

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



Zuzana Jelínková

Imunologická vyšetření neplodných párů

Bakalářská práce

HRADEC KRÁLOVÉ

2008

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Imunologická vyšetření neplodných párů

Bakalářská práce

Autor: Zuzana Jelínková
Studijní obor: Zdravotnická bioanalytika
Forma studia: Kombinovaná
Vedoucí práce: RNDr. Marcela Drahošová

Hradec Králové

2008

P o d ě k o v á n í

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Marcele Drahošové za odborné vedení, cenné připomínky, motivaci k mé práci a především trpělivost. Dále pak PharmDr. Petru Jílkovi jakožto mému garantovi za farmaceutickou fakultu a všem zaměstnancům katedry biologických a lékařských věd FAF UK za ochotu a pomoc. Zvláštní dík patří zaměstnancům imunologické laboratoře FNHK a mé rodině.

CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je pokud možno podat celkový přehled o možnostech imunologického laboratorního vyšetření u neplodných párů v naší laboratoři a zároveň se zabývá retrospektivním vyhodnocením dat získaných od pacientů v průběhu roku 2007 na Ústavu klinické imunologie a alergologie FN HK.

V úvodu jsou podány základní statistické údaje dotýkající se problematiky neplodnosti. Teoretická část je zaměřena především na podání obecných informací týkajících se příčin neplodnosti jak u muže, tak u ženy. Dále zde jsou popsány jednotlivé imunologické parametry prováděné na ÚKIA FN HK, pomocí nichž je možné odhalit jednotlivé imunopatologie u neplodných párů.

Experimentální část poukazuje na to, v jaké míře se na neplodnosti podílí právě imunologický faktor. K tomuto účelu budou sloužit nashromážděná data naměřených výsledků od pacientů naší ambulance a laboratoře v průběhu roku 2007.

SOUHRN

Reprodukční imunologie dnes patří mezi lékařské disciplíny, které se podílejí na výzkumu, diagnostice a léčbě neplodných párů. Přičemž za neplodný lze považovat pár, u něhož do 12 měsíců při intenzivním snažení nedojde k otěhotnění. Imunitní systém, ať z pohledu buněčné či humorální imunity, se na reprodukčních neúspěších podílí až z dvaceti procent. Laboratorní imunologická vyšetření jako jsou protilátky proti spermiím, protilátky proti zoně pellucidě, protilátky proti membránovým fosfolipidům, buněčná imunita proti spermiím a trofoblastu, spolu se stanovením kvality ejakulátu včetně akrozomu spermií, tvoří mozaiku pomocí níž lze jednotlivé imunopatologie odhalit.

SUMMARY

Reproductive immunology today belongs to those medical disciplines which carry out diagnostic research and treatment of sterile couples. By "sterile" we mean a couple which hasn't conceived within twelve months of intensive effort. The immune system, be it from the point of view of cell or humoral immunity, accounts for up to twenty percent of reproduction failures. The immunologist laboratory examinations of such things as sperm antidotes, zone pellucide antidotes, membrane fosfolipid antidotes, sperm cell immunity, and trofoblast cell immunity, together with a determination of the quality of the ejaculate, including the sperm acrosome, form a mozaic by means of which the particular immunological pathologies can be discovered.

ZKRATKY

APA – antifosfolipidové protilátky

APS – antifosfolipidový syndrom

ASA – protilátky proti spermiím (antisperm antibodies)

B-In Sp – buněčná inhibice spermií

B-In Tr – buněčná inhibice trofoblastu

C3 – složka komplementu 3

C4 – složka komplementu 4

CD – Cluster of differentiation (diferenciační buněčné znaky)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FNHK – fakultní nemocnice Hradec Králové

FSH – folikostimulující hormon

HLA – human leukocyte antigens

IU – intra uterus

IAP – intraakrozomální protein

IVF – in vitro fertilizace

LH – luteotropní hormon

MAR – mixed antiglobulin reaction

POV – předčasné ovariální vyhasnutí

SPEG – Protilátky proti spermiím IgG ELISA

TAT – tray aglutinační test

ÚKIA – Ústav klinické imunologie a alergologie

WHO – World Health Organization

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1 Ohlédnutí do historie reprodukční imunologie	9
2.2 Příčiny neplodnosti u muže	9
2.2.1 Imunologická příčina neplodnosti.....	10
2.2.1.1 Antigeny:.....	10
2.2.1.2 Protilátky:.....	10
2.3 Příčiny neplodnosti u ženy	12
3. Parametry vyšetřované v reprodukční imunologii na ÚKIA HK.....	16
3.1 Protilátky proti spermiím ASA	17
3.1.1 Stanovení ASA v ejakulátu přímým MAR testem	17
3.1.2 Stanovení ASA v séru aglutinací (Tray Aglutinační Test – TAT).....	18
3.1.3 Stanovení ASA v séru testem ELISA	19
3.2 Protilátky proti zoně pellucidě	20
3.2.1 Stanovení antizonálních protilátek testem ELISA – průkaz autoprotilátek	21
3.2.2 Stanovení antizonálních protilátek hemaglutinačně.....	21
3.3 Protilátky proti membránovým fosfolipidům.....	22
3.3.1 Kardiolipin, autoprotilátky IgG, IgM.....	22
3.3.2 Beta-2 glykoprotein I, autoprotilátky IgG,IgM	23
3.4 Buněčná imunita proti spermiím	23
3.4.1 Test inhibice migrace pod agarózou.....	24
3.5 Buněčná imunita proti trofoblastu.....	24
3.5.1 Test inhibice migrace pod agarózou.....	25
3.6 Akrozom spermií.....	25
3.6.1 Stanovení kvality akrozomu spermií.....	26
3.7 SpermFlow Test	27
3.8 Jiné imunopatologie související s neplodností.....	28
4. Experimentální část	29
4.1 Retrospektivní vyhodnocení výsledků neplodných párů vyšetřovaných v naší laboratoři v rámci reprodukční imunologie.....	29
4.2 Shrnutí výsledků vyšetření	33
5. Diskuse	34
6. Závěr.....	35
7. Literatura	36

1. Úvod

Reprodukční imunologie se zabývá příčinami neplodnosti jak u mužů, tak u žen. V České republice je v současné době přibližně 20 - 25% párů nedobrovolně bezdětných. Toto číslo má mírnou tendenci stoupat.

Postižení ze strany ženy nalzááme v 50% případů, v 40% ze strany muže a v 10% případů je nalezeno postižení u obou partnerů. Podle výsledků Světové zdravotnické organizace se problémy s plodností nově objevují asi u 2 miliónů párů ročně.

Pokud pár nemůže dlouhodobě otěhotnět, mluvíme o neplodnosti (sterilitě). Při nechráněných pohlavních stycích, v průměru 4-5x týdně, by žena měla otěhotnět do půl roku. Maximum plodnosti u ženy je od 19 do 25 let. U muže se maximum plodnosti nestanovuje.

Nedojde-li při intenzivním snažení k otěhotnění do 12 měsíců, lze pár považovat za neplodný.

Imunitní systém se v malé či větší míře na reprodukčních neúspěších podílí až z dvaceti procent. Podíl imunologické příčiny snížené plodnosti nebo zcela neplodnosti však nemůžeme sledovat odděleně, ale vždy komplexně s ohledem na ostatní funkce neuroendokrinního aparátu (Ulčová-Gallová, 1999; v přehledném článku Nouza et al., 2007).

2. Teoretická část

2.1 Ohlédnutí do historie reprodukční imunologie

Mezi historické průkopníky reprodukční imunologie řadíme Mečnikova, Lendsteinerja a Metalnikova, kteří se experimentálně pokoušeli navodit tvorbu protilátek u laboratorních zvířat opakovanými vpichy zvířecího i lidského ejakulátu pod kůži. V roce 1926 dokonce Američan Rosenfeld navodil ženám, opakovanými podkožními injekcemi lidského ejakulátu, dva měsíce trvající sterilitu. V padesátých letech byly dr.Henlem odděleny protilátky proti spermiím ze séra krysa a králíků a ty pak použity na živých spermiích různých druhů savců, což vedlo k zastavení pohybu spermií. Až v sedmdesátých letech se postupně přecházelo od pokusů na laboratorních zvířatech do úrovně člověka. V dnešní době již reprodukční imunologie patří mezi suverénní lékařské disciplíny a podílí se nejen na výzkumu, ale i na diagnostice a léčbě neplodných pacientů. (Ulčová-Gallová, 1999).

2.2 Příčiny neplodnosti u muže

Mezi známé příčiny neplodnosti u muže patří patologický spermioqram, který může být ovlivněn hormonálně, geneticky nebo imunologicky. Vývoj lidských spermií řídí v podstatě tři hormony: folikostimulující (FSH), luteinizační (LH) a testosteron. Hladiny FSH a LH ovlivňují funkci varlat, a to tak, že FSH působí na Sertoliho buňky a napomáhá tak vytváření spermií. LH podporuje vznik testosteronu v Leidigových buňkách. Mezi další příčiny poruch vytváření spermií ve varlatech a nadvarlatech patří některé vrozené nebo získané vlivy (stres, zhoršující se životní prostředí, nikotin, alkohol, drogová závislost, četné druhy záření). Zdravý dospělý muž vytváří až sto milionů pohlavních buněk-

spermií, za dostatečnou dnes považujeme i nižší produkci, tj. do dvaceti milionů. U mužů se dále můžeme setkat s poruchami pohlavní aktivity, vlastní hormonální příčinou neplodnosti a v neposlední řadě imunologickou příčinou neplodnosti (v přehledném článku Nouza et al., 2007).

2.2.1 Imunologická příčina neplodnosti

Obranyschopnost organismu je zajištěna celou řadou buněk a buněčných mechanismů. Patří sem např. fagocytující buňky-makrofágy, které jsou schopné rozpoznat, zachytit, přeměnit, zase zpracovat a předat dalším buňkám cizorodé látky (antigeny), dále T a B lymfocyty. Funkce T-lymfocytů spočívá v buněčné obranyschopnosti, jsou namířeny především proti virům a bakteriím. B-lymfocyty, které se po stimulaci antigeny mění v plazmatické buňky, vytvářejí specifické protilátky. Svou nezastupitelnou roli vedle výše zmiňovaných buněk hrají orgány imunitní soustavy (brzlík, slezina, kostní dřeň a četné mízní uzliny) v nichž se odehrává většina klíčových procesů imunitní odpovědi.

2.2.1.1 Antigeny:

Jako antigeny jsou označovány všechny cizorodé látky, které nejsou organismu vlastní a jsou schopné vyvolat imunitní odpověď, jak buněčnou, tak protilátkovou. Jako antigeny se uplatňují bílkoviny, horšími antigeny bývají polysacharidy a nukleové kyseliny, zřídka se antigenně uplatňují lipidy. Důležitá je i otázka sebeznaků. Velmi stručné vysvětlení se opírá o krátké raménko lidského šestého chromozomu, kde jsou u každého z nás individuálně zakódované znaky HLA. Úloha sebeznaků na každé buňce jednoho lidského těla v praxi znamená neslučivost orgánů a tkání mezi různými lidmi a zvířaty.

2.2.1.2 Protilátky:

Za specifické protilátky považujeme tedy produkty B-lymfocytů. Antigenem aktivované B-lymfocyty se rychle a opakovaně množí a některé se přemění

v plazmatické buňky. Ty pak vytvářejí příslušné protilátky, které rozdělujeme do pěti imunoglobulinových tříd (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD).

Imunoglobuliny jsou bílkoviny různých tvarů a vazebných schopností. Jejich vlastností v protiinfekčním procesu je připravovat choroboplodné činitele k imunologickému odstranění. Velmi významná je i imunologická paměť organismu. Ta je umožněna přítomností paměťových B-lymfocytů (zdánlivě nečinné formy B-lymfocytů, vzniklé při styku s cizorodou látkou), které se při opětovném setkání s antigenem mění ve své výkonné formy. Průběh reakce je pak mnohem rychlejší a účinnější. V imunologii lidského rozmnožování má tato paměť svoji nezastupitelnou úlohu (Krejsek, 2004; Fučíková, 1994)

U muže je z imunologického hlediska zcela výsadním orgánem varle. Ve varlatech se vytvářejí jednak spermie (v Sertoliho buňkách), jednak mužský hormon testosteron (v Leidigových buňkách). Z kanálků varlat se pak spermie dostávají do nadvarlat, kde plnohodnotně dozrávají. Zralé spermie pak putují chámovodem do semenných váček. Při vystříknutí semene (ejakulaci) se vyprazdňují semenné váčky a spolu s příměsemi tekutiny z prostaty se spermie dostávají do močové trubice a z ní ven. Ve varleti díky svému uložení (mimo přímý krevní kontakt) a díky velmi omezené mízní drenáži za normálních podmínek nedochází k přímé imunologické reakci (Klika et al., 1974). Buňky tvořící protilátky se tedy se spermii nebo jinými látkami obsaženými v ejakulátu nesetkají. Avšak v podpurné tkáni varlete se nacházejí některé makrofágy a další buňky (lymfocyty a granulocyty) chránící varle před infekcí. Tyto buňky se mohou do ejakulátu dostat z krve nadvarlete (Ulčová – Gallová, 1999).

Zevní membrána spermií je složena z glykoproteinů, lipoproteinů a enzymů, které působí jako antigen tělu vlastní, tedy jako autoantigen. Tyto autoantigeny při porušení hematotestikulární bariéry navozují tvorbu autoprotištětek. Nejčastějším mechanismem je poranění, zánět, operační výkon, nádor, zablokování vývodných pohlavních cest při některých vrozených vadách, ale i

neznámá příčina. Protilátky, které pak mohou spermie poškozovat, shlukovat nebo omezovat jejich pohyb se nacházejí nejen v seminální plazmě, ale i v séru. Při vybičované buněčné autoimunitě zde nacházíme malé lymfocyty, makrofágy a jiné buňky, včetně buněčných působků, cytokinů. Tyto buňky, aktivované většinou náhlou infekcí nebo vleklým zánětem, mohou spermie přímo ničit nebo poškozovat svými cytokiny (Ulčová – Gallová, 1999; v přehledném článku Nouza et al., 2007).

2.3 Příčiny neplodnosti u ženy

Mezi příčiny neplodnosti u žen řadíme psychické problémy, problémy gynekologické a anatomické (nepravidelnosti pochvy), poruchy a záněty hrdla děložního, hypoplazii, hyperplazii nebo nepravidelnou polohu děložního těla, neprůchodnost vejcovodů, hormonální poruchu, mající za následek nedostatečnou činnost vaječnicků, ale také neznámou (idiopatickou) příčinu neplodnosti, kdy výsledky vyšetření obou partnerů jsou normální a konečně imunologické příčiny.

Jendou z příčin imunologické neplodnosti u žen je tvorba protilátek proti spermii. Spermie jsou pro ženu antigenně i geneticky cizí buňkou. Proto se při poruše přirozené snášenlivosti po setkání antigenu (spermie) s imunokompetentními buňkami tvoří protilátky. Významné postavení v tomto procesu má hrdlo děložní. Po fyziologickém koitu je v oblasti hrdla v zadní poševní klenbě asi 200 až 500 miliónů spermií. Lidská seminální plazma obsahuje řadu významných enzymů, které štěpí hlen v hrdle a usnadňují tak pronikání spermií do dalších oddílů reprodukčního traktu. Do vejcovodu se však dostane 1 spermie z 25 tisíc. U přecitlivělých žen, které mají velkou náchylnost k alergickým reakcím, u žen s opakovanými záněty, s endometriózou je reprodukční trakt schopen vytvářet protilátky již při prvním setkání se spermii. Častým faktorem pro vytvoření protilátek jsou i opakované odběry oocytů pro IVF. U takto imunizované ženy se později objevují protilátky nejen v oblasti

cervixu, ale i v oblasti dutiny děložní, v tubách, v peritoneální tekutině, ale i v séru. Někdy je proces imunizace ženy usnadněn tím, že chybí imunosupresivní faktor v seminální plazmě ejakulátu.

V detailním biochemickém studiu hlenu děložního byly prokázány bílkoviny, elektrolyty, aminokyseliny, mucin a některé významné imunologické látky jako komplement C3 a C4, který v přítomnosti komplement dependentních protilátek může zkrátit dobu přežívání spermie v hrdle. Účinkem těchto protilátek může být také narušena akrozomální část spermie a tím dochází k zablokování účinku enzymů hlavičkové části spermie, které rozpouštějí povrch vajíčka. Dále se v hrdle děložním nachází velký počet plazmatických buněk, které jsou schopné produkovat protilátky proti spermii. Cervikální T-lymfocyty jsou fixovány na slizničním povrchu děložního hrdla nebo migrují do vyšších oddílů reprodukčního traktu (Coulam et al., 2003). T-lymfocyty se účastní buňkami zprostředkované reakce proti spermii. Obdobnou úlohu mají vedle lymfocytů i makrofágy. Za fyziologických podmínek se některé spermie dostanou až k vajíčku, jiné jsou rychle fagocytovány makrofágy nebo polymorfonukleárními leukocyty už v hrdle. Plné rozvinutí imunologické reakce závisí na površích spermii, imunogenních látkách obsažených v seminální plazmě a hlavně vnímavosti imunitních mechanismů. V děložním hrdle mohou být identifikovány protilátky IgA, IgG a vzácně IgE. Vyskytnou-li se v hlenu tyto spermaglutinující protilátky, mluvíme o spermaglutinujícím hlenu, který aglutinuje spermie a tím znemožňuje pohyblivost. Dalšími protilátkami mohou být imobilizační protilátky. V přítomnosti těchto protilátek ztrácí spermie svou pohyblivost, aniž by se shlukovaly. Přítomnost cytotoxických protilátek narušuje enzymatické vybavení akrozomální části spermii. Tato část spermii je důležitá pro svou lytickou funkci zona pellucida oocytu.

Jednou z dalších příčin neplodnosti je vytváření látek proti zona pellucida. Zona pellucida je 10 mikrometrů silná glykoproteinová vrstva, která obklopuje oocyt. Zona pellucida hraje významnou roli při setkání spermie s vajíčkem při

fertilizaci. Jedním z důvodu neproniknutí spermie do vajíčka mohou být zvýšené hladiny antizonálních protilátek. Tyto protilátky bývají u žen tím vyšší, čím častější jsou odběry oocytů pro IVF. Antizonální protilátky bývají typu IgA, IgM, IgG a lze je nalézt v krvi, ve folikulární a peritoneální tekutině.

V případě opakovaného potrácení se po vyloučení neimunologických příčin, kterými jsou inkompetence hrdla, hypoplazie dělohy, hormonální, infekční a genetické příčiny se dá uvažovat o antifosfolipidovém syndromu (APS). Antifosfolipidový syndrom se projevuje vysokými titry antifosfolipidových protilátek (APA), recidivujícími habituálními potraty, trombocytopenií, trombózou. Mezi komplikace v těhotenství při APS patří: opakovaná růstová retardace plodu, endometrióza, hypertenze v graviditě, porucha placenty - předčasné odlupování, předčasné porody. Je prokázáno, že ženy s antifosfolipidovými protilátkami až v 90% případů samovolně potrácejí. Antifosfolipidové protilátky patří mezi autoprottilátky namířené proti negativně nabitým buněčným fosfolipidům, které jsou součástí každé membrány každé buňky těla. Existuje celá řada buněčných fosfolipidů - fosfatidylserin, kys.fosfatidová, fosfatidylinositol, fosfatidyletanolamin, kardiolipin. Antifosfolipidové protilátky poškozují trofoblast a vytvářejí toxické komplexy s trofoblastickými antigeny, které přímo poškozují zárodek. Fosfatidylserin je vytěsňován buňkami zárodku na povrch a tím působí jako obnažený epitop. Na tento fosfatidylserin se váže protilátka a tento komplex antigen-protilátka poškozuje embryo. APA poškozují přímo cévy placenty, tvoří tromby a tím je ucpávají. Díky tomu je část placenty nefunkční a tím je nedostatečně zásoben plod a vzniká hypotrofie plodu (Girardi et al., 2007).

APA navíc způsobují rozvrat hladin mezi vazodilatačním prostacyklinem a vasokonstrikčním tromboxanem, který navíc ještě shlukuje destičky. Výsledkem tohoto rozvratu je porucha srážení krve. Tento rozvrat je z části kompenzován matkou, která začne vytvářet PP4 - lidský placentární antikoagulační faktor, který blokuje srážení krve a váže na sebe fosfolipidy. APA bývají spojovány

nejen s komplikacemi v graviditě, ale i s infekčními onemocněními, s léky používanými v psychiatrii, s neurologickým onemocněním, s infarktem myokardu atd. Přítomnost těchto protilátek může ovlivnit fertilizaci tím, že se tyto protilátky naváží na fosfolipidy ovariální tkáně a tím zabrání vytvoření a uvolnění zralého oocyty. Dále se tyto protilátky mohou vázat přímo na spermie nebo oocyty. Některá samovolná potrácení, která mají imunologickou příčinu, jsou z nedostatku vlastních blokuujících protilátek (Ulčová – Gallová, 1999; v přehledném článku Nouza et al., 2007).

Léčebná terapie APS je kortikosteroidy za současného podávání protizánětlivých a antikoagulačních léků. V některých případech jsou podávány nitroděložní imunoglobuliny, což může vést ke zlepšení stavu a snížení imunologických komplikací (Ulčová – Gallová, 1999; v přehledném článku Nouza et al., 2007).

3. Parametry vyšetřované v reprodukční imunologii na ÚKIA HK

- Protilátky proti spermiím ASA (antisperm antibodies)
- Protilátky proti zoně pellucidě
- Protilátky proti membránovým fosfolipidům
- Buněčná imunita proti spermiím
- Buněčná imunita proti trofoblastu
- Akrozom spermií – stanovení kvality
- SpermFlow Test – stanovení kvality ejakulátu

▪ Preanalytická fáze

Ejakulát

Pacient musí být poučen o způsobu odběru a jeho eventuelním transportu. Odběr do sterilní nádoby bez aditiv. Před vyšetřením je nutná konstantní doba bez ejakulace (dle WHO manuálu 48 hodin až 7 dnů). Při jednotlivých vyšetřeních musí být tato doba stejná. Stabilizace parametrů spermioqram nastává 5. den abstinence a tato doba se jeví jako optimální. Nejlepší je okamžité zpracování ejakulátu, pokud pacient není schopen, je možný odběr v domácím prostředí, pacient musí být poučen a vybaven odběrovou nádobou. Transport nesmí trvat déle jak 60 minut, musí proběhnout ve tmě a teplotě blízké teplotě těla.

Sérum

Odběr do standartní zkumavky bez protisrážlivých prostředků nebo s použitím separačních gelů a akcelérátorů. Po odběru je nutno zkumavku nechat stát při pokojové teplotě cca 1 – 2 hodiny a potom uložit zkumavku na max. 1 den do lednice (4 – 8°C) nebo předat do laboratoře. Sérum se získá sedimentací nebo centrifugací (10 minut, 3000 rpm).

Seminální plasma

Nativní ejakulát získaný výše uvedeným postupem se centrifuguje rychlostí 3600 rpm po dobu 6 minut, poté se odsaje supernatant – horní vrstva seminální plasmy (Krejsek et al., 2007).

3.1 Protilátky proti spermiím ASA

Pokud se ASA vyskytují u mužů, hovoříme o autoprotiátkách (protilátky proti vlastní tkáni, autos = vlastní), vyskytují-li se u žen, hovoříme o isoprotiátkách (protilátky proti cizím tkáním, v tomto případě spermiím, které nejsou tělu ženy vlastní).

Jedná se o protilátky spermie shlukující – nazývané též spermaglutinační, které shlukují spermie nejčastěji hlavičkami, jejich krčky, nebo bičíky, ale i hlavičkami a bičíky současně. Dále o protilátky znemožňující pohyb spermií – tedy sperimobilizační a o protilátky poškozující spermie – spermycotoxické, namířené především na enzymatický aparát části hlavičky spermií, které říkáme akrozom.

- ASA a jejich laboratorní vyšetření:

3.1.1 Stanovení ASA v ejakulátu přímým MAR testem (mixed antiglobulin reaction)

Charakteristika: Test slouží k přímému průkazu autoprotiátek navázaných na spermie v pacientově ejakulátu.

Princip metody: aglutinace - latexový test.

Materiál: čerstvý ejakulát.

Hodnocení: Výsledky jsou udávány v procentech spermií s navázanými protilátkami. Protilátky se stanovují ve třídě IgG a IgA.

Hodnoty do 10%negativní
10%-39%suspektní
více jak 39%.....pozitivní

3.1.2 Stanovení ASA v séru aglutinací (Tray Aglutinační Test – TAT)

Charakteristika: Protilátky proti spermii se vyšetřují zejména u páru s neplodností z neznámé příčiny. Protilátky se mohou vázat na různé části spermie a způsobit jejich shluknutí, omezovat jejich pohyblivost a tak ztěžovat průchod genitálním traktem ženy, mohou zkracovat dobu přežití spermie a omezovat jejich vazbu na vajíčko. Přítomnost protilátek v séru neznamená automaticky jejich přítomnost v semenné plazmě. Vyšetření se provádí u žen i mužů. U mužů vznikají jako následek porušení hematotestikulární bariéry, nejčastěji pro blokádu vývodných cest, lokální zánět n. jako důsledek zkřížené reakce v důsledku imunizace bakteriálními antigeny. U žen může být příčinou vzniku přetížení ochranného systému zabraňujícího imunizaci antigeny spermii a přívod vysoké koncentrace spermii do horní části genitálního traktu, např. při IU inseminaci (intra uterus). U neplodných žen lze prokázat protilátky až u 25% případů (Ulčová – Gallová, 1999).

Princip metody: aglutinace spermii sérem.

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum obou partnerů a současně čerstvý ejakulát.

Hodnocení: Výsledky jsou udávány v kvalitativní podobě (pozitivní/negativní).

V případě pozitivity se uvádí procento aglutinovaných spermii z celkového počtu.

Hodnoty 0%negativní
1%-29%suspektní
30% a více....pozitivní



Obrázek 1: Aglutinace spermií (Foto ÚKIA)

3.1.3 Stanovení ASA v séru testem ELISA

Charakteristika: Protilátky proti spermiím se vyšetřují zejména u páru s neplodností z neznámé příčiny. Protilátky se mohou vázat na různé části spermie a způsobit jejich shluknutí, omezovat jejich pohyblivost a tak ztěžovat průchod genitálním traktem ženy, mohou zkracovat dobu přežití spermie a omezovat jejich vazbu na vajíčko. Přítomnost protilátek v séru neznamena automaticky jejich přítomnost v semenné plazmě. Vyšetření se provádí u žen i mužů. U mužů vznikají jako následek porušení hematotestikulární bariéry, nejčastěji pro blokádu vývodných cest, lokální zánět nebo jako důsledek zkřížené reakce v důsledku imunizace bakteriálními antigeny. U žen může být příčinou vzniku přetížení ochranného systému zabraňujícího imunizaci antigeny spermií a přívod vysoké koncentrace spermií do horní části genitálního traktu, např. při IU inseminaci (intra uterus). U neplodných žen lze prokázat protilátky až u 25% případů.

Výsledek aglutinační reakce nemusí korelovat s výsledky ELISA.

Princip metody: enzymová imunoanalýza (ELISA).

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum obou partnerů.

Hodnocení: Výsledky jsou udávány v U/ml.

0 – 60 U/ml.....negativní nález

61 – 100 U/ml.....hraniční nález

více jak 100 U/ml...pozitivní nález

3.2 Protilátky proti zoně pellucidě

Zona pellucida tvoří nejdůležitější povrchovou vrstvu lidského vajíčka, je 10 mikrometrů silná, průsvitná a světlolomná. Je tvořena glykoproteinem (71% tvoří bílkoviny - proteiny a 29% tvoří cukry – glycidy), který při styku se spermii sehraává důležitý krok v začátku oplodnění (Gupta at al.,2007). Zona pellucida tak zabraňuje oplodnění několika spermii najednou. Tu spermii, kterou si vybere, k sobě přilne pomocí specifické vazby přes hlavní glykoproteinovou komponentu a pomůže jí k akrozomální reakci. Další funkce zony pellucidy spočívá v ochraně časně oplozeného vajíčka při cestě do dutiny děložní. V ženském organismu se proti zoně pellucidě mohou relativně často vytvářet protilátky, které nazýváme antizonální. Antizonální protilátky narušují funkce zony pellucidy a jsou schopné účinně zabránit oplození a jelikož jsou namířeny proti vlastní tkáni pacientčina organismu, jedná se o autoprottilátky. Lze je nalézt v krevní plazmě, v tekutině obklopující vajíčko (folikulární tekutina) a vnitřní břišní orgány (peritoneální tekutina). Hladiny prottilátek proti zona pellucida bývají u některých žen tím vyšší, čím častěji u těchto pacientek dochází k odběrům oocytů ze stimulované ovariální tkáně v průběhu IVF.

- Zona pellucida a její laboratorní vyšetření:

3.2.1 Stanovení antizonálních protilátek testem ELISA – průkaz autoprotilátek

Charakteristika: Funkcí zona pellucida je specifická vazba funkčně kompetentních spermií a zábrana vstupu nadpočetných spermií do oocyту po průniku první spermie. Protilátky proti zona pellucida se mohou vázat na specifické receptory pro spermie, maskovat je, deformovat a bránit tak fertilizaci. Fertilizaci zabrání rovněž precipitace povrchové vrstvy zona pellucida.

Princip metody: enzymová imunolýza (ELISA).

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum.

Hodnocení: Výsledky jsou udávány v U/ml.

0 – 10 U/ml.....negativní nález

11 – 20 U/ml.....hraniční nález

více jak 20 U/ml.....pozitivní nález

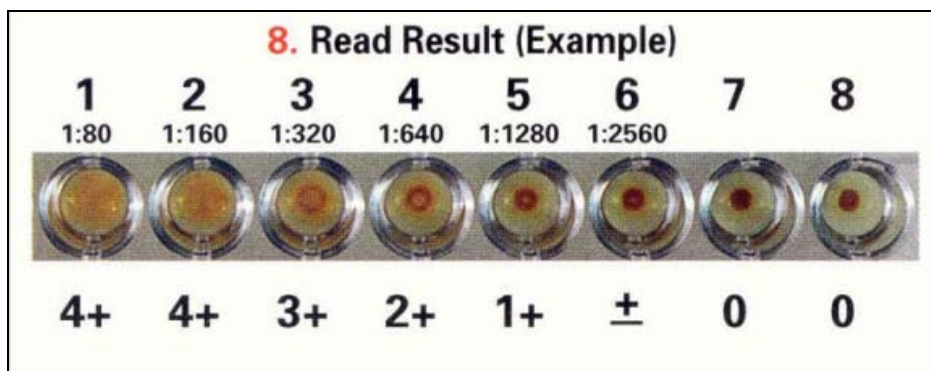
3.2.2 Stanovení antizonálních protilátek hemaglutinačně

Charakteristika: Při stanovení protilátek proti zoně pellucidě se s úspěchem využívá ta skutečnost, že lidské antizonální protilátky zkříženě reagují se zonou pellucidou prasnic. Protilátky jsou většinou charakteru G, M a A.

Výsledek hemaglutinace nemusí korelovat s výsledky ELISA testu.

Princip metody: Hemaglutinace.

Hodnocení: pozitivní/negativní, po dohodě lze uvést titr.



Obrázek 2: Pozitivní hemaglutinační stanovení antizonálních protilátek (Foto ÚKIA)

3.3 Protilátky proti membránovým fosfolipidům

Přítomnost vysokých hladin antifosfolipidových protilátek může ovlivnit normální fertilizaci tím, že se tyto protilátky naváží na fosfolipidy ovariální tkáně tak, že zabraňují vytvoření a uvolnění funkčního oocytu. Vlastní fertilizační proces může být ovlivněn i přímými vazbami antifosfolipidových protilátek na povrchové komponenty oocytu a spermie. Předpokládá se jejich negativní interference v procesech jako je nidace a placentace. Až 90% pacientek s vysokou hladinou antifosfolipidových protilátek především ze třídy IgG potrácejí již v prvním trimestru.

- Laboratorní vyšetření fosfolipidů:

3.3.1 Kardiolipin, autoprotiátky IgG, IgM

Charakteristika: Testem stanovujeme protilátky proti kardiolipinu beta2-glykoprotein I dependentní, které rozpoznávají negativně nabitě fosfodiesterové skupiny fosfolipidů, jež jsou součástí každé membrány (obalové vrstvy) každé buňky našeho těla.

Princip metody: ELISA.

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum.

Hodnocení: Výsledky uvádíme ve specifických jednotkách GPL – U/ml pro třídu IgG a MPL – U/ml pro třídu IgM.

Rozmezí normálních hodnot je 0 – 10,00 GPL – U/ml

a 0 – 7,00 MPL – U/ml

3.3.2 Beta–2 glykoprotein I, autoprotilátky IgG,IgM

Beta-2 glykoprotein I je fyziologický inhibitor koagulace. Ve vazbě s fosfolipidy hraje roli proteinového kofaktoru nutného pro indukci tvorby antifosfolipidových protilátek. Protilátky proti beta-2 glykoproteinu I se často vyskytují současně s protilátkami proti kardiolipinu, tvoří se však i proti samotnému beta-2 glykoproteinu I a mohou se tak vyskytnout i u pacientů s absencí antifosfolipidových protilátek. Protilátky proti beta-2 glykoproteinu I někdy označujeme jako protilátky proti proteinu vázajícímu fosfolipidy.

Princip metody: ELISA.

Materiál: venózní srážlivá krev nebo sérum.

Hodnocení: Výsledky uvádíme v U/ml.

Rozmezí normálních hodnot pro IgG i IgM jsou 0 – 8 U/ml.

3.4 Buněčná imunita proti spermím

U některých mužů z neplodného páru prokazujeme v ejakulátu velké množství bílých krvinek (malé lymfocyty, makrofágy a jiné buňky). Tyto buňky, aktivované většinou náhlou infekcí nebo vleklým zánětem, mohou přímo ničit spermie nebo je poškozovat mezibuněčnými produkty, cytokiny. Zvýšené hladiny některého z buněčných působků, cytokinů v krvi nebo ejakulátu prozradí vybičovanou buněčnou imunitu proti spermím.

- Laboratorní vyšetření buněčné imunity proti spermiím:

3.4.1 Test inhibice migrace pod agarózou

Charakteristika: Tento test patří mezi speciální testy diagnostiky neplodnosti a provádí se s živými leukocyty separovanými z periferní krve pacienta. Slouží ke zjištění přítomnosti lymfocytů specificky namířených proti antigenům spermií. Tyto lymfocyty se po setkání s antigenem podílejí na rozvoji nežádoucí imunitní reakce, která je možnou příčinou neplodnosti. Reakce na antigeny spermií vyšetřujeme u žen i u mužů. Stanovení je založeno na kultivaci separovaných leukocytů s testovanými antigeny v jamkách vyhloubených v agaróze. Leukocyty adherují k podložce a spontánně migrují do okolí. Pokud jsou ve směsi buněk specificky reagující lymfocyty, tak se aktivují a produkují cytokiny ovlivňující ostatní buňky. Výsledkem je zpomalení migrace leukocytů a zmenšení migračních zón oproti kontrole bez antigenu.

Princip metody: kultivace pod agarózou.

Materiál: heparizovaná krev, čerstvý ejakulát.

Hodnocení: V testu stanovujeme poměr plochy migrační zóny leukocytů kultivovaných v přítomnosti antigenů spermií a migrační zóny leukocytů kultivovaných bez těchto antigenů. Výsledek vyjadřujeme v procentech.

Normální hodnoty jsou 65 – 120%.

3.5 Buněčná imunita proti trofoblastu

Trofoblast, ze kterého se vyvíjí placenta a plodové obaly plní kromě jiného bariérovou funkci mezi plodem a matkou. Chemicky se jedná o sialomucinovou vrstvu, bránící přestupu větších molekul z plodu do krevního oběhu matky a naopak. Alterace trofoblastu ze strany matky může vést k selhání počátečních fází procesu nidace a placentace (Madar, 2004).

- Laboratorní vyšetření buněčné imunity proti trofoblastu:

3.5.1 Test inhibice migrace pod agarózou

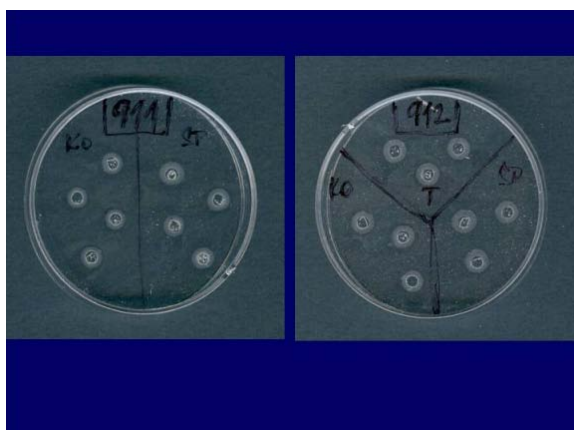
Charakteristika: Stejně jako v případě buněčné imunity namířené proti spermii se zde využívá inhibičního migračního testu in vitro za účasti buněčné kultury odvozené od lidského trofoblastu.

Princip metody: kultivace pod agarózou.

Materiál: heparizovaná krev, čerstvý ejakulát.

Hodnocení: V testu stanovujeme poměr plochy migrační zóny leukocytů kultivovaných v přítomnosti antigenů trofoblastu a migrační zóny leukocytů kultivovaných bez těchto antigenů. Výsledek vyjadřujeme v procentech.

Normální hodnoty jsou 75 – 120%.



Obrázek 3: Test inhibice migrace pod agarózou (Foto ÚKIA)

3.6 Akrozom spermíí

Stanovení kvality akrozomu bývá běžnou součástí imunologického vyšetření.

Akrozom „čepička“ spermie (pokrývající 2/3 hlavičky spermie) obsahuje řadu působků, které mají schopnost rozpouštět vaječné membrány. Počáteční přilnutí povrchu hlavičky spermie je doprovázeno vazbami enzymatických (např. galaktosyltransferáza) a neenzymatických molekul (např. lektin) (Pěknicová et

al., 2005). Navázání spermií k povrchu vajíčka patří mezi velmi složitý děj, zahrnující přilnutí dvou zcela geneticky odlišných buněk.

- Akrozom a jeho laboratorní vyšetření:

3.6.1 Stanovení kvality akrozomu spermií

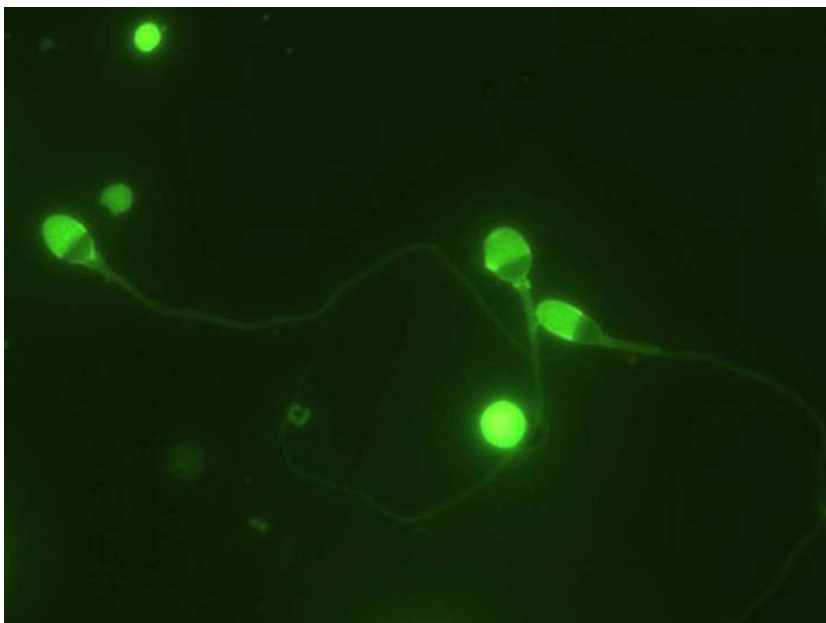
Charakteristika: Vyšetření slouží ke stanovení procenta spermií s normálním výskytem akrozomu v hlavičce spermií. Pouze po uvolnění dostatečného množství akrosinu dojde k úspěšné penetraci spermií do oocyty. Při výskytu převažujících spermií s nekvalitním akrozomem klesá přirozená fertilizační schopnost. Stanovení se zakládá na přímé imunofluorescenci, zobrazující akrosin spermií. Metoda využívá lektin hrachu konjugovaný s fluoresceinem, který se vyznačuje afinitou k vnitřní membráně akrozomu, nebo monoklonálních protilátek, které se vážou na intraakrozomální proteiny.

Princip metody: přímá imunofluorescence.

Materiál: čerstvý ejakulát.

Hodnocení: Výsledky udáváme v procentech spermií s normálním výskytem akrosinu v hlavičce z celkového počtu.

Normální hodnoty jsou v rozmezí 50 – 100%.



Obrázek 4: Světélkující akrozom spermií (Foto ÚKIA)

3.7 SpermFlow Test

Tento test umožňuje vyšetřit v ejakulátu metodou průtokové cytometrie následující parametry:

- počet spermií
- počet leukocytů
- vitalita spermií
- integrita akrozomu spermií
- přítomnost intra-akrozomálního proteinu ve spermiích

Charakteristika: Při využití průtokové cytometrie dochází k měření velkého počtu spermií a také k detekci buněk na základě specifického značení pomocí monoklonálních protilátek.

Princip:

Počet spermií a počet leukocytů – Měření je založeno na přidání vnitřního standardu (fluorescenčních kuliček o známém počtu) ke vzorku ejakulátu.

Detekce leukocytů ve vzorku je prováděna pomocí protilátky anti-CD45/PE-DY647.

Vitalita spermií – Měříme pomocí proprium jodidu, který proniká narušenou membránou mrtvých buňek a váže se na DNA.

Integrita akrozomu – Detekujeme intraakrozomální protein (IAP), který je přítomen v akrozomu. Pokud akrozom spermie není narušen, není tento protein možno detekovat. U spermií s narušenou membránou je tento protein dostupný pro protilátku proti IAP a je detekován.

Přítomnost intra-akrozomálního proteinu – Po narušení nebo permeabilizaci membrány spermií se IAP stává stává dostupný pro protilátku proti IAP a je detekován. V případě že spermie IAP neobsahují, není po permeabilizaci spermií protilátkou proti IAP detekován.

Pozn. Toto vyšetření je v naší laboratoři prováděno od počátku roku 2008, tudíž není zahrnuto v experimentální části této práce (Krejsek et al., 2007).

3.8 Jiné imunopatologie související s neplodností

Závěrem výčtu v naší laboratoři testovaných imunopatologií je nutné uvést fakt, že existuje celá řada dalších imunopatologických pochodů a markerů, které mohou souviset s neplodností (např. onemocnění štítné žlázy, POV, céliakie, syst. imunopatologická onemocnění...)

4. Experimentální část

4.1 Retrospektivní vyhodnocení výsledků neplodných párů vyšetřovaných v naší laboratoři v rámci reprodukční imunologie

Vyšetření na Ústavu klinické imunologie FNHK absolvovalo v roce 2007 celkem 165 partnerských dvojic (t.j. 330 pacientů) s poruchami plodnosti (zejména sterilitou, opakovanými potraty a opakovaným selháním IVF). Z nich alespoň u jednoho z páru byla u 53,80% nalezena imunologická příčina neplodnosti (nejčastěji zvýšená specifická buněčná imunita v genitálu ženy, dále přítomnost protilátek na spermiích partnera, zvýšené množství antikardiolipinových protilátek v krvi ženy a další).

- Laboratorní imunologická vyšetření, kterým se pacienti v naší laboratoři podrobili:

- *Humorální imunita:*

1. stanovení protilátek proti spermiím u muže v krvi a seminální plasmě
2. stanovení protilátek proti spermiím v séru ženy
3. stanovení protilátek proti zona pellucida v séru ženy
4. stanovení antifosfolipidových protilátek u infertilních pacientek v séru

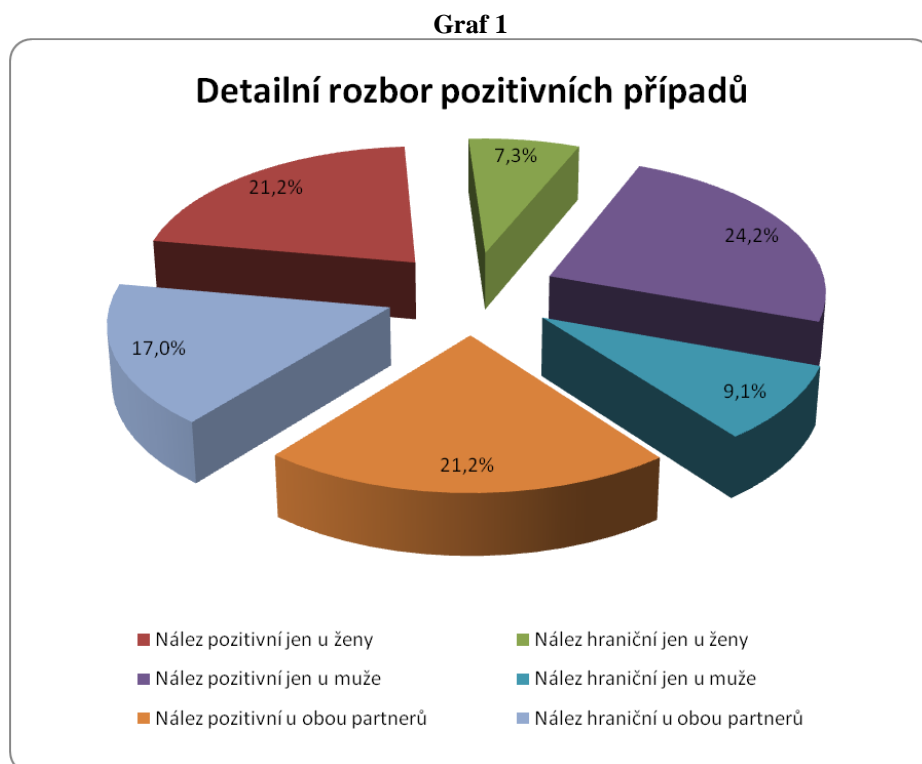
- *Buněčná imunita:*

1. stanovení buněčné imunity proti spermiím u muže
2. stanovení buněčné imunity proti spermiím u ženy
3. stanovení buněčné imunity proti trofoblastu u ženy

➤ Jiné:

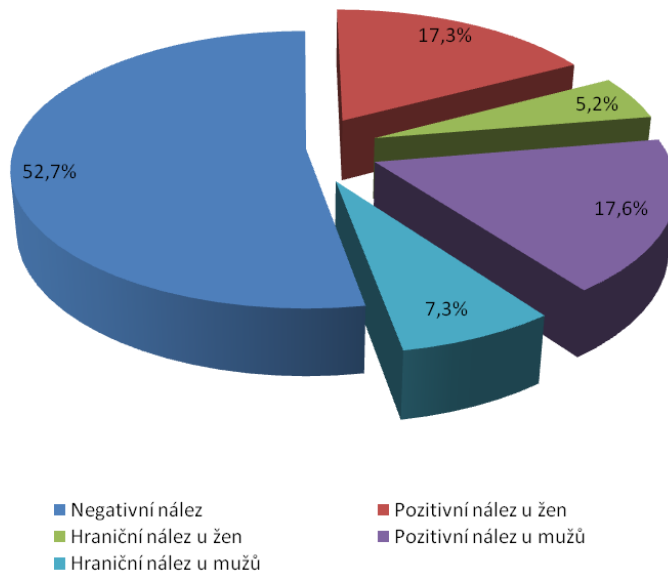
1. stanovení kvality akrozomu spermií
2. případně zachycení jiných imunopatogenit

Výsledky imunologického vyšetření neplodných párů jsou zaznamenány níže v uvedených grafech:



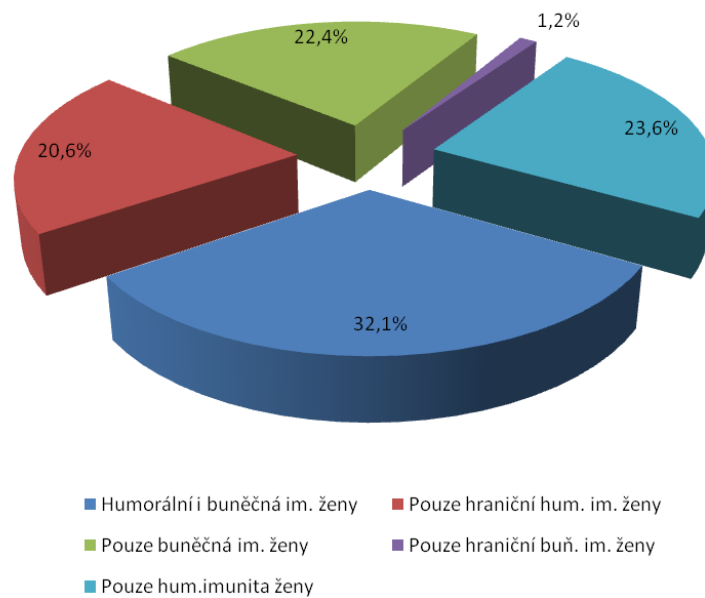
Graf 2

Výsledky imunologických vyšetření jednotlivci



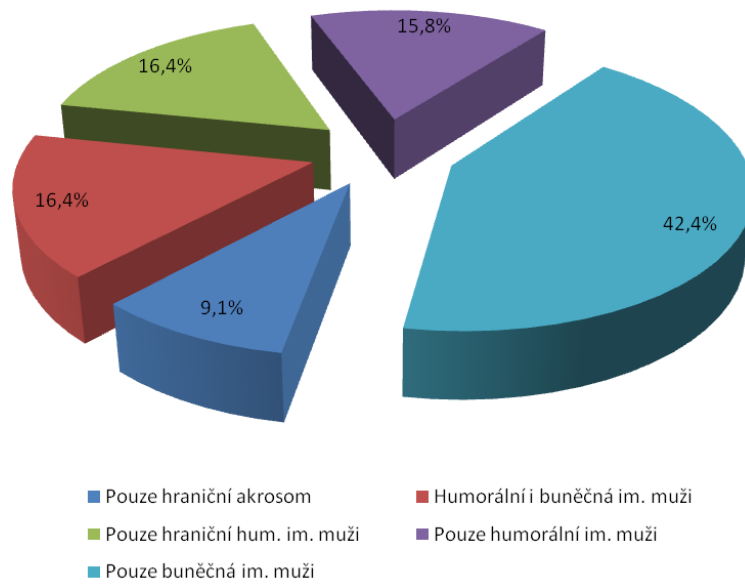
Graf 3

Zastoupení jednotlivých imunopatologií ženy



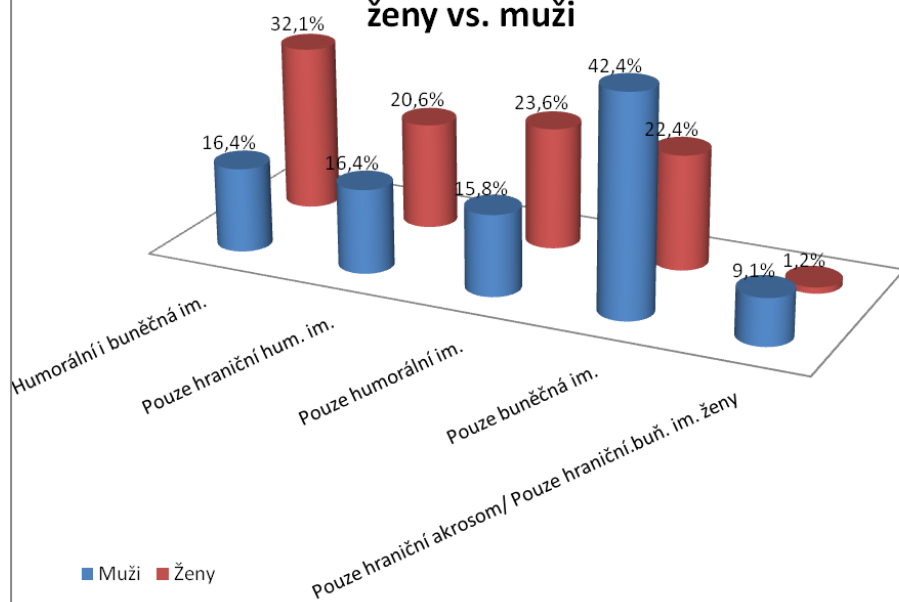
Graf 4

Zastoupení jednotlivých imunopatologií mužů



Graf 5

Zastoupení jednotlivých imunopatologií ženy vs. muži



4.2 Shrnutí výsledků vyšetření

Imunologický pozitivní nález byl zachycen u 53,8% párů.

U imunopatologicky pozitivních párů se příčina nacházela

v 21,2% pouze na straně ženy,

v 24,2% pouze na straně muže,

v 21,2% u obou současně,

zbytek připadá na hraniční případy.

Z provedených imunologických testů byl u žen nejčastěji pozitivní nález v B-InTr (15,9%) a B-InSp (11,8%), antizonální protilátky (9,2%) a SPEG (8,2%). U mužů převládal B-InSp (28,2%), hraniční akrozom (12,8%) a hraniční SPEG (10,3%).

5. Diskuse

Výsledky zaznamenané v naší laboratoři poukazují na stoupající prevalenci imunopatologií u neplodných párů. Obzvláště je pak tento nárůst zaznamenán u mužů. Ze získaných dat lze usuzovat i na význam hraničních imunopatologických nálezů. V rámci páru oproti jednotlivcům sledujeme vyšší celkovou prevalenci imunopatologií. Ukazuje se, že imunitní systém v procesu reprodukce sehrává řadu významných kroků, ať už z pohledu buněčné (fagocytující a antigen předkládající buňky např. makrofágy), nebo protilátkové imunity. Lze usuzovat, že výskyt patologií v oblasti reprodukční imunologie by v naší populaci mohl být mnohem vyšší, než jak se předpokládá.

6. Závěr

Je smutné, že některé páry nejprve podstoupí několik bezúspěšných IVF zákroků a teprve poté jsou odeslány k imunologickému vyšetření, kde je nalezena patologie. Odstranění této patologie by přitom pomohlo mnohonásobně zvýšit pravděpodobnost početí, včetně částečné eliminace fyzického a psychického zatížení těchto párů. Tato práce potvrzuje, že imunologické vyšetření má své pevné a opodstatněné místo v celé řadě vyšetření neplodných párů a mělo by minimálně předcházet všem invazivním terapeutickým metodám léčby u neplodných párů, zvláště pak u žen.

7. Literatura

- COULMAN, C. B., ROUSEV, R. G. Increasing circulating T-cell activation markers are linked to subsequent implantation failure after transfer of in vitro fertilized embryos. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003,50, 340-45.
- GIRARDI, G., KOCKSHIN, M. D., SALMON, J. E. The antiphospholipid syndrome as a disorder initiated by inflammation: implications for the therapy of pregnant patients. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007; 3,140 – 147.
- GUPTA, S. K., CHAKRAVARTY, S., SURAJ, K., BANSAL, P., GANGULY, A., JAIN, M. K., BHANDARI, B. Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;63:203-16.
- FUČÍKOVÁ, T., *Základy klinické imunologie*, RDI PRESS, 1994, ISBN 80-90067-4-3.
- KLIKA, E., VACEK, Z. *Histologie*, AVICENUM, 1974
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*, NUCLEUS HK, 2004, ISBN 80-86225-50-X.
- KREJSEK, J., DRAHOŠOVÁ, M., ANDRÝS, C., HAVLASOVÁ, J., SÝKORA, T. *Laboratorní příručka klinické imunologie a alergologie*, 2007, ISBN 978-80-254-0951-0.
- NOUZA, K., MADAR, J., NOUZA, M., KUČERA, E. *Imunologie a imunopatologie reprodukčního procesu*, *Alergie* 3/2007.
- NOUZA, K., MADAR, J., NOVÁKOVÁ, D. *Systémová enzymoterapie, Imunologie a imunopatologie mužského a ženského pohlavního systému* 24. 5. 2000, strana 20, *medicína* 5, VII.
- MADAR, J. *Patologická imunita proti trofoblastu a endometriu jako možná příčina poruch plodnosti u žen / nositel grantu Ústav pro péči o matku a dítě. -- Praha : IGA MZ ČR, 2004.*

NEIL, J. D. „Knobil and Neill's Physiology of Reproduction“, Academic Press; 3 edition (12 Dec 2005), ISBN-10: 0125154003.

PĚKNICOVÁ, J. , CHLÁDEK, D., HOZÁK, P. Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as marker for male infertility diagnostics as estimation of spermatogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 53, [-] 1-8 (2005). Grant: GA MZd(CZ) NJ7463.

TEPLÁ, O., PĚKNICOVÁ, J., KOČÍ, K., MIKA, J., MRÁZEK, M., ELZEINOVÁ, F. Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertil Steril* 86:113-120,2006.

ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Diagnóza-neplodnost,Útok protilátek. Petrklíč, Praha,1999, ISBN 80-7229-020-7