



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Julija ŠMID

**VLOGA IMUNSKEGA STANJA PRI NEPLODNOSTI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Julija ŠMID

**VLOGA IMUNSKEGA STANJA PRI NEPLODNOSTI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**THE ROLE OF IMMUNE STATUS IN INFERTILITY**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Mojco Narat.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Damjana DROBNE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 28. 8. 2018

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 612.633:612.017(043.2)
- KG imunsko stanje, neplodnost, oploditev, ugnezditev, protitelesa, imunoterapija
- AV ŠMID, Julija
- SA NARAT, Mojca (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2018
- IN VLOGA IMUNSKEGA STANJA PRI NEPLODNOSTI
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VIII, 20 str., 1 pregl., 1 sl., 55 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Neplodnost je bolezen, ki je v sodobnem svetu vse pogosteje diagnosticirana. Vzrokov neplodnosti je veliko, eden izmed njih je imunska neplodnost. Imunsko stanje je pomembno pri zagotavljanju optimalnih pogojev za potovanje ženskih in moških spolnih celic po ženskem genitalnem traktu, njihovo združitev ter kasneje ugnezditev, rast in razvoj. Težave, povezane z imunsko neplodnostjo, se pojavljajo na različnih nivojih in jih je mnogokrat težko ustrezno ovrednotiti. Glavno orodje za zmanjšanje neplodnosti, povezane z imunskimi motnjami, je supresija ali regulacija imunskega sistema s pomočjo imunoterapije.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDK 612.633:612.017(043.2)
- CX immune status, infertility, fertilization, implantation, antibodies, immunotherapy
- AU ŠMID, Julija
- AA NARAT, Mojca (mentor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2018
- TI THE ROLE OF IMMUNE STATUS IN INFERTILITY
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VIII, 20 p., 1 tab., 1 fig., 55 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the modern world, infertility is an increasingly diagnosed disease. There are many causes of infertility, immune infertility being one of them. When it comes to ensuring the optimum conditions for the transport of female and male gametes through the female genital tract, the implantation, and the growth and development of the gametes, the immune status plays an important role. Fertility problems arise at various levels and are thus often difficultly assessed properly. The infertility caused by the immune disorders can be decreased with the help of immunotherapy, which causes immunosuppression or immunoregulation.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO SLIK	VIII
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	1
<b>2</b>	<b>MOŠKI IN REPRODUKCIJA</b>	1
2.1	SEMENSKA TEKOČINA	2
2.2	SPERMIJI	2
2.3	KAPACITACIJA IN AKROSOMSKA REAKCIJA	2
<b>3</b>	<b>ŽENSKE IN REPRODUKCIJA</b>	2
3.1	OPLODITEV	3
3.2	UGNEZDITEV	3
<b>4</b>	<b>IMUNOLOŠKI DEJAVNIKI NEPLODNOSTI</b>	3
4.1	IMUNSKI SISTEM	4
4.2	DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA NEUSPEŠNO OPLODITEV	4
<b>4.2.1</b>	<b>Mukozna imunost ženskega genitalnega trakta</b>	4
<b>4.2.2</b>	<b>Preobčutljivost ženskega genitalnega trakta</b>	5
<b>4.2.3</b>	<b>Protitelesa proti spermijem</b>	6
4.3	DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA NEUSPEŠNO UGNEZDITEV	7
4.4	T-REGULATORNE CELICE	7
<b>4.4.1</b>	<b>Avtoimunske motnje ugnezditve</b>	7
4.4.1.1	Antifosfolipidna protitelesa	8
4.4.1.2	Celice naravne ubijalke	8
<b>4.4.2</b>	<b>Izoimunske motnje ugnezditve</b>	9
4.4.2.1	Molekule HLA	9
4.4.2.2	HLA-G	9
4.4.2.3	Rh faktor	10
<b>5</b>	<b>IMUNOTERAPIJA</b>	11
5.1	IMUNOTERAPIJA Z MALIMI MOLEKULAMI	11

<b>5.1.1</b>	<b>Prednizolon</b>	11
<b>5.1.2</b>	<b>Takrolimus</b>	11
<b>5.1.3</b>	<b>Ciklosporin</b>	11
5.2	IMUNOTERAPIJA Z VELIKIMI MOLEKULAMI	12
<b>5.2.1</b>	<b>INTRAVENOZNI IMUNOGLOBULINI</b>	12
<b>5.2.2</b>	<b>Protitelesa anti-TNF</b>	12
5.2.2.1	Adalimumab (Humira)	12
5.2.2.2	Etanercept (Enbrel)	13
<b>5.2.3</b>	<b>G-CSF</b>	13
<b>5.2.4</b>	<b>GM-CSF</b>	13
5.3	CELIČNA IMUNOTERAPIJA	14
<b>5.3.1</b>	<b>PLI</b>	14
5.4	INTRALIPIDI	14
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČEK</b>	16
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	16

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste imunoterapije pri zdravljenju neplodnosti in mehanizmi delovanja .....	15
---	----

## KAZALO SLIK

Slika 1: Aglutinacijski učinki ASA. Aglutinacija (A) glave spermijev, (B) repa spermijev, (C) končnega dela repa spermijev, (D) simultana aglutinacija glave in repa spermijev (Ulcova-Gallova, 2006, cit po. Brazdova, 2014). .....	6
--	---





## 1 UVOD

Neplodnost je bolezen reproduktivnega sistema, ki je definirana kot nezmožnost klinične zanositve po dvanajstih mesecih ali več rednih, nezaščitenih spolnih odnosov, kar velja za ženske, ki so mlajše ali starejše od 35 let. Predstavlja oslABLJENO ZMOŽNOST REPRODUKCIJE pri posamezniku ali pri njegovem partnerju (Zagers-Hochschild in sod., 2017). Neplodnost prizadene vsak sedmi par v zahodnem svetu in vsak četrti par v državah v razvoju. V določenih regijah sveta, vključno z državami Srednje Evrope, je neplodnih parov do kar 30 % (Mascarenhas in sod., 2012), med katerimi je najvišji tudi delež neplodnih moških (Agarwal in sod., 2015).

Vzroki neplodnosti so različni (Gnoth in sod., 2005) in v splošnem temeljijo na prirojelih, hormonskih, morfoloških ali imunoloških motnjah, kljub temu pa je gotov vzrok težko diagnosticirati (Brazdova, 2014).

Neplodnost velja za zelo razširjeno kronično zdravstveno motnjo, ki prizadene pare neodvisno od starosti. Če se pri standardnih preiskavah spermioograma oz. analize semena, testa ovulacije in histerosonosalpingografije oz. testov prehodnosti jajcevodov (HSSG) ne zazna nobenih abnormalnosti, velja neplodnost za nepojasnjeno (Gleicher in Barad, 2006). Nepojasnjena neplodnost (NP) je bila do pred kratkim še relativno neznana tematika, dandanes pa se na področju reproduktivne medicine pojavlja vedno več člankov, povezanih z njo. Endometrioze, tubularna neplodnost, prezgodnje staranje jajčnikov in imunska neplodnost so diagnoze, ki naj bi po določenih navedbah (Gleicher in Barad, 2006; Siristatidis in Bhattacharya, 2007) pojasnjevale NP. Dejavnike imunske neplodnosti bom na različnih nivojih tudi opisala.

## 2 MOŠKI IN REPRODUKCIJA

Sperma ali seme je koncentrirana heterogena suspenzija spermijev, ki se tekom ejakulacije izloča iz moških spolovil. Da je sposobna oploditi žensko spolno celico, morajo biti spermiji ustrezno vitalni, gibljivi in imeti normalno morfologijo. Sestava se med posamezniki razlikuje, in sicer glede na izgled, viskoznost, volumen, število celic, pH vrednost, vsebnost beljakovin itd. (Cooper in sod., 2010). Slednja je zelo pomembna za delovanje sperme, predvsem v interakciji z različnimi okolji v ženskem genitalnem traktu, kjer specifični peptidi in proteini delujejo kot signali za ženski imunski sistem, ki posledično sprejme ali zavrne moško spolno celico (Rodriguez-Martinez in sod., 2011).

## 2.1 SEMENSKA TEKOČINA

Semenska tekočina (ST) je tekoči del sperme in vsebuje različne organske in anorganske komponente (npr.  $\alpha$ -glukozidazo, hialuronidazo, karnitin, fruktozo, prostaglandine, citrat, cink, selen), ki so pomembne za metabolizem spermijev. S svojim pH, ki je 7,35–7,50, ščiti spermije pred kislim okoljem vaginalne flore. Tvori se v modih, obmodku in ostalih žlezah (prostata, semenski vezikli, Cowperjeva žleza). Sestava ST je podobna krvni plazmi, vendar pa se razlikuje v vsebnosti saharidov (Kumar in sod., 2009; Brazdova in sod., 2012). Vsebuje visoke koncentracije fruktoze, ki je glavni vir energije mitohondrijem v semenčicah tekom potovanja po ženskem reproduktivnem traktu. Njena kompleksna sestava zagotavlja uspešno oploditev jajčne celice (Pilch in Mann, 2006).

ST vsebuje tudi več imunoregulatornih faktorjev in imunogenih komponent, ki predstavljajo potencialne tarče vnetnih citokinov, levkocitov in kaskade komplemента v ženskem genitalnem traktu (Chung in sod., 1994; Sharkey in sod., 2007; Rodriguez- Martinez in sod., 2011).

## 2.2 SPERMIJI

Spermiji ali semenčice so moške spolne celice, velike približno 55–65  $\mu\text{m}$ . Sestavljeni so iz glave, osrednjega dela in repa. Glava spermija vsebuje jedro, ki nosi dedni zapis. Oblika glave je ravna in ovalna. Na skrajnem vrhnjem delu glave se nahaja struktura, imenovana akrosom, ki vsebuje proteolitične in hidrolitične encime. Encimi spermija mu skupaj z njegovo obliko pomagajo prodreti v jajčno celico. V osrednjem delu se nahajajo mitohondriji, mikrotubuli in zunanja gosta vlakna. V tem delu se nahajajo tudi encimi oksidativne fosforilacije. Encimatske in mikrotubulne komponente so odgovorne za poganjanje zadnjega dela, tj. repa, ki omogoča spermiju, da se lahko premika in s tem čim hitreje doseže žensko gameto. Giba se s krožnimi gibi in lahko doseže hitrost od 10 do 60  $\mu\text{m/s}$ . Mobilnost je odvisna od prisotnosti magnezijevih in kalcijevih ionov (Smith in sod., 2009).

## 2.3 KAPACITACIJA IN AKROSOMSKA REAKCIJA

Število spermijev, ki dejansko lahko oplodijo jajčece, je nizko. Najprej morajo dozoreti v procesu, imenovanem kapacitacija, šele nato lahko prodrejo v sloj okoli jajčne celice in se pripnejo na ustrezen receptor na njeni površini. Poleg omenjenega procesa, se iz akrosoma izločajo tudi proteolitični in hidrolitični encimi. Akrosomska reakcija omogoča končno penetracijo in zlitje obeh spolnih celic (Eisenbach in Giojalas, 2006).

## 3 ŽENSKA IN REPRODUKCIJA

Jajčece ali ovum je ženska spolna celica, ki jo izločajo ženski spolni organi. Je okrogla in bistveno večja od moške (150-300  $\mu\text{m}$ ). Zaščitena je z zono pellucido (ZP), ki jo obdajajo

kumulusne in koronarne celice. Vsebuje rumenjarkovo vrečko, ki predstavlja vir hrane zarodku v zgodnjem embrionalnem razvoju (Brazdova, 2014; Okabe, 2014).

### 3.1 OPLODITEV

Oploditev ali fertilizacija je proces, pri katerem pride do združitve moške in ženske gamete, posledica tega pa je nastanek zigote, prve stopnje razvoja novega organizma. Iz nje se tekom embrionalnega razvoja ustvari nov organizem. Že nekaj sekund po ejakulaciji se pH nožnice iz kislega spremeni v bazičnega. ST redči cervikalni mukus in s tem omogoča lažji prehod spermijev proti jajčni celici. Ključen korak pri oploditvi je penetracija spermija v zono pellucido, tj. glikoproteinski sloj okoli membrane jajčne celice. Do oploditve pride v razširjenem delu jajcevoda, tj. ampuli. Zigota se deli in potuje naprej proti maternici. Zgodnjo fazo embrionalnega razvoja predstavlja morula, ki se okoli osmega ali devetega dneva po oploditvi ugnezdi (Brazdova, 2014; Dekel in sod., 2010).

### 3.2 UGNEZDITEV

V času ugnezditve se oplojena jajčna celica, ki se imenuje blastocista, ugnezdi v steno maternice. Trofoblasti, specializirane celice embria, ki se kasneje diferencirajo v placento, začnejo tvoriti povezave z endometrijem, tj. notranjim epitelom maternice. To omogoča osnovo za prehransko, hormonsko in respiratorno izmenjavo preko matere na zarodek (Brazdova, 2014; Dekel in sod., 2010). Endometrij je v času ugnezditve preplavljen s številnimi levkociti matere, ki ščitijo zarodek pred zavrnitvijo materinega imunskega odziva. Kljub temu, da celice zarodka na svoji površini izražajo paternalne antigene, ki bi jih v normalnih pogojih materin imunski sistem prepoznal kot sebi tuje, celice imunskega sistema matere pomagajo pri zaščiti embria. Pomembno vlogo pri tem imajo limfociti B in T, celice naravne ubijalke (NK), monociti in makrofagi ter s citokini in rastnimi faktorji povezano signaliziranje (Somerset in sod., 2004; Kofod in sod., 2018).

## 4 IMUNOLOŠKI DEJAVNIKI NEPLODNOSTI

Poleg endometrioz, tubularne neplodnosti in prezgodnjega staranja jajčnikov, ki predstavljajo odgovor na NP, obstajajo tudi imunološki dejavniki, ki so odgovorni za neuspešno zanositev. Postajajo vse resnejši zdravstveni problem, saj onemogočajo normalno reprodukcijo (Gleicher in Barad, 2006). Težave pri neplodnosti v povezavi z imunskim sistemom se lahko pojavljajo na nivoju oploditve ali na nivoju ugnezditve. Da bi razumeli, kako sta imunski sistem in neplodnost povezana, je najprej potrebno strniti, kaj imunski sistem sploh je.

## 4.1 IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem je kompleksen skup organov, tkiv, celic, molekul, ki delujejo v smeri obrambe pred telesu tujimi snovmi. Funkcije in lastnosti imunskega sistema so prepoznavanje antigenov, ločevanje med lastnim in tujim ter obramba pred tujim. Glede na mehanizme obrambe, ga delimo na naravni ali prirojeni ter specifični ali pridobljeni imunski odziv, čeprav so komponente obeh tesno povezane (Abbas in sod., 2016). Naravni imunski odziv ni specifičen in zagotavlja takojšnjo ter maksimalno obrambo. Sistem predstavljajo epitelne bariere, nevtrofilci, monociti in iz njih nastali makrofagi, celice naravne ubijalke (natural killer, NK), sistem komplementa in citokini naravne imunosti. Specifični imunski odziv je obrambni sistem gostitelja, ki se primarno odraža na antigen-specifičnih receptorjih, ki jih na svoji površini izražajo limfociti B in T. Sproži se, če v telo vdre tuja snov. Nosilci specifičnega imunskega odziva so limfociti, vrsta levkocitov, in njihovi produkti (Abbas in sod., 2016; Chaplin, 2010).

## 4.2 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA NEUSPEŠNO OPLODITEV

Ob spolnem odnosu na milijone moških spolnih celic vstopi v nožnico. Cervikalni in vaginalni mukus ženskega genitalnega trakta predstavljata medij za njihov transport in zaščito. Ker imajo spermiji na svoji površini številne antigene, ki so med seboj heterogeni, imajo tudi visok avto- in izo-imunizacijski potencial. Tako lahko pri moških in ženskah inducirajo nastajanje spermalno reaktivnih celic T. Protitelesa, ki jih imenujemo protitelesa proti spermijem (anti-sperm antibodies, ASA), opsonizirajo moške spolne celice, motijo kapacitacijo in akrosomsko reakcijo ter otežujejo njihovo penetracijo v ZP. Takšne kasnejše fagocitirajo levkociti (Franklin in Kutteh, 1999; Bronson, 2011).

### 4.2.1 Mukozna imunost ženskega genitalnega trakta

Ključna vloga mukozne imunosti je na lokalni ravni omejiti ali preprečiti vstop okoljskih antigenov v ženski genitalni trakt. Žleze z zunanjim izločanjem materničnega vratu zato izločajo cervikalni mukus, ki je v večini sestavljen iz vode, poleg vode pa vsebuje tudi glikoproteinsko mrežo, ki je napolnjena s sluzjo. Ta je bogata z imunoglobulini (IgG, IgA, IgM), kalcijem, natrijem, kalijem, fruktozo in glukozo, aminokislinami, C3 in C4 komponentami komplementa, citokini, prostaglandini in elementi v sledovih (Zn, Cu, Fe, Mn, Se). Fruktoza je sladkor, ki je pomemben za uspešen metabolizem spermijev. Cervikalni mukus vsebuje tudi glicerol, ki deluje kot naravni lubrikant in hkrati predstavlja medij za transport sperme (Woof in Mestecky, 2005; Mestecky in sod., 2007; Brazdova, 2014).

IgG je najpogostejši imunoglobulin v serumu in predstavlja kar 75 % vseh Ig. Pojavlja se v štirih različnih podrazredih in je edini izmed protiteles, ki lahko prečka placento. Pripenja se na makrofage in monocite ter določene limfocite, ki imajo receptorje Fc za Fc regijo IgG. Je dober opsonin in pripravi antigene na fagocitozo (Schroeder in Cavacini, 2010).

IgA je protitelo, ki se nahaja v serumu in izločkih. Kadar se nahaja v serumu, je monomer, značilen pa je predvsem za izločke (solze, slina, mukus, kolostrum), kjer se pojavlja v dimerni obliki. Obstaja v dveh podrazredih, IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub>, v cervikalnem in vaginalnem mukusu je koncentracija obeh enaka. Ima protivneten učinek, saj veže antigene in oteži njihov vstop v sluznico. Tako inhibira sistem komplementa in zmanjša vpliv antigena na celice NK (Woof in Mestecky, 2005).

IgM je pentamer in največje protitelo ter se ob okužbi v celicah B sintetizira prvi. IgM je tretji najpogostejši immunoglobulin v serumu. Ima deset vezišč, kar omogoča odlično aglutinacijo in odstranitev antigenov. Pri aktivaciji klasične poti komplementa je IgM učinkovitejši od IgG. Zelo je pomemben pri upočasnjevanju ali preprečevanju širjenja patogena v začetnih fazah bolezni (Schroeder in Cavacini, 2010).

Na mukozno imunost, in s tem na koncentracijo izločenih imunoglobulinov, vplivajo citokini in hormoni (Franklin in Kutteh, 1999). Sestava cervikalnega mukusa je torej odvisna od faze menstrualnega ciklusa. pH mukusa cerviksa je v osnovi kisel, vendar tekom ovulacije postane bazičen, da spermijem omogoči preživetje. pH se zviša, ker se povečata količina vode in elektrolitov. Takrat se koncentraciji IgG in IgA znižata. To se zgodi zaradi IL-1 $\beta$  (Woof in Mestecky, 2005; Mestecky in sod., 2007; Brazdova, 2014).

Cervikalni mukus vsebuje ASA. Od njihove koncentracije je odvisno potovanje spermijev skozi mukus vse do jajčne celice in nadaljnja oploditev. Koncentracija ASA kot protiteles IgA in IgG je najvišja v lutealni in folikularni fazi menstrualnega ciklusa. Najnižja je v času ovulacije (Franklin in Kutteh, 1999).

#### **4.2.2 Preobčutljivost ženskega genitalnega trakta**

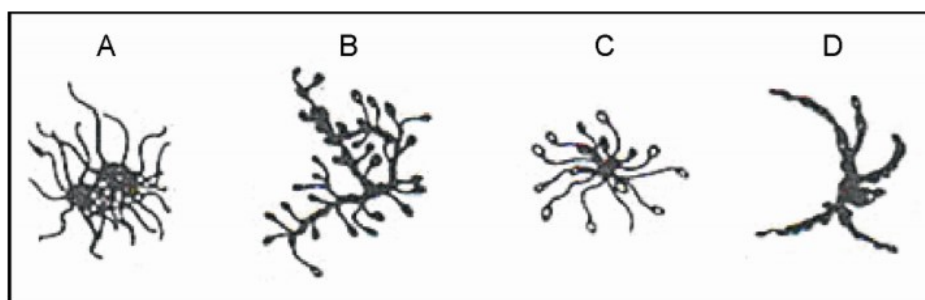
Izredno redek pojav do katerega lahko pride, če je ženski genitalni trakt preobčutljiv na moško seme, je alergija na humano seminalno plazmo (human seminal plasma allergy, HSPA) (Shah in Panjabi, 2004). Pri tem pride do tvorbe protiteles IgE (Weidinger in sod., 2006; Brazdova in sod., 2012), in posledično do pojava simptomov, ki so lahko lokalni in/ali sistemski, ter se pojavijo takoj ob stiku s spermo ali pa nekaj ur po spolnem odnosu. Lokalni vzroki vključujejo srbenje, pekoč občutek, rdečico in otekanje vulve ali nožnice. Napačno se jih lahko diagnosticira kot bakterijska, glivična ali virusna vnetja. Pri sistemskih vzrokih pride do pojava koprivnice, otekanja obraza, jezika, ust, grla, oteženega dihanja, piskanja, kašlja, slabosti, bruhanja in driske. To lahko vodi v anafilaktični šok, ki je smrtno nevaren. Simptomi se v do 50 % primerov pojavijo takoj po prvem spolnem odnosu. Ženske, ki so utrpel alergijske reakcije tekom prvega spolnega odnosa, so lahko občutljive na druge alergene, ki križno reagirajo s ST. Pacientke s HSPA imajo težave pri zanositvi, vendar pa neplodnost še ni bila dokazana (Weidinger in sod., 2006; Bernstein, 2011; Shah in Panjabi, 2004).

IgE je monomerno protitelo, ki se v serumu pojavlja najredkeje. Veže se na mastocite in bazofilce, zato ima glavno vlogo pri alergijskih reakcijah. Stik IgE z antigenom vodi v sproščanje signalnih molekul iz mastocit (npr. histamini), kipovzročajo alergijske reakcije. IgE in MALT detektirata patogene, ki vstopajo v telo in na mestu vstopa povečujeta imunski odziv (Schroeder in Cavacini, 2010).

#### 4.2.3 Protitelesa proti spermijem

ASA so strukturno imunoglobulini različnih izotipov. Določimo jih v krvi in limfi ter na lokalni ravni v seminalni tekočini moških in cervikalno-vaginalnem mukusu pri ženskah. V splošnem se pri ženskah ASA največkrat pojavljajo kot IgG v krvi, kot IgA pa v cervikalno-vaginalnem mukusu. Pri moških sta IgG in IgA najpogostejša v ejakulatu, IgG in IgM pa v krvnem serumu. Na spermije ASA delujejo citotoksično, jih imobilizirajo in v končni fazi aglutinirajo (Brazdova, 2014). Pri moških pride najpogosteje do tvorbe ASA zaradi vnetij ali okužb ter operacij genitalij, vnetja obmodka, nespuščenih testisov in razširjenih ven na testisih (Kosanović in Janković, 2010). ASA povzročajo slabšo mobilnost spermijev in njihovo vezavo na jajčno celico. Pri ženskah ASA vplivajo na mnoge procese pred in po oploditvi, npr. na gibljivost in aglutinacijo spermijev, potovanje spermijev skozi cervikalni mukus, kapacitacijo, akrosomsko reakcijo, pripenjanje in penetracijo v zono pellucido itd. (Brazdova in sod., 2012). Pojavijo se lahko tudi citotoksična protitelesa, ki moške spolne celice dejansko uničijo (Brazdova, 2014).

Prisotnost zgolj enega antigena na spermiju ne povzroči neplodnosti. Da se to zgodi, morajo biti navzoči multipli antigeni in s tem multipla ASA. Na plodnost ravno tako ne vplivajo vsa ASA, ki jih producira moško ali žensko telo, saj vpleteni antigen ni nujno vključen v proces oploditve (Brazdova, 2014; Bronson, 2011). Do tvorbe ASA pride pogosteje, kot do tvorbe protiteles proti jajčni celici (Bohring in Krause, 2003).



Slika 1: Aglutinacijski učinki ASA. Aglutinacija (A) glave spermijev, (B) repa spermijev, (C) končnega dela repa spermijev, (D) simultana aglutinacija glave in repa spermijev (Ulcova-Gallova, 2006, cit. po Brazdova, 2014).

### 4.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA NEUSPEŠNO UGNEZDITEV

Priprava endometrija je osnova za uspešno nosečnost. Vršni se tekom vsakega menstrualnega ciklusa v času lutealne faze pred ugnezditvijo. Gre za debeljenje notranje stene maternice, ki je ključno za pripravo imunske tolerance matere in zaščito embria. V tem času je v endometriju izmed vseh celic imunskega sistema 65–75 % celic NK. Ostale odstotke predstavljajo makrofagi, dendritične celice ter regulatorne celice T (Treg). Pred ugnezditvijo pride do preklopa celic Th1 specifične imunosti, ki izločajo IL-2, IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$ , v celice Th2 naravne imunosti, ki izločajo IL-4, IL-5 in IL-10. V celicah endometrija namreč nastajata dva citokina, IL-15 in IL-18. IL-15 je direktno udeležen v zorenju celic NK maternice in je bistvenega pomena za proizvodnjo citokinov v celicah Th2. IL-18 je citokin, ki spodbuja nastajanje celic Th2 in se poveča med ugnezditvijo. Njegova vloga je preoblikovanje krvnih žil matere. Ta prekop je ključnega pomena za ugnezditvev in uspešno nosečnost, saj zmanjšuje citotoksično delovanje celic NK v maternici proti embriu. Th1 odziv je povezan z lizo trofoblastnih celic in je opažen pri ženskah z NP (Lédée in sod., 2016; Kofod in sod., 2018).

### 4.4 T-REGULATORNE CELICE

Celice Treg so specializirana subpopulacija celic T in imajo ključno vlogo pri imunosupresiji in preprečevanju avtoimunosti. Večina se jih razvije v timusu, nekatere tudi v perifernih limfnih organih, in sicer iz naivnih celic T pomagalk (Th). Diferenciacija in delovanje celic je odvisno od izražanja specifičnega transkripcijskega faktorja FoxP3 in kasneje sinteze dveh citokinov, TGF- $\beta$  in IL-10 (Sakaguchi, 2000; Jasper in sod., 2006). Z izločanjem TGF- $\beta$  in IL-10 celice Treg povečajo zaščito fetusa in na različnih nivojih utišajo imunski odziv. To naredijo z inhibicijo aktivacije limfocitov, dendritičnih celic in makrofagov. Na svoji površini lahko izražajo CTLA-4, kostimulatorno molekulo, ki odstrani ali blokira molekule B7 na antigen predstavitevni celicah (APC) ter s tem onemogoči aktivacijo celic T preko CD28. CTLA-4 lahko tudi stimulira celice T, da v večini izločajo TGF- $\beta$  (Sakaguchi, 2000).

Večina celic Treg je CD4<sup>+</sup> in na svoji površini izražajo CD25, receptor za IL-2. V normalnih pogojih je v prvem trimesečju nosečnosti število CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> celic Treg močno povečano in ostaja takšno vse do rojstva otroka. Znižano število teh celic pa rezultira v spontanem splavu (Somerset in sod., 2004). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> celice Treg so nujne za normalni potek nosečnosti (Jasper in sod., 2006).

#### 4.4.1 Avtoimunske motnje ugnezditve

Obstaja veliko različnih avtoimunskih disfunkcij ugnezditve, ki so povezane z različnimi protitelesi. Gre za to, da celice imunskega sistema ženske formirajo protitelesa proti lastnemu tkivu. Avtoimunske motnje so najpogostejše, in sicer rezultirajo v več kot 90 % vseh imunološko povezanih neplodnostih. Vključujejo antifosfolipidna, antitiroidna protitelesa,



protitelesa proti aneksinu, protrombinu, lamininu in zoni pellucidi (ZP) ter celice naravne ubijalke. Nekatere najpogosteje povezane z neplodnostjo so (Brazdova in sod., 2016):

#### 4.4.1.1 Antifosfolipidna protitelesa

Antifosfolipidni sindrom je avtoimunska motnja ženskega imunskega sistema, pri kateri le-ta proizvaja abnormalna protitelesa, ki jih imenujemo antifosfolipidna protitelesa (anti-phospholipid antibodies, APA). APA se tarčno vežejo na negativno nabite dele fosfolipidov, bolj natančno na fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidiletanolamin,  $\beta$ 2-glikoprotein, aneksin V in kardiolipin. Takšna vezava povzroča povečano tvorbo krvnih strdkov. APA so v večini protitelesa IgG, spremljajo jih tudi IgA in IgM. Povezujemo jih z zgodnjim ali poznim spontanim splavom, znotrajmaternično smrtjo zarodka in placentarno trombozo (Brazdova, 2014).

APA imajo visoko afiniteto vezave na fosfatidilserin, fosfolipidno komponento, ki se izraža na trofoblastih. Fosfatidilserin-specifična APA povzročajo vaskularne poškodbe placente in s tem hipotrofijo fetusa. Materino telo zaščiti plod s proizvodnjo večje količine antikoagulantov, vendar pa s tem ogrozi zarodek, saj lahko zaradi kasnejše tvorbe protiteles proti antikoagulantom pride do spontanega splava. Še vedno ni potrjeno, da je povišana koncentracija APA dejansko vzrok neplodnosti, kljub temu pa naj bi bile povezane z mentalno zaostalostjo novorojenčka (Ruiz-Irastorza in sod., 2010)

#### 4.4.1.2 Celice naravne ubijalke

Kljub temu, da se je v zadnjih letih veliko imunoloških raziskav (Brazdova in sod., 2016; Somerset in sod., 2004; Sakaguchi, 2000) osredotočilo na specifični imunski sistem, ki vključuje limfocite B in T, pa ne smemo pozabiti na pomembne akterje, tj. celice naravne ubijalke. Celice NK so veliki granulirani limfociti, ki na svoji površini ne izražajo receptorjev celic B in T (BCR, TCR), izražajo pa številne druge receptorje (npr. CD16, CD56). Nahajajo se v krvi in perifernih limfnih organih in predstavljajo približno 10 % vseh limfocitov. So torej vrsta belih krvnih celic in so del nespecifičnega oz. prirojenega imunskega sistema. Celice NK prepoznajo okuženo celico ter se odzovejo tako, da jo ubijejo. Če pridejo v stik z makrofagom, prepoznajo IL-12, ki ga makrofagi s fagocitiranim mikrobom izločajo. Celice NK se odzovejo z izločanjem IFN- $\gamma$ , citokina, ki aktivira makrofage, da ubijejo fagocitirane mikrobe (Abbas in sod., 2016).

Celice NK so vrsta celic imunskega sistema, ki se najbolj množično pojavljajo v maternici, predvsem v sluznici in endometriju. Njihovo število je največje ravno v času ugnezditev, ko se poveča vse do 70 %, če do le-te pride. Nižati se začne okoli 20. tedna nosečnosti, do konca nosečnosti pa celice NK povsem izginejo. Celice NK imajo receptorje, ki se direktno vežejo s celicami placente, proizvajajo pa citokine, ki spodbujajo rast trofoblastnih celic. Citokini so načeloma v ravnovesju, tako da je razvoj embria zavarovan. Če pride do prekomernega ali

napačnega nastajanja citokinov, le-ti ogrožajo trofoblastne celice, kar povzroča nefunkcionalno ugnezditev (Dosiou in Giudice, 2005). Povečana aktivnost celic NK je torej povezana neuspešno ugnezditvijo.

#### 4.4.2 Izoimunske motnje ugnezditve

Izoimunske motnje vključujejo formacijo protiteles proti tkivu, ki je povezano s tujim, npr. moškimi ali otrokom. Pojavljajo se v manj kot 10 % neuspešnih ugnezditvev (Brazdova, 2014; Brazdova in sod., 2016).

##### 4.4.2.1 Molekule HLA

Ključna naloga imunskega sistema je, da loči lastno od tujega. Pri tem predstavlja nosečnost specifično situacijo. Ko pride do oploditve, mora embrio na nek način sporočiti imunskemu sistemu matere, da ga prepozna kot sebi lastno tkivo, in ne kot sebi tuje tkivo, čeprav nosi determinante, ki materi niso lastne. To stori z izražanjem molekul MHC na površini trofoblastov, ki jih pri človeku imenujemo antigeni HLA (human leukocyte-associated) in jih delimo na dva glavna tipa (Chaplin, 2010).

Obstajajo trije glavni razredi molekul HLA tipa I: HLA-A, HLA-B in HLA-C. Vsakega kodira posamezen gen. So heterodimeri, sestavljeni iz polimorfne transmembranske  $\alpha$ -verige in nepolimorfne  $\beta$ -2-mikroglobulina. Molekule HLA tipa I izražajo APC, ki antigene predstavijo preko TCR  $CD8^+$  celici T. Tudi molekule tipa II so sestavljene iz dveh polipeptidnih verig, vendar gre v tem primeru za MHC-kodirana transmembranska proteina  $\alpha$ -in  $\beta$ -verige. Obstajajo trije glavni razredi HLA molekul tipa II: HLA-DR, HLA-DQ in HLA-DP (Bjorkman, 1997). Proteine tipa II konstitutivno izražajo celice B, dendritične celice, monociti in makrofagi, torej vse APC, ki antigene predstavijo  $CD4^+$  celicam T. Izražanje tipa II lahko inducirajo tudi številne druge celice, vključno z epitelnimi in endotelnimi celicami, ki jih stimulira  $IFN-\gamma$ , ter jim omogoča, da antigene predstavijo  $CD4^+$  celicam T na mestih vnetja (Chaplin, 2010).

##### 4.4.2.2 HLA-G

HLA-G je univerzalni HLA, ki se izraža na celicah placent. Imunosupresivno deluje na celice NK, dendritične celice (DC), monocite, makrofage, B in T limfocite, citotoksične limfocite T (CTL) in celice T pomagalke ter zavira imunski odziv matere na embrionalne antigene: inducira apoptozo, inhibira proliferacijo in migracijo določenih celic, spremeni signalizacijo s pomočjo citokinov idr. (Hunt in sod., 2006). Zaradi vpliva HLA-G pride do neravnovesja med izločenimi citokini, ki jih producirajo celice Th1 in Th2 pomagalke. Prevladajo citokini Th1 (IL-2,  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ) (Chaplin, 2010). To vodi do progresivne ali nenadne trofoblastne motnje pri ugnezditvi, ki se najpogosteje kaže kot ponavljajoči se

spontani splav. Lahko pa se zgodi, da se celice imunskega sistema matere ne odzovejo na sicer ustrezen signal HLA G. Imunski sistem matere napade embrio, vendar ga ne fagocitira, temveč inaktivira njegovo DNA. Posledično se celice prenehajo deliti, kar ustavi rast in razvoj embria (Hunt in sod., 2006).

#### 4.4.2.3 Rh faktor

Rh faktor je protein, ki ga najdemo na površini rdečih krvničk. Gre za kompleksen krvni sistem, ki vključuje veliko število antigenov. Kodirata ga dva gena, in sicer *RHD* in *RHCD*. Če je *RHD* odsoten, na površini eritrocitov ne zasledimo proteina in govorimo o Rh-negativni osebi. Če sta prisotna gena *RHD* in *RHCD*, je protein na površini izražen in oseba Rh-pozitivna. Rh-negativnih je približno 15 % populacije. Inkompatibilnost med krvno skupino matere in zarodka se pojavi med nosečnostjo. Predstavlja izoimunsko motnjo, ki v določenih izidih povzroči spontani splav. Če sta Rh faktorja matere in zarodka različna, lahko pride do težav, saj so eritrociti zarodka sposobni prečkati posteljico. V tem primeru imunski sistem matere zazna plod kot tujek in začne proizvajati anti-Rh protitelesa. Ta protitelesa, ki so strukturno IgG, lahko ponovno prečkajo placento in napadejo krvničke fetusa. Temu pravimo hemolitična bolezen ploda in novorojenčka, pri kateri imajo eritrociti skrajšano življenjsko dobo zaradi protiteles v krvnem obtoku matere. Eritrociti so pomembni prenašalci kisika po tkivih organizma, zato njihovo zmanjšano število vodi do resnih zdravstvenih zapletov ali celo smrti zarodka ali novorojenčka. Težave se načeloma ne pojavijo tekom prve nosečnosti, saj telo v tako kratkem času ni sposobno proizvesti dovolj protiteles, ki bi ogrožala fetus. Če pa se protitelesa enkrat tvorijo, jih telo ne more samo odstraniti. Zato je v primeru ponovne nosečnosti potrebno preventivno zdravljenje. Kljub temu, da sta kri matere in otroka med nosečnostjo ločeni, lahko v določenih okoliščinah pride do stika med njima (amniocenteza, krvavitve med nosečnostjo, porod itd.). Rh-negativna mati prejme Rh-immunoglobuline v obliki injekcije, da se s tem prepreči nastajanje anti-Rh protiteles (Westhoff, 2007).

## 5 IMUNOTERAPIJA

Imunoterapija je način zdravljenja reproduktivnih motenj, ki jih povzročajo neravnovesja imunskega sistema. Uporablja se za aktivacijo ali blokado naravnih mehanizmov telesa v boju proti neplodnosti. V preteklih letih so za zdravljenje z imunoterapijo uporabljali pretežno steroidom podobne molekule, kot so prednizolon in intralipidi, ter intravenozne imunoglobuline (IVIG). Trenutno sta za zdravljenje neplodnosti z imunoterapijo v uporabi takrolimus in ciklosporin. To sta zdravili, ki delujeta kot supresorja in modulatorja imunskega odziva na splošno, s pridom pa se uporabljata za utišanje imunskega odziva matere ter na takšen način preprečujeta zavračanje embria in s tem neuspešno nosečnost. V porastu pa je uporaba novejših in bolj specifičnih metod, ki zmanjšajo število stranskih učinkov ter temeljijo na uporabi monoklonskih protiteles in citokinov. Glede na strukturo molekul ločimo tri različne metode imunoterapije (Abdolmohammadi-Vahid in sod., 2016):

### 5.1 IMUNOTERAPIJA Z MALIMI MOLEKULAMI

#### 5.1.1 Prednizolon

Prednizolon je protivnetno in imunosupresijsko sredstvo, ki lahko zmanjša nastajanje vnetnih citokinov. Uporablja se za zdravljenje avtoimunskih motenj in imunskih stanj v nosečnosti. Prednizolon je steroid, ki ima malo število stranskih učinkov. Le 10 % sredstva namreč doseže fetus, večina se ga razgradi v placenti. Deluje tako, da inhibira nastajanje citokinov v celicah Th1, kar pripelje do optimalnega razmerja med citokini Th1 in Th2. Višja koncentracija citokinov Th2 reducira število celic NK in omili njihovo delovanje, zato se ga uporablja pri ženskah, ki so že doživele spontani splav in imajo povečano število celic NK. Terapija s prednizolonom se uporablja tudi pri ženskah z APA (Fawzy in El-Refaeey, 2014).

#### 5.1.2 Takrolimus

Takrolimus je imunosupresijsko sredstvo, ki se uporablja pri transplantacijah. Takrolimus inhibira nastajanje, proliferacijo in aktivacijo imunskih celic, ki so udeležene v procesu zavrnitve presadka. Inhibira tudi proliferacijo limfocitov, citotoksičnih limfocitov T (CTL) in sintezo ter sproščanje IL-2. Učinkovit je pri avtoimunskih ter reproduktivnih motnjah, kjer pride do povišane koncentracije citokinov celic Th1 in pri težavah z ugneditvijo. Takrolimus se veže na vezavni protein FK506, ki se imenuje imunofilin FKBP12. Nastane nov kompleks, ki preprečuje transkripcijo IL-2 gena in signalizacijo celic T preko interakcije s kalcinevrinom (Kino in sod., 1987).

#### 5.1.3 Ciklosporin

Ciklosporin je imunosupresivno sredstvo, ki zmanjša tveganje zavrnitve presadka po transplantaciji. Inhibira signalne poti, ki so pomembne za aktivacijo limfocitov T in

transkripcijo IL-2 (kalcinevrin/kalmodulin/NF-AT pot). Zmožen je povečati produkcijo IL-4, kar ugodno vpliva na Th2 imunski odziv, hkrati pa inhibira nastajanje Th1 citokinov. Posledično zmanjša delovanje celic NK, makrofagov in dendritičnih celic. V prvih treh mesecih nosečnosti inducira povezavo trofoblastov z endometrijem ter inhibira njihovo apoptozo. Uporaben je tudi za zdravljenje avtoimunskih motenj (Zhou in sod., 2007).

## 5.2 IMUNOTERAPIJA Z VELIKIMI MOLEKULAMI

### 5.2.1 INTRAVENOZNI IMUNOGLOBULINI

Intravenozni imunoglobulini so narejeni iz prečiščene človeške plazme več tisočih zdravih donorjev. Vsebujejo širok spekter naravnih protiteles in nepatogenih avtoprotiteles, protiteles proti eksogenim antigenom (npr. bakterijam), fragmente Fab IgG, imunomogulatorne peptide (npr. CD95) in mnoge citokine (npr. IL-2, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  itd.). V imunoterapiji se uporabljajo kot imunomodulatorji, in sicer zmanjšajo število celic NK s citotoksično aktivnostjo. IVIG povečajo ekspanzijo supresorskih celic T in izboljšajo njihovo funkcijo. Zmanjšujejo nastajanje protiteles (Virro in sod., 2012). IVIG se uporabljajo skupaj z drugimi imunoterapijami, npr. s prednizolonom ali adalimumabom, da se izboljša učinkovitost in uspešnost zdravljenja (Winger in sod., 2009).

### 5.2.2 Protitelesa anti-TNF

Anti-TNF so protitelesa, ki se dandanes uporabljajo za zdravljenje motenj, povezanih s spontanimi splavi. Gre za tip imunoterapije, ki ima za tarčo vnetne citokine. Novejši zaviralci v uporabi so protitelesa anti-TNF- $\alpha$ . Ameriška Agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration) jih je odobrila pet, vendar sta v uporabi za zdravljenje neplodnosti in spontanih splavov le dva : adalimumab in etanercept. Ker gre za novejša zdravila, še ni preizkušeno, ali imajo več koristnih ali škodljivih učinkov (Rump in Schönborn, 2010).

TNF- $\alpha$  in IL-10 sta citokina, ki imata recipročno delovanje. Celice Th1 izločajo TNF- $\alpha$ , medtem ko IL-10 izločajo celice Th2 in Treg. Za normalen potek nosečnosti morajo biti koncentracije celic Th2 in Treg ter s tem IL-10 visoke. Ker IL-10 inhibira sintezo citokinov Th1 ter s tem TNF- $\alpha$ , in hkrati stimulatorno deluje na celice Th2 in Treg, poveča zaščito fetusa in hkrati zmanjša možnost imunskega napada nanj. Obratno pa povečana koncentracija celic Th1 ter TNF- $\alpha$  vodi v lizo trofoblastnih celic. Posledično ne pride do diferenciacije letih v placento (Sakaguchi, 2000; Lédée in sod., 2016; Kofod in sod., 2018).

#### 5.2.2.1 Adalimumab (Humira)

Adalimumab je v celoti humano monoklonsko protitelo IgG1 anti- TNF- $\alpha$ , ki se sintetizira s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA v sesalskih celicah, najpogosteje v ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO). Protitelo blokira interakcije TNF- $\alpha$  z njegovimi receptorji,

tako da se na Fv regijo adalimumaba veže TNF- $\alpha$ , in hkrati zmanjšuje razmerje med TNF- $\alpha$  in IL-10. Najbolje je, da je adalimumab prisoten v času ugnezditev, saj to še poveča uspešnost zanositve. V telesu je stabilen 10–20 dni (Winger in sod., 2009).

#### 5.2.2.2 Etanercept (Enbrel)

TNF se lahko veže na dva tipa receptorjev, tj. TNFR1 ali TNFR2. Prvega izraža večina celic, medtem ko je drugi specifičen za celice imunskega sistema. Etanercept je Fc-fuzijski protein, ki je v celoti humanega izvora in je narejen je iz ekstracelularne domene TNFR2 in Fc dela IgG1. Sintetizira se podobno kot adalimumab, in sicer z uporabo tehnologije rekombinantne DNA s transfekcijo plazmida v CHO celice. Delovanje etanercepta je podobno TNFR2, in sicer inaktivira TNF- $\alpha$  tako, da z ekstracelularno domeno TNFR2 veže TNF- $\alpha$ . Ker s tem zmanjša vnetni odziv, se uporablja za obvladovanje nosečnosti. Ker je fuzijski protein, je v telesu stabilen in učinkovit dalj časa od naravno prisotnih TNFR2. Kljub temu obstajajo polemike pri uporabi etanercepta, saj naj bi z inhibicijo TNF- $\alpha$  negativno vplival na ovulacijo (Sills in sod., 2001).

#### 5.2.3 G-CSF

Granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (G-CSF) je citokin, ki vpliva na proliferacijo in diferenciacijo granulocitov. Izločajo ga endometrijske in trofoblastne celice v nosečnosti, z vrhom v prvem trimesečju. G-CSF vpliva na ovulacijo in ugnezditve, ker trofoblastnim celicam in fetusu nudi zaščito. Povečuje tudi število celic Treg in IL-4 ter s tem spodbuja odziv Th2, aktivira dendritične in zmanjšuje delovanje celic NK, zato se uporablja pri zdravljenju ponavljajočih se spontanah splavov (Würfel, 2015).

#### 5.2.4 GM-CSF

Granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (GM-CSF) je kritični dejavnik diferenciacije in proliferacije matičnih celic v granulocite in makrofage. Producirajo ga epitelne celice ženskega reproduktivnega trakta, predvsem v času ugnezditve. Ženske s ponavljajočimi se spontanimi splavi imajo nižjo koncentracijo GM-CSF v primerjavi z zdravimi ženskami, zato se uporablja za njihovo zdravljenje. Citokin je učinkovit pri ugnezditvi in normalnemu poteku nosečnosti (Wicks in Roberts, 2016).

## 5.3 CELIČNA IMUNOTERAPIJA

### 5.3.1 PLI

Imunizacija s paternalnimi limfociti (paternal lymphocyte immunization, PLI) je metoda imunoterapije, ki se uporablja za zdravljenje žensk, ki so imele spontane splave in neuspešne IVF. Pri PLI je donor limfocitov oče otroka ali zdrav donor z izraženimi različnimi HLA. Limfociti se obnašajo kot imunogeni, ki stimulirajo imunski odziv matere, tako da proizvaja protitelesa. Ta protitelesa blokirajo HLA antigene fetusa, da bi se izognili njihovemu prepoznavanju T-celic materinega imunskega sistema. Zelo pomembna pri tej metodi sta odmerek in način imunizacije. Optimalni učinek povzroči  $100 \times 10^6$  ali  $>100 \times 10^6$  limfocitov in intradermalni, intravenozni, subkutani, intrakutani ali intramuskularni način imunizacije. PLI lahko izvajamo v treh časovnih obdobjih, in sicer pred nosečnostjo, med nosečnostjo ter pred in med nosečnostjo matere (Pandey in sod., 2004). PLI poveča frekvenco celic CD4+ CD25+ Treg in izboljšala izid nosečnosti (Yang in sod., 2009).

## 5.4 INTRALIPIDI

Intralipidi so maščobne emulzije z imunosupresijskim delovanjem, ki jih v telo vnesemo intravenozno. Vsebujejo sojino olje, glicerin in jajčne fosfolipide, glavna komponenta pa je linolna kislina. Ne spadajo v nobeno od zgoraj naštetih metod, zato jih obravnavamo ločeno. Zaradi prisotnih večkrat nenasičenih maščobnih kislin intralipidi spremenijo sestavo fosfolipidne celične membrane in s tem delovanje imunskih celic, predvsem limfocitov. Zavirajo nastajanje citokinov Th1, npr. IL-2, ki predstavljajo aktivacijski signal za celice B in T. So relativno poceni metoda zdravljenja, ki zboljša rodnost pri ženskah s ponavljajočimi se spontanimi splavi (Granato in sod., 2000).

Preglednica 1: Vrste imunoterapije pri zdravljenju neplodnosti in mehanizmi delovanja

Vrsta imunoterapije	Mehanizem delovanja	Viri
<b>Prednizolon</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibira nastajanje Th1 citokinov</li> <li>• Zmanjšuje razmerje Th1/Th2</li> <li>• Zmanjšuje število celic NK in njihovo delovanje</li> </ul>	Fawzy in El-Refacey, 2014
<b>Takrolimus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibira kalcinevrin/kalmodulin/NF-AT signalno pot</li> </ul>	Kino in sod., 1987
<b>Ciklosporin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibira kalcinevrin/kalmodulin/NF-AT signalno pot</li> <li>• Preklop na Th2 odziv</li> <li>• Inhibira delovanje celic NK, DC, MF</li> <li>• Inhibira povezavo trofoblastov z endometrijem med nosečnostjo</li> </ul>	Zhou in sod., 2007
<b>IVIG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zmanjšuje število celic NK</li> <li>• Povečuje ekspanzijo supresorskih T-celic</li> <li>• Zmanjšuje nastajanje avtoproteiteles in protiteles</li> </ul>	Virro in sod., 2012
<b>Adalimumab</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blokira interakcije TNF-<math>\alpha</math></li> <li>• Zmanjšuje razmerje med TNF- <math>\alpha</math> in IL-10</li> </ul>	Winger in sod., 2009
<b>Etanercept</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inaktivira TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>	Sills in sod., 2001
<b>G-CSF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vpliv na proliferacijo in diferenciacijo granulocitov</li> <li>• Vpliv na ovulacijo in ugnezditev</li> <li>• Zaščita fetusa in trofoblastnih celic</li> <li>• Povečuje število Treg celic</li> <li>• Povečuje Th2 odziv s povečanim številom IL-4</li> <li>• Aktivira DC</li> <li>• Zmanjšuje delovanje celic NK</li> </ul>	Würfel, 2015
<b>GM-CSF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vpliv na zorenje jajčne celice in spermijev, ugnezditev, uspešno nosečnost, razvoj fetusa in rojstvo živega otroka</li> </ul>	Wicks in Roberts, 2016
<b>PLI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulira imunski sistem matere</li> <li>• Blokira HLA antigene fetusa</li> <li>• Poveča frekvenco CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg celic</li> </ul>	Pandey in sod., 2004; Yang in sod., 2009
<b>Intralipidi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spreminjajo sestavo fosfolipidne celične membrane</li> <li>• Inhibirajo nastajanje Th1 citokinov</li> </ul>	Granato in sod., 2000



## 6 ZAKLJUČEK

Neplodnost je reproduktivna motnja, ki je v sodobnem času vse bolj prisotna. Vzroki za nastanek so različni, vse več pa je takšnih, ki so povezani z nestabilnostjo imunskega sistema. Imunološki dejavniki vplivajo na neplodnost na različnih nivojih in s tem preprečujejo uspešno zanositev in nadaljnji potek nosečnosti. Imunoterapija kot način zdravljenja z uporabo imunosupresorjev in imunomodulatorjev očitno zmanjšuje negativne vplive imunoloških dejavnikov neplodnosti. Ker je reprodukcija ključnega pomena za ohranjanje človeške vrste, se na področju imunološke neplodnosti pojavlja vedno več člankov. Sklepam, da se bo v prihodnosti njihovo število še povečevalo in s tem pripomoglo k inovativnejšim, varnejšim in učinkovitejšim pristopom zdravljenja.

## 7 VIRI

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. 2016. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune system*. 5th ed. Missouri, Elsevier: 334 str.
- Abdolmohammadi-Vahid S., Danaii S., Hamdi K., Jadidi-Niaragh F., Ahmadi M., Yousefi M. 2016. Novel immunotherapeutic approaches for treatment of infertility. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84: 1449-1459
- Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M. R. 2015. A unique view on male infertility around globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13, 37, doi:10.1186/s12958-015-0032-1: 9 str.
- Bernstein J. A. 2011. Human seminal plasma hypersensitivity: an under-recognized women's health issue. *Postgraduate Medicine*, 123, 1: 120-125
- Bjorkman P.J. 1997. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell*, 89, 2: 167-170
- Bohring C., Krause W. 2003. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. *Human Reproduction*, 18, 5: 915-924
- Brazdova A. 2014. Study of immunological properties of sperm and seminal plasma antigens: anti-seminal and anti-sperm antibodies in female immune infertility: characterization of targeted proteins. *Immunology*. Paris, Université Pierre et Marie Curie: 150 str.
- Brazdova A., Senechal H., Peltre G., Poncet P. 2016. Immune aspects of female infertility. *International Journal of Fertility and Sterility*, 10, 1: 1-10
- Brazdova A., Zidkova J., Peltre G., Ulcova-Gallova Z. 2012. IgG, IgA and IgE reactivities to sperm antigens in infertile women. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 5, 2: 85-89
- Bronson R. 2011. Biology of the male reproductive tract: its cellular and morphological considerations. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65, 3: 212-219

- Chaplin D. D. 2010. Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 2: 3-23
- Cooper T. G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H. W., Behre H. M., Haugen T. B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M. T., Vogelsong K. M. 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16: 231-245
- Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G. 2010. Inflammation and implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63, 1: 17-21
- Dosiou C., Giudice L.C. 2005. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine Reviews*, 26, 1: 44-62
- Eisenbach M., Giojalas L. C. 2006. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 276-285
- Fawzy M., El-Refaeey A.A. 2014. Does combined prednisolone and low molecular weight heparin have a role in unexplained implantation failure? *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289, 3: 677-680
- Franklin R. D., Kutteh W. H. 1999. Characterization of immunoglobulins and cytokines in human cervical mucus: influence of exogenous and endogenous hormones. *Journal of Reproductive Immunology*, 42, 2: 93-106
- Gleicher N., Barad D. 2006. Unexplained infertility: does it really exist? *Human Reproduction*, 21, 8: 1951-1955
- Gnoth C., Godehardt P., Frank-Herrmann P., Friol K., Tigges J., Greundl G. 2005. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human Reproduction*, 20, 5: 1144-1147
- Granato D., Blum S., Rössle C., Le Boucher J., Malnoë A., Dutot G. 2000. Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 24, 2: 113-118
- Hunt J. S., Langat D. K., McIntire R. H., Morales P. J. 2006. The role of HLA-G in human pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1: 10, doi:10.1186/1477-7827-4-S1-S10: 8 str.
- Jasper M. J., Tremellen K. P., Robertson S. A. 2006. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Molecular Human Reproduction*, 12, 5: 301-308
- Kino T., Hatanaka H., Miyata S., Inamura N., Nishiyama N., Yajima T., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H. 1987. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *The Journal of Antibiotics*, 40, 9: 1256-1265

- Kofod L., Lindhard A., Hviid T. V. F. 2018. Implications of uterine NK cells and regulatory T cells in the endometrium of infertile women. *Human Immunology*, 79, 9: 693-701
- Kosanović M. M., Janković M. M. 2010. Molecular heterogeneity of gelatin-binding proteins from human seminal plasma. *Asian Journal of Andrology*, 12, 3: 363-375
- Kumar N., Singh A. K. 2015. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8, 4:191-196
- Kumar V., Hassan M. I., Tomar A. K., Kashav T., Nautiyal J., Singh S., Singh T. P., Yadav S. 2009. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *Journal of Biosciences*, 34, 6: 899-908
- Lédée N., Petitbarat M., Chevrier L., Vitoux D., Vezmar K., Rahmati M., Dubanchet S., Gagery H., Bensussan A., Chaouat G. 2016. The uterine immune profile may help women with repeated unexplained embryo implantation failure after in vitro fertilization. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75, 3: 388-401
- Mascarenhas M. N., Flaxman S. R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G. A. 2012. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, 9, 12: e1001356, doi: 10.1371/journal.pmed.1001356: 12 str.
- Mestecky J., Russell M. W., Elson C. O. 2007. Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier? *The Journal of Immunology*, 179, 9: 5633-5638
- Okabe, M. 2014. Mechanism of fertilization: a modern view. *Experimental Animals*, 63, 4: 357-365
- Pandey M. K., Thakur S., Agrawal S. 2004. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 269, 3: 161-172
- Pilch B., Mann M. 2006. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biology*, 7: 40-49
- Rodriguez-Martinez H., Kvist U., Ernerudh J., Sanz L., Calvete J. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *American Journal of Reproductive Immunology*, 66: 11-22
- Ruiz-Irastorza G., Crowther M., Branch W., Khamashta M.A. 2010. Anti-phospholipid syndrome. *The Lancet*, 376: 1498-1509
- Rump J., Schönborn H. 2010. Conception and course of eight pregnancies in five women on TNF blocker etanercept treatment. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 69, 10: 903-909
- Russell P., Anderson L., Lieberman D., Tremellen K., Yilmaz H., Cheerla B., Sacks G. 2011. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women

- with recurrent reproductive failure I: Techniques. *Journal of Reproductive Immunology*, 91: 90-102
- Sakaguchi S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 101: 455-458
- Schroeder H. W., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. 2010. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 202: 41-52
- Shah A., Panjabi C. 2004. Human seminal plasma allergy: a review of a rare phenomenon. *Clinical and Experimental Allergy*. 34, 6: 827-838
- Sharkey D. J., Macpherson A. M., Tremellen K. P., Robertson S. A. 2007. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular Human Reproduction*, 13: 491-501
- Sills E., Perloe M., Tucker M. J., Kaplan C. R., Palermo G. D. 2001. Successful ovulation induction, conception, and normal delivery after chronic therapy with etanercept: a recombinant fusion anti-cytokine treatment for rheumatoid arthritis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 46, 5: 366-368
- Siristatidis C., Bhattacharya S. 2007. Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter. *Human Reproduction*, 22, 8: 2084-2087
- Smith D. J., Gaffney E. A., Blake J. R., Kirkman-Brown J. C. 2009. Human sperm accumulation near surfaces: a simulation study. *Journal of Fluid Mechanics*, 621: 289-320
- Somerset D. A., Zheng Y., Kilby M. D., Sansom D. M., Drayson M. T. 2004. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*, 112, 1: 38-43
- Virro M. R., Winger E. E., Reed J. L. 2012. Intravenous immunoglobulin for repeated IVF failure and unexplained infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*, 68, 3: 218-225
- Weidinger S., Mayerhofer A., Raemsch R., Ring J., Köhn F. M. 2006. Prostate-specific antigen as allergen in human seminal plasma allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 1: 213-215
- Westhoff C. M. 2007. The structure and function of the Rh antigen complex. *Seminars in Hematology*, 44, 1: 42-50
- Wicks I. P., Roberts A. W. 2016. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 12, 1: 37-48
- Winger E. E., Reed J. L., Ashoush S., Ahuja S., El-Toukhy T., Taranissi M. 2009. Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF. *American Journal of Reproductive Medicine*, 61, 2: 113-120

- Woof J. M., Mestecky J. 2005. Mucosal immunoglobulins. *Immunological Reviews*, 206: 64-82
- Würfel W. 2015. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor in patients with repetitive implantation failures and/or recurrent spontaneous abortions. *Journal of Reproductive Immunology*, 108: 123-135
- Yang H., Qiu L., Di W., Zhao A., Chen G., Hu K., Lin Q. 2009. Proportional change of CD4+ CD25+ regulatory T cells after lymphocyte therapy in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertility and Sterility*, 92, 1: 301-305
- Zagers-Hochschild F., Adamson G. D., Dyer S., Racowsky C., de Mouzon J., Sokol R., Rienzi L., Sunde A., Schmidt L., Cooke I. D., Simpson J. L., van der Poel S. 2017. The international glossary on infertility and fertility care. *Fertility and Sterility*, 108, 3: 390-406
- Zhou W. H., Du M. R., Dong L., Zhu X. Y., Yang J. Y., He Y. Y., Li D. J. 2007. Cyclosporin A increases expression of matrix metalloproteinase 9 and 2 and invasiveness in vitro of the first-trimester human trophoblast cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Human Reproduction*, 22, 10: 2743-2750