptory⁶⁾.

Estrogeny ovlivňují populaci pomocných T-helper2 (Th2) lymfocytů, které hrají roli v aktivaci B-lymfocytů a tvorbě protilátek. Studie ukazují, že mohou regulovat prezentaci antigenů makrofágy a dendritickými buňkami⁷⁾.

Naopak androgeny ovlivňují populaci pomocných T-helper1 (Th1) lymfocytů a aktivují CD8+ lymfocyty⁸⁾. Prolaktin stimuluje jak humorální, tak buněčnou imunitu⁹⁾.

2.1.1.1 Hormony a autoimunitní choroby

Disbalanční stav hormonálních hladin, narušující jednu z hlavních součástí udržení homeostázy, může být důvodem vzniku autoimunitních chorob, které mají vliv i na případnou sterilitu nebo infertilitu. Jedná se hlavně o systémový lupus erythematosus (SLE), Sjörgenův syndrom (SS) nebo roztroušenou sklerózu (RS).

Systémový lupus erythematosus (SLE)

SLE je autoimunitní imunopatologické onemocnění, které postihuje častěji ženy. Tendence zhoršení nemoci se objevuje od těhotenství až do období menopauzy. Estrogen a prolaktin působí jako imunitní stimulanty dozrávání a selekce autoreaktivních B-lymfocytů a tvorby autoprotilátek. U 22 - 33 % pacientek s diagnostikovaným SLE může být stanovena těžká hyperprolaktinémie¹⁰⁾. Disbalance mezi hladinami hormonů je výsledkem snížené hladiny imunosupresivních androgenů a zvýšenou

produkcí estrogenů, než je tomu u běžné populace žen¹¹⁾. Část pacientek trpí hypoandrogenismem, nízkou hladinou testosteronu a sníženou hladinou luteinizačního hormonu (LH), což ovlivňuje reprodukční schopnost žen. Velkou komplikací u žen trpících SLE je vznik sekundárního antifosfolipidového syndromu (Antiphospholipid syndrome - APS) a následně komplikace s ním spojené.

Autoprotilátky, které spolu s dalšími diagnostickými ukazateli stanovujeme u podezření na SLE, jsou: antinukleární protilátky (ANA) a anti-ds-DNA ve vysokých titrech, protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (anti-ENA) - konkrétně anti Sm, které jsou pro pacienty se SLE specifické, anti-Ro (SSa) a anti-La (SSb), Lupus-Like Anticoagulant (LLA) nebo antikadiolipinové protilátky (aCL), viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Četnost výskytu autoprotilátek u aktivní formy SLE.

Autoprotilátky	Výskyt v %	Metoda Detekce
ANA - v abnormálně vysokých titrech	90%	IF
Anti-ds-DNA - v abnormálně vysokých titrech	90%	IF, ELISA
Anti-Sm	30%	ELISA
Anti-Ro (SSa)	35%	ELISA
Anti-La (SSb)	15%	ELISA

Zdroj: Fučíková T. Klinická imunologie v praxi. Druhé, přepracované vydání. Galén 1997; 158-162.

Ženám se SLE je indikovaná perorální antikoncepce (optimálně čistě gestagenová) a přesné načasování otěhotnění metodou asistované reprodukce. Otěhotnění je nutné načasovat na dobu remise onemocnění, kdy je snižená pravděpodobnost opětovného vzplanutí nemoci v průběhu těhotenství nebo po porodu.

V případě, že pacientka otěhotní během aktivní formy nemoci, může dojít k poškození ženy i plodu. Závažnou komplikací SLE je lupusová nefritida (LN), která je spojena s výraznou proteinurií. K propuknutí LN dochází u 65 až 92 %¹²⁾ těhotných pacientek s aktivní formou SLE. Další komplikací je předčasný porod a úmrtí plodu před 28. týdnem těhotenství. K předčasnému porodu dochází nejčastěji v souvislosti s vysokými titry anti-ds-DNA protilátek. Dále při snížení množství krevních elementů v důsledku anemie a trombocytopenie, hypertenze a jistě i v důsledku imunosupresivní léčby, která pacientkám musí být podávána.

Hlavní komplikací týkající se neplodnosti u žen se SLE je kombinace výskytu LLA nebo aCL, které vedou k opakovaným RPL a to až u 60 - 95 % pacientek se SLE¹³⁾. Poruchu plodnosti u žen se SLE může ovlivňovat hormonální disbalance, vyvolaná přítomností autoantilátok a léčbou steroidy, která vede k poruchám menstruace a anovulačním cyklům.

Sjögrenův syndrom

Sjögrenův syndrom (SS) je autoimunitní onemocnění, které postihuje především ženy. Hlavním příznakem tohoto onemocnění jsou vysychající sliznice. Ty však nemusí způsobovat vážné problémy a jsou pacientkami opomíjeny. Nemoc je asociována s RPL i sterilitou. Pokud se pacientkám podaří otěhotnět, může u plodu dojít ke vzniku AV-bloku III. stupně, což je významná srdeční vada. Tuto vadu je nutno léčit ještě intrauterinně. Existuje také riziko vzniku novorozeneckého SLE¹⁴⁾. U pacientek častěji nacházíme zvýšenou hladinu prolaktinu, která může vést k hormonálním poruchám a následně k problémům s otěhotněním.

Diagnosticky důležité jsou pozitivní ANA, anti-ENA, konkrétně anti-Ro (SSa) a anti-La (SSb). Ty jsou velmi signifikantní pro SS.

Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je autoimunitní onemocnění bílé hmoty centrální nervové soustavy. Pochody spojené s RS vedou ke ztrátě myelinu v zánětlivých ložiscích a následně k difuzní ztrátě axonů. Postihuje ženy v poměru k mužům 2:1 (Tabulka 1). Vznik RS může být ovlivněn geneticky. Značnou úlohu zde hrají také hladiny hormonů.

Onemocnění může způsobit zvýšenou hladinu estrogenu a progesteronu v důsledku poškození osy hypotalamus-hypofýza-gonády a to převážně ve třetím trimestru těhotenství¹⁵⁾. Může docházet ke zvýšení hladiny prolaktinu¹⁶⁾. Ta negativně ovlivňuje schopnost ženy otěhotnět a donosit plod. Dále může docházet k hyperkoagulačním stavům a následným trombózám v oblasti placenty, které končí poškozením plodu nebo abortem.

U žen s diagnózou RS lze detekovat celou řadu orgánově nespecifických autoantilátok. Jejich výskyt je však do značné míry dán imunointervenční terapií, která je ženě z důvodu RS podávána. Nejčastěji u pacientek prokazujeme přítomnost pozi-

tivních ANA protilátek. V souvislosti s poruchami plodnosti patří k nejvýznamnějším autoprotilátkám se zvýšeným výskytem APLA a protilátky proti annexinu V.

U žen s RS se objevuje také zvýšená možnost sterility a infertility v důsledku hormonálních změn. Tyto změny v hladinách hormonů jsou důsledkem poškození organismu autoimunitními procesy. Prodělané těhotenství může vést k progresivnějšímu průběhu onemocnění. Příčinou je odblokování predispozičních genů následkem hormonálních změn během gravidity a šestinedělí, přičemž hlavní role je přisuzována estrogenům. Přibývá rovněž informací o tom, že fetální antigeny přímo ovlivňují matčin imunitní systém, indukují vznik a expanzi antigen-specifických klonů T-regulačních lymfocytů a spouští kaskádu dějů vedoucích k rozvoji RS¹⁷⁾.

2.1.2 Genetické faktory a imunitní systém

Genetické faktory podstatně ovlivňují náchylnost jednotlivců ke vzniku konkrétní AD a podílejí se na vzniku a rozvoji autoimunitních chorob. Ve vztahu k poruchám plodnosti je důležité zmínit vliv X chromozomu. X chromozom má totiž unikátní epigenetickou charakteristickou vlastnost a to, že jeden ze dvou X chromozomů je u žen inaktivován. Expresi X-vázaných znaků ovlivňuje zcela náhodná inaktivace jednoho z X chromozomů a podíl buněk s aktivní anebo mutantní alelou tak může být velmi variabilní. Na chromozomu X se nejspíše nacházejí desítky genů, které mohou být asociovány s AD, variabilita však může sahát od prakticky normálního stavu až po úplnou manifestaci autoimunitní choroby.

2.1.3 Mikrochimerismus

Mikrochimerismus je definovaný jako pohyb hematopoetických kmenových buněk z krevního oběhu plodu do krevního oběhu matky. Přítomnost malého množství těchto buněk, které jsou tělu cizí, a jsou tudíž geneticky odlišné od buněk hostitelského jedince, může vyvolat vznik autoimunitního onemocnění.

Studie naznačují, že opakovaná přítomnost mikrochimerických buněk, které pronikly z plodu do těla matky, může být zapojena do patogeneze systémové sklerózy¹⁹⁾, SLE nebo Hashimotovy thyreoditidy.

2.2 Autoprotilátky objevující se u pacientek se sterilitou nebo infertilitou

Autoprotilátky můžeme rozdělit do skupiny orgánově specifických autoprotilátek a orgánově nespecifických protilátek. Zatímco orgánově specifické protilátky

mohou poškozovat konkrétní tkáň nebo buňky reprodukčního systému, orgánově nespecifické mohou sloužit jako diagnostický základ pro identifikaci některých AD nebo mohou sloužit jako ukazatel některých poruch netýkajících se AD, ale systému jako takového.

2.2.1 Orgánově specifické autoprotilátky

Mezi orgánově specifické autoprotilátky sledované v předkládané studii můžeme zařadit antiovariální protilátky (AOVA), protilátky proti zona pellucida (AZPA) a protilátky proti spermiím (ASA).

2.2.1.1 Protilátky proti ovariím

Antiovariální protilátky jsou namířeny proti buňkám produkujícím steroidy (folikulární buňky, membrána granulóza, buňky theca folliculi interna a luteinní buňky). U těchto protilátek není zatím možné zjistit, jedná-li se pouze o následek poškození buněk ovaria nebo o přímý patologický stav porušení tolerance vlastního.

Protilátky proti ovariím se často objevují v kombinaci s jinými autoprotilátkami. U předčasného ovariálního selhání (Premature Ovarian Failure - POF), asociovaného s adrenální autoimunitou, jsou detekovány protilátky proti některým typům buněk produkujících steroidní hormony, jako jsou ovaria, testes nebo placenta. AOVA koexistují s dalšími autoprotilátkami typu protilátky proti thyroideální peroxidáze (anti-TPO) a protilátky proti tyreoglobulinu (anti-TG) u autoimunních tyreoditid. V některých případech se objevují i u SLE. Antiovariální protilátky se pak vyskytují u 10 až 30 % případů pacientek s POF¹⁹⁾.

Některé studie také poukazují na snížené schopnosti na otěhotnění po IVF u pacientek s prokázanými antiovariálními protilátkami²⁰⁾. U žen s pozitivitou AOVA je třeba počítat rovněž s neuspokojivou odpovědí na hormonální ovariální hyperstimulaci v IVF cyklech.

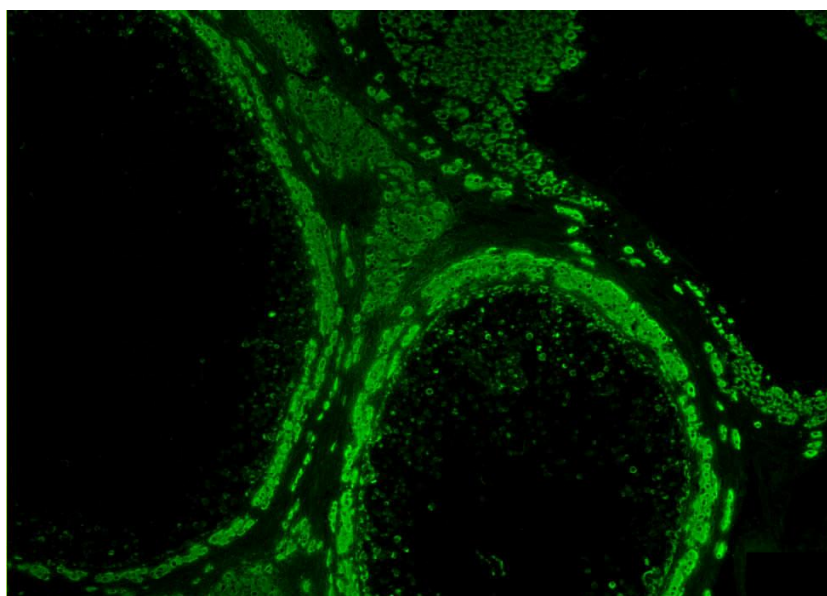
Syndrom předčasného ovariálního selhání

Jako syndrom předčasného ovariálního selhání je označován nástup menopauzy před dosažením věku 40 let a vyskytuje se průměrně u jednoho až dvou procent žen²¹⁾. Stejně jako fyziologická menopauza ve věku kolem 50 let je předčasná menopauza doprovázena zástavou menstruačního cyklu po dobu jednoho roku a více, zvýšenou hladinou folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a snížením hladiny estradiolu v krvi²²⁾. Některé případy POF mohou mít genetickou příčinu, např. u Turnerova syn-

dromu. U malého procenta žen má POF podklad v genetické predispozici nebo environmentální příčinu (virová infekce, chemoterapie nebo operace pánve).

Ženy s POF mohou mít chorobu asociovanou s adrenálním autoimunitním onemocněním, s jinou autoimunitní imunopatologickou chorobou jako je diabetes mellitus I. typu, Crohnova choroba, ulcerózní kolitidou, RS nebo primární biliární cirhóza. Může se také jednat o izolovanou idiopatickou POF, která je způsobená autoimunitními mechanismy, ale i environmentálními faktory.

Obrázek 1 Protilátky proti ovariím – metoda nepřímé imunofluorescence, tkáň opičích ovarií



Zdroj: <http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity/other-antibody-patterns/index.aspx>, 17.1.2014 20:35

2.2.1.2 Protilátky proti zona pellucida

Protilátky proti zona pellucida (AZPA) jsou namířené proti glykoproteinové matrix, která se nachází na povrchu oocytů a zajišťuje jejich povrchovou ochranu. Je to klíčové místo styku vajíčka a spermie. Zde se rozhoduje o jejich navázání a o samotném oplodnění vajíčka. Pokud žena vytváří protilátky proti zona pellucida, může dojít k situaci, že je tato zóna pro spermie neprostupná.

Zvýšená hladina těchto protilátek se nachází zejména u žen, které jsou opakovaně stimulovány pro odběr vajíček před IVF a u žen s izolovaným POF. Protilátky proti zona pellucida se objevují také u pacientek s endometriózou. Jejich primární

role zůstává nejistá. Koexistují však s jinými autoprotilátkami, které jsou příčinou autoimunitních poruch, které brání otěhotnění nebo způsobují RPL.

Experimentálním výzkumem na zvířecích modelech bylo zjištěno, že tyto protilátky brání vývoji folikulů²³.

2.2.1.2 Protilátky proti spermiím

Buněčné membrány hlaviček spermií obsahují četné antigenní komponenty, které se mohou imunitnímu systému jevit jako cizorodé. Důvodem je skutečnost, že varle patří k imunologicky privilegovaným orgánům a spermie jsou chráněny vrozenou expresí Fas ligandu (FasL nebo CD95L), který indukuje apoptózu T-lymfocytů. K prolomení tolerance a ke vzniku protilátek proti spermiím (ASA) u mužů i u žen může dojít v důsledku přecitlivělosti organismu (zejména v důsledku opakovaných infekcí urogenitálního traktu, po úrazech genitálu či jiném porušení homeostázy reprodukčních orgánů) a to hned po prvním setkání organismu se spermií. U žen se ASA objevují v oblasti cervixu, ale i v oblasti dutiny děložní - pak se jedná o izoprotilátky. Dále v oblasti tub, v peritoneální tekutině a v séru. Samotný vznik protilátek je závislý na povrchích spermií a na imunogenních látkách obsažených v seminální plazmě. Další důležitou roli hraje vnímavost rozpoznávacích systémů imunity, které mohou být ovlivněny také geneticky.

Protilátky proti spermiím mohou nepříznivě ovlivnit lidskou plodnost. Obvykle je imunitní odpověď organismu na toto „cizí těleso“ paralyzována působením anti-idiotypových protilátek spolu s imunosupresorovými faktory v ejakulátu. Tato rovnováha mezi škodlivým působením a "skutečnou" imunitní odpovědí může vyústit ve vznik protilátek proti spermiím a následný perzistující zánět.

Přítomnost ASA může komplikovat i procesy související s asistovanou reprodukcí a to jak v období prefertilizace, tak v postfertilizačním období. Důvodem je skutečnost, že některé cílové antigeny ASA mohou být exprimovány i na embryu v počátcích jeho intrauterinního vývoje.

2.2.2 Orgánově nespecifické autoprotilátky

Jedná se o autoprotilátky, které nejsou namířené proti konkrétnímu orgánu, ale určitému typu tkáně nebo jejích komponent. Mohou být diagnostikovány ve vztahu k AD nebo mohou způsobovat onemocnění ovlivňující schopnost otěhotnět, případně vedou i k RPL.

Do souboru vyšetření, které mohou být nápomocny ke správnému řešení problému sterility a infertility u žen, můžeme zařadit tyto sledované autoprotilátky: protilátky proti annexinu V, antifosfolipidové protilátky (APLA), protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG) a antinukleární autoprotilátky (ANA).

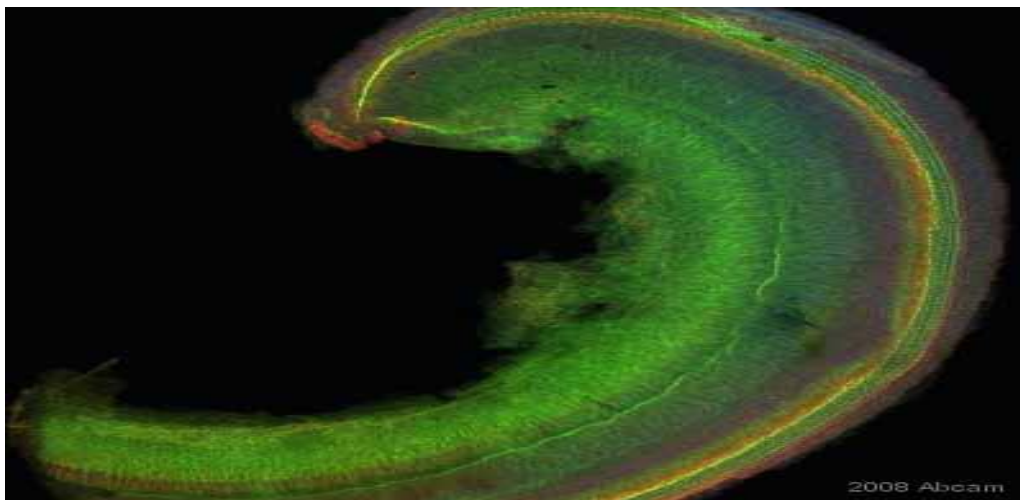
2.2.2.1 Protilátky proti annexinu V

Annexin V patří do skupiny placentárních antikoagulačních faktorů (PAP) a je hojně zastoupený v placentě. Jedná se o kalcium dependentní protein vázající zejména kyselé fosfolipidy, které se v placentě nacházejí. Mají účinnou antikoagulační aktivitu působící na destičkách, v buňkách trofoblastu a v endoteliálních buňkách. Vysoká koncentrace annexinu V v placentárních syncytiotrofoblastech napomáhá mechanismu zachování krevní fluidity na povrchu placenty a placentární integritě. Trombózu a potrat u APS mohou způsobit antifosfolipidové protilátky narušením této ochranné funkce annexinu V. Následkem je zvýšení kvantity trombogenních fosfolipidů v krevním řečišti.

U protilátek proti annexinu V se předpokládá interference s antikoagulační funkcí annexinu V. V důsledku jejich působení dochází ke vzniku placentárních trombóz a jejího odloučení. Protilátky proti annexinu V byly detekovány u pacientů se systémovým autoimunitním onemocněním, hlavně u SLE nebo RS. Jsou rovněž spojovány s intrauterinním úmrtím plodu, opakujícími se potraty a preeklampií.

Obrázek 2 Annexin V - exprese na myší placentě

Přímá imunofluorescence s použitím primární (králičí) protilátky proti annexinu V a sekundární (ovčí anti - králičí) protilátky proti IgG. Cytoskelet je značen fluorochmem Alexa Fluor 488® - Phalloidin, jádra buněk jsou značena fluorochromem DAPI.



Zdroj: <http://www.abcam.com/Annexin-V-antibody-ab14196.html>, 20.8. 2013 21:56

2.2.2.2 Antifosfolipidové protilátky

Jedná se o nespecifické autoprotiátky proti membránovým a cirkulujícím fosfolipidům, které způsobují různými mechanizmy hyperkoagulační stavy. Jejich působením dochází k uzávěru cév. Přítomnost antifosfolipidových protilátek (APLA) ukazuje na možnou přítomnost APS. Ten dělíme na primární – při neprokazatelné jiné příčině tvorby antifosfolipidových protilátek a na sekundární, který je součástí systémového autoimunitního onemocnění – nejčastěji SLE. Antifosfolipidové protilátky mohou být namířeny proti: fosfatidylserinu, fosfatidyletanolaminu, kyselině fosforečné, fosfatidylglycerolu, fosfatidyl- β 2-glykoproteinu (součást kardiolipinu), annexinu V (důležité k diagnóze antifosfolipidového syndromu) a v podstatě proti jakémukoliv humánnímu fosfolipidu či jeho kofaktoru. APLA snižují tvorbu prostacyklinu (PGI_2), který fyziologicky dilatuje cévní řečiště a inhibuje agregaci trombocytů. V opačném případě - přítomnost APLA zvyšuje tvorbu tromboxanu A_2 , který má vazokonstrikční účinky a zesiluje agregaci trombocytů (Tabulka 3). Další účinek APLA je tlumení aktivace antitrombinu III, inhibuje aktivaci proteinu C a proteinu S, závislých na fosfolipidu.

Prokoagulační vlastnosti endotelových buněk po vazbě APLA spočívají ve zvýšené expresi adhezních molekul ICAM-1, VCAM-1 a PECAM-1. To umožní adheenci především makrofágů, které jsou zdrojem cytokinů prohlubujících protrombotické procesy.

Neméně důležité je narušení funkce přirozených regulátorů a inhibitorů koagulace například annexinu V.

Tabulka 3 Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek

Mechanismus působení APLA
Vazba na povrchové fosfolipidy různých buněčných typů
Reakce s fosfolipidy na vnitřní straně membrány
Inhibice produkce prostacyklinu
Zesílení tvorby tromboxanu
Deficit proteinů C, S, tromboembolie
Zesílení tvorby tkáňových faktorů
Permanentní aktivace trombocytů
Destrukce trombocytů

Zdroj: Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie. Nucleus HK 2004. Imunopatogeneze vybraných autoimunitních imunopatologických chorob; 571-648*

Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom je definován výskytem recidivujících žilních nebo arteriálních trombóz, často spojených s trombocytopenií a přítomností antifosfolipidových protilátek. U žen pak se syndromem spojeným s opakovaným potracením plodu.

Rozlišujeme primární APS, který se projevuje výše zmíněnými charakteristikami a sekundární APS, který je nejčastěji manifestován u nemocných se SLE, systémovou sklerózou, revmatickou artritidou nebo vaskulitidou.

Mezi klinická kritéria APS patří opakované venózní a arteriální trombózy. U žen, dle klasifikačních kritérií ustanovených během 11. mezinárodního kongresu o antifosfolipidovém syndromu konaného v roce 2004 v australském Sydney (tzv. sydneyjská kritéria APS), jde o jedno či více předčasných narození morfologicky zdravého novorozence ve 34. týdnu nebo dříve, spojené s těžkou preklapsií a/nebo HELLP syndromem (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets), která může končit smrtí nebo těžkou insuficiencí placenty. Tři nebo více jinak nevysvětlitelných následných samovolných potratů před 10. týdnem gravidity. Dále jedno či více jinak nevysvětlitelných ztrát morfologicky normálního plodu v 10. a dalších týdnech gravidity²⁴⁾ a opakované trombocytopenie a livedo reticularis. Laboratorními kritérii jsou přítomnost LLA (Lupus-Like Anticoagulant-LLA) a antikardiolipinových protilátek IgG a IgM ve vyšších titrech. Na určení diagnózy je pak zapotřebí pozitivních laboratorních testů alespoň 2x za 3 měsíce a minimálně jeden klinický nález²⁵⁾.

Vliv APS/SLE na těhotenství a plod

Zásadní komplikací pacientek s APS/SLE je RLP v důsledku vzniku mnohočetných placentárních trombóz a vaskulopatií spirálních arterií a následné placentární insuficienci, která vede k abortu plodu – viz. výše. Nejčastěji dochází k potracení plodu v časných fázích těhotenství.

Starší i nedávno provedené studie se zaměřily na několik různých aspektů problematiky těhotenství a poškození plodu u pacientek s APS/SLE. Jsou to malý fyzický vzrůst, zpomalený neurologický vývoj, vliv léků podávaných matkám během těhotenství na stav imunitního systému novorozenců a rozvoj autoimunitních onemocnění²⁶⁾.

Jednou z hlavních komplikací dětí narozených těmito pacientkám je poměrně nízká porodní váha v poměru k jejich gestačnímu věku a z nich plynoucí kom-

plikace. Vede například k neuropsychogenním poruchám jako jsou dyslexie, dysgrafie a to až ve 14 % případů dětí narozeným matkám s APS/SLE oproti běžné populaci, kde se tyto poruchy objevují ve 2 až 5 % případů²⁷⁾. Závažný je také problém výskytu vrozeného srdečního neonatálního lupusu a to až v 86 %²⁸⁾.

Těhotenství může vést tedy ke smrti jak plodu, tak matky a musí být bedlivě sledováno a načasováno do období remise nemoci, podpořené vhodnou léčbou, která nebude toxická pro plod.

2.2.2.3 Protilátky proti tkáňové transglutamináze

Enzym tkáňová transglutamináza (tTG) se vyskytuje uvnitř buněk a to v mnoha druzích tkání a orgánů jako jsou srdce, játra nebo tenké střevo. Nachází se převážně v cytozolu, může být přítomen i v jádře a mitochondriích. Intracelulárně se nacházející tTG hraje důležitou roli při apoptóze.

Po uvolnění do okolí je vysoce rezistentní proti proteolýze a účastní se reparace tkání a adheze buněk. Spolu s gliadinem tvoří komplexy, které jsou schopny vyvolat tvorbu protilátek proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG). Pozitivní anti-tTG jsou důležitým diagnostickým ukazatelem některých střevních onemocnění. Spolu s vyšetřením protilátek proti endomysiu je signifikantní pro celiakální sprue (Tabulka 4).

Pozitivní anti-tTG mohou být přítomny i u jiných automimunitních chorob jako jsou diabetes mellitus I. typu, autoimunitní hypothyreóza a u Addisonova choroba. Jedná se o onemocnění s infertilitou přímo související.

Existuje skupina pacientek, které trpí nespecifickými příznaky střevních onemocnění, jejichž důsledkem dochází k problému s fertilitou a během těhotenství. První příznaky se objevují již v pubertálním věku pacientek a často dochází k oddálení příchodu menstruace, dále brzké menopauze, hypogonádismu, k potratu nebo narození dítěte s nízkou porodní váhou.

Dalším problémem, týkající se vztahu onemocnění střev a otěhotnění, je vznik malabsorbčního syndromu u pacientek s onemocněním střev. Důsledkem malabsorbčního syndromu dochází také ke snížení hladiny zinku a selenu, který ovlivňuje syntézu a distribuci luteinizačního a folikul stimulujícího hormonu. Tyto hormony přímo ovlivňují reprodukční systém. Dochází k poruše vstřebávání vitamínu B12. Následkem jeho snížené hladiny dochází k poruše vstřebávání železa a následné anemie.

U těhotných pacientek, které trpí nediodnostikovaným a neléčeným střevním onemocněním spojeným s intolerancí lepku, dochází k předčasným porodům, postižením plodu a k porodu dětí s nízkou porodní váhou.

Ukládání gliadinu v trofoblastu a fibroidních buňkách a exprese tTG v cytotrofoblastu a v trofoblastu, vede k abnormalitám placenty a ke zvýšené apoptóze a následně k intrauterinní růstové retardaci²⁹⁾.

Tabulka 4 Výskyt autoprotilátek ve vztahu k celiakii

Metoda	Senzitivita v %	Specifita v %
EMA IgA	≥ 90%	98,20%
Anti-tTG IgA	≥ 90%	≥ 90%

Zdroj: Zdroj:Krejsek J, Kopecký O. Klinická imunologie. Nucleus HK 2004. Imunopatogeneze vybraných autoimunitních imunopatologických chorob; 571-648

2.2.2.4 Antinukleární protilátky, protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům

Přítomnost nespecifických antijaderných autoprotilátek může souviset s některými autoimunitními imunopatologickými chorobami, jejichž důsledkem může být infertilita nebo sterilita. Tyto nespecifické autoprotilátky se však mohou objevovat i bez vztahu s těmito imunopatologickými chorobami.

2.2.2.5 Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům

Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (anti-ENA) jsou všeobecně považovány za podskupinu ANA protilátek. Mezi ENA antigeny patří např. solubilní substance A (SS-A) a Robertsův protein (Ro-protein). Jedná se o dva totožné antigeny. SS-A se skládá ze čtyř krátkých RNA molekul a dvou proteinů o velikosti 60 kDa, resp. 52 kDa. Protilátky proti SS-A jsou často přítomné u pacientů trpících SLE, ale také u těhotných SLE pacientek s rizikem vzniku kongenitální srdeční zástavy u novorozenců. Expresse SS-A a zároveň solubilního faktoru B (SS-B) je známkou mírné progresse onemocnění. SS-A a SS-B protilátky se ve velké míře objevují ve vysokých titrech u SS. SS-B a La protein jsou dva identické antigeny. SS-B je definován jako fosfoprotein o hmotnosti 47 kDa, který je asociován s různými molekulami. Spolu s SS-A je diagnostikován u pacientů s SS.

Smithův antigen (Sm) a Sm/RNP (Ribonucleoprotein particle - RNP) se skládá z 9 odlišných polypeptidů, které společně s RNP proteiny jsou součástí jader-

ného komplexu. Anti-Sm autoprottilátky jsou považovány za markery SLE onemocnění asociovaného s HLA DR4.

Anti-Scl-70 autoprottilátky se váží k eukaryotické topoizomeráze I, což je enzym lokalizovaný v jádře. Tam se účastní změn terciální struktury genomové DNA během její replikace. Klinický význam mají tyto prottilátky u pacientů trpících sklerodermií, SLE nebo SS.

2.2.2.6 Antinukleární prottilátky

Antinukleární prottilátky (ANA) jsou namířeny proti celému spektru antigenů proteinové/glykoproteinové povahy v jádrech buněk. Nemusí mít klinický význam, avšak mohou být průvodním jevem a patogenetickým faktorem závažných imunopatologických chorob. Ve vztahu k poruchám plodnosti se o úloze ANA dosud povětšinou jen spekuluje. Ze zkušeností víme, že např. v populaci žen s RPL je zastoupení ANA pozitivit vysoké³⁰⁾. Část vědců si však tento fenomén vysvětluje tím, že s věkem stoupá výskyt ANA, jakož i výskyt RPL tj. že jde o náhodou koincidenci dvou nezávislých jevů. Jiné studie přináší důkazy pro přímý vliv ANA na vývoj oocytů a embryí³¹⁾.

ČÁST II - EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

3. Předmět studie a cíl práce

Cílem studie bylo zmapovat závislost přítomnosti autoprotilátek a diagnózy autoimunitních poruch u pacientek s diagnostikovanou sterilitou nebo RPL v I. a II. trimestru, odeslaných v letech 2012 až 2013 z CAR Gynekologicko-porodnické kliniky VFN a 1.lékařské fakulty v Praze k prvovýšetření na imunologické oddělení. Studie byla prováděna ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze, v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky na úseku klinické a reprodukční imunologie.

3.1 Studovaná populace

Do studie bylo zařazeno 150 pacientek z celkového počtu 1238 pacientek (12 %), které byly odeslány z CAR k imunologickému vyšetření. Skupina 150 pacientek byla vybrána na základě positivity některé z autoprotilátek a rozčleněna do skupin dle aktuálního problému v procesu početí. Předmětem studie je tudíž vysoce vyselektovaná populace mladých žen ve fertilním věku, které již prošly rozsáhlým vyšetřením v oblasti reprodukční medicíny, jednoznačně splňují výše uvedená kritéria indikace reprodukčně-imunologického vyšetření a u kterých lze s velkou pravděpodobností vyloučit jinou známou příčinu poruchy plodnosti.

Pacientky byly o studii informovány, podepsaly protokol informovaného souhlasu, studie byla schválena Etickou komisí VFN a 1.LF UK č. 1162/12 S-IV.

3.2 Vyšetřované parametry

Autoprotilátky, které jsme si pro náš účel zvolili jako směrodatné, byly antinukleární protilátky, včetně typizace na HEP-2 buňkách, protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům, včetně typizace anti Ro-SSA a anti La-SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1 a anti-centromery, protilátky proti tkáňové transglutamináze, antifosfolipidové protilátky, antiovariální protilátky, protilátky proti zona pellucida, protilátky proti spermiiám a protilátky proti annexinu V.

3.3 Formulace výzkumného problému

- 1) Deskriptivní charakteristika souboru neplodných žen s autoimunitním laděním organismu.
- 2) Relační analýza výskytu autoprotilátek v jednotlivých podskupinách žen dle charakteru reprodukčního problému.
- 3) Možná kauzální asociace sterility a infertility s určitým spektrem autoprotilátek.

4. Metodika

Všechny autoprotilátky byly vyšetřeny ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky na úseku laboratoře klinické imunologie a alergologie.

Metody ANA, včetně typizace na Hep-2 buňkách, APLA, anti-ENA včetně typizace a anti-tTG, jsou metody akreditované podle mezinárodně platné normy ČSN EN ISO 15189.

Všechny analýzy byly provedeny ze séra. U všech odebraných vzorků proběhla preanalytická a analytická fáze dle stanovených norem.

Orgánově specifické protilátky typu AOVA, AZPA a ASA byly stanoveny v podtřídě IgG metodou enzymové imunoanalýzy (Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA) na přístroji NexGenFour™ firmy Adaltis. Jedná se o plně automatizovaný přístroj, který může zpracovávat 4 mikrotitrační destičky metodou ELISA. K vyšetření byly použity diagnostické sety firmy Bioservdiagnostic.

Stanovení protilátek proti annexinu V bylo provedeno metodou ELISA ve třídě IgG na diagnostickém setu IMTEC-ANNEXIN V – AntibodiesScreen firmy Humandiagnosics.

Antifosfolipidové protilátky byly stanoveny metodou ELISA na setech firmy ORGENTEC v podtřídě IgG a IgM.

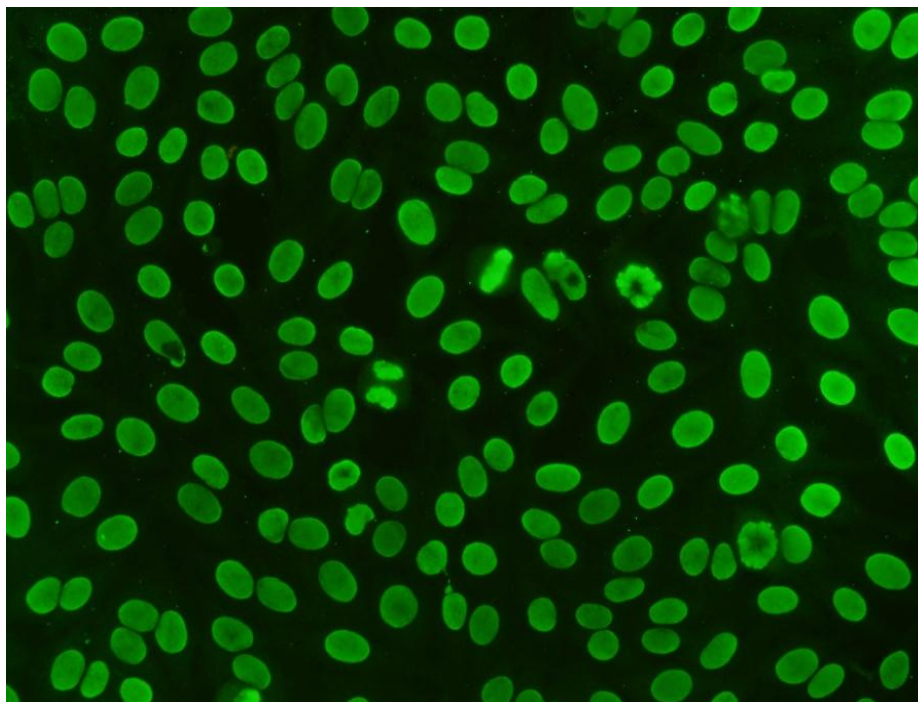
Stanovení anti-ENA protilátek bylo prováděno metodou ELISA pro kvantitativní screening a metodou imunodot pro identifikaci autoprotilátek proti cílovým antigenům SS-A, SS-B, Sm, Sm/RNP, Sl-70, Jo-1 a centromeře v séru. Vyšetření provádíme na diagnostických setech firmy MATAZYME™ ENA Screen 7.

Metodou vyšetření antinukleárního faktoru (ANF) a ANA je nepřímá imunofluorescence (IF). Jde o plně automatizovaný postup, který probíhá na přístroji HELMED® firmy Aeskulab v podtřídách IgG v ředění 1:10.

Vyšetření ANA na Hep-2 buňkách je zaměřené na přítomnost extrahovatelných nukleárních antigenů typu Ro/SS-A-Ro. Bylo prováděno na setech firmy ImmunoConcepts metodou nepřímé imunofluorescence (IF) a to v podtřídách IgG, IgA a IgM v ředění 1:20 (Obrázek 3).

Vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze se provádí metodou ELISA na setech firmy BioSystems, a to ve třídách IgA a IgG.

Obrázek 3 Antinukleární protilátky v izotypu IgG, HEp-2 buňky, pozitivní homogenní fluorescence.



Zdroj: © Ing. Miroslav Hind'oš, Všeobecná fakultní nemocnici v Praze, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky., Olympus BX51, zvětšení 400x

5. Analýza výsledků

Do cílové skupiny bylo zařazeno 150 pacientek, tj. 12 % všech žen, poslaných v letech 2012 až 2013 k prvovýšetření do ambulance reprodukční imunologie z velkého centra asistované reprodukce fakultní nemocnice.

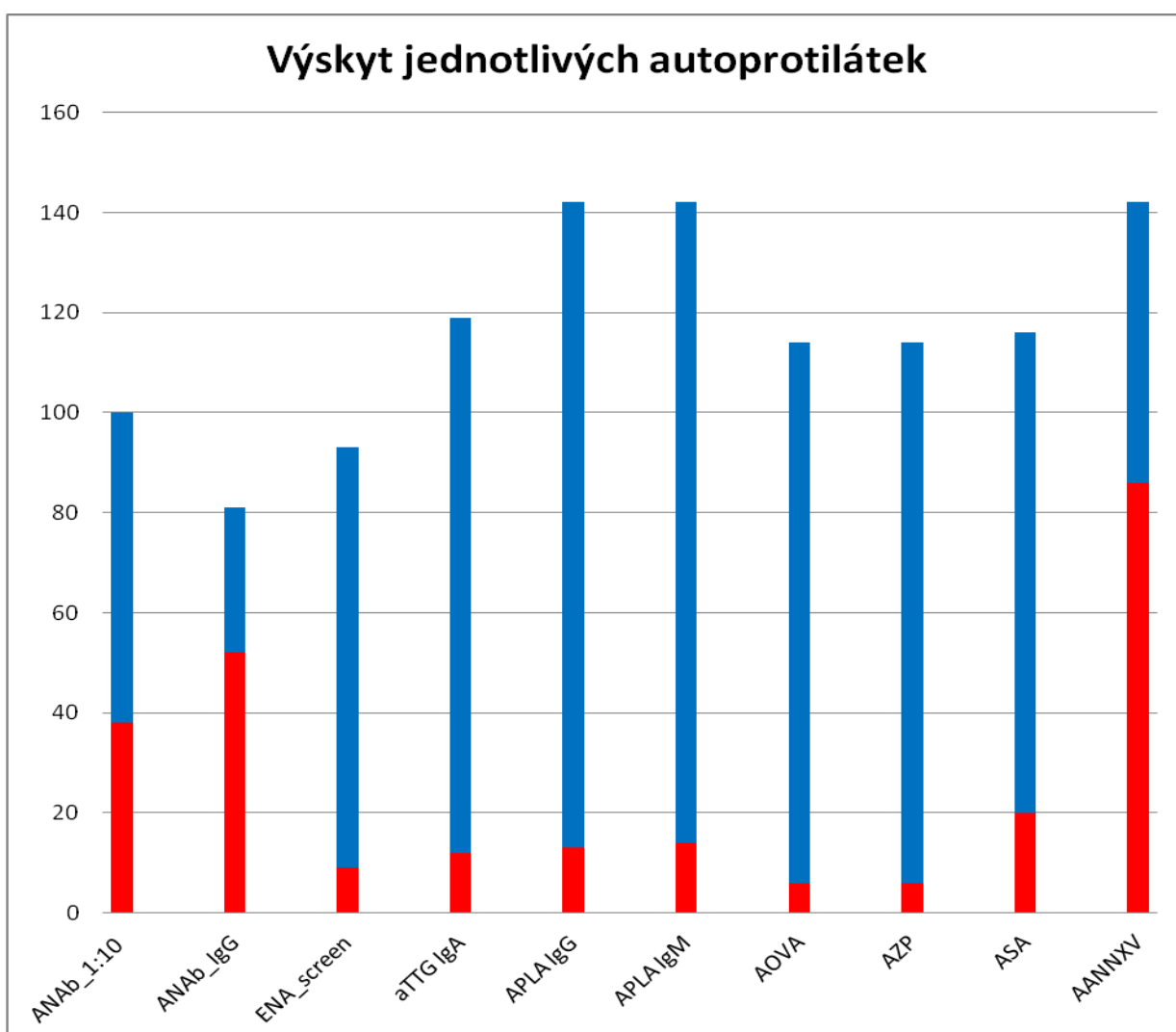
Jednalo se o pacientky ve věku 24 až 48 let s diagnostikovanou sterilitou nebo RPL v I. a II. trimestru. U vybraných 150 pacientek se objevila pozitivita některé z vyšetřovaných autoprotilátek a/nebo byla stanovena diagnóza imunopatologického onemocnění. Tyto pacientky byly následně rozříděny do skupin dle charakteru poruchy plodnosti a charakteru imunopatologie. Tyto podskupiny byly podrobeny statistické analýze, která byla provedena s pomocí softwaru Microsoft Excel (Microsoft, USA) a Statistica CZ 11.0 (StatSoft, USA). Byla provedena standardní deskriptivní analýza a za účelem deskriptivního popisu dat, byly vytvořeny tabulky a grafy. Pro kategoriální data (tj. diagnózy) byly vypočteny relativní četnosti, pro srovnání kategoriálních dat byl použit Fisherův chí-kvadrát test. Všechny použité statistické testy byly hodnoceny na hladině významnosti $p < 0,05$.

5.1 Deskriptivní charakteristika souboru neplodných žen s autoimunitním laděním organismu

Zastoupení jednotlivých autoprotilátek v celém souboru 150 žen je uvedeno v Grafu 1.

Graf 1 Zastoupení jednotlivých autoprotilátek v souboru pacientek odeslaných k imunologickému vyšetření

AANNXV	<i>Protilátky proti annexinu V</i>
ANA_IgG	<i>Antinukleární protilátky - typizace na HEP-2 buňkách</i>
ANAb_1:10	<i>Antinukleární protilátky v ředění 1:10</i>
Anti_ENA	<i>Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům</i>
AOVA	<i>Protilátky proti ovariím</i>
APLA_IgG	<i>Antifosfolipidové protilátky v IgG</i>
APLA_IgM	<i>Antifosfolipidové protilátky v IgM</i>
ASA	<i>Antispermatozoidální protilátky</i>
aTTG_IgA	<i>Protilátky proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA</i>
AZP	<i>Protilátky proti zona pellucida</i>



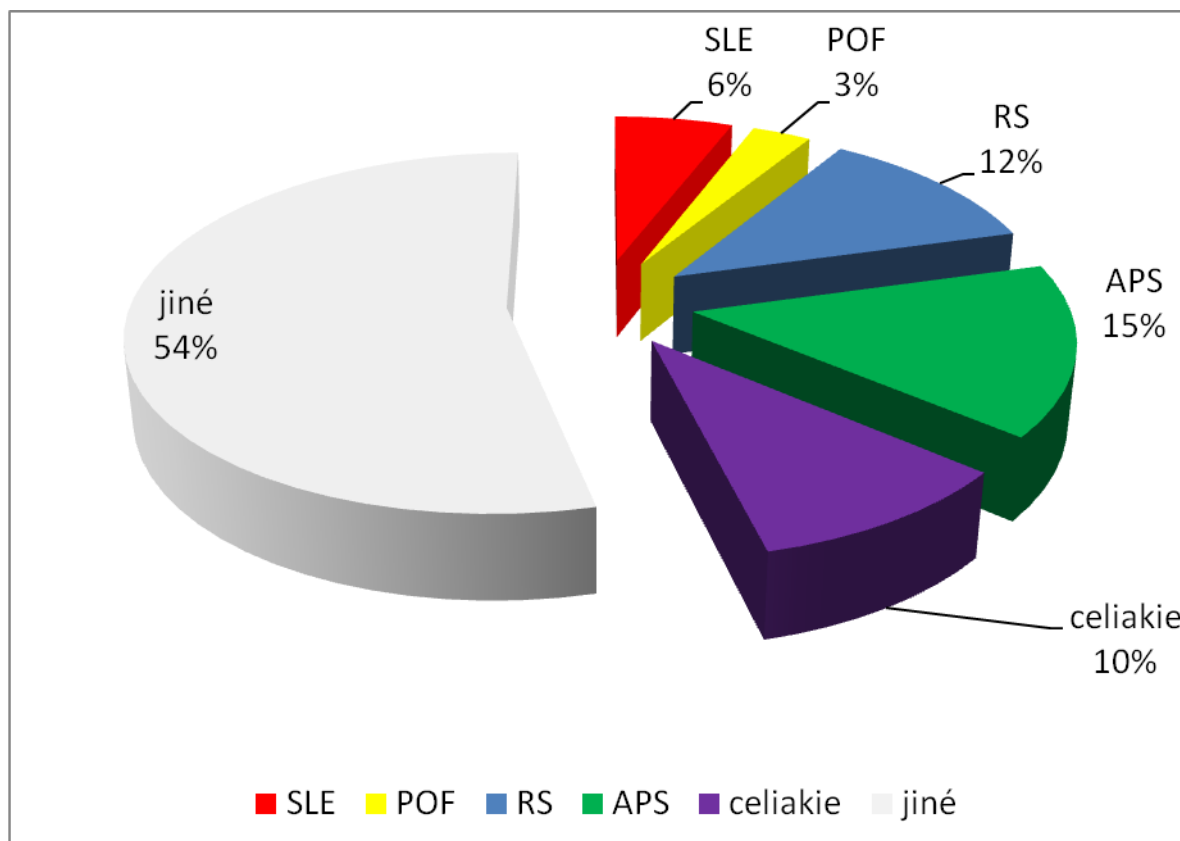
Zdroj: Autor

- Prokázaná pozitivita jednotlivých autoprotilátek v souboru pacientek
- Negativní výsledek stanovovaných autoprotilátek v souboru pacientek

Nejčastější diagnózy imunopatologických chorob v souboru 150 sledovaných žen uvádí Graf 2.

Graf 2 Nejčastější diagnózy imunopatologických chorob v souboru 150 nemocných s poruchami plodnosti

- SLE** *Systémový lupus erythematoses*
- POF** *Předčasné ovariální selhání*
- RS** *Roztroušená skleróza*
- APS** *Antifosfolipidový syndrom*



Zdroj: Autor

V souboru pacientek bylo diagnostikováno 10 případů SLE (6 %). Čtyři pacientky se do CAR dostavily s již dříve diagnostikovaným onemocněním, šest pacientek pak patří do skupiny s vysokým stupněm ohrožení tímto onemocněním a počínající onemocnění typu SLE bylo stanoveno v přímé souvislosti s problémem neplodnosti.

S diagnózou POF a pozitivní AOVA byly v souboru přítomny tři pacientky (3 %). Jednalo se o pacientky, u kterých došlo k rozvinutí choroby v důsledku radioterapie pro uzly na štítné žláze, léčby akné retinoly a těžkého diabetes melitus I. typu

s komplikacemi. V jednom případě šlo o pacientku s pozitivními AOVA ale bez diagnostikované POF.

Dvacet pacientek (12 %) přišlo do ambulance s diagnózou roztroušené sklerózy. Sedm pacientek s RS otěhotnělo alespoň jednou přirozenou cestou a zdárně porodilo. Tři pacientky porodily po IVF, u deseti pak k otěhotnění a donošení životashopného plodu nedošlo. U deseti pacientek došlo k potratu během I. trimestru, u čtyř pacientek v II. trimestru, ve čtyřech případech došlo k předčasnému porodu.

U dvaceti šesti (15 %) pacientek byl diagnostikovaný APS a to jak splňující diagnostická kritéria, tak suspektní. Jednalo se v naprosté většině o pacientky, které prodělaly 3 a více potratů v I. trimestru. Všechny pacientky měly pozitivní protilátky proti annexinu V. Čtyři z těchto pacientek měly navíc pozitivní APLA ve vyšších titrech. Dvě pacientky měly APS jako komplikaci SLE a RS.

5.2 Vyhodnocení jednotlivých parametrů a jejich závislosti na postižení

Stanovené imunologické parametry jsme hodnotili ve vztahu přirozeného otěhotnění proti IVF, počtem potratů v I. Trimestru (> 3) a ve II. trimestru a přítomností předčasného porodu před 34. týdnem gravidity.

5.2.1 Vyhodnocení výsledků vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze

Anti-tTG IgA a IgG, jakožto signifikantní znak celiakie, byly nalezeny u 10,08 % pacientek.

Ve skupině pacientek, které otěhotněly přirozenou cestou, se protilátky vyskytovaly v 17,07 %, zatímco ve skupině pacientek po prodělaném IVF pouze ve 3,03 %. To je nejspíše dáno zvýšeným sledováním těchto pacientek s podezřením na problémy intolerance lepku už v základním vyšetřovaném panelu a případném vysazení lepku z potravy, které vede k vymizení těchto autoprotiátek.

Ženy, které potratily v I. trimestru, měly stanoveny přítomnost anti-tTG ve 12,70 %, ženy, které potratily v II. trimestru v 5,56 %. Z této skutečnosti vyplývá, že pozitivita anti-tTG IgA/IgG a tedy intolerance lepku, vedoucí ke zvýšené stimulaci imunitního systému přímo ovlivňuje vzniklé těhotenství, zejména průběh I. trimestru.

Zajímavou skutečností je, že ve skupině žen, které v I. trimestru neprodělaly žádný potrat v porovnání se skupinou žen, které časně potracely více než třikrát,

dochází k signifikantnímu rozdílu. V této skupině byla stanovena pozitivita těchto auto-protilátek u 18,18 % pacientek oproti nepotrácujícím ženám, kde je tato hodnota pouze 7,14 %. Neléčená celiakie je tedy jeden z příčin vedoucích k RPL. Souhrn výsledků je popsán v Tabulce 5.

Tabulka 5 Souhrnná tabulka výsledků vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze v kontrolních skupinách

Porovnávané skupiny žen	Pozitivní Anti-tTGlgA/IgG, %	Negativní Anti-tTGlgA/IgG, %
Skupina všech pacientek bez ohledu na okolnosti	10,08 %	89,92 %
Skupina pacientek, které porodily po přirozeném otěhotnění	17,07 %	82,93 %
Skupina pacientek, které porodily po IVF/IUI	3,03 %	96,97 %
Skupina pacientek, které potratily v I. trimestru	12,70 %	87,30 %
Skupina pacientek, které potratily ve II. Trimestru	5,56 %	94,44 %
Skupina pacientek, které neproděly potrat	7,14 %	92,86 %
Skupina pacientek, které prodělaly 3 a více potratů	18,18 %	81,82 %

Zdroj: Autor

5.2.2 Vyhodnocení výsledků vyšetření antifosfolipidových protilátek

U 9,15 % (třináct pacientek) byly nalezeny pozitivní APLA IgG a u 9,86 % APLA ve třídě IgM. Protilátky proti fosfolipidům se vyskytly jak u velmi mladých, tak i starších fertálních žen (věk 24 až 42 let). V tabulce 11 je vidět jasná závislost mezi přítomností pozitivních APLA IgG u pacientek, které potratily v II. trimestru (26,09 %)

oproti 12,50 % u žen v I. trimestru, $p = 0.0015$. Ještě více signifikantní je rozdíl v zastoupení APLA-positivních pacientek, které potratily třikrát a vícekrát v I. trimestru (17,80 %) oproti ženám, které nepotrácejí (5,80 %), $p < 0.0001$.

Z uvedeného vyplývá, že APS je jedním z hlavních důvodů RPL, přičemž v našem souboru byly častější druhotrimestrální aborty, viz Tabulka 6.

Tabulka 6 Závislost APLA positivity na klinickém obrazu v jednotlivých skupinách

Porovnávané skupiny žen	Pozitivní APLA IgG	Pozitivní APLA IgM
Skupina všech pacientek bez ohledu na okolnosti	9,15 %	9,86 %
Skupina pacientek, které porodily po přirozeném otěhotnění	10,64 %	5,13 %
Skupina pacientek, které porodily po IVF/IUI	12,77 %	8,7 %
Skupina pacientek, které potratily v I.trimestru	12,50 %	10,96 %
Skupina pacientek, které potratily ve II.trimestru	26,09 %	7,69 %
Skupina pacientek, které neprodělaly potrat	5,80 %	8,70 %
Skupina pacientek, které prodělaly 3 a více potratů	17,50 %	9,76 %

Zdroj: Autor

5.2.3 Vyhodnocení výsledků autoprotilátek proti annexinu V

Přítomnost protilátek proti annexinu V byla prokázána u osmdesáti sedmi pacientek ve věku 27 až 48 let z vyšetřované skupiny, což odpovídá 60,56 %. U třiceti čtyřech pacientek byla k léčbě neplodnosti použita metoda IVF nebo IUI, přičemž u těchto žen docházelo signifikantně častěji k opakovaným neúspěšným pokusům

o uchycení embrya, tj. k selhání technik asistované reprodukce ($p = 0.0078$). U čtyřiceti osmi annexin V-pozitivních pacientek došlo k potratu plodu během I. trimestru, u třinácti pacientek došlo ke ztrátě plodu během II. trimestru a k předčasnému porodu u osmi pacientek ($p < 0.0001$), viz Tabulka 7.

Přítomnost protilátek proti annexinu V je tedy velmi častá jak u pacientek s opakovaným neúspěchem IVF/IUI, tak i u pacientek časně potrácejících v I. trimestru. Vyšetření lze tedy považovat za signál vedoucí k odhalení APS a jeho léčení ještě před samotným započítím léčení pomocí technik asistované reprodukce, případně vyšetření u pacientek, které potrácejí v I. trimestru.

Tabulka 7 Závislost positivity protilátek proti annexinu V na klinickém obrazu v jednotlivých skupinách

Porovnávané skupiny žen	Pozitivní anti-annexin V	Negativní anti-annexin V
Skupina všech pacientek bez ohledu na okolnosti	60,56 %	39,44 %
Skupina pacientek, které porodily po přirozeném otěhotnění	72,00 %	28,00 %
Skupina pacientek, které porodily po IVF/IUI	60,56 %	39,44 %
Skupina pacientek, které potratily v I. trimestru	64,47 %	35,53 %
Skupina pacientek, které potratily ve II. trimestru	69,57 %	30,43 %
Skupina pacientek, které neprodělaly potrat	56,06 %	43,94 %
Skupina pacientek, které prodělaly 3 a více potratů	65,00 %	35,00 %

Zdroj: Autor

5.2.4 Vyhodnocení výsledků vyšetření protilátek proti ováriím, zona pellucida a spermiím

Pozitivní protilátky proti ováriím vyšly u 5,26 % sledovaných žen ve věkovém rozmezí 33 až 37 let. Čtyři z těchto pacientek trpí POF. Pět pacientek podstoupilo IVF a plod se jim podařilo donosit živý. V jednom případě pak došlo k porodu před 34tt. Jedna z pacientek, u které nebylo diagnostikováno POF, opakovaně potrácela v I. trimestru. Ani jedna z pacientek neměla pozitivní protilátky proti zona pellucida, jedna pacientka měla kromě pozitivních AOVA také pozitivní ASA.

Pozitivní protilátky proti spermiím byly stanoveny u 17,24 % žen ve věku 30 až 41 let. Devatenáct pacientek podstoupilo IVF nebo IUI a u šesti z nich došlo k potratu v I. trimestru. U žádné pacientky nedošlo k potratu v II. trimestru nebo k předčasnému porodu. Jedenácti pacientkám s pozitivními ASA se podařilo po IVF donosit plod a porodit zdravé dítě. Deset pacientek mělo kromě protilátek ASA diagnostikovány i pozitivní protilátky proti annexinu V.

Protilátky proti zona pellucida byly vyhodnoceny jako pozitivní v 5,26 % případech žen ve věku od 31 do 37 let. Ve dvou případech byly u pacientek zároveň stanoveny protilátky proti annexinu V. Všechny ženy s pozitivitou AZP otěhotněly až po IVF ICSI.

5.2.5 Vyhodnocení přítomnosti antinukleárních protilátek

Autoprotilátky proti jaderným antigenům byly vyhodnoceny jako pozitivní u 18 % žen a ve 20 % případů jako slabě pozitivní, věk žen s pozitivitou nálezů se pohyboval v rozmezí 24 až 43 let. Zastoupení ANA bylo tudíž v našem vysoce vyselektovaném souboru signifikantně vyšší ve srovnání s běžnou populací v tomto věkovém rozmezí³²⁾, $p = 0.017$ ANA pozitivita byla nalezena u všech našich 10 pacientek s diagnózou SLE.

Pozitivní anti-ENA protilátky byly nalezeny u 13,41 % žen, přičemž pět z těchto pacientek trpí SLE.

6. Diskuze

Předkládaná studie výskytu autoprotilátek v souboru žen s idiopatickými poruchami plodnosti prokázala, že část z těchto "idiopatických" neplodností je ve skutečnosti imunopatologicky podmíněna.

V našem souboru se jednalo o 12 % všech žen, u kterých reprodukční gynekolog na tuto eventualitu pomyslel. Je to poněkud vyšší zastoupení imunopatologií, než uvádějí recentní zahraniční zdroje. Např. izraelští autoři ze Shoefeldovy pracovní skupiny uvádí prevalenci imunopatologií ve skupině neplodných žen < 10 %³³⁾. Zde je však potřeba zdůraznit, že námi sledovaný soubor 150 žen byl již dříve podrobně vyšetřen, byly vyloučeny jiné příčiny poruchy plodnosti (gynekologické, endokrinní, genetické, infekční atd.), tudíž se tedy nejednalo o standardní populaci žen s poruchami plodnosti, ale již o vyselektovanou podskupinu žen s nejasnou příčinou neplodnosti. Domníváme se, že toto číslo jasně hovoří ve prospěch indikace reprodukčně-imunologických testů u neplodných žen, byť se bezesporu nemůže jednat o vyšetřovací metody první volby.

Rovnou odeslat pacientku k reprodukčnímu imunologovi je vhodné u žen, které do center asistované reprodukce přicházejí s již dříve stanovenou diagnózou autoimunitní nemoci. V našem souboru 150 žen nakonec splnilo diagnostická kritéria některého z autoimunitních onemocnění až 46 % pacientek a v jejich případě byla včasná a řádná diagnostika autoimunity podmínkou další léčby technikami asistované reprodukce.

V námi sledovaném souboru jsme našli signifikantně vyšší výskyt ANA ve srovnání se zdravou populací téhož věku. Tímto by bylo možné zpochybnit jednu z hypotéz výskytu ANA u neplodných žen, která hovoří o vyšším věku žen podstupujících léčbu IVF, který jde ruku v ruce s nárůstem výskytu positivity ANA v souvislosti s věkem. Teorií o vlivu ANA na oplození, vznik embrya, jeho nidaci a vývoj je celá řada, na jednoznačné vysvětlení možných konsekvencí však zatím čekáme.

Jinak je tomu u případů positivity protilátek proti tkáňové transglutamináze a tedy u diagnózy celiakie. V našem souboru jsme až u 10 % žen potvrdili tuto diagnózu. Uvážíme-li, že odhadovaný výskyt celiakie v ČR je 0,5 %³⁴⁾ jde o zcela jasný význam této diagnózy a tohoto analytu při objasňování příčin poruch plodnosti. U pacientek, u kterých docházelo k opakovaným potratům během I. trimestru, jsme našli

anti-tTG až v 18 % případů. U těchto pacientek je velký předpoklad, že k opakovaným ztrátám plodu v prvním trimestru docházelo v důsledku nediagnostikovaného střevního onemocnění.

Dobře známou a ve světě opakovaně popsanou skutečností je jasná závislost mezi přítomností APLA a protilátek proti annexinu V a vzniku RPL zejména v I. a II. trimestru. V našem souboru byly protilátky proti annexinu V diagnostikovány až u 60,56 % žen, u kterých docházelo k RPL v I. nebo II. trimestru. Domníváme se proto, že stanovení APLA a annexin V by mělo patřit ke screeningovým testům u všech žen s RPL.

Ve skupině 150 vyšetřovaných žen se u 5,26 % pacientek objevily auto-protilátky proti zona pellucida. Jde sice o malé procentuální zastoupení autoprottilátek, které se tykají sterility, nikoli však zanedbatelné. Přítomnost protilátek proti zona pellucida může být jedním z důvodů neúspěšných IVF. Je-li známa příčina těchto IVF neúspěchů a "obejde-li" se pozitivita AZPA s pomocí intracytoplazmatické injekce spermie do vajíčka (ICSI), může být úspěšně dosaženo gravidity. AZPA pozitivitu je třeba považovat za jasnou indikaci k IVF ICSI.

AOVA se objevovaly u všech pacientek trpících POF. Dosud není zcela zjevné, jestli jsou tyto protilátky příčinou postižení vaječníků nebo zda jde o pouhý epifenomen jiného chorobného procesu, vedoucího k vyhasnutí funkcí vaječníků.

Všeobecně nízké zastoupení positivity AZPA a AOVA svědčí pro to, že nejde o screeningové diagnostické metody reprodukční medicíny a že jejich indikace patří do rukou reprodukčního imunologa.

Poměrně značný podíl neplodných žen v našem souboru tvořily pacientky s pozitivitou protilátek proti spermiím (> 17 %). Šlo v naprosté většině o ženy sterilní, tj. o pacientky, kterým se gravidita nedařila vůbec. Pouze u šesti z dvaceti šesti ASA-pozitivních žen došlo k prvotrimestrálnímu potratu, což lze ale přičíst mj. kombinované imunopatologii s pozitivitou dalších autoprottilátek, např. protilátek proti annexin V. Tento relativně finančně nenáročný a technicky dobře proveditelný test by dle našeho názoru mohl být k dispozici jako screeningový test primární či sekundární sterility pro všechny gynekology, nikoliv pouze pro specialisty v reprodukční medicíně.

7. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se pokusila shrnout dosavadní teoretické i praktické poznatky z oblasti diagnostiky autoimunitních onemocnění a imunopatologických poruch u neplodných párů a žen s RLP. Kromě deskriptivní charakteristiky souboru 150 neplodných žen s autoimunitním laděním organismu jsem provedla relační analýzu výskytu autoprotilátek v jednotlivých podskupinách žen dle charakteru reprodukčního problému. Přínosem práce je upozornění na možné kauzální asociace sterility a infertility s určitým spektrem autoprotilátek, což bylo ve studovaném souboru prokázáno zejména u antifosfolipidových protilátek a protilátek proti annexinu V, u protilátek proti spermiím a u žen s diagnózou celiakie.

Imunologická vyšetření byla do souboru vyšetření reprodukční medicíny začleněna teprve nedávno. Hledají se souvislosti nejen v přítomnosti autoprotilátek, ale též ve vyšetření buněčné imunity a stavu imunitního systému jako takového, protože těhotenství je děj, který je imunitním systémem zásadně ovlivněn.

Imunologická laboratorní diagnostika se tedy bezesporu stává nedílnou součástí vyšetření neplodných párů a má své místo jak při screeningových, tak i vysoce specializovaných vyšetřeních.

8. Seznam obrázků, grafů a tabulek

- Tabulka 1** - Poměr zastoupení autoimunitních chorob u mužů a žen. Pollard K M. Gender differences in autoimmunity associated with exposure to environmental factors. *Journal of Autoimmunity* 38(2012) J177-J186 s.9
- Tabulka 2** - Četnost výskytu autoprotilátek u aktivní formy Systémového Lupus erythematosus. Fučíková T. *Klinická imunologie v praxi*. Druhé, přepracované vydání. Galén 1997; 158-162 s.11
- Tabulka 3** - Mechanismus působení antifosfolipidových protilátek . Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. Nucleus HK 2004. Imunopatogeneze vybraných autoimunitních imunopatologických chorob; 571-648 s.18
- Tabulka 4** - Výskyt autoprotilátek ve vztahu s celiakií. Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. Nucleus HK 2004. Imunopatogeneze vybraných autoimunitních imunopatologických chorob; 571-648 s.21
- Tabulka 5** - Souhrnná tabulka výsledků vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze v kontrolních skupinách s.30
- Tabulka 6** - Závislost APLA positivity na klinickém obrazu v jednotlivých skupinách s. 31
- Tabulka 7** - Závislost positivity protilátek proti annexinu V na klinickém obrazu v jednotlivých skupinách s.32
- Obrázek 1** - Protilátky proti ovariím – metoda nepřímé imuofluorescence, tkáň opičích ovarií. Převato z <http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity/other-antibody-patterns/index.aspx> s. 15
- Obrázek 2** - Annexin V – exprese na myší placentě. Převzato z <http://www.abcam.com/Annexin-V-antibody-ab14196.html> s. 17
- Obrázek 3** - Antinukleární protilátky v izotypu IgG, HEp-2 buňky, pozitivní homogenní fluorescence. Převzato od Ing. Miroslav Hindoš, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky., Olympus BX51, zvětšení 400x s. 25
- Graf 1** - Zastoupení jednotlivých autoprotilátek v souboru pacientek odeslaných k imunologickému vyšetření s. 27
- Graf 2** - Nejčastější diagnózy imunopatologických chorob v souboru 150 nemocných s poruchou plodnosti s. 28

9. Literatura

1. Řežábek K. Asistovaná reprodukce. Jessenius Maxdorf, 2008
2. Howard J.A.C, Selmi C, Shoenfeld Y, The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. J Autoimmun 38 (2012) J266-J274
3. Howard J.A.C, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. J Autoimmun 38 (2012) J266-J274
4. Drahošová M. a kolektiv. Algoritmus pro stanovení parametrů protilátkové a buněčné imunity u žen a mužů s poruchami plodnosti. Alergie 4/2010, s. 285-292.
5. Rairweather DL, Frisancho-Kiss, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. Am J Pathol 2008;173:600-9
6. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune disease. J Autoimmun 2007;28:1-6.
7. McMurry RW. Estrogen. Prolactin and autoimmunity: actions and interactions. Int Immunopharmacol 2001;1:995-1008
8. Raveche ES, Steinberg AD, Bertzil. Sexhormones in autoimmunit. Pituitary Funct Immun; 1986:283-301.
9. McCarthy M. The „gender gap“ in autoimmune disease. Lancet 2000;356:1088
10. Orbach H, Zandman-Goddard G, Amital H, Barak V, Szekanecz Z, Szucs G, et al. Novel biomarkers in autoimmune diseases. Ann N Y Acad Sci 2007;1109:385-400
11. Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S. New M. Low plasma androgens in women with SLE. Arthritis Rheum 1987;30:241-8
12. Andreolo L, Fredi M, Nalli C, Reggia Rossella. Pregnancy implications for systemic lupus erythematosus and the anti phospholipid syndrome. J Autoimmun 38 (2012) J197-J208
13. De Moerloose, P. Phospholipid-Binding Antibodies and Recurrent Pregnancy Loss. Front Endocrinol 1993; 2; 349-354
14. Buyon JP. Neonatal lupus. Curr Opin Rheumatol 1996;8:485-90
15. Nicot A. Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. Front Biosci 2009;14:4477-515
16. Azar ST, Yamout B. Prolactin secretion is increased in patient with multiple sclerosis. Endocr Res 1999;25:207-14

17. Patas K, Engler JB, Friese MA, Gold SM. Pregnancy and multiplesclerosis: fetomaternal immunecross talk and its implications for disease activity. *J Reprod Immunol* 2013 ;97(1):140-6.)
18. Willer CJ, Herrera BM, Morrison KM, Sadovnick AD, Ebers GC. Association between microchimerism and multiplesclerosis in Canadian twins. *J Neuroimmunol* 2006;179:145-51
19. Luborsky L, Seerin V. Shatavi. Autoimmune Ovarian Failure. Převzato z https://www.aarda.org/infocus_article.php?ID=25
20. Luborsky L, Pong J. Pregnancy Outcome and Ovarian Antibodies in Infertility Patients Undergoing Controlled Ovarian Hyperstimulation 2003; *Am J Reprod Immunol* 261-263
21. Howard JA, Sliem C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun* 38(2012); J266-J274
22. Betterle C, Rossi A, Dalla Pria A, Pedini B, Gavasso S, et al. Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history (*Oxf*) 993;39:35-43
23. Smith, Hosid S. Předčasné ovariální selhání spojeno s autoantikémii proti Zona pellucida. *Int J Fertil Menopaus Stud* 1994;39:316-319
24. Hlusin A, Krčová V. Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína pro praxi* (2003); 434-36
25. Krejsek J, Kopecký O. Klinická imunologie. Nucleus HK 2004. Imunopatogeneze vybraných autoimunitních imunopatologických chorob; 571-648
26. Tincani A, Danieli E, Nuzzo M, Scarsi M, Motta M, Cimaz R, et al. Impact of in utero environment on the offspring of lupus patients. *Lupus* 2006;15:801-7
27. Neri F, Chimini L, Bonomi F, Filippini E, Motta M, Faden D, et al. Neuropsychological development of children born to patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004;13:805-11
28. Izmirly PM, Saxena A, Kim MY, Wang D, Sahl SK, Llanos C, et al. Maternal and fetal factors associated with mortality and morbidity in a multi-racial registry of anti-SSA/Ro-associated cardiac neonatal lupus. *Circulation* 2011;124(18):1927-35
29. Ozgör B, Selimoğlu MA., Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand J gastroenterol.* 2010 Apr;45(4):395-402
30. Habara T, Nakatsuka M, Konishi H, Asagiri K, Noguchi S, Kudo T. Elevated blood flow resistance in uterine arteries of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2002;17(1):190-4.

31. Ying Y, Zhong YP, Zhou CQ, Xu YW, Wang Q, Li J, Shen XT, Wu HT. Antinuclear antibodies predicts a poor IVF-ET outcome: impaired egg and embryo development and reduced pregnancy rate. *Immunol Invest.* 2012;41(5):458-68.
32. Tan E.M, T, Feltkamp E, Smolen W. J. S. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *arthritis and rheumatism.* Vol. 40, No 9, September 1997, pp 1601-1611
33. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun.* 2012 May;38(2-3):J266-74.
34. Metodický pokyn Ministerstva zdravotnictví ČR "Cílený screening celiakie". *Věstník MZ ČR* 2008, částka 3, s. 51-54