

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Kateřina Kaslová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Kateřina Kaslová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**CHARAKTERIZACE NK BUNĚK U PACIENTEK
S ENDOMETRIÓZOU**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.

PLZEŇ 2024

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Na této straně se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 3. 2024

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Kateřina Kaslová

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Charakterizace NK buněk u pacientek s endometriózou

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.

Počet stran – číslované: 44

Počet stran – nečíslované: 21

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 47

Klíčová slova: endometrióza, NK buňky, KIR, CDL

Souhrn:

Endometrióza je progresivní chronické onemocnění, pro které je charakteristický výskyt funkční endometriální tkáň mimo dutinu děložní. Jedná se o velmi časté onemocnění, které postihuje až 15 % žen v reprodukčním věku, u kterých vede nejčastěji k vzniku chronické pánevní bolesti, ale i neplodnosti. Patogeneze endometriózy není stále zcela známa, existuje ale několik teorií, které se snaží její vznik osvětlit. Jednou z nich je i přítomná dysregulace imunitního systému. V této bakalářské práci jsme pomocí průtokové cytometrie porovnávali zastoupení NK buněk v periferní krvi a jejich povrchových KIR receptorů u žen trpících endometriózou a zdravých žen. Bohužel i přes důkladnou analýzu jsme nedošli k žádnému statisticky významnému rozdílu mezi sledovanými soubory. Je třeba provést další studie s větším množstvím vzorků, které by mohly lépe zachytit biologickou variabilitu a použít komplexnější metodologii analýzy.

Abstract

Surname and name: Kateřina Kaslová

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Characterization of NK cells in patients with endometriosis

Consultant: MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.

Number of pages – numbered: 44

Number of pages – unnumbered: 21

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 47

Keywords: endometriosis, NK cells, KIR, CDL

Summary:

Endometriosis is a progressive chronic condition characterized by the presence of functional endometrial tissue outside the uterine cavity. It is a very common disorder, affecting up to 15 % of women of reproductive age, often leading to chronic pelvic pain and infertility. The pathogenesis of endometriosis is not fully understood, although several theories attempt to elucidate its origins. One of them involves the dysregulation of the immune system. In this bachelor thesis, we compared the representation of NK cells in peripheral blood and their surface KIR receptors in women with endometriosis and healthy women using flow cytometry. Unfortunately, despite thorough analysis, we did not find any statistically significant differences between the studied groups. Further studies with larger sample sizes are needed to better capture biological variability and utilize a more comprehensive methodology for analysis.

Předmluva

Tuto bakalářskou práci jsem psala se zájmem o téma. Propojení imunologie a histologie v tomto podání mě velmi bavilo. Paní doktorku Čedíkovou jsem oslovila se zájmem psát bakalářskou práci pod ní na téma související s pohlavním ústrojím žen. Společně jsme vybraly téma, které mě osobně nadchlo. Chtěla jsem pracovat na výzkumu, který je zaměřen hlavně na ženské pohlavní problémy. Myslím si, že práce splnila svůj účel a já jsem ráda, že jsem toto téma pod paní doktorkou mohla psát.

Poděkování

Tímto bych ráda chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Miroslavě Čedíkové, PhD., za její vynaložený čas, poskytnuté rady, odborné materiály v rámci mé bakalářské práce a za její vynikající přístup ke mně jako studentce.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM OBRÁZKŮ	13
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM ZKRATEK	15
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 DĚLOHA A ENDOMETRIUM	18
1.1 Endometrium	18
1.1.1 Vrstvy endometria	18
1.2 Funkce endometria.....	18
2 ENDOMETRIÓZA.....	20
2.1 Etiopatogeneze.....	20
2.1.1 Implantační teorie	21
2.1.2 Imunologická teorie.....	21
2.1.3 Teorie luteinizovaného neprasklého folikulu (LUF).....	21
2.1.4 Metaplastická teorie.....	22
2.1.5 Indukční teorie.....	22
2.1.6 Transportní teorie	22
2.1.7 Hormonální teorie.....	22
2.1.8 Genetická teorie.....	22
2.1.9 Oxidativní stres.....	23
2.2 Diagnostika	23
2.3 Klasifikace	24
2.3.1 Klasifikace dle lokalizace.....	24
2.3.2 Klasifikace dle stupně závažnosti.....	24
2.4 Klinický obraz.....	25
2.4.1 Asymptomatická forma endometriózy	25
2.4.2 Symptomatická forma endometriózy.....	25
2.5 Komplikace	26
2.6 Terapie	26
2.6.1 Chirurgická léčba.....	27
2.6.2 Medikamentózní léčba.....	27
2.6.3 Kombinovaná léčba	28
2.7 Prevence.....	28
2.8 Dopad endometriózy na kvalitu života ženy.....	29

3	IMUNITNÍ SYSTÉM.....	30
3.1	Nespecifický imunitní systém.....	30
3.1.1	nespecifického IS s důrazem na NK buňky.....	30
3.2	Specifický imunitní systém.....	34
3.2.1	Buňky specifického IS.....	35
3.3	Spolupráce nespecifického a specifického imunitního systému.....	36
4	NK BUŇKY U ŽEN S ENDOMETRIÓZOU	37
4.1	Snížená cytotoxicita NK buněk při dysregulaci estrogenu.....	38
4.2	Dysfunkce NK buněk při dysregulaci cytokinů a chemokinů	38
4.2.1	TNF- α	39
4.2.2	IFN- γ	39
4.2.3	GM-CSF	40
4.2.4	IL-10	40
4.3	Snížená funkce NK buněk při dysregulaci KIR receptorů.....	40
4.3.1	2DL1.....	41
4.3.2	2DL2.....	41
4.3.3	2DL3.....	42
4.3.4	2DL5.....	42
4.3.5	3DL1.....	42
4.3.6	3DL2.....	42
	PRAKTICKÁ ČÁST	43
5	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	43
5.1	Hlavní cíl.....	43
5.2	Dílčí cíle.....	43
6	VÝZKUMNÉ OTÁZKY	44
7	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	45
8	METODIKA PRÁCE	46
8.1	Izolace mononukleárních buněk	46
8.2	Průtoková cytometrie	49
8.2.1	Příprava vzorku	50
8.2.2	Barvení vzorku	51
8.2.3	Nastavení přístroje.....	52
8.2.4	Statistické vyhodnocení.....	52
9	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	53
9.1	Sledovaný soubor.....	53
9.2	Zastoupení NK buněk a KIR receptorů	54
	DISKUZE A ZÁVĚR.....	59

SEZNAM LITERATURY.....	61
------------------------	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf 2 Zastoupení KIR 2DL1 u pacientek a zdravých kontrol.....	55
Graf 1 Zastoupení NK buněk u pacientek a zdravých kontrol	55
Graf 3 Zastoupení KIR 2DL2 u pacientek a zdravých kontrol.....	56
Graf 4 Zastoupení KIR 2DL3 u pacientek a zdravých kontrol.....	56
Graf 5 Zastoupení KIR 2DL5 u pacientek a zdravých kontrol.....	57
Graf 6 Zastoupení KIR 3DL1 u pacientek a zdravých kontrol.....	57
Graf 7 Zastoupení KIR 3DL2 u pacientek a zdravých kontrol.....	58

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma shrnující etiopatogenezy endometriózy	20
Obrázek 2 Hlavní receptory exprimované na povrchu NK buněk	37
Obrázek 3 KIR receptory	41
Obrázek 4 Nanesení zředěné periferní krve na Ficoll – Paque.....	47
Obrázek 5 Zředěná periferní krev nanesena na Ficoll – Paque	47
Obrázek 6 Oddělení buffy coatu po stočení	48
Obrázek 7 Peleta buněk po stočení usazená na dně zkumavky	49
Obrázek 8 Princip průtokové cytometrie	50
Obrázek 9 Ukázka analýzy dat z průtokového cytometru	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Panely na průtokovou cytometrii pro povrchové znaky NK buněk	51
Tabulka 2 Charakteristika souboru	53
Tabulka 3 Zastoupení NK buněk a KIR receptorů u sledovaných souborů	54

SEZNAM ZKRATEK

APC.....	antigen prezentující buňky
APC (barvivo).....	allofykocyanin
BCR	B-buněčný receptor
CA.....	sacharidový antigen
CD.....	cluster of differentiation
CNS.....	centrální nervová soustava
DMSO.....	dimethylsulfoxid
EDTA.....	kyselina ethylendiamintetraoctová
FasL	Fas ligand
FITC.....	fluorescein isothiokyanát
GM-CSF.....	faktor stimulující kolonie granulocytů
GnRH.....	gonadotropin
HLA	hlavní histokompatibilní komplex
IFN.....	interferon
IgD	imunoglobulin typu D
IgG	imunoglobulin typu G
IL.....	interleukin
IS	imunitní systém
KIR.....	receptory podobné zabíječským imunoglobulinům
LH	luteinizační hormon
LTA.....	lymfotoxin alfa
LUF.....	syndrom neprasklého folikulu

MCP..... monocytární chemoatraktivní proteiny

NK..... přirození zabíječi

NKG..... skupina přirozených zabijáků

PAMP..... molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenních mikroorganismů

PBS fosfátový pufr

PE..... fykoerytrin

PerCP peridinin-chlorofyl-protein

PRR..... receptory rozeznávající molekulové vzory

SDF faktor odvozený ze stromálních buněk

TCR..... T-buněčný receptor

TNF tumor nekrotizující faktor

VEGF..... vaskulární endotelový růstový faktor

ÚVOD

Endometrióza představuje chronické, zánětlivé onemocnění, které je charakteristické přítomností endometriálních lézí. Jedná se o onemocnění, s kterým se v dnešní době potýká mnoho žen. U endometriózy není známá příčina vzniku, avšak existuje mnoho teorií. Každá z těchto teorií vysvětluje problematiku vzniku endometriózy z jiného úhlu pohledu. V posledních letech se nejvíce přiklání k teorii imunologické, kde hrají roli imunitní buňky, zejména pak nově NK buňky.

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat NK buňky a jejich KIR receptory u pacientek s endometriózou a u zdravých kontrol za pomoci průtokové cytometrie.

V teoretické části bakalářské práce je uvedena základní charakteristika endometriózy a imunitního systému s důrazem na NK buňky.

Praktická část se věnuje už samotnému porovnání v zastoupení NK buněk a KIR receptorů mezi pacientkami s endometriózou a zdravými kontrolami.

TEORETICKÁ ČÁST

1 DĚLOHA A ENDOMETRIUM

Děloha (uterus) je orgán v reprodukčním systému ženského těla, který hraje klíčovou roli při těhotenství a menstruačním cyklu. Nachází se v malé pánvi a spojuje se s vagínou, do horní části dělohy ústí dva vejcovody. Délka dělohy u ženy obvykle činí 8-10 centimetrů a lze ji rozdělit do několika částí, cervix, isthmus, corpus a fundus.

Během menstruačního cyklu prochází děloha řadou změn. V případě že nedojde k oplodnění, dochází k odlučování vnitřní vrstvy dělohy. Pokud ale dojde k oplodnění vajíčka spermií, děloha poskytuje vhodné prostředí pro implantaci oplozeného vajíčka a jeho další vývoj. (Štefánek, 2011)

1.1 Endometrium

Endometrium je vnitřní vrstva děložní stěny, která vystýlá děložní dutinu (cavitas uteri). Na povrchu endometria se nachází jednovrstevný cylindrický epitel. Pod cylindrickým epitelem se nachází vazivové stroma s bohatým zastoupením fibroblastů. Endometrium je členěno do dvou vrstev, jejichž stavba se mění v závislosti na fázi menstruačního cyklu, a to s cílem případné podpory implantace oplodněného vajíčka. (Fitzgerald, 2021; Hanzlová; 2013)

1.1.1 Vrstvy endometria

Jak bylo již zmíněno, existují dvě hlavní vrstvy endometria. Jedná se o funkční vrstvu a o vrstvu bazální. Funkční vrstva je vrchní vrstva sliznice dělohy a je důležitá při těhotenství. Tato vrstva se mění v průběhu menstruačního cyklu v závislosti na hormonálních změnách, které ovlivňují růst a regeneraci tkáně.

Bazální vrstva se nachází pod funkční vrstvou a obsahuje zárodečné buňky, ze kterých mohou vznikat nové buňky pro obnovu děložní sliznice, tudíž hlavní funkcí bazální vrstvy je regenerace endometria. (Hanzlová; 2013)

1.2 Funkce endometria

Endometrium u žen plní několik podstatných funkcí. Patří sem např. poskytnutí ideálních podmínek pro implantaci oplodněného vajíčka. Dále také reguluje menstruační cyklus, což je významné pro udržení plodnosti a přirozeného procesu menstruace.

Endometrium má i imunitní funkci, a to skrze produkci imunitních faktorů, konkrétně protilátek, cytokinů, kyseliny hyaluronové apod. Poslední klíčovou funkcí je podpora růstu placenty, což je klíčový orgán během těhotenství, který zajišťuje plodu živiny a kyslík. Celkově můžeme říct, že funkce endometria je podstatná pro reprodukci a plodnost žen. (Fitzgerald, 2021; Hanzlová; 2013)

2 ENDOMETRIÓZA

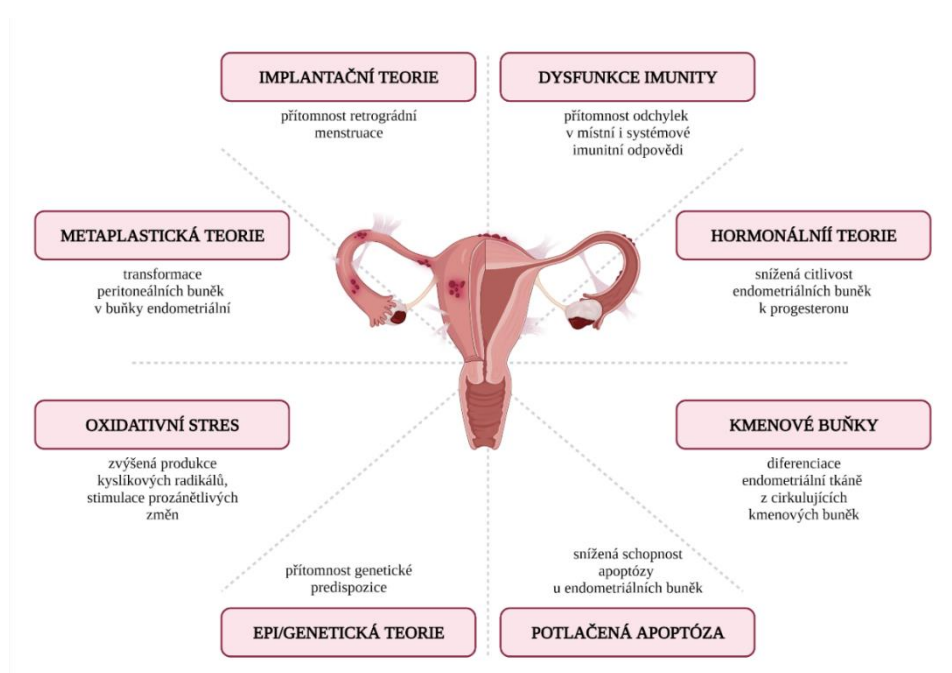
Endometrióza je benigní estrogen-dependentní progresivní chronické onemocnění. Vyznačuje se tím, že funkční endometriální žlázy a stroma jsou přítomny mimo svou obvyklou lokalizaci v děložní dutině. Ektopicky se endometrióza vyskytuje hlavně u orgánů malé pánve, tj. jsou postiženy zejména vaječníky, vejcovody, děložní vazy, pánevní peritoneum a rektovaginální septum. Mezi méně časté lokalizace patří např. laparotomické jizvy, hernie, střevní kličky, močový měchýř, zevní rodidla, plíce, střeva a játra

Endometrióza postihuje zejména ženy v reprodukčním věku s maximem výskytu mezi 30-40 lety. Typickým projevem endometriózy je cyklická pánevní bolest, dále pak dysmenorea, dysparaunie a porucha plodnosti. (Ventruba, 2008; Meričko, 2016)

2.1 Etiopatogeneze

Etiopatogeneze endometriózy není dosud zcela objasněna. Existuje však několik teorií vzniku endometriózy. Klinické a experimentální pozorování nevyvracejí žádnou z teorií a nevyklučují ani možnost jejich provázanosti. Je důležité poznamenat, že etiopatogeneze endometriózy je pravděpodobně složitým kombinovaným účinkem spousty faktorů a průběh či konkrétní projevy onemocnění se mohou u jednotlivých žen zcela lišit. (Ventruba, 2008; Klézl, 2018; Meričko, 2016)

Obrázek 1 Schéma shrnující etiopatogenezy endometriózy



Zdroj: https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2023_273.pdf

2.1.1 **Implantační teorie**

Neboli Sampsonova teorie, vychází z předpokladu, že se endometriální tkáň implantuje prostřednictvím zpětného toku menstruační krve (retrográdní menstruace) v oblasti malé pánve. Za normálních okolností by měla krev při menstruaci proudit ven z děložní dutiny skrze děložní hrdlo a pochvu. Důvod, proč dochází k retrográdní menstruaci, není zatím zcela znám. Může jim být např. mechanická překážka odtoku krve z dělohy, nešetrné vyšetření v nevhodný termín či intrauterinní výkony. (Koninckx, 2021; Ventruba, 2008)

2.1.2 **Imunologická teorie**

Byla poprvé popsána v roce 1987 a stále více studií se přiklání k této teorii. Základní myšlenkou imunologické teorie je, že pokud se endometriální ložiska dostanou do pánevní dutiny nebo do jiných částí těla, měly by být rozpoznány a zneškodněny buňkami imunitního systému, avšak u žen s endometriózou tomu tak není. Předpokládá se dysfunkce imunitního systému, kde buňky imunitního systému nejsou schopny rozpoznat a tím pádem i zneškodnit endometriální ložiska. Jedna z možností je, pokud žena trpí chronickým zánětem, dochází zde k oslabení imunitního systému, což vede k neschopnosti rozpoznat endometriální ložiska. Dále se může jednat o imunitní dysregulaci, zde dochází k poruchám regulace imunitního systému, to může vést k nedostatečné reakci imunitního systému. Endometriální ložiska jsou v některých případech schopny samy vyvinout mechanismy, které jim umožní uniknout detekci imunitního systému, tento fenomén se označuje jako imunitní escape. Důležité je však zahrnout i genetické předpoklady, jelikož některé genetické varianty spojené s imunitním systémem mohou zvyšovat riziko rozvoje endometriózy. (Ventruba, 2008)

2.1.3 **Teorie luteinovaného neprasklého folikulu (LUF)**

Podle této teorie dochází k endometrióze v důsledku luteinovaného neprasklého folikulu. Při ovulaci dochází v ovariu k uvolnění Graafova folikulu, kdy folikul za běžných okolností praskne, a tak uvolní oocyt. U LUF teorie tomu tak není. Ovariální folikul nepraskne a oocyt se neuvolní. Místo toho folikul zůstane uzavřený a stává se z něj tzv. luteinovaný folikul, to znamená, že se stává luteální buňkou. Teorie tvrdí, že obsah luteinovaného folikulu může být podobný endometriálním buňkám, a tak se mohou vytvářet endometriální léze v ovarium. Důležité je podotknout, že LUF teorie je sporná, jelikož nikdy nebyla plně ověřena. (Ventruba, 2008)

2.1.4 **Metaplastická teorie**

Vysvětluje vznik endometriózy transformací nebo metaplazií jiných buněk v pánevní dutině na buňky podobné endometriálním, a to na podkladě opakované iritace. Tato teorie by mohla vysvětlit, jak je možné, že endometrióza je schopna postihnout různé části pánevní dutiny, místo toho, aby se šířila retrográdní menstruační cestou, jak navrhuje implantační teorie. V současné době se však metaplastická teorie nepovažuje za příčinu, nýbrž za následek endometriózy. (Ventruba, 2008)

2.1.5 **Indukční teorie**

Zdůrazňuje vliv chemických látek na vznik endometriózy. Může se jednat o hormonální nerovnováhu, kdy změny v hladinách hormonů (progesteronu a estrogenů) mohou ovlivnit růst endometriální tkáně. Také zde jsou zahrnuty i externí vlivy, např. expozice toxickým látkám. Indukční teorie tedy klade důraz na interakci různých faktorů, které mohou vyústit v endometriózu. (Ventruba, 2008)

2.1.6 **Transportní teorie**

Předpokládá, že endometriální buňky se šíří do jiných částí těla pomocí vaskulární a lymfatické cesty. Během menstruace se mohou endometriální buňky uvolňovat z endometria, a tak se dostat do cirkulace krve nebo lymfy, následně putovat po těle, usadit se mimo dělohu a vytvořit endometriální ložiska. Transportní teorie podobně jako metaplastická teorie by vysvětlovala, jak je možné, že endometrióza může postihnout různé části těla. (Ventruba, 2008)

2.1.7 **Hormonální teorie**

Hormonální teorie se zaměřuje na roli hormonálních faktorů při vývoji tohoto onemocnění. Endometrióza je často spojována s hormonální nerovnováhou, konkrétně s vysokou hladinou estrogenu v těle. Ta může přispět k růstu a šíření endometriální tkáně mimo dělohu. Hormony spojené se vznikem endometriózy jsou zejména estrogeny a progesterony. (Lamceva, 2023)

2.1.8 **Genetická teorie**

Tato teorie vzniku endometriózy se zaměřuje na roli genetických faktorů při vývoji tohoto onemocnění. Předpokládá se, že určité genetické varianty nebo mutace mohou zvýšit riziko vzniku endometriózy u jedinců, kteří jsou k ní geneticky predisponováni. Endometrióza může být spojena s určitými genetickými variantami či geny, které ovlivňují např. imunitní odpověď, zánětlivé procesy nebo hormonální regulaci. (Koninckx, 2019)

2.1.9 Oxidativní stres

Oxidativní stres je stav, při kterém v těle převažují nestabilní molekuly nazývané volné radikály a zároveň není k dispozici dostatečné množství antioxidantů, které by tyto radikály neutralizovaly. Tento stav může vést k poškození buněk a tkání. Existuje několik mechanismů, které spojují oxidativní stres s vývojem endometriózy. U žen s endometriózou bylo zjištěno, že mají často zvýšenou hladinu volných radikálů a nižší úroveň antioxidantů, což naznačuje dysregulaci oxidativního stresu u žen s endometriózou. (Scutiero, 2017)

2.2 Diagnostika

Podezření na endometriózu lze stanovit dle anamnézy a palpačního vyšetření. Pokud lékař má podezření na endometriózu, přistoupí k dalším krokům, tj. vizualizaci nebo biopsii. U anamnézy je podstatné se zaměřit na cykličnost symptomů, zda jsou symptomy přítomny i u rodinných příslušníků (matky, sestry atd.). V případě podezření na možný výskyt endometriózy, je potřeba provést následné podrobné gynekologické a laparoskopické vyšetření. (Janoušková, 2018; Koninckx, 2021)

Gynekologické vyšetření u lehkých forem endometriózy nemusí prokázat žádnou abnormalitu. Naopak interní endometrióza je prokazatelná zvětšenou a bolestivou dělohou, může být přítomna retrovertovaná děloha v různých stádiích fixace a bolestivé zduření v zadní poševní klenbě. Laparoskopie je považována za nezbytné vyšetření pro potvrzení diagnózy a umožňuje i následný odběr histologického materiálu. Další možné vyšetření je za pomoci ultrazvuku, které může prokázat cystické formace v oblasti adnex. Lze také využít vyšetření CA-125, senzitivita tohoto vyšetření je vyšší při odběru ve střední folikulární fázi a u závažnějších stádií endometriózy. Vyšetření CA-125 se ale především využívá k diagnostice karcinomu ovarií. Hysteroskopie a hysterosalpingografie mohou prokázat postižení dělohy. Histologické vyšetření podává objektivní důkaz, vzorky jsou odebírány z více ložisek, což dává větší šanci pozorovat změnu dělohy. Někdy je obtížné rozeznat endometriózu od nádorů orgánů malé pánve (zvýšený CA-125), častá je koincidence myomatózy. (Ventruba, 2008; Klézl, 2018; Fanta, 2012)

2.3 Klasifikace

2.3.1 Klasifikace dle lokalizace

Endometriosis genitalis interna je častá forma endometriózy postihující hlavně dělohu či vejcovod. Je způsobena tím, že bazální endometrium postupně proniká do myometria a vytváří zde dutinky, které jsou vyplněné krví, a to způsobuje zvětšení dělohy. Mezi časté projevy patří dysmenorea a prodloužení menstruačního krvácení.

Endometriosis genitalis externa je méně častá forma endometriózy, která postihuje vaječník, vejcovod, pánevní peritoneum, retrocervikální prostor, děložní hrdlo, sakrouterinní vazy apod. Pokud je postižen vaječník, jedná se o tzv. ovariální endometriózu, kde se velikost ložisek pohybuje od drobných povrchových ložisek až po čokoládové (Sampsonovy) cysty. Tato ložiska se nazývají endometriomy, mohou dosahovat velikosti až cca 10 cm a srůstat s okolím. Je-li postižen vejcovod, ložisko ho může uzavřít, což vede k hromadění krve (haematosalpinx). Dále může být postihnut i retrocervikální prostor. Tato retrocervikální endometrióza je typická bolestivými uzlíky v sakrouterinních vazech a v rektovaginálním septu.

Vzácnější variantou je endometriosis extragenitalis, kdy se ložiska vyskytují mimo pohlavní ústrojí. Mezi postižené orgány patří např. močový měchýř, střeva, ale mohou být zasaženy i další. Vzácněji se může nacházet ve vzdálenějších orgánech, jako jsou plíce nebo operační jizvy. (Meričko, 2016; Fanta, 2012)

2.3.2 Klasifikace dle stupně závažnosti

V současnosti je endometrióza klasifikována do 4 hlavních kategorií, a to pomocí systému ASRM, který byl vyvinut Americkou společností pro reprodukční medicínu.

Stupně endometriózy jsou:

I. stupeň (minimální) - je charakterizován přítomností jednotlivých drobných ložisek endometriální tkáně. Tyto ložiska jsou malá, izolovaná a nepronikají hluboko do tkání.

II. stupeň (mírný) - endometriální ložiska jsou stále na povrchu tkáně, ale jsou větší a mohou být více rozšířená. Také se mohou nacházet na různých místech v pánvi (vaječníky, vejcovody, povrch dělohy a další).

III. stupeň (střední) - zde jsou endometriální ložiska větší a mohou způsobovat zánět a jizvení okolních tkání. Mohou také vést k vzniku adhezí mezi orgány, což může způsobovat bolesti a vést k potížím s plodností.

IV. stupeň (těžký) - jedná se o poslední stupeň, kdy je endometrióza nejzávažnější. Ložiska jsou velká, hluboká a mohou se vyskytovat na různých místech, včetně orgánů jako střeva či močový měchýř. Dochází k rozsáhlému jizvení a deformaci tkání, což opět může mít za následek problémy s plodností, či dokonce i dopad na celkové zdraví ženy.

Klasifikace dle stupně závažnosti je důležitá zejména při plánování léčby endometriózy, jelikož každý stupeň vyžaduje jiný terapeutický přístup. (Fanta, 2018; Ventruha, 2008)

2.4 Klinický obraz

Endometriózu z hlediska klinických projevů lze rozdělit na formu asymptomatickou a formu symptomatickou. (Janoušková, 2018; Klézl, 2018)

2.4.1 Asymptomatická forma endometriózy

Jedná se o formu endometriózy, při které se neprojevují žádné symptomy. Ženy nemají subjektivní obtíže, jelikož endometriální ložiska nereagují na hormonální podněty. Asymptomatická endometrióza může být zjištěna úplnou náhodou při jiných lékařských vyšetřeních, např. při ultrazvuku břicha či pánevní oblasti, nebo při preventivní gynekologické prohlídce. (Janoušková, 2018; Klézl, 2018)

2.4.2 Symptomatická forma endometriózy

Tato forma endometriózy se projevuje již typickými symptomy. Mezi běžné symptomy u endometriózy patří:

Sekundární dysmenorea – bolestivé menstruační křeče, které jsou sekundární vůči jiným zdravotním stavům. Nastupuje až po letech s normálním průběhem menstruace.

Pánevní bolest – může způsobit zánět, podráždění a bolest. Pánevní bolest u endometriózy se mohou projevovat různě, např. chronická bolest, bolest při močení a stolici, bolest v podbříšku atd. Většinou se pánevní bolest vyskytuje cyklicky v průběhu a ke konci menstruace.

Dyspareunie – bolest během pohlavního styku. Pokud za dyspareunií stojí endometrióza je tato bolest způsobena poškozením sakrouterinních vazů nebo retroverzní dělohy.

Neplodnost – u žen, které jsou v důsledku endometriózy neplodné, dochází k poruše ovulace, funkcí žlutého tělíska nebo adhezním procesem v důsledku endometriózy.

Existují i další projevy endometriózy, které však závisí na dalších okolnostech, zejména na lokalizaci (viz. 2.3.1). (Janoušková, 2018; Klézl, 2018)

2.5 Komplikace

Největší možnou komplikací u endometriózy je neplodnost. Spojení tedy mezi endometriózou a neplodností je jisté. Samotná endometrióza je v současnosti považována za samotný faktor neplodnosti, který ovlivňuje reprodukční funkce na třech úrovních:

1. Centrálně, přes hypogonadotropní a ovariální dysfunkci.
2. Mechanicky, zánětlivé změny způsobující fibrózu a adheze.
3. Lokálně, vliv abnormní sekrece na ovulaci, ovum pick-up, fertilizaci a tubární transport.

Další možnou komplikací je mimoděložní těhotenství, jehož příčinou může být ektopické endometrium ve vejcovodu nebo na povrchu vaječníků. Vzácnější komplikací jsou peritoneální dráždění při prasknutí cysty, torze adnex, zánětlivé změny. (Kobayashi, 202; Koninckx, 2021)

2.6 Terapie

Při léčbě endometriózy není přesně dán postup terapie. Léčba musí být u každé ženy individuální, jelikož se může endometrióza lišit např. v lokalizaci, či závažnosti. Při terapii je také nutné respektovat přání pacientky, jako udržení funkce plodnosti aj. Je nutné respektovat obtíže pacientky, věk a lokalizaci procesu.

Ženy, které mají asymptomatickou formu endometriózy, je možné ponechat bez terapie, ale musí docházet na pravidelné zdravotní prohlídky (dispenzarizace, expektace). (Klézl, 2018; Fanta, 2012)

2.6.1 Chirurgická léčba

Tento způsob léčby byl praktikován zejména do poloviny 20. století, jelikož neexistovala medikamentózní léčba. V současnosti je chirurgická léčba zvažována, zejména tehdy, kdy léky nepřináší dostatečnou úlevu, nebo pokud jsou postihnuty orgány, které způsobují závažné potíže. Chirurgickou léčbu lze rozdělit na konzervativní a radikální.

Konzervativní chirurgie zahrnuje postupy, které se snaží zachovat co nejvíce reprodukčních orgánů a tkání. Mezi využívané postupy při konzervativní chirurgii patří excize, elektronová koagulace ložisek, laserová vaporizace, exstirpace ovariálních cyst a rozrušení srůstů. Většina výkonů při konzervativní chirurgii se provádí laparoskopicky. Přístup konzervativní chirurgie je zejména vhodný u žen, které si chtějí zachovat možnost těhotenství.

Radikální chirurgie zahrnuje abdominální hysterektomii a bilaterální adnexektomii, provádí se výhradně ve velmi pokročilých případech, kdy endometrióza postihuje značné části pánevních orgánů a tkání. Je-li tento chirurgický postup proveden v reprodukčním věku, je dále nezbytná prevence vzniku osteoporózy, atrofické kolpity a předčasných změn kardiovaskulárního systému estrogenní substituční terapií. Riziko růstu zbytku endometriálních ložisek je malé. (Klézl, 2018; Koninckx, 2021; Fanta, 2012)

2.6.2 Medikamentózní léčba

Tento způsob léčby je založen především na principu hormonální léčby. Základní koncept hormonální léčby je zastavit cyklické přeměny endometria inhibicí tvorby ovariálních estrogenů a tím převést endometrium do atrofického stádia. Účinnost léčby závisí zejména na přítomnosti či absenci steroidních receptorů, dále také na lokalizaci a vaskularizaci lézí. Pokud se však jedná o ovariální ložiska, hormonální léčba je bezvýsledná. Nejpoužívanějšími hormonálními medikamenty jsou progestiny, danazol, estrogen-gestagenní léčba a GnRH-analogová léčba. (Hrušková, 2011; Koninckx, 2021)

Progestiny jsou hormony, které jsou produkovány v lidském těle, lze je také užívat i ve formě léků. Nejběžnější progestiny užívané při léčbě endometriózy jsou medroxyprogesteron acetát, lynestrenol a levonorgestrel a další. Progestiny se podávají ve formě tablet nebo injekcí. Pokud jsou progestiny podávány po dobu 4-6 měsíců navozují v těle pacientky pseudograviditu. V důsledku pseudogravidity dochází u endometriálních ložisek k decidualizaci, následuje nekróza a resorpce ektopického endometria se zajizvením.

Danazol je syntetický derivát testosteronu. Danazol potlačuje růst endometriální tkáně tím, že utlumuje produkci estrogenů s LH, tedy vyvolává pseudomenopauzu. Léčba danazolem se jeví jako účinná, avšak má mnoho vedlejších účinků kvůli svému androgennímu a anabolickému efektu. Vedlejší účinky danazolu jsou akné, změna hlasu, přírůstek na hmotnosti, hirsutismus, seborea aj. Úspěšnost léčby pomocí danazolu u neplodných žen se pohybuje okolo 30-60 %.

Estrogen-gestagení léčba zahrnuje kombinaci estrogenů a gestagenů. Podává se hormonální antikoncepcí po dobu 6-9 měsíců. Tato léčba je zejména vhodná u pacientek s lehčí formou endometriózy.

GnRH-analogová léčba snižuje hladinu pohlavních hormonů v těle, a tím vytváří dočasný hypoestrogenní stav, který odpovídá menopauze. Mezi GnRH (gonadotropin-releasing hormone) analogy spadají goserelin, nafarelin, triptorelin atd. Avšak tato léčba s sebou nese vedlejší účinky, např. návaly pocení a poševní suchost. GnRH-analogová léčba má významný přínos pro terapii neplodnosti, kde úspěšnost těhotenství dosahuje 30-70 % léčených žen. (Ventruba, 2008; Klézl, 2018)

2.6.3 **Kombinovaná léčba**

Tento druh léčby kombinuje hormonální a chirurgickou léčbu endometriózy. Tato léčba zahrnuje předoperační nebo pooperační hormonální léčbu. Předoperační terapie má za úkol redukovat pánevní vaskularizaci a endometriální ložiska za účelem snížit rozsah pooperační krevní ztráty. Za to pooperační terapie by měla odstranit reziduální ložiska endometriózy. Kombinovaná léčba se doporučuje u pacientek s těžší formou endometriózy. (Ventruba, 2008; Klézl, 2018)

2.7 **Prevence**

Jelikož endometrióza je u více než třetiny pacientek idiopatické povahy, je velmi obtížné dodržovat primární prevenci. Důležitou se však stává sekundární prevence, a to hlavně u mladých žen, které trpí na pánevní bolesti. Významná je také prevence iatrogenního vzniku endometriózy, kdy jsou lékařské výkony spojeny s rizikem vtažení sliznice endometria do operační rány nebo okolí. Mezi dříve uznávaná preventivní opatření lze zařadit také včasnou léčbu hypoplazie rodidel, děložní retroverze a myomatózy. Bohužel žádné z těchto opatření nevyvrací vznik endometriózy. (Koninckx, 2021)

2.8 Dopad endometriózy na kvalitu života ženy

Endometrióza jako mnoho dalších onemocnění má určitý dopad na každodenní kvalitu života. Ženy žijí s velkou bolestí, zejména během menstruace. Tato bolest může být velmi intenzivní, což může ovlivnit plnění běžných aktivit během dne. S bolestí přichází i psychická zátěž, která může vyústit v úzkost či depresi, tyto faktory pak mohou ovlivnit celkovou životní spokojenost ženy. Dalším dopadem je omezení plodnosti, kdy chirurgické zákroky a silné bolesti mohou ovlivnit schopnost ženy otěhotnět a narušit i partnerské vztahy. Všechny zmíněné dopady na kvalitu života žen s endometriózou se navzájem doplňují a významně ovlivňují celkovou kvalitu života. (Hrušková, 2011; Janoušková, 2018)

3 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém umožňuje organismu bránit se cizorodým látkám a zajišťuje jejich následnou likvidaci. Pokud je tato schopnost narušena, znamená to, že živý organismus není schopen efektivně se bránit potencionálním patogenům. Imunitní systém dělíme na nespecifický a specifický. Každý z těchto systémů zahrnuje další složky buněčné a humorální imunity. (Lokaj, 2019)

3.1 Nespecifický imunitní systém

Nespecifický imunitní systém je také označován jako vrozená imunita. Jedná se o systém evolučně starší, který reaguje na patogeny a cizí látky bez ohledu na jejich konkrétní povahu. Buněčná část nespecifického imunitního systému je reprezentována především fagocytujícími buňkami. Mezi fagocytující buňky řadíme neutrofilní granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Tyto buňky se diferencují z myeloidního progenitoru. K dalším buňkám vrozené imunity patří i NK, ty však nemají schopnost fagocytózy a vyvinuly se z lymfoidního progenitoru. Humorální část vrozeného imunitního systému je tvořena komplementem, interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny. Kromě těchto dvou složek existují fyzikální, chemické a biologické bariéry, které jsou nedílnou součástí nespecifického imunitního systému. Mezi tyto bariéry patří např. povrch kůže a sliznic, pohyb řasinek, enzymy jako lysozym ve slinách apod. (Hořejší, 2008; Moser, 2010)

3.1.1 nespecifického IS s důrazem na NK buňky

NK buňky

Morfologicky se jedná o velké granulocytární lymfocyty. Zkratka „NK“ pochází z anglického natural killers a znamená, že tyto buňky jsou schopny likvidovat nádorové, či virově infikované buňky, a to bez předchozí stimulace. NK buňky nemají antigenně specifické receptory, což se uplatňuje zejména u patologických buněk, které jsou schopny se bránit před likvidací CD8⁺ T lymfocyty (produkci abnormálně málo molekul HLA I. třídy). V tomto případě nastupují NK buňky, ty totiž dokážou rozeznat a likvidovat buňky exprimující jen malý počet HLA molekul I. třídy. (Luci, 2008)

NK buňky mají na svém povrchu několik specifických znaků. Jedním z nejdůležitějších je CD56. Tento znak má dva typy CD56^{bright} a CD56^{dim}. CD56^{bright} NK buňky jsou vývojově mladší, produkují velké množství cytokinů a chemokinů a mají malou

schopnost usmrcovat buňky. Naproti tomu CD56^{dim} NK buňky jsou již zralé, v malém množství produkují cytokiny a chemokiny, obsahují velké množství cytoplazmatických granul, čímž mají vyšší schopnost usmrcovat buňky. Další významný povrchový znak NK buněk je CD16. Tento znak je receptorem pro Fc část imunoglobulinu. Signály, které jsou zprostředkovány CD16 aktivují cytotoxické mechanismy, díky nimž dochází k usmrcení cílové buňky. (Poli, 2009) Dalším povrchovým znakem je CD178, známý též jako Fas ligand (FasL). Tento charakteristický znak má značný význam, protože je schopný se vázat na Fas receptor, což následně spouští proces apoptózy. Fas ligand je klíčový pro udržení rovnováhy v těle, v němž odstraňuje buňky infikované, či jinak poškozené a současně předchází vzniku nežádoucím autoimunitním reakcím. V neposlední řadě je tu znak CD94. Jedná se o glykoprotein, který tvoří společně s NKG2 molekulární komplex označovaný jako CD94/NKG2. Tento komplex posiluje schopnost NK buněk identifikovat a následně likvidovat buňky s odlišnými povrchovými markery spojenými s infekcí, nádorem nebo jinými patologickými stavy. Celkově tato spolupráce receptorů umožňuje účinnou imunitní reakci. (Dogra, 2020; Luci, 2008)

KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors), též CD158, jsou rodinou vysoce polymorfních aktivačních a inhibičních receptorů, které slouží jako klíčové regulátory funkce lidských NK buněk. Expresí KIR, které reagují s HLA molekulami I. třídy, je totiž rozhodující pro vývoj a správnou funkci NK buněk. Tento proces se nazývá „vzdělávání“ nebo „výzbroj“. Když jsou NK buňky vytvořeny, vycházejí z procesu „vzdělávání“, který je spojen s expresí vlastních HLA molekul I. třídy. Tímto způsobem jsou NK buňky „vycvičeny“ k rozpoznání patologických či jinak pozmeněných buněk. V případech, kdy jsou některé buňky, například nádorové nebo viry infikované, schopny potlačit expresi HLA molekul I. třídy, se často stávají cílem útoku NK buněk. KIR hrají roli zejména v regulaci NK buněk během infekce, rakoviny, transplantace kmenových buněk a v těhotenství. Hlavními ligandy pro KIR jsou HLA molekuly I. třídy, které jsou přítomny téměř na každé normální buněčné membráně. Tyto molekuly jsou kódovány s geny s vysokou variabilitou. NK buňky tedy vykazují toleranci k normálním buňkám díky expresi inhibičních receptorů vázajících se na HLA molekuly I třídy, včetně KIR. V závěru lze tvrdit, že KIR jsou klíčovými regulátory, které ovlivňují vývoj, toleranci a aktivaci NK buněk v imunitním systému. (Dębska-Zielkowska, 2021; Luci, 2008)

Jelikož jsou NK buňky buňkami imunitního systému, produkují interleukiny. Ty představují skupinu signálních molekul, která zastává klíčovou úlohu v imunitní odpovědi a

komunikaci mezi buňkami imunitního systému. Existuje několik interleukinů, které ovlivňují NK buňky. Jedním z nich je IL-2, ten zvyšuje cytotoxickou aktivitu NK buněk. Působí také jako růstový faktor podporující růst a množení NK buněk. Podobné vlastnosti jako IL-2 má i IL-15. Dále je tu IL-12, který má významný vliv na aktivaci NK buněk. Jeho podstatnou vlastností je, že podporuje produkci IFN- γ u NK buněk. S IL-12 spolupracuje IL-18, který též podporuje produkci IFN- γ . NK buňky produkují ještě IL-10. Tento interleukin je často spojován s tlumením imunitní odpovědi a udržováním imunitní homeostázy. IL-10 má schopnost potlačovat aktivaci NK buněk. Tato schopnost může být někdy prospěšná, třeba při regulaci přehnaných imunitních odpovědí, ale zároveň může také oslabit cytotoxickou schopnost NK buněk. Interakce mezi interleukiny a NK buňkami je nepostradatelná pro správné fungování imunitního systému. (Luci, 2008)

IFN- γ spadá do skupiny cytokinů a má u NK buněk několik velmi důležitých funkcí. Jedna z funkcí IFN- γ je aktivace NK buněk a posílení jejich schopnosti ničit cílové buňky. Tato aktivace přináší zvýšenou cytotoxickou aktivitu. IFN- γ také přispívá ke zvýšení celkové imunitní odpovědi. Stimuluje produkci dalších cytokinů a chemokinů, což zvyšuje koordinaci imunitního systému. Navíc IFN- γ podporuje zvýšení exprese receptorů na povrchu NK buněk, včetně receptorů pro cytokiny. Tímto způsobem jsou NK buňky schopny lepšího vnímání a efektivní reakce na signály ve svém mikroprostředí. Regulace imunitních reakcí je dalším aspektem působení IFN- γ , ovlivňuje totiž exprese dalších molekul a regulují interakce NK buněk s ostatními buňkami imunitního systému. IFN- γ též podporuje tvorbu protilátek a zlepšuje prezentaci antigenu, což má pozitivní vliv na adaptivní imunitní odpověď. (Lieberman, 2002; Luetke-Eversloh, 2014)

TNF- α řadíme podobně jako IFN- γ do skupiny cytokinů. Za pomoci TNF- α jsou NK buňky podněcovány k aktivaci, což vede k posílení jejich schopnosti eliminovat patologické buňky. Také TNF- α může v určitých buňkách stimulovat apoptózu. Schopnost apoptózy je klíčová k regulaci růstu nádorových buněk. TNF- α se uplatňuje i u zánětlivých reakcí či infekcí a funguje jako jeden z mediátorů tohoto imunitního procesu. Nesmíme však zapomenout, že nadměrné množství TNF- α může být škodlivé a bývá spojeno s různými zánětlivými onemocněními, např. revmatoidní artritida nebo Crohnova choroba. Z těchto důvodů je velmi důležité kontrolovat hladiny TNF- α . Studium vztahu mezi TNF- α a NK buňkami může poskytnout klíčové poznatky pro vývoj terapeutických strategií cílených na posílení imunitní odpovědi při nádorových onemocněních a zánětlivých stavech. (Luci, 2008; Luetke-Eversloh, 2014)

Další nedílnou součástí NK buněk je spolupráce perforinů a granzymů. Perforiny jsou glykoproteiny, které vytváří póry v buněčných membránách cílových buněk. Jsou klíčové pro cytotoxickou aktivitu NK buněk. Tím, že perforiny vytvářejí póry v jiných buněčných membránách, umožňují vstup granzymů do cílových buněk. Granzymy jsou enzymy, jež jsou uvnitř granul v NK buňkách. Tyto enzymy jsou po vstupu do cílových buněk schopny indukovat apoptózu. Také mohou štěpit určité bílkoviny a aktivovat jiné enzymy, které jsou zapojeny do apoptózy dané buňky. Ve finále lze konstatovat, že perforiny a granzymy vytvářejí efektivní kooperaci v cytotoxické aktivitě NK buněk. (Luci, 2008; Prager, 2019)

V závěru, je nutné sdělit, že NK buňky jsou nenahraditelným prvkem imunitního systému, který svým zásadním vlivem přispívá ke správnému chodu celého lidského organismu. Poruchy či dysfunkce NK buněk mohou s sebou nést řadu komplikací, a to s trvalými dopady na lidské zdraví. (Luci, 2008)

Granulocyty

Jsou pojmenovány dle přítomnosti specifických granul v cytoplazmě. Dle barvitelnosti těchto granul je rozdělujeme na neutrofilní, eosinofilní a basofilní. Granulocyty se vyskytují v krevním oběhu, kostní dřeni i ve tkáních. Granulocyty mají schopnost přizpůsobit se a přesouvat se mezi krví a tkáněmi v závislosti na požadavcích imunitního systému. (Hall, 2021)

Neutrofilní granulocyty jsou nejčastějším typem granulocytů. Neutrofilní, proto, že jejich granula mají neutrální nebo jen lehce bazickou povahu. Životnost neutrofilních granulocytů je krátká. Mezi jejich funkce patří odstraňování patogenních mikroorganismů fagocytózou, degranulace, tvorba cytokinů a tvorba neutrofilových extracelulárních pastí. Po vykonání svých funkcí neutrofilní granulocyty zanikají a jsou následně pohlceny makrofágy a monocyty. (Hall, 2021)

Eosinofilní granulocyty obsahují granula, která jsou barvena eosinem, a díky tomu mají červený odstín. Typicky se vyskytují ve tkáních. Podobně jako neutrofilní granulocyty, jsou eosinofilní granulocyty krátkodobě žijící buňky. Jsou schopny fagocytózy, avšak ve výrazně menší míře než neutrofilní granulocyty. Eosinofilní granulocyty jsou důležité při parazitárních infekcích a alergických reakcích. (Hall, 2021)

Basofilní granulocyty mají granula obsahující histamin, heparin, serotonin a další mediátory, což jim umožňuje hrát roli při vazodilataci a koagulaci. Jejich granula se barví modře. Přestože basofilní granulocyty tvoří méně než 1 % cirkulujících leukocytů, mají významné funkce, kam patří např. spojení s alergickými reakcemi a záněty. (Hall, 2021)

Mastocyty neboli žírné buňky, nepatří tak úplně do granulocytů, ale jsou jim velmi podobné, především pak basofilním granulocytům. Mastocyty se nachází v pojivových tkáních po celém těle. Ve svých granulech obsahují (stejně jako basofilní granulocyty) histamin, heparin a serotonin apod. Slouží jako účinná obrana proti parazitárním infekcím, regulují imunitní odpověď a přispívají k normálnímu metabolismu pojivových tkání. Na druhou stranu je nutné se zmínit o tom, že mastocyty jsou zodpovědné za časný typ přecitlivělosti a možná pomáhají i tvorbě některých nádorů. Společně s basofilními granulocytami jsou zodpovědné za vznik anafylaktického šoku.

Monocyty

Radíme je mezi agranulocyty, jelikož neobsahují granula. Monocyty vznikají v kostní dřeni a následně cirkulují krví a po vstupu do tkání se diferencují na makrofágy s dlouhou životností. Jedná se o prekurzory makrofágů (buňky specializované na fagocytózu). Mimo to také přispívají imunitní odpovědi tím, že prezentují antigeny T-lymfocytům. Dále plní klíčovou úlohu při rozpoznání a fagocytóze patogenů. Přestože jsou v krvi vzácnější, mohou se zvýšit v reakci na infekce či záněty. (Hall, 2021)

3.2 Specifický imunitní systém

Specifický imunitní systém je jinak označován jako získaná či adaptivní imunita. Jeho součástí jsou evolučně mladší mechanismy, které jsou antigenně specifické. Reaguje tedy na konkrétní antigeny a vytváří proti nim specifické protilátky. Buněčné mechanismy jsou zprostředkovány B a T lymfocyty, které se vyvinuly z lymfoidního progenitoru. B a T lymfocyty mají regulační a cytotoxické funkce. Humorální část získané imunity představují protilátky neboli imunoglobuliny, které jsou produkovány plazmatickými buňkami. Mechanismy specifické imunity se spouštějí až po setkání s určitým antigenem, a také je pro jejich iniciaci nezbytná aktivita složek vrozené imunitní odpovědi. Specifická imunita je důležitá při opakované infekci stejným patogenem, jelikož vykazuje paměťovou funkci. Po prvním setkání s patogenem se některé B a T lymfocyty diferencují na paměťové buňky. Při opakované infekci stejným patogenem jsou paměťové buňky schopny rychlé imunitní

odpovědi. Tato schopnost paměti specifického imunitního systému je základem pro očkování. (Hall, 2021; Tomar, 2014)

3.2.1 Buňky specifického IS

B lymfocyty

B-lymfocyty náleží k systému specifické imunity. Zprostředkovávají humorální odpověď, a to diferenciací do plazmatických buněk, které produkují imunoglobuliny. Na povrchu B lymfocytů se nachází specifický receptor ve formě membránově vázaného IgM či IgD, který je označován jako BCR. Tento typ lymfocytů se vyvíjí z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni, ve které i následně zrají a diferencují se ve zralé B lymfocyty. Již zralé B lymfocyty migrují do sekundárních lymfoidních orgánů. pokud zde dojde ke styku s antigenem, zralé B lymfocyty se aktivují a diferencují v plazmatické buňky. (Hall, 2021)

T lymfocyty

Jedná se o buňky hematopoetického původu, které jsou součástí buněčné složky specifické imunity. Aby T lymfocyty byly schopny rozpoznávat antigenní peptidy prezentované v komplexu s HLA molekulami, mají na svém povrchu antigenně specifický receptor, tzv TCR. T lymfocyty se vyvíjejí z CD34⁺ pluripotentních hematopoetických buněk kostní dřene. Následně většina T lymfocytů dozrává v thymu a malá část ve sliznici trávicího traktu a v jaterní tkáni. Po dozrání vznikají zralé naivní T lymfocyty, ty pak putují z thymu do krve a dále do lymfatických uzlin či jiných sekundárních lymfoidních orgánů. Zde jsou v blízkém kontaktu s antigen prezentujícími buňkami (APC) a čekají na aktivační signál. Pokud aktivační signál chybí, nebo pokud je slabý, T lymfocyty opouštějí tyto lymfatické orgány, vrací se zpět do krve a opět znovu migrují do jiného sekundárního lymfoidního orgánu. Tento koloběh zvyšuje šanci setkání s APC prezentující komplex antigenních peptidů s HLA molekulami, který je T lymfocyt schopen rozpoznat pomocí svého TCR receptoru. (Hall, 2021)

Existuje velké množství T lymfocytů s různými povrchovými znaky, ale nejvýznamnější jsou CD8⁺ (cytotoxické) a CD4⁺ (pomocné) T lymfocyty. CD8⁺ T lymfocyty se váží na HLA II. třídy a CD4⁺ T lymfocyty se váží na HLA I. třídy. Dalším velmi významným znakem na povrchu těchto buněk je kostimulační receptor CD28, ten se váže na ligandy CD80 a CD86, jež jsou exprimovány na povrchu APC a tím poskytuje T lymfocytům

nezbytný druhý aktivační signál. Poté již aktivované T lymfocyty exprimují molekulu CD40L, která se váže na CD40. (Hall, 2021; Zander, 2019)

3.3 Spolupráce nespecifického a specifického imunitního systému

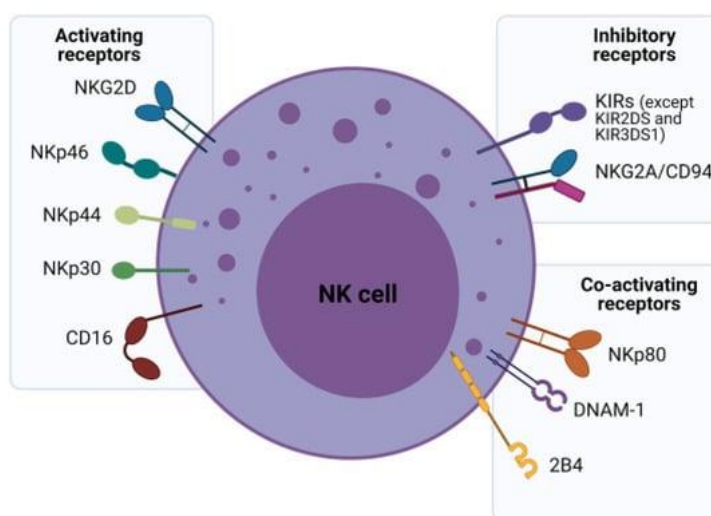
Mechanismy nespecifické a specifické imunity na sebe funkčně navazují. Nespecifický imunitní systém zajišťuje v časných fázích infekce urychlené zahájení imunitní odpovědi a následné zapojení i specifického imunitního systému. Důležitou roli ve spojení těchto dvou mechanismů mají APC, které jsou nezbytné pro aktivaci specifického imunitního systému. Za nejúčinnější buňky překládající antigen jsou považovány dendritické buňky, které představují spojující článek mezi nespecifickou a specifickou částí imunitního systému. Dendritické buňky se v našem organismu vyskytují ve zralé a nezralé formě. Nezralé formy jsou rozmístěny ve tkáních a podílejí se na zachování tolerance vůči vlastním tkáním. Pokud v organismu není infekce, nezralé dendritické buňky pohlcují odumřelé buňky zdravých tkání a jejich části vystaví na svém povrchu společně s HLA molekulami. Dochází k tomu, že T lymfocyty tyto autoantigeny rozpoznají a potlačují reakci vůči danému antigenu. Naopak zralé dendritické buňky vznikají, pokud je v organismu přítomna infekce. Zralé dendritické buňky ztrácejí schopnost pohlcovat, a naopak se stávají účinnými APC. Pouze zralé dendritické buňky dokážou aktivovat naivní lymfocyty. (Théry, 2001)

4 NK BUŇKY U ŽEN S ENDOMETRIÓZOU

Možný vztah mezi vznikem endometriózy a určitou dysfunkcí imunitních buněk již popisuje imunologická teorie vzniku endometriózy. Významnou roli v tomto procesu nejspíše zastávají NK buňky, proto jim bude věnován podrobnější text.

NK buňky se jeví jako klíčové s ohledem na vznik, průběh a případně i možnou léčbu endometriózy. Mikroprostředí u endometriózy sdílí určité podobnosti s nádorovým mikroprostředím. Bylo prokázáno, že zánětlivé cytokiny mohou vytvářet mikroprostředí podobné nádorovému u žen s endometriózou. Jelikož NK buňky jsou nepostradatelné v boji proti nádorovým buňkám, lze na ně takto nahlížet i u endometriózy. (Reis, 2022; Ścieżyńska, 2019)

Obrázek 2 Hlavní receptory exprimované na povrchu NK buněk



Zdroj:

https://www.mdpi.com/cells/cells-10-01058/article_deploy/html/images/cells-10-01058-g001-550.jpg

Bylo zjištěno, že normální mikroprostředí endometria v sobě skrývá vrozenou imunosupresivní schopnost proti cytotoxické aktivitě NK buněk, která pravděpodobně umožňuje implantaci embrya. U žen trpících endometriózou byl pozorován tento účinek větší, což v pánevním prostředí může vést k umožnění implantace endometria a vzniku léze. Důvodem ale nejspíše nebude pokles počtu NK buněk u žen s endometriózou, ale jejich narušená funkce. Dále se předpokládá, že i fragmenty endometria samy o sobě získávají schopnost vyhnout se buňkám imunitního systému. (Ścieżyńska, 2019; Terrén, 2019)

4.1 Snížená cytotoxicita NK buněk při dysregulaci estrogenu

U endometriózy může docházet k dysregulaci hormonálních hladin, a to zejména estrogenu. Ložiska endometria mohou mít schopnost lokálně syntetizovat estrogen, což může vést ke vzniku nepříznivého mikroprostředí pro NK buňky. Takto lokálně produkováný estrogen může stimulovat MCP-1 a VEGF, což vede ke snížené cytotoxické aktivitě NK buněk. (Ahn, 2015)

MCP-1 je chemokin, který má za úkol přitáhnout monocyty a makrofágy k místu zánětu. Zvýšená hladina MCP-1 bývá spojována s různými zánětlivými stavy a patologickými procesy. U endometriózy může být zvýšená produkce MCP-1 výsledkem nadprodukce lokálního estrogenu. (Ahn, 2015)

VEGF je vaskulární endoteliální růstový faktor, jehož hlavní funkcí je podpora angiogeneze. Angiogeneze je komplexní proces vzniku nových cév z již existujících cév. Tento mechanismus hraje zásadní roli v reprodukci, buněčném vývoji a rozvoji buněk. U dospělých jedinců je proliferace endoteliálních buněk řízený proces, který závisí na rovnováze mezi angiogenními a angiostatickými faktory. Tyto faktory jsou aktivovány v případě potřeby a následně pečlivě inhibovány, jakmile je dosaženo stanoveného cíle. Zvýšená rychlost množení endoteliálních buněk často koresponduje s výskytem rakoviny a formováním nádorů, které jsou známé svou závislostí na procesu angiogeneze z důvodu svého růstu a umožnění metastazování. (Ambramiuk, 2022; Ahn, 2015)

V mikroprostředí endometriózy se můžeme setkat s podobným procesem. Pokud by byl VEGF v nadměrném množství, může to vést k nekontrolovatelné angiogenezi s tvorbou hypoxických podmínek. Tato hypoxie a celkové změny v mikroprostředí endometriózy mohou ovlivnit aktivitu NK buněk. VEGF také může ovlivnit NK buňky přímo tím, že omezí jejich cytotoxickou aktivitu. To může být způsobeno změnami ve fyziologii NK buněk, jako je snížením exprese povrchových molekul zodpovědných za rozpoznání cílových buněk nebo snížením produkce efektorových molekul. (Abramiuk, 2022; Ahn, 2015)

4.2 Dysfunkce NK buněk při dysregulaci cytokinů a chemokinů

Endometrióza je charakterizována chronickým zánětem, což může ovlivnit hladiny různých cytokinů v těle. Obecně lze dělit cytokiny na prozánětlivé a protizánětlivé. Mezi prozánětlivé cytokiny související s rozvojem endometriózy patří např. IL-1, TNF- α , IFN- γ a GM-CSF. Tyto cytokiny primárně zesilují zánětlivou odpověď na infekci tím, že podporují

nábor dalších imunitních buněk a prozánětlivých mediátorů do místa poškození. Naopak protizánětlivé cytokiny, kam patří např. IL-4, IL-6, IL-10, ty primárně regulují intenzitu a délku trvání zánětlivé odpovědi tím, že potlačují účinky prozánětlivých cytokinů. (Abramiuk, 2022; Ahn, 2015)

Chemokiny jako MCP-1, IL-8 a SDF-1 jsou schopny přitáhnout imunitní buňky do místa poškození a stimulovat produkci dalších cytokinů. Tato kaskáda událostí, které tvoří zánětlivou odpověď, je důležitým aspektem rozvoje endometriózy. Běžná imunitní odpověď proti infekcím nebo poškození tkání je tvořena křehkou rovnováhou mezi prozánětlivými a protizánětlivými cytokiny. Dysregulace cytokinů je považována za důležitý aspekt patogeneze u mnoha onemocnění, včetně endometriózy, kde se jedná zejména o TNF- α , IFN- γ , GM-CSF a IL-10. (Ahn, 2015)

4.2.1 TNF- α

TNF- α je nejvíce studovaným proteinem z rodiny tumor nekrotizujících faktorů ve spojitosti s endometriózou. U žen s endometriózou byly zjištěny zvýšené hladiny TNF- α , zejména pak u žen v pokročilých stádiích onemocnění. Tato zvýšená hladina TNF- α může mít významný vliv na funkci NK buněk, např. na jejich schopnost aktivace. (Ahn, 2015; Lieberman, 2002)

Dalším možným efektem je inhibice exprese adhezivních molekul NK buněk. To ovlivňuje schopnost těchto buněk interagovat s dalšími buňkami imunitního systému, a i s cílovými buňkami, což celkově vede ke snížení efektivity NK buněk. Toto snížení exprese může mít i vliv na migraci NK buněk k potřebným místům, a to také omezuje jejich schopnost lokalizovat a ničit cílové léze endometriózy. (Ahn, 2015; Lieberman, 2002)

4.2.2 IFN- γ

U žen s endometriózou byly pozorovány různé změny v imunitní odpovědi. Je možné, že tyto změny souvisí s dysregulací hladiny IFN- γ u žen s endometriózou, což může ovlivňovat růst a proliferaci buněk. V souvislosti s endometriózou, kde dochází k nekontrolovatelnému růstu endometriální tkáně mimo dělohu, může IFN- γ hrát roli v regulaci těchto procesů. (Fukui, 2021; Luetke-Eversloh, 2014)

Při chronickém zánětu, který je typický u endometriózy, může také nadměrná produkce IFN- γ vést k vyčerpání NK buněk a omezení jejich cytotoxické aktivity. Pokud

nadměrná produkce IFN- γ přetrvává delší dobu, může imunitní systém vyvinout toleranci na tento cytokin, a to může vést k redukcí odpovědi NK buněk. (Fukui, 2021; Luetke-Eversloh, 2014)

V některých případech, zejména v mikroprostředí nádorů, které se podobá mikroprostředí endometriózy, IFN- γ může podporovat vznik inhibičních signálů, což může bránit NK buňkám v účinném rozpoznávání a ničení cílových buněk. (Fukui, 2021; Luetke-Eversloh, 2014)

4.2.3 GM-CSF

Tento chemokin, který je důležitý ve stimulaci produkce granulocytů a makrofágů v kostní dřeni. Může také ovlivňovat funkce jiných buněk, včetně NK buněk. Přebytek či nadměrná expozice GM-CSF by mohla signalizovat aktivaci zánětlivých procesů v endometriálních lézích. Vyšší hladina GM-CSF může také snižovat přirozenou cytotoxickou aktivitu NK buněk. T (Louis, 2020; Toullec, 2020)

4.2.4 IL-10

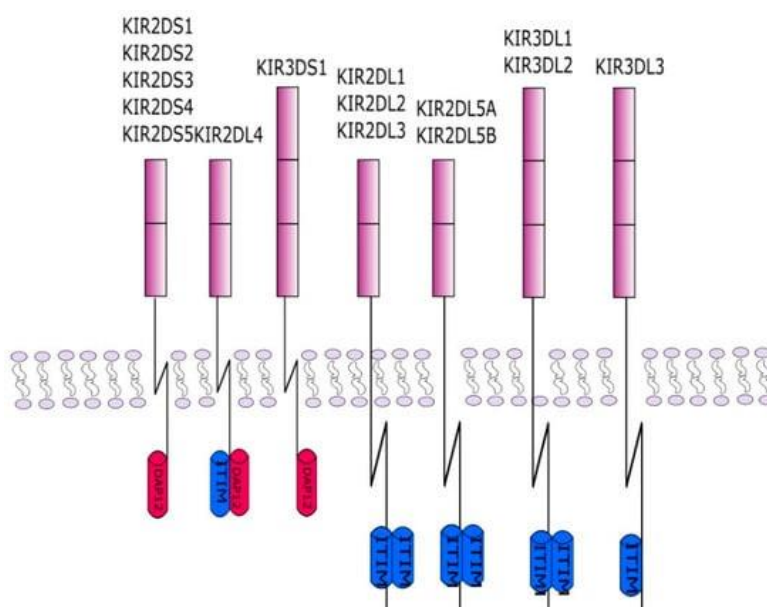
IL-10 je protizánětlivý cytokin, který zastává důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi a potlačení zánětlivých procesů. U žen s endometriózou může docházet k poruchám regulace tohoto cytokinu a k vzniku příliš intenzivní zánětlivé reakce. (Abramiuk, 2022; Ahn, 2015)

4.3 Snížená funkce NK buněk při dysregulaci KIR receptorů

KIR receptory jsou nedílnou součástí NK buněk. Tyto receptory mají geneticky determinované varianty, které hrají klíčovou roli ve sledování a reakci na potenciálně nebezpečné buňky v těle. Narušená či nedostačující funkce KIR receptorů může být důsledkem mnoha faktorů. Jedním z nich bývá genetická predispozice. Různé genetické varianty KIR receptorů mohou ovlivnit jejich expresi a funkci. Dále může dojít k mutaci genů pro KIR receptory. Mutace mohou být buď zděděné, nebo vznikají náhodně během života jedince. Vliv na funkci KIR receptorů mohou mít také i některá virová onemocnění, např. cytomegalovirus. Nesprávná funkce KIR receptorů může být způsobena i hormonálními změnami, například během těhotenství či u endometriózy. Tyto pochody mohou způsobit celkovou dysregulaci KIR receptorů a tím přispět k přetrvávání zánětlivého stavu, jako je v tomto případě endometrióza. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015; Ścieżyńska, 2019)

Existuje několik KIR receptorů, které obecně dělíme na inhibiční a aktivační. V souvislosti s endometriózou jsou zastoupeny spíše inhibiční KIR receptory, které mají za úkol inhibovat cytotoxickou aktivitu NK buněk, pokud jsou exprimovány molekuly HLA I. třídy na povrchu cílové buňky. Tímto procesem se tak zabrání útoku NK buněk na zdravé buňky. Mezi KIR receptory související s endometriózou patří 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1 a 3DL2. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015)

Obrázek 3 KIR receptory



Zdroj:

https://www.mdpi.com/cells/cells-10-01777/article_deploy/html/images/cells-10-01777-g003-550.jpg

4.3.1 2DL1

Jedná se o inhibiční KIR receptor zaměřený na HLA-C2 molekuly. Tento receptor má význam v regulaci aktivace NK buněk a identifikaci infikovaných buněk., Pomáhá udržovat imunitní rovnováhu v těle. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015)

4.3.2 2DL2

Jedná se o další inhibiční KIR receptor, který je zaměřený na specifické varianty HLA-C1. Společně s 2DL3 je klíčový v interakci mezi NK buňkami a buňkami cílové tkáně. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015)

4.3.3 **2DL3**

Podobně jako 2DL1 a 2DL2 je tento receptor určený pro určité varianty HLA-C1. Také pomáhá udržovat imunitní toleranci. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015)

4.3.4 **2DL5**

Tento receptor má komplexní úlohu a není zcela jasné, zda ho lze zařadit přímo do inhibičních nebo aktivačních KIR receptorů. Jeho funkce a vazebné charakteristiky nejsou pevně definovány jako u ostatních KIR receptorů. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015)

4.3.5 **3DL1**

Inhibiční KIR receptor, který je cílený na specifické varianty HLA-B a HLA-A molekul. Zastává důležitou roli při rozpoznávání buněk s poruchami v expresi HLA molekul I. třídy. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015)

4.3.6 **3DL2**

U toho KIR inhibičního receptoru nelze zcela určit jeho hlavní funkci, avšak bývá zapojen do významných imunologických dějů. 3DL2 může být zapojen do regulace cytotoxické aktivity NK buněk, kdy pomáhá udržovat rovnováhu mezi aktivací a inhibicí imunitní odpovědi. Dále může rozpoznávat buňky, které mají poruchy v expresi HLA molekul I. třídy. 3DL2 může také hrát roli v udržování imunitní tolerance. (Dębska-Zielkowska, 2021; Manser, 2015)

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem naší práce byla charakteristika NK buněk u pacientek s přítomným endometriemem v porovnání se zdravými kontrolami. Zaměřili jsme se zejména na expresi KIR receptorů na povrchu NK buněk.

5.2 Dílčí cíle

1. Provést základní charakteristiku sledovaných souborů – ženy s endometriózou a zdravé ženy.
2. Porovnat zastoupení NK buněk u žen s endometriózou a zdravých žen.
3. Porovnat zastoupení KIR receptorů NK buněk u žen s endometriózou a zdravých žen.

6 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

1. Je přítomen statisticky významný rozdíl u žen s endometriózou a zdravých žen v parametrech:

- věk
- váha
- výška
- body mass index
- menarché
- délka menstruačního cyklu
- počet dní menstruačního krvácení

2. Liší se zastoupení NK buněk v periferní krvi u pacientek s endometriózou a zdravých žen?

3. Liší se zastoupení KIR receptorů na povrchu NK buněk mezi sledovanými soubory?

7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Sledovaný soubor tvořilo 48 žen, jednalo se o 23 pacientek s endometriózou a 25 zdravých žen. Endometrióza byla diagnostikována u pacientek na základě jejich anamnézy, klinického stavu a sonografického vyšetření, které odhalilo ovariální endometriom. Diagnóza byla následně potvrzena laparoskopií.

Od každé ženy byly získány základní anamnestické údaje jako je věk, váha, výška, body mass index (BMI), menarché, délka menstruačního cyklu a délka menstruačního krvácení. Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni a všechny ženy podepsaly informovaný souhlas.

8 METODIKA PRÁCE

Pro charakterizaci KIR receptorů na povrchu NK buněk byla nejprve nutná izolace mononukleárních buněk z periferní krve. Následně byly pomocí průtokové cytometrie detekovány NK buňky a na jejich povrchu charakterizovány jednotlivé typy KIR receptorů (2DL1+, 2DL2+, 2DL3+, 2DL5, 3DL1, 3DL1), a to jak u zdravých žen, tak žen s endometriózou. Získaná data byla statisticky zpracována.

8.1 Izolace mononukleárních buněk

Izolace mononukleárních buněk, kam patří i NK buňky, může být provedena z různých zdrojů, a to z periferní krve, tkání nebo nádorů. V tomto případě proběhla izolace z periferní krve žen. Pro zpracování vzorku byly potřeba následující pomůcky:

- zkumavky o objemu 15ml a 50ml
- stojánek na zkumavky
- pipety a špičky
- pasteurky
- sérologické pipety
- vzorky krve ve zkumavkách K₃EDTA
- chemikálie:
 - separačního médium Ficoll-Paque
 - fosfátový pufr (PBS)

Izolaci mononukleárních buněk lze rozdělit do několika kroků:

1. Periferní krev byla odebrána do zkumavek obsahující EDTA (Vacurette® K₃EDTA o objemu 6 ml), což zabránilo srážení krve.
2. Samotná separace buněk probíhá v laminárním boxu, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Nejprve byla krev přenesena do 50 ml zkumavky a následně naředěna fosfátovým pufrem (PBS) v poměru 1:1. Takto připravená krev byla opatrně pomocí Pausterovy pipety nanesena do předem připravené 15 ml zkumavky s Ficoll-Paque. Tento proces využívá hustotního gradientu k oddělení mononukleárních buněk od ostatních složek krve. Nanesení krve na Ficoll-Paque musí probíhat velmi pomalu a opatrně, aby nedošlo k promíchání vzorku krve

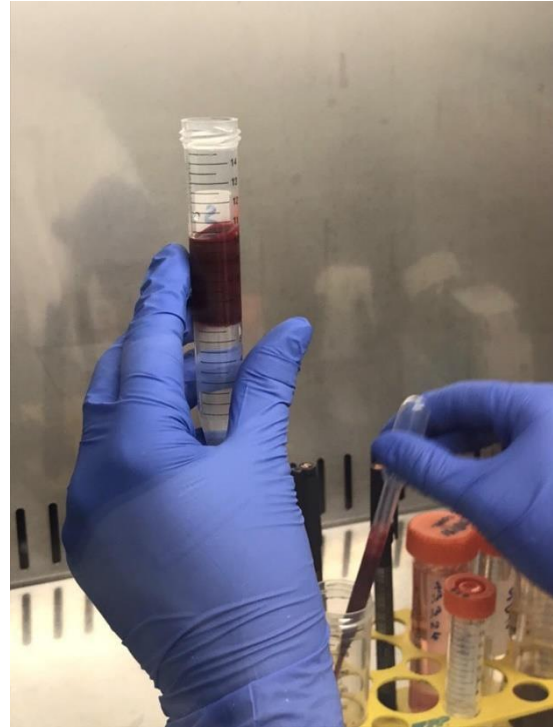
s Ficoll – Paque. Takto připravené vzorky byly přeneseny do centrifugy a centrifugovány 30 minut při rychlosti 300 g s rychlostí rozjezdu a brzdění na nule, což umožnilo separaci buněk na základě jejich hustoty.

Obrázek 4 Nanesení zředěné periferní krve na Ficoll – Paque



Zdroj: Vlastní

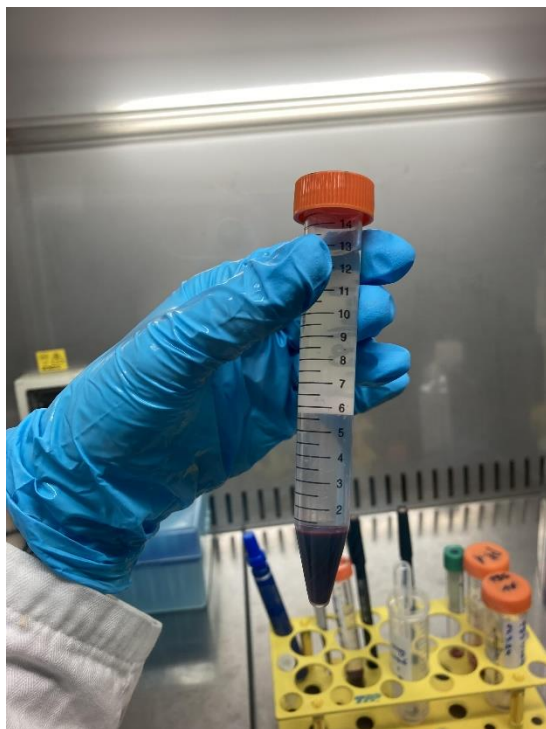
Obrázek 5 Zředěná periferní krev nanesena na Ficoll – Paque



Zdroj: Vlastní

3. Po centrifugaci došlo k oddělení buffy coatu. Následně buffy coat opatrně odebereme pomocí pausterovy pipety a přeneseme do nové 50 ml zkumavky. Pokud máme odebraný všechn buffy coat, doplníme objem do 30 ml PBS, takto připravenou 50 ml zkumavku dáme stočit do centrifugy na 10 minut při rychlosti 300 g s rychlostí rozjezdu a brždění sedm.

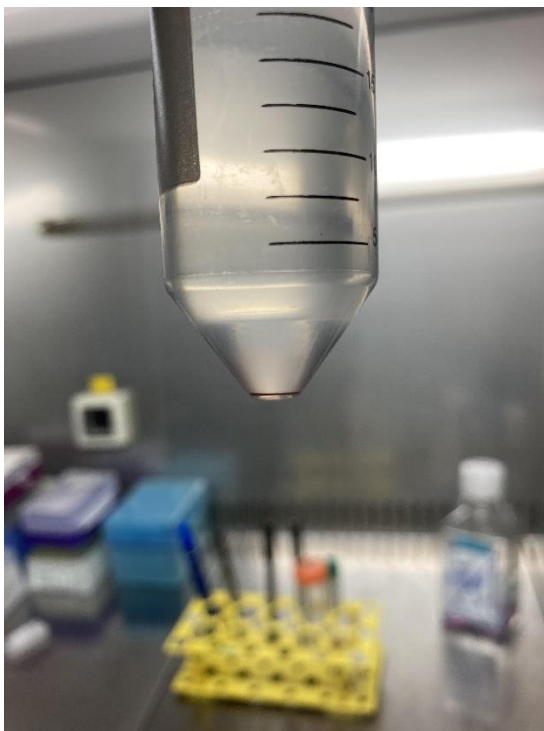
Obrázek 6 Oddělení buffy coatu po stočení



Zdroj: Vlastní

4. Po dokončení stočení v centrifuze můžeme pozorovat peletu buněk na dně 50 ml zkumavky. Dále je potřeba slít supernatant, aby peleta zůstala dole. Následně byla peleta rozvolněna za pomoci rozvolňovacího média, a to přidáním 1 ml k peletě do 50 ml zkumavky.

Obrázek 7 Peleta buněk po stočení usazená na dně zkumavky



Zdroj: Vlastní

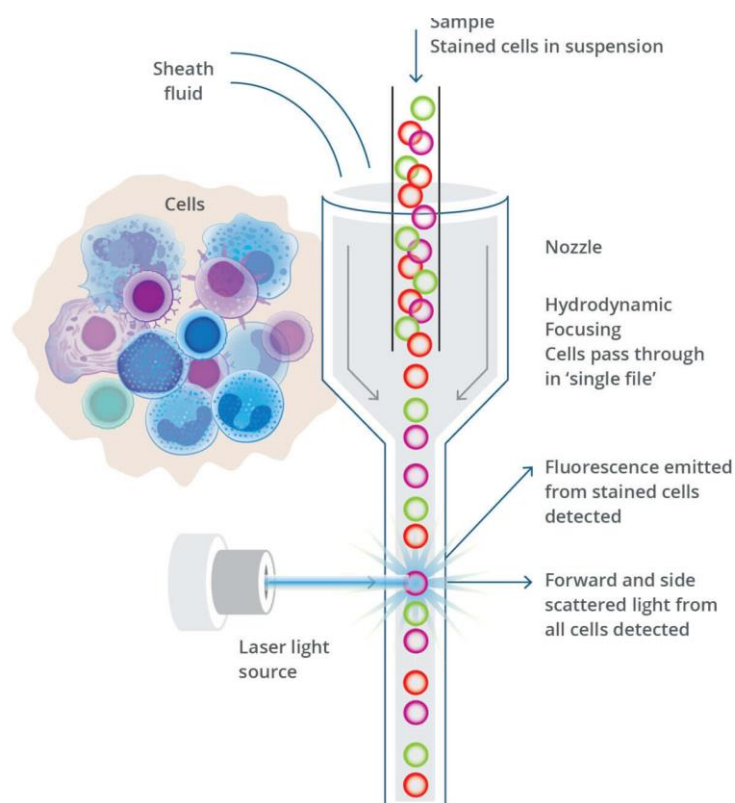
5. U takto připravených vzorků následně probíhalo měření zastoupení NK buněk ve vzorku a charakterizace KIR receptorů, a to pomocí průtokové cytometrie. (GE Healthcare, 2010)

8.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je molekulárně analytická laboratorní metoda. Umožňuje identifikovat a kvantifikovat konkrétní znaky buňky. Metoda je velmi univerzální a rychlá.

Princip průtokové cytometrie spočívá v detekci fluorescenčního signálu. Vzhledem k tomu, že samotné buňky zřídka fluoreskují, jsou používány fluorescenčně značené protilátky k identifikaci požadovaných znaků. Buňky jsou následně v přístroji řízeny speciálně navrženým tokem, aby v daném okamžiku prošla vždy jen jedna buňka z analyzované suspenze. Tato buňka je osvětlena souborem laserů s určitými vlnovými délkami a je sledována emitovaná fluorescence. Tento proces se nazývá imonofenotypizace a může být použit k typizaci různých buněčných znaků. V našem experimentu nám imunotypizace pomohla identifikovat NK buňky s KIR receptory 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1 a 3DL2. (Givan, 2011; Ormerod, 1994; Shapiro, 1995)

Obrázek 8 Princip průtokové cytometrie



Zdroj:

<https://marvel-b1-cdn.bc0a.com/f00000000288736/www.streck.com/wp-content/uploads/2020/11/flow-cytometry-light-scatter-illustration.jpg>

8.2.1 Příprava vzorku

Před samotným prováděním analýzy je obvykle nutné obarvit buňky pomocí fluorescenčních barviv. Tato barviva mohou být specifická pro různé povrchové markery buněk. Je důležité sestavit tzv. panel. Panel v průtokové cytometrii je soubor specifických fluorescenčních markerů, které jsou použity k získání dané populace buněk, kterou chceme dále zkoumat.

Panel na průtokovém cytometru pro analýzu NK buněk s KIR receptory by zahrnoval fluorochromy pro detekci specifických markerů, které jsou charakteristické pro NK buňky a jejich KIR receptory.

Pro určení NK buněk lze použít specifické protilátky zaměřené na povrchové molekuly, které jsou charakteristické pro NK buňky. Mezi tyto markery patří CD16 a CD56, které se běžně využívají k identifikaci NK buněk. V tomto výzkumu jsme konkrétně použili protilátky proti CD16 (PerCP) a CD56 (APC).

V rámci analýzy exprese KIR receptorů je důležité použít specifické protilátky pro detekci zkoumaných receptorů 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1 a 3DL2. (Holíček, 2020)

Pro průtokovou cytometrii jsme sestavili následující panely do dvou zkumavek.

Tabulka 1 Panely na průtokovou cytometrii pro povrchové znaky NK buněk

fluorochrom	BV421	PerCP	APC	FITC	PE
množství protilátky	2 μ l	2 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
1. zkumavka	CD56	CD3	2DL2/2DL3	2DL3	2DL1
2. zkumavka	CD56	CD3	2DL5	3DL1	3DL1/DL2

Zdroj: Vlastní

Takto připravené panely umožňují identifikaci NK buněk (pomocí CD16 a CD56) a současně analýzu exprese určitých izoform KIR receptorů. Po aplikaci všech gateů lze analyzovat expresi KIR receptorů na populaci NK buněk a získat tak kvantitativní informace o expresi jednotlivých receptorů. (Holíček, 2020)

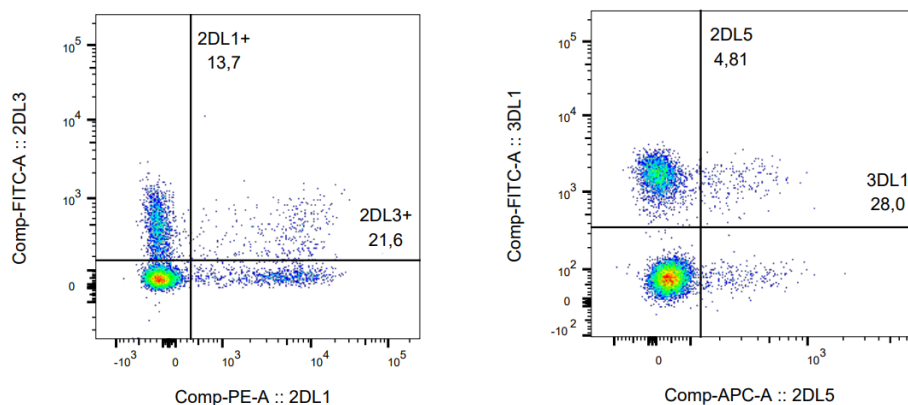
8.2.2 Barvení vzorku

Pro barvení vzorku a následnou analýzu NK buněk a exprese určitých izoform KIR receptorů je klíčové dodržovat daný postup, aby byly zajištěny spolehlivé a reprodukovatelné výsledky. U barvení vzorku je důležité postupovat pečlivě stanovených postupů, aby se minimalizovali možné chyby a zkreslení výsledků.

Barvení vzorku se provádí přidáním specifických barvicích směsí obsahujících protilátky s fluorochromy. Tento proces zahrnuje řádné promíchání vzorku s barvicí směsí tak, aby se všechny buňky rovnoměrně pokryly a minimalizovala se tvorba bublin. Vzorek se dále inkubuje při pokojové teplotě po stanovenou dobu (15 minut). Doba inkubace se může lišit v závislosti na konkrétních podmínkách a požadovaném výsledku.

Po inkubaci bylo provedeno opláchnutí vzorku pomocí roztoku PBS, aby se odstranili přebytečné protilátky. Následně byl vzorek centrifugován (5 min), poté slit supernatant a zbylý vzorek rozvolněn ve 300 μ l PBS. Takto připravený vzorek byl analyzován na průtokovém cytometru. (Leslie, 2006)

Obrázek 9 Ukázka analýzy dat z průtokového cytometru



Zdroj: Vlastní

8.2.3 Nastavení přístroje

Před zahájením samotného měření, je klíčové zajistit kalibraci průtokového cytometru. Tento proces je klíčový pro zajištění spolehlivosti a konzistence měření. Provádí se kontrola laserového výkonu, optimalizace nastavení detektorů a ověření celkového výkonu přístroje pomocí standardních kontrolních vzorků. Důležitá je také kompenzace mezi jednotlivými fluorescenčními kanály, což pomáhá minimalizovat překryvy spekter a zajišťuje přesnou kvantifikaci signálů. (Givan, 2011; Ormerod, 1994; Shapiro, 1995)

8.2.4 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo zpracováno pomocí metody dvou výběrového t-testu. Za statisticky významný rozdíl byla považována hladina významnosti 5 % ($p < 0,05$).

9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Po změření intenzity signálů na průtokovém cytometru byly vyhodnoceny výsledky pro panely NK buněk a KIR receptorů.

9.1 Sledovaný soubor

Do této práce bylo zařazeno 23 pacientek s endometriózou a 25 zdravých žen, které vykazovaly normální klinický nález. Průměrný věk pacientek byl 32,05 let ($SD \pm 6,64$), u kontrol se jednalo o 32,62 let ($SD \pm 7,22$). Od žen byly získány základní anamnestické údaje, jako je jejich výška, váha, BMI, věk menarché, délka menstruačního cyklu a počet dní menstruačního krvácení. Tuto základní charakteristiku shrnuje Tabulka 1.

Průměrná váha pacientek byla 69,9 kg ($SD \pm 17,31$), výška 167,86 cm ($SD \pm 7,85$) a BMI 24,67 ($SD \pm 5,16$). Z gynekologické anamnézy bylo zjištěno, že průměrná délka menstruačního cyklu pacientek je 28,69 dní (nejkratší cyklus 21 dní a nejdelší cyklus 40 dní), délka krvácení činí 6,95 dní ($SD \pm 5,26$) a první menstruaci ženy měly průměrně v 12,55 letech ($SD \pm 1,9$).

Naproti tomu u zdravých kontrol byla průměrná váha 64,98 kg ($SD \pm 13,14$), výška 166,40 cm ($SD \pm 7,28$) a BMI 23,45 ($SD \pm 4,41$). Průměrná délka menstruačního cyklu byla 29,70 dní (nejkratší cyklus 26 dní a nejdelší cyklus 42,5 dní), délka krvácení 5,04 dní ($SD \pm 1,00$) a rok menarché 12,62 let ($SD \pm 1,41$).

Tabulka 2 Charakteristika souboru

CHARAKTERISTIKA SOUBORU		
SLEDOVANÝ PARMETR	PACIENTKA (n = 23)	KONTROLA (n = 25)
Věk	32,05 let ($SD \pm 6,64$)	32,62 let ($SD \pm 7,22$)
Váha	69,90 kg ($SD \pm 17,31$)	64,98 ($SD \pm 13,14$)
Výška	167,86 cm ($SD \pm 7,85$)	166,40 ($SD \pm 7,28$)
BMI	24,67 ($SD \pm 5,16$)	23,45 ($SD \pm 4,41$)
Menarché	12,55 let ($SD \pm 1,90$)	12,62 let ($SD \pm 1,41$)
Délka menstruačního cyklu	28,69 dní ($SD \pm 3,95$)	29,70 dní ($SD \pm 3,71$)
Délka krvácení	6,95 dní ($SD \pm 5,26$)	5,04 dní ($SD \pm 1,00$)

Zdroj: Vlastní

9.2 Zastoupení NK buněk a KIR receptorů

U pacientek s endometriózou i u zdravých kontrol bylo změřeno procentuální zastoupení samotných NK buněk a následně detailněji zastoupení jednotlivých KIR receptorů za pomoci metody průtokové cytometrie. Tuto charakteristiku ohledně NK buněk a jejich receptorů shrnuje Tabulka 2.

Průměrné zastoupení samotných NK buněk bylo u pacientek 12,53 % (SD ± 4,89). U jednotlivých KIR receptorů bylo zastoupení ve skupině pacientek následující: 2DL1⁺ buněk bylo 13,25 % (SD ± 5,85), 2DL2⁺ 33,60 % (SD ± 11,10), 2DL3⁺ 23,96 % (SD ± 11,98) a 2DL5⁺ bylo 1,55 % (SD ± 2,25). Dále byly u pacientek změřeny i 3DL1⁺ NK buňky, jejichž průměrné zastoupení bylo 13,07 % (SD ± 10,18) a 3DL2⁺ 18,33 % (SD ± 11,20).

U zdravých kontrol bylo průměrné zastoupení NK buněk 12,64 % (SD ± 4,57). U jednotlivých KIR receptorů se jednalo o hodnoty 2DL1⁺ 16,99 % (SD ± 12,49), 2DL2⁺ 29,33 % (SD ± 9,14), 2DL3⁺ 19,81 % (SD ± 13,24) a 2DL5⁺ 1,85 % (SD ± 2,46). Pro 3DL1⁺ se jednalo o hodnotu 14,47 % (SD ± 9,57) a u 3DL2⁺ 20,81 % (SD ± 14,48).

V zastoupení NK buněk a jednotlivých podtypů KIR receptorů nebyla v námi sledovaných souborech nalezena žádná statistická významnost.

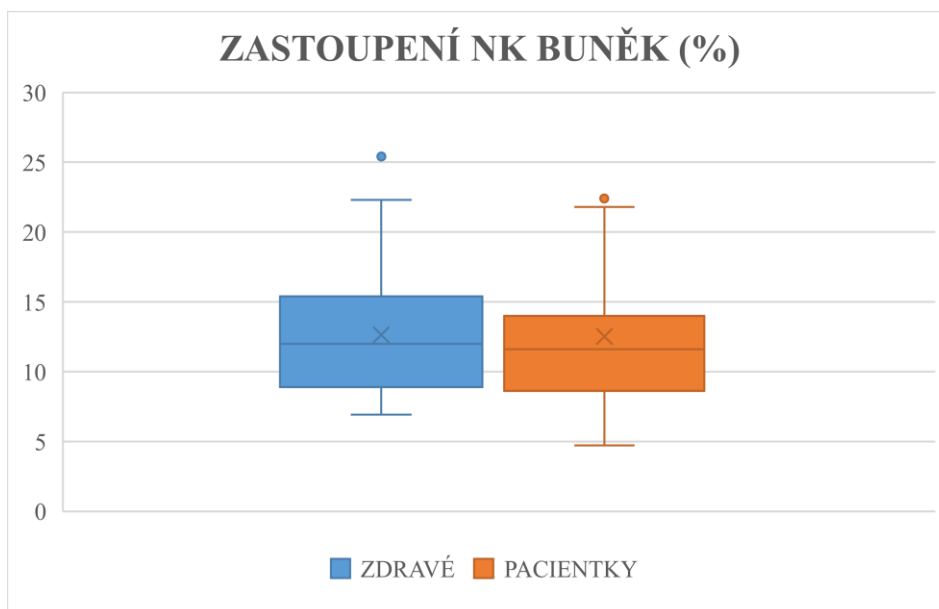
Výsledky podrobně zobrazuje Tabulka 3 a Graf 1 až 7.

Tabulka 3 Zastoupení NK buněk a KIR receptorů u sledovaných souborů

CHARAKTERIZACE KIR RECEPTORŮ NK BUNĚK		
LABORATORNÍ PARAMETR	PACIENTKA n = 23	KONTROLA n = 25
NK buňky (%)	12,53 (SD ± 4,89)	12,64 (SD ± 4,57)
2DL1 ⁺ (%)	13,25 (SD ± 5,85)	16,99 (SD ± 12,49)
2DL2 ⁺ (%)	33,60 (SD ± 11,10)	29,33 (SD ± 9,14)
2DL3 ⁺ (%)	23,96 (SD ± 11,98)	19,81 (SD ± 13,24)
2DL5 ⁺ (%)	1,55 (SD ± 2,25)	1,85 (SD ± 2,46)
3DL1 ⁺ (%)	13,07 (SD ± 10,18)	14,47 (SD ± 9,57)
3DL2 ⁺ (%)	18,33 (SD ± 11,20)	20,81 (SD ± 14,48)

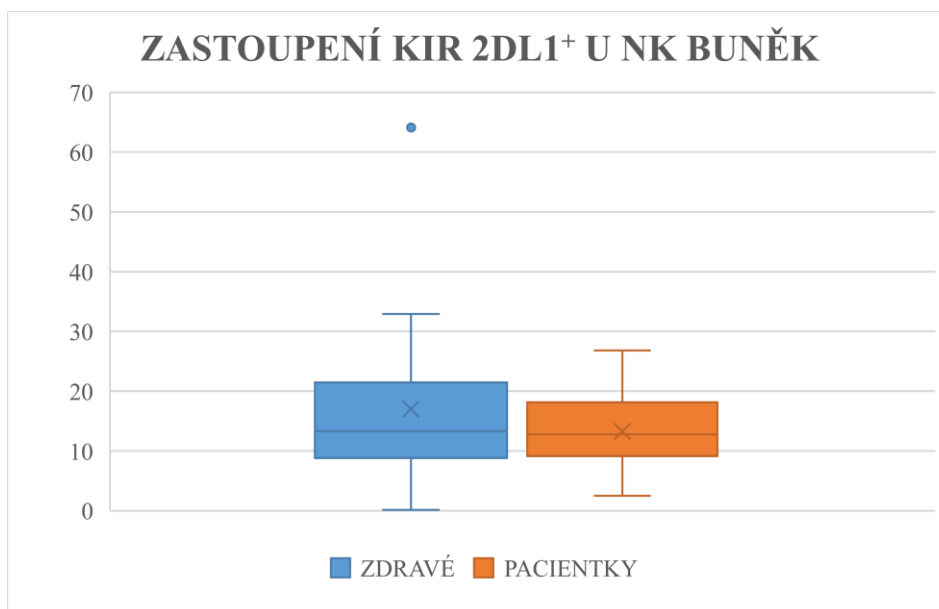
Zdroj: Vlastní

Graf 2 Zastoupení NK buněk u pacientek a zdravých kontrol



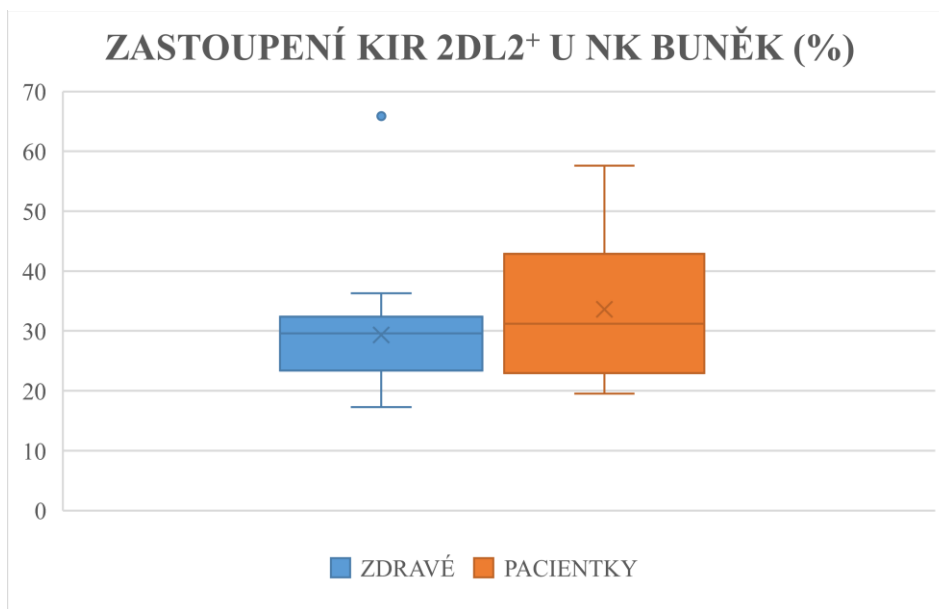
Zdroj: Vlastní

Graf 1 Zastoupení KIR 2DL1 u pacientek a zdravých kontrol



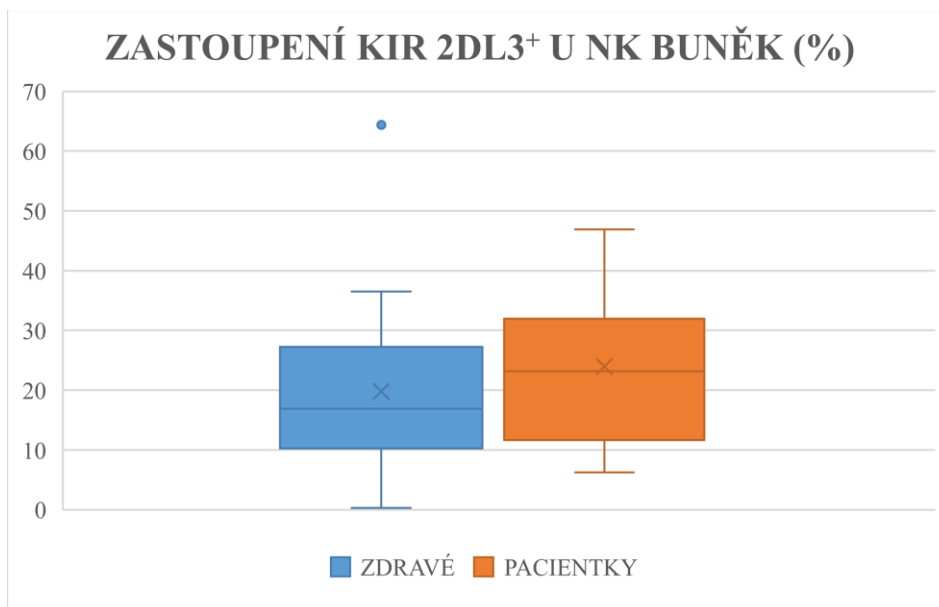
Zdroj: Vlastní

Graf 3 Zastoupení KIR 2DL2 u pacientek a zdravých kontrol



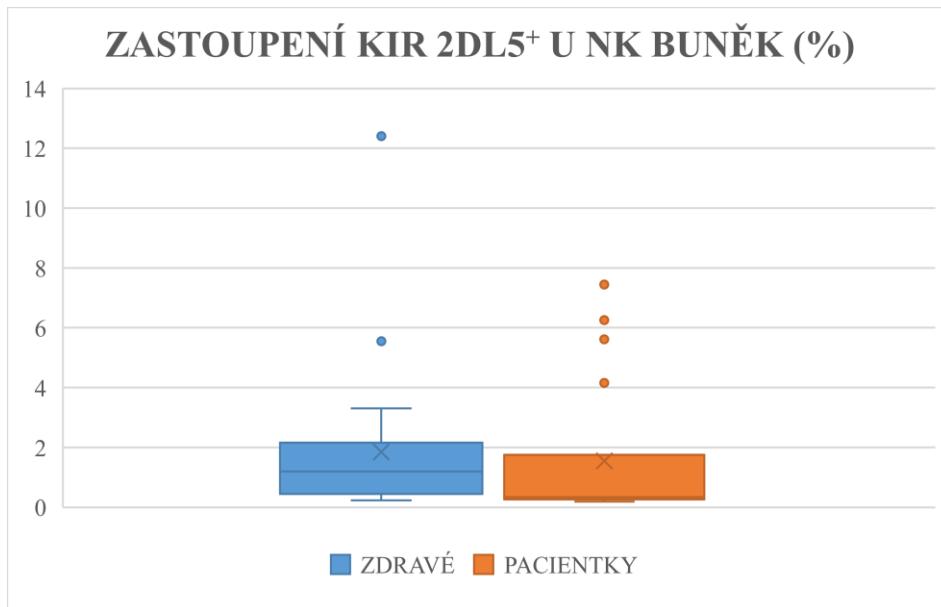
Zdroj: Vlastní

Graf 4 Zastoupení KIR 2DL3 u pacientek a zdravých kontrol



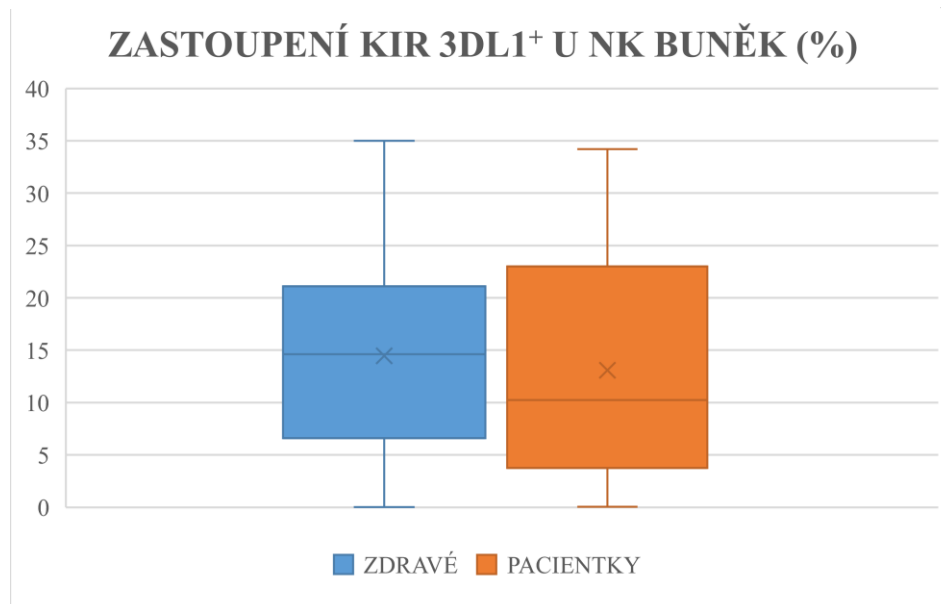
Zdroj: Vlastní

Graf 5 Zastoupení KIR 2DL5 u pacientek a zdravých kontrol



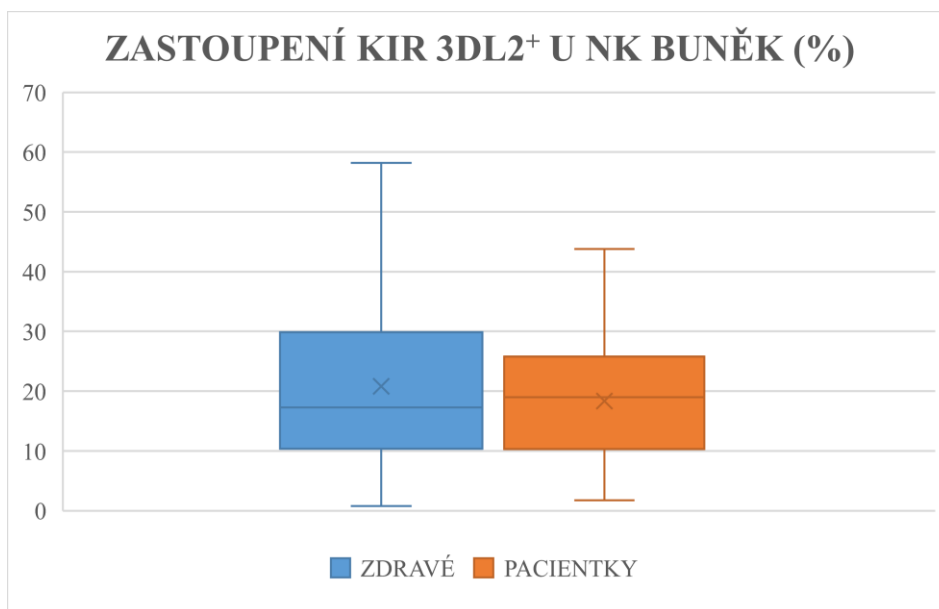
Zdroj: Vlastní

Graf 6 Zastoupení KIR 3DL1 u pacientek a zdravých kontrol



Zdroj: Vlastní

Graf 7 Zastoupení KIR 3DL2 u pacientek a zdravých kontrol



Zdroj: Vlastní

DISKUZE A ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsme se zabývali charakteristikou NK buněk u pacientek s endometriózou v porovnání se zdravými ženami. Celkově bylo vyšetřeno 48 žen (23 pacientek a 25 kontrol), u nichž jsme sledovali jednak jejich základní charakteristiku a z laboratorních parametrů zastoupení NK buněk a charakteristiku jejich povrchových KIR receptorů. Jako metoda byla zvolena průtoková cytometrie.

Cílem práce byla identifikace případných rozdílů mezi ženami trpícími endometriózou a ženami zdravými.

I přesto, že jsme sledovali 23 pacientek s endometriózou a 25 zdravých kontrol, nepodařilo se nám identifikovat žádné statisticky významné rozdíly ve sledovaných parametrech jak osobní anamnézy, gynekologické anamnézy a ani u laboratorních parametrů.

Analýza exprese KIR receptorů byla provedena s očekáváním, že by mohla poskytnout nějaký náznak o snížené expresi KIR receptorů u pacientek s endometriózou, Nicméně i přes naše očekávání nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v expresi KIR receptorů mezi pacientkami a zdravými kontrolami. Pro tuto skutečnost existuje několik možných vysvětlení.

Prvním z těchto vysvětlení může být malý rozsah sledovaného souboru. Přestože jsme se snažili získat dostatečný počet účastníků, aby naše výsledky byly významné, mohlo být potřeba většího souboru pro zajištění dostatečné statistické síly.

Dále by mohla hrát roli rozmanitost endometriózy. Toto onemocnění je známo svou heterogenitou, což znamená, že pacientky mohou mít různé formy a závažnost onemocnění. Může se tak stát, že některé subtypy endometriózy jsou více spojeny s určitými imunitními charakteristikami než jiné. V našem souboru byly zastoupeny jen pacientky s jednou formou endometriózy, a to s endometriomem.

Dalším možným vysvětlením je biologická variabilita. I když jsme se snažili získat co nejhomogennější vzorky, existují stále individuální rozdíly v imunologických odpovědích. Tyto rozdíly mohou způsobit značnou variabilitu v našich datech, což může snížit citlivost na detekci statisticky významných rozdílů.

Posledním bodem je metodologie analýzy. V naší bakalářské práci v praktické části jsme použili průtokovou cytometrii k měření zastoupení exprese KIR receptorů na povrchu NK buněk. Tato laboratorní technika umožňuje detailní analýzu jednotlivých buněčných populací a jejich markerů. Avšak je třeba zdůraznit, že průtoková cytometrie může být citlivá na mnoho faktorů, které mohou ovlivnit výsledky. Při použití průtokové cytometrie jsou stěžejními aspekty příprava vzorků, kalibrace přístroje, správné obarvení vzorků a analýza dat. I přes pečlivou standardizaci a kontrolu těchto procesů, stále existuje možnost technických chyb, které by mohly ovlivnit naše výsledky. Například nedostatečná příprava vzorků nebo špatná kalibrace přístroje mohou vést k nepřesným měřením. Stejně tak může být chybná interpretace dat nebo nedostatečná eliminace pozadí.

Tyto technické aspekty mohou mít zásadní vliv na detekci drobných rozdílů v expresi KIR receptorů mezi pacientkami a zdravými kontrolami. Navzdory naší snaze o standardizaci a kontrolu procesů průtokové cytometrie, je možné, že technické chyby či variabilita souboru mohly přispět k tomu, že jsme nedokázali identifikovat statisticky významné rozdíly mezi sledovanými soubory.

Závěrem lze sdělit, že i přes to, že jsme neprokázali statisticky významné rozdíly v charakteristikách NK buněk a v expresi KIR receptorů u pacientek a zdravých kontrol, naše práce poskytuje další krok vpřed v této oblasti. Je třeba provést další studie s větším množstvím vzorků, které by mohly lépe zachytit biologickou variabilitu a použít komplexnější metodologie analýzy. Tyto kroky by mohly přispět k lepšímu porozumění imunitní odpovědi při endometrióze a poskytnout základ pro vývoj nových terapeutických přístupů pro pacientky trpící tímto onemocněním.

SEZNAM LITERATURY

Abramiuk M, Grywalska E, Małkowska P, Sierawska O, Hrynkiewicz R, Niedźwiedzka-Rystwej P. The Role of the Immune System in the Development of Endometriosis. *Cells*. 2022 Jun 25;11(13):2028. doi: 10.3390/cells11132028. PMID: 35805112; PMCID: PMC9265783.

AHN, Soo Hyun, Stephany P. MONSANTO, Caragh MILLER, et al., (2015). Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *BioMed Research International* [online] [accessed. 17. December 2020]. Retrieved z: doi: <https://doi.org/10.1155/2015/795976>.

Becar M, Kasi A. Physiology, MHC Class I. 2022 Sep 26. In: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 32310482.

Berger AC, Roche PA. MHC class II transport at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Jan 1;122 (Pt 1):1-4. doi: 10.1242/jcs.035089. PMID: 19092054; PMCID: PMC2714400.

BUC, M. 2013. HLA komplex a jeho biologický a medicínsky význam. [online]. Portál Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave [cit. 02. 03. 2024]. Dostupné z: <https://portal.fmed.uniba.sk/clanky.php?aid=183>. ISSN 1337-9577.

Dębska-Zielkowska J, Moszkowska G, Zieliński M, Zielińska H, Dukat-Mazurek A, Trzaskowski P, Stefańska K. KIR Receptors as Key Regulators of NK Cells Activity in Health and Disease. *Cells*. 2021 Jul 14;10(7):1777. doi: 10.3390/cells10071777. PMID: 34359951; PMCID: PMC8303609.

Dogra P, Rancan C, Ma W, Toth M, Senda T, Carpenter DJ, Kubota M, Matsumoto R, Thapa P, Szabo PA, Li Poon MM, Li J, Arakawa-Hoyt J, Shen Y, Fong L, Lanier LL, Farber DL. Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence. *Cell*. 2020 Feb 20;180(4):749-763.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.01.022. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32059780; PMCID: PMC7194029.

FANTA, M, P KOLIBA and Hana HRUŠKOVÁ, (2012). Endometrióza. *Čes. Gynek.*, 77. vol. 2012, no. 4, p. str. 314-319.

Fitzgerald, H. C., Schust, D. J., & Spencer, T. E. (2021). In vitro models of the human endometrium: evolution and application for women's health. *Biology of Reproduction*, 104(2), 282-293. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa183>.

Fukui, A., Mai, C., Saeki, S., Yamamoto, M., Takeyama, R., Kato, T., Ukita, Y., Wakimoto, Y., Yamaya, A. a Shibahara, H. (2021). Pelvic endometriosis and natural killer cell immunity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 85(4), e13342. <https://doi.org/10.1111/aji.13342>.

GE Healthcare. (2010). Properties of mononuclear cells isolated by the Ficoll-Paque method. Sigma-Aldrich [online]. [vid. 2020-12-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/isolation-ofmononuclear-cells/properties-of-isolated-cells.html>

Givan, A. L. (2011). Flow cytometry: an introduction. *Methods in Molecular Biology*, 699, 1-29. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5_1.

Gruen, J. R., et al. (2001). Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Frontiers in Bioscience*, 6, D960-D972.

Hall JE. Hall ME. Resistance of the body to infection: I. leukocytes, granulocytes, the monocyte-macrophage system, and inflammation. In: Hall JE, Hall ME, eds. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 14th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2021: chap 33-34.

HANZLOVÁ, J. a HEMZA, J. 2013. Základy anatomie soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní [online]. [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/zenske_organy.html.

Holíček, P., Truxová, I., Kasíková, L., Vosahlíková, S., Šálek, C., Raková, J., Fučíková, J. (2020). Posouzení cytotoxicity zprostředkované NK buňkami průtokovou cytometrií po rychlé, vysoce výnosné izolaci z periferní krve. *Methods in Enzymology*, 631, 277-287. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.05.034>.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. vol. 3, Praha: Triton, 2008. 280 s. ISBN 80-7254-686-4.

HRUŠKOVÁ, Hana, (2011). Endometrióza: výrazný dopad na kvalitu života ženy. *Interní medicína pro praxi*. 1. 10., vol. 13, no. 10, pp. 394-396. ISSN 12127299, 18035256.

JANOŤKOVÁ K., PLÁTENÍKOVÁ T., HÁJEK M., et al., (2018). Endometrióza a její vliv na plodnost a kvalitu života. *Prakt. Lék.* vol. 2018, no. 98(4), pp. 147-152.

KLÉZL, Petr, Jan DRAHOŇOVSKÝ, Michael HALAŠKA, et al., (2018). Hluboká infiltruující endometrióza postihující uropoetický trakt. *Urologie pro praxi*. 1.7., vol. 19, no. 3, pp. 116-120. ISSN 12131768, 18035299.

Kobayashi, H., Kawahara, N., Ogawa, K., & Yoshimoto, C. (2020). A Relationship Between Endometriosis and Obstetric Complications. *Reproductive Sciences*, 27(3), 771-778. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00118-0>.

Koninckx, P. R., Fernandes, R., Ussia, A., Schindler, L., Wattiez, A., Al-Suwaidi, S., Tahlak, M. (2021). Pathogenesis Based Diagnosis and Treatment of Endometriosis. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 12, 745548. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.745548>.

Koninckx, P. R., Ussia, A., Adamyan, L., Wattiez, A., Gomel, V., & Martin, D. C. (2019). Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. *Fertility and Sterility*, 111(2), 327-340. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.013.

Lamceva, J., Uljanovs, R., & Strumfa, I. (2023). The Main Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4254. doi:10.3390/ijms24054254.

Leslie, G. (2006). *Flow Cytometry: A Basic Guide*. Institute of Medical Biology.

Lieberman LA, Hunter CA. Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN-gamma by NK cells. *Microbes Infect.* 2002 Dec;4(15):1531-8. doi: 10.1016/s1286-4579(02)00036-9. PMID: 12505525.

LOKAJ, Jindřich. (2019). Imunitní systém ve fyziologickém řádu organismu. *Vnitřní lékařství*. vol. 2, no. 65, pp. 71-74.

Louis, C., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Yang, Y., D'Silva, D., Kratina, T., Dagley, L., Hadiyah-Zadeh, S., Rautela, J., Masters, S. L., Davis, M. J., Babon, J. J., Ciric, B., Vivier, E., Alexander, W. S., Huntington, N. D., a Wicks, I. P. (2020). NK cell-derived GM-CSF

potentiates inflammatory arthritis and is negatively regulated by CIS. *Journal of Experimental Medicine*, 217(5), e20191421. <https://doi.org/10.1084/jem.20191421>.

Luetke-Eversloh M, Cicek BB, Siracusa F, Thom JT, Hamann A, Frischbutter S, Baumgrass R, Chang HD, Thiel A, Dong J, Romagnani C. NK cells gain higher IFN- γ competence during terminal differentiation. *Eur J Immunol*. 2014 Jul;44(7):2074-84. doi: 10.1002/eji.201344072. Epub 2014 May 19. PMID: 24752800.

Luci C, Tomasello E. Natural killer cells: detectors of stress. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(11):2335-40. doi: 10.1016/j.biocel.2008.05.001. Epub 2008 May 15. PMID: 18595768.

Manser, A. R., Weinhold, S., & Uhrberg, M. (2015). Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunological Reviews*, 267(1), 178-196. <https://doi.org/10.1111/imr.12316>.

MERIČKO, Lukáš and Tomáš TICHÝ, (2016). Kožní endometrióza. *Dermatologie pro praxi*. 1.10., vol. 10, no. 3, pp. 141-143. ISSN 18022960, 18035337.

Moser, M., & Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28(Suppl 3), C2-13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>.

Ormerod, M. G. (1994). *Flow Cytometry*. 2nd ed. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.

Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 126(4), 458-465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x>.

Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. 2019 Jun;105(6):1319-1329. doi: 10.1002/JLB.MR0718-269R. Epub 2019 May 20. PMID: 31107565.

Reis, J. L., Rosa, N. N., Ângelo-Dias, M., Martins, C., Borrego, L. M., & Lima, J. (2022). Natural Killer Cell Receptors and Endometriosis: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 331. <https://doi.org/10.3390/ijms24010331>.

Scutiero, G., Iannone, P., Bernardi, G., Bonaccorsi, G., Spadaro, S., Volta, C. A., Greco, P., & Nappi, L. (2017). Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the

Literature. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 7265238. doi:10.1155/2017/7265238.

Shapiro H.M.: *Practical Flow Cytometry*, Third Edition, Willey-Liss, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 1995

Ścieżyńska, A., Komorowski, M., Soszyńska, M. a Malejczyk, J. (2019). NK Cells as Potential Targets for Immunotherapy in Endometriosis. *Journal of Clinical Medicine*, 8, 1468. <https://doi.org/10.3390/jcm8091468>.

ŠTEFÁNEK, Jiří. 2011. MUDr. IČO 88318427. [online]. 6. březen 2023. [cit. 6. březen 2023]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/deloha>.

Terrén, I., Orrantia, A., Vitallé, J., Zenarruzabeitia, O., & Borrego, F. (2019). NK Cell Metabolism and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10, 2278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02278>.

Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2001 Feb;13(1):45-51. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00180-1. PMID: 11154916.

Tomar, N., & De, R. K. (2014). A brief outline of the immune system. *Methods in Molecular Biology*, 1184, 3-12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_1.

Toullec, L., Batteux, F., Santulli, P., Chouzenoux, S., Jeljeli, M., Belmondo, T., Hue, S., & Chapron, C. (2020). High Levels of Anti-GM-CSF Antibodies in Deep Infiltrating Endometriosis. *Reproductive Sciences*, 27(1), 211-217. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00021-8>.

VENTRUBA, Pavel, 2008. Endometrióza. In: ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Karel CITTERBART. *Gynekologie. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, s. 143-147. ISBN 978-80-7262-501-7.

Zander, R., Schauder, D., Xin, G., Nguyen, C., Wu, X., Zajac, A., & Cui, W. (2019). CD4+ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8+ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer. *Immunity*, 51(6), 1028-1042.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.10.009>.