

LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PLZNI A  
GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA LF UK A FN V PLZNI



# **Sledování imunogenních vlastností lidské spermie**

Jan Cibulka

Autoreferát doktorské dizertační práce

Plzeň 2013



## Grantová podpora

Tato práce vznikla s podporou grantu MSM 002 162 0812

## Poděkování

Mé upřímné poděkování patří paní profesorce MUDr. Zdeňce Ulčové-Gallové, DrSc., jejímu odbornému vedení a trpělivosti takřka mateřské. Děkuji týmu laboratoře reprodukční imunologie, Katarině Bibkové a Zdeňce Mičanové – bez vás je laboratoř mrtvým pojmem. Za podněty ryze biochemické děkuji i Dr. Zídkové. Mé díky posílám na Polskou akademii věd do Poznaně profesorovi Macieji Kurpiszovi a především paní Dr. Marzeně Kamieniczné a Dr. Karolině Nowické za pomoc při zavádění techniky biotinylace a 2D elektroforézy/Western blottingu.

## Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci zpracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním dizertační práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon ve znění pozdějších předpisů.

V Plzni dne

.....  
Jan Cibulka

## Obsah

1	Úvod.....	6
2	Obecná část.....	7
2.1	Úvod do neplodnosti – definice pojmů.....	7
2.1.1	Příčiny neplodnosti – muž.....	8
2.1.2	Příčiny neplodnosti – žena.....	8
2.2	Imunologicky podmíněná neplodnost.....	8
2.2.1	Protilátky proti zona pellucida.....	9
2.2.2	Antifosfolipidové protilátky.....	9
2.2.3	Antithyroidální protilátky.....	9
2.2.4	Protilátky proti spermím.....	9
2.3	Protilátky proti spermím – ASA.....	9
2.3.1	Vztah ASA k neplodnosti.....	9
2.3.2	ASA – prevalence.....	10
2.4	Patogeneze neplodnosti zprostředkované ASA.....	10
2.5	Diagnostika ASA.....	10
2.5.1	Immunobead assay – IBD (přímý a nepřímý).....	11
2.5.2	Smíšený antiimmunoglobulinový test – MAR test (přímý a nepřímý).....	11
2.5.3	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	11
2.5.4	Fribergův spermaglutinační test.....	11
2.5.5	Penetrační testy.....	11
2.5.6	Průtoková cytometrie.....	12
2.5.7	Interpretace testů.....	12
2.6	Léčba ASA pozitivních pacientů.....	12
2.7	ASA a asistovaná reprodukce.....	12
2.8	Lidská spermie – vznik antigenní entity.....	13
2.8.1	Spermatogeneze.....	13
2.8.2	Spermiogeneze a epididymální maturace.....	13
2.8.3	Ejakulace.....	13
2.8.4	Kapacitace.....	13
2.8.5	Akrozomální reakce.....	13
2.9	Imunologie reprodukce ve službách antikoncepce.....	14
2.9.1	Antikoncepční vakcína.....	14
2.9.2	Vakcína proti spermím – dosažitelná realita?.....	14
2.10	Spermatozoidální antigeny – základy proteomiky.....	14
2.10.1	Phage display.....	14
2.10.2	Knock out.....	15
2.10.3	Extrakční postupy.....	15
3	Experimentální část.....	16
3.1	Příprava antigenů z lidských spermii pro immunoblotting.....	16
3.2	Izolace a imunologická identifikace spermaglutinujících protilátek z lidského séra. .....	17
3.3	Příprava panelu směsných antigenů lidské spermie pro immunoblotting – imunofluorescenční studie.....	18
3.4	Rozlišení povrchových antigeňů lidské spermie metodou biotinového značení. ...	19

3.5	Mapování povrchových antigenů lidské spermie protilátkami spermaglutinačních sér .....	20
4	Závěr.....	21
5	Souhrn.....	22
6	Summary.....	22
7	Seznam použité literatury .....	23
8	Přílohy .....	27
8.1	Publikační činnost autora.....	27

## Seznam použitých zkratk

2D	dvourozměrná elektroforéza
ADAM	A Disintegrine and Metaloproteáze
ALP	alkalická fosfatasa
APA	antiphospholipid antibodies, antifosfolipidové protilátky
APS	ammonium persulphate
APS	antifosfolipidový syndrom
ASA	protilátky proti spermii
aCL	anti-kardiolipin
a $\beta$ 2GPI	anti- $\beta$ 2 glykoprotein I
LA	lupus antikoagulans
aPL	anti-fosfolipidové protilátky
aANX V	anti-annexin V
aPS	anti-fosfatidylserin,
aPC	anti-fosfatidylcholin
aPI	anti-fosfatidylinositol
aPT	anti-protrombin
APS	persíran amonný (ammonium persulphate)
ASA	antisperm antibodies, protilátky proti spermii
aTG	anti-thyreoglobulin
aTPO	anti-thyreoperoxidáza
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	bovinní sérový albumin
CASA	Computer-aided semen analysis, počítačová analýza spermioqramu
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	klonovaná (copy, cloned) deoxyribonukleová kyselina
CV	kontracepční vakcína
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FR	Fertility Rate, úspěch při oplodnění
FSH	folikulostimulační hormon
GnRH	gonadotropiny uvolňující hormon
hCG	lidský choriový gonadotropin
H-H	head-to-head, aglutinace spermii hlavičkami
HLA	Human Leukocyte Antigen
Hsp60	Heat shock protein
IBD	immunobead assay
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie
IEF	isoelektrická fokusace

Ig	imunoglobulin (třídy A, E, G, M)
IUI	intrauterinní inseminace
IVF	in vitro fertilizace
kDa	kilo-Daltony
LDH	laktátdehydrogenáza
LH	luteinizační hormon
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation
MARtest	smíšený antiimunoglobulinový test (přímý)
NC	nitrocelulóza
PBS	fosfátový pufr
PGE2	prostaglandin E2
pI	isoelektrický bod
PID	Pelvic Inflammatory Disease
PLBN	vzorkovací pufr neredukující
PR	Pregnancy Rate, úspěšnosti těhotenství
PRI	Poradna reprodukční imunologie
RID	radiální imunodifúze
Rpm	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulphate)
SDS-PAGE	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
STD	sexuálně přenosné nemoci
TAT	spermaglutinační test
TBS-T	TBS pufr (Tris buffered saline) a Tween
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> – tetramethylendiamid
TTP	(Time to Pregnancy) doba potřebná k otěhotnění
TOF	Time-Of-Flight
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
T-T tail-to-tail,	aglutinace spermií bičíky
T-tip-T-tip	aglutinace spermií konci bičíků
UV	ultrafialové záření
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická
WHO	Světová zdravotnická organizace

## 1 Úvod

Muž a žena se v příčinách sterility dělí přibližně rovným dílem, jakkoliv výslednice je společná. Věkové optimum pro početí není sice u muže nijak dáno, zdá se však, že neustále se zhoršující parametry spermioqramu jsou citlivým ukazatelem proměny zhoršujícího se životního prostředí.

U ženy je sterilita důsledkem anatomických nebo hormonálních poruch, infertilita pak nejčastěji pochází z příčin genetických. Problematika neúspěchů asistované reprodukce však stále častěji ukazuje na imunitní pozadí rejekce embrya.

Cílem této práce je vytvořit jeden z možných pohledů na problematiku lidské neplodnosti v důsledku působení protilátek, především pak protilátek proti spermii. Nejedná se sice o krucální příčinu tohoto civilizačního stavu, ale věřím, že pochopení fungování imunitních vztahů lidské spermie a jejího okolí má pro nás velkou výpovědní hodnotu o principech platných v průběhu celého procesu gametogeneze, oplodnění i těhotenství. Pochopení těchto základních vztahů nám může pomoci v diagnostice a léčbě imunitně podmíněné neplodnosti. Za prezentovanými skutečnostmi a názory stojí mnoho let laboratorní práce bezpočtu výzkumných týmů, prezentované laboratorní výsledky jsou pak výsledkem několikaleté spolupráce laboratoře reprodukční imunologie Gynekologicko-porodnické kliniky Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Plzni, laboratoří Ústavu biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze a Institutu genetiky člověka polské Akademie věd v Poznani. Úkolem bylo provést charakterizaci antigenů lidských spermií a seminální plasmy užitím sérových protilátek neplodných pacientek s pozitivními spermaglutinačními testy. Jako negativní kontroly byla vzata séra dívek ve věku 8 – 11 let. Pro metody charakterizace byly voleny SDS-elektroforesa, dvourozměrná elektroforesa a isoelektrická fokusace. Z pomocných metod použitých při designu lyzovacího postupu a výběru vhodných sér uvádím spermaglutinační techniky, imunofluorescenční mikroskopii, kapalinovou chromatografii a biotinylationi.

## 2 Obecná část

Imunologické pozadí poruch plodnosti se uvažuje až u 50% párů, přičemž jen protilátková aktivita proti spermii představuje 2 – 30% případů [1, 2]. Jedná se o velmi heterogenní soubor čítající jak případy sterility, kde se těžiště problému nachází spíše na straně protilátek primárně namířených proti gametám, tak případy infertility, kde dominantní iniciativu přejímá spíše imunita buněčná.

Reprodukční imunologie má své nezastupitelné místo i v době metod asistované reprodukce, byť se její diagnosticko-terapeutické portfolio stále více přesouvá do oblasti imunologie trofoblastu [3]. Zdálo by se, že výzkum antispermatozoidálních protilátek má v moderním kontextu (zejména metod asistované reprodukce) jen podružný význam, avšak už jen z didaktického hlediska se jedná těžko nahraditelný zdroj poznání a inspirace pro každého reprodukčního imunologa. Věříme, že tato práce bude reprezentativním průřezem problematiky imunologie lidské spermie a částečně i úvodem do reprodukční imunologie jako takové.

### 2.1 Úvod do neplodnosti – definice pojmů

Prevalence neplodnosti se odhaduje mezi 12 – 14% celosvětově, v „civilizovaných“ zemích západního typu (jakkoliv je tato definice vágní) se uvažuje o 20 – 25%.

Hodnocení neplodnosti obvykle rozlišuje příčiny na straně muže, tedy čistě mužský faktor neplodnosti a faktor ženský. Zjednodušeně lze říci, že se v posledních letech muž i

žena na neplodnosti podílí stejnou měrou [4], strukturovanější pohled na danou problematiku ukazuje na čistě mužský faktor ve 30%, ženský faktor v 35%, kombinovaný faktor na průniku obou předchozích ve 20% a nakonec nevysvětlitelný, idiopatický faktor neplodnosti v 15 % [5-7]. Jednotlivé faktory se u postiženého páru mohou kombinovat a naše snaha o exaktní vyjádření příčin pak obvykle selhává.

Problematika neplodnosti, a zejména té tak zvané „jinak nevysvětlitelné“, je předmětem diagnostického a terapeutického přístupu nejen gynekologů, endokrinologů a andrologů, ale i dalších asociovaných oborů, jako právě imunologů, zejména reprodukčních, dále pak genetiků, psychologů, sexuologů a dalších [1].

### 2.1.1 Příčiny neplodnosti – muž

Mužskou příčinu neplodnosti páru zvažujeme tehdy, pokud lze jednoznačně vyloučit neplodnost ženskou při spermioqramu neodpovídajícímu WHO kritériím [8]. Snížená plodnost u muže bývá důsledkem vrozených, nebo získaných abnormalit urogenitálního traktu. Ve 40 – 60% nacházíme příčinu v patologiích spermioqramu, přičemž vyšetření anatomických či hormonálních poměrů, ani anamnéza neskýtají žádné vysvětlení. Hovoříme o idiopatické mužské neplodnosti. Patologie spermioqramu se mohou navíc sdružovat do tzv OAT-syndromu (oligo-astheno-teratozoospermie).

### 2.1.2 Příčiny neplodnosti – žena

Za příčinami ženské neplodnosti nacházíme vedle endometriózy nejčastěji tzv. tubární faktor a faktor ovariální – ovulační dysfunkci. Podle kritérií WHO jsou tyto dysfunkce dále děleny do podskupin: I. s hyperprolaktinemií, II. nízkou hladinou gonadotropinů a III. zahrnující primární ovariální selhání [9].

Z dalších možných příčin uvádíme anatomické nepravidelnosti dělohy, přítomnost endometriálních polypů, submukózních myomů, obliteraci dutiny děložní při Ashermanově syndromu; primární neplodnost u Turnerova syndromu. Představují však natolik minoritní skupinu příčin (viz tabulka 1), že tímto považujeme jejich význam v kontextu této práce za dostatečně zdokumentovaný.

Příčina neplodnosti ženy však může zůstat dlouho, nebo zcela skryta. Podle různých autorů představuje neznámá příčina 15 – 25% konstatovaných neplodností [1]. Mezi významné negativní prognostické faktory ovlivňující plodnost na všech úrovních, jako oplodnění, implantace a vývoj plodu patří faktory imunologické.

Jedním ze zdrojů ženské neplodnosti může být izoimunizace organismu antigeny spermií, nebo seminální plasmy [10-13]. O etiologii, patogeneze, diagnostice a léčbě bude pojednáno v samostatné kapitole.

## 2.2 Imunologicky podmíněná neplodnost

Je prokázán přímý vztah mezi sníženou fertilitou a abnormalitami v imunologických testech, jako jsou vyšetření přítomnosti protilátek proti gametám, dále diagnostika antifosfolipidového syndromu a antifosfolipidových protilátek,



antinukleárních protilátek, orgánově specifických protilátek, zejména pak protilátek proti strukturám a působkům štítné žlázy [14, 15].

### 2.2.1 Protilátky proti zona pellucida

Zona pellucida je deset mikrometrů silná glykoproteinová vrstva chránící oocyt. Hraje důležitou roli nejen při oplodnění, ale i v procesu folikulogeneze. Je silně imunogenní a efekt antizonálních protilátek se může uplatňovat jak přímo, ve smyslu bránění splnutí gamet, tak nepřímo v etiopatogenezi předčasného ovariálního selhání [16].

### 2.2.2 Antifosfolipidové protilátky

APS a přítomnost aPL bývá spojována nejen se sterilitou v nejužším slova smyslu, ale i potráčovostí [17] a předčasnými porody, poškozením plodu, intrauterinní růstovou retardací, abrupcí placenty, ale i s preeklampií a těhotenskou hypertenzí [18].

### 2.2.3 Antithyroidální protilátky

Mezi další významnou skupinu autoprottilátek figurujících v poruchách plodnosti patří bezesporu i tkáňově specifické protilátky proti antigenům štítné žlázy, zejména pak proti thyreoperoxidáze (aTPO) a thyreoglobulinu (aTG), zkříženě pak s antigenními strukturami zona pellucida, receptory pro lidský choriogonadotropin a dalšími placentárními antigeny [14, 15].

### 2.2.4 Protilátky proti spermiiím

Vzhledem k tématu této práce (Imunologie lidské spermie) zařazují problematiku antispermatozoidálních protilátek – ASA – jako samostatnou kapitolu.

## 2.3 Protilátky proti spermiiím – ASA

### 2.3.1 Vztah ASA k neplodnosti

Antispermatické protilátky (ASA) se mohou vyskytovat u mužů i žen a jsou dokumentovány u 9 až 12,8% neplodných párů [19-21].

Je dnes obecně přijímanou skutečností, že imunitní odpověď na spermie může blokovat jejich funkci a omezovat tak plodnost jako takovou [22]. Tyto ASA zejména tříd IgG, IgA a IgM (jen velmi zřídka IgE) jsou identifikovány v séru, seminální plazmě, cervikálním hlenu, peritoneální a folikulární tekutině, nebo jako epitopy vázané přímo na povrchu spermii [1]. Vliv na spermie se odvíjí nejen od kvality a kvantity těchto protilátek, ale především od charakteru antigen-protilátkové interakce [23]. ASA pak mohou způsobovat snížení až inhibici motility spermii [24], jejich poškození [25], útlum až nemožnost akrozomální reakce [26], bránění penetrace cervikálním hlenem [27], ovlivňují interakci spermie-zona pellucida [21, 28], a v neposlední řadě mohou zcela zabránit

splynutí spermie s oocytem [29, 30]. Ukazuje se, že nejrozmanitější efekt na funkci spermie mají protilátky namířené proti antigenním strukturám hlavičky [31].

ASA navázané na spermie mohou dále indukovat imunitní odezvu a mohou komplikovat implantaci embrya, nebo dokonce způsobovat potrácivost v časných stádiích těhotenství [32].

### 2.3.2 ASA – prevalence

Hodnocení aktuální prevalence ASA není v současné době snadné vzhledem k množství užívaných metod. Srovnání jejich výsledků nám ale i tak může posloužit k rámcové představě významu ASA v lidské neplodnosti.

#### 2.3.2.1 Etiologie ASA u muže – autoimunizace

V procesu rozpoznávání vlastních antigenů spermie chybí, protože jejich vývoj začíná až obdobím puberty; imunitní systém tedy spermii nezná. Navíc (a nejspíš právě proto) je prostředí jejich vývoje vysoce imunitně privilegované ochrannou hemato-testikulární bariérou semenotvorných kanálků tvořenou bazální membránou Sertoliho buněk a jejich pevnými spoji typu tight-junction. Poškození mužského genitálního traktu mohou být důsledkem vývojové anomálie, chirurgického výkonu (vasektomie), nebo úrazu [33, 34].

#### 2.3.2.2 Etiologie ASA u ženy – isoimunizace

I u ženy dochází za určitých okolností k tvorbě ASA. Zde hovoříme o procesu izoimunizace. Etiologie vzniku ASA má u ženy svá specifika vycházející z utváření a funkce ženského genitálního traktu a z charakteru spermií jakožto cizorodého materiálu.

## 2.4 Patogeneze neplodnosti zprostředkované ASA

Přesný mechanismus neplodnosti zprostředkované ASA není ve své rozmanitosti dosud zcela objasněný. V mužském a posléze v ženském genitálním traktu mohou ASA vykazovat celou škálu ovlivnění spermií od jejich vývoje, po jejich funkci, jak bylo zmíněno výše. Jedná se zejména o vliv na maturaci, penetraci, kapacitaci a akrozomální reakci [23].

## 2.5 Diagnostika ASA

„Neexistuje dokonalá metoda k detekci antispermatozoidálních protilátek, ani spermatozoidálních antigenů, ačkoliv obě by byly nedocenitelným nástrojem k pochopení významu produkce antispermatozoidálních protilátek a potenciálnímu ovlivnění imunitní odpovědi na spermie za účelem omezení neplodnosti nebo vývoje imunokontraktiv“ [35]. Pro stanovení ASA existují četné metody, některé přesnější, některé levnější, některé rychlejší, žádná však není ideální. Kvalitní metoda by měla kombinovat maximum výhod

za předpokladu vysoké senzitivity a specifity, stanovení třídy imunoglobulinů, eventuálně schopnosti jejich lokalizace na spermii.

### 2.5.1 Immunobead assay – IBD (přímý a nepřímý)

Imunočásticové testy (immunobead assay – IBD) [36, 37] jsou založené na polyakrylamidových nebo latexových mikročásticích potažených specifickým antiimunoglobulinem, zpravidla kovalentně váží antihumánní králičí imunoglobulin. Imunočástice jsou smíchány s čerstvými, vitálními vzorky spermií a v přítomnosti příslušné ASA naváží postižené spermie.

### 2.5.2 Smíšený antiimunoglobulinový test – MAR test (přímý a nepřímý)

MAR test – mixed antiimmunoglobulin reaction test – [38, 39] je do značné míry obdobou IBD testu s tím rozdílem, že jako částice jsou použity erytrocyty (humánní, O Rh- pozitivní, nebo zvířecí – beraní). Tyto erytrocyty mají na svém povrchu navázané lidské imunoglobuliny jednotlivých izotopů, pro jednotlivá vyšetření vždy jiné. Variantou přímého, direct-MAR testu je nepřímý, indirect – iMAR test. Slouží ke stanovení ASA v ostatních biologických materiálech (sekretech, tělních tekutinách).

### 2.5.3 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Jinou možností detekce ASA je ELISA. Využívá enzymem značených protilátek proti izotypově specifickým ASA. Omezení této metody však spočívá v nutnosti fixace vyšetřovaného materiálu a uváděnou nižší senzitivitou. Nedokáže rovněž odlišit lokaci vazby ASA na spermii. ELISA zatím nenašla širší klinické uplatnění.

### 2.5.4 Fribergův spermaglutinační test

TAT – tray agglutination test (rovněž Fribergův test, [40]) se užívá ke stanovení přítomnosti ASA v krevním séru, popřípadě v seminární plazmě apod. V sériově nařaděných vzorcích vyšetřovaného biologického materiálu po přidání dárcovských spermií (s prokázanou ASA negativitou) po inkubaci při 37°C sledujeme pod světelným mikroskopem, v jakém nejvyšším naředění jsou ještě patrné spermaglutinace.

### 2.5.5 Penetrační testy

Kremerův penetrační test [41] je simulací průniku spermií ovulačním cervikálním hlenem, jakýmsi in vitro postkoitálním testem, na rozdíl od kterého může hodnotit i nepartnerské interakce.

### 2.5.6 Průtoková cytometrie

Z dalších možných metod uvádíme průtokovou cytometrii. K přímé (ASA vázané na vyšetřovaných spermích) nebo nepřímé (ASA pochází z vyšetřovaného vzorku, ve kterém se inkubují spermie ASA negativního dárce) detekci slouží izotopově specifický antiimunoglobulín se značením dle použitého detektoru (fluorescein, magnetické nebo radioaktivní částice). Z hlavních výhod se uvádí přesná kvantitativní analýza a izotypová specifika pro vyšetřované ASA. Je nicméně nutné vyšetřovat nemotilní spermie a vzhledem k nutnému určitému stupni fixace je zde riziko poškození a falešných pozitivit. Z dalších nevýhod: čas na přípravu vzorku, cena a vysoce erudovaný personál.

### 2.5.7 Interpretace testů

Z tohoto množství vesměs subjektivně hodnocených testů mohou pramenit mnohdy i konfliktní data. Situaci navíc komplikuje samotná biologická podstata zkoumaného materiálu (spermie), která se in vitro může nevyzpytatelně měnit (kapacitace, akrozomální reakce) a prezentovat svůj povrch jako nekonstantní soubor antigenů, kdy některé mizí, dosud skryté se objevují a neustále hrozí, že analýza bude definitivně zkreslena antigeny vnitřní strany cytoplazmatické membrány a intracelulárním obsahem.

## 2.6 Léčba ASA pozitivních pacientů

Ve snaze omezit negativní působení ASA na reprodukci postupujeme ve smyslu této strategie:

- 1) metodami snižujícími tvorbu ASA
- 2) metodami odstraňujícími již přítomné ASA
- 3) technikami IVF. Motivem těchto technik je snížit pravděpodobnost expozice gamet vlivu ASA a zlepšit tak jejich fertilizační schopnost.

Dvěma základními metodami snižujícími produkci ASA jsou: kondomem chráněný pohlavní styk (eliminace antigenní nálože) a kortikosteroidní léčba ať už perorální, nebo lokální aplikací hydrokortizonu ektocervikálně [1, 42, 43]; další léčebnou modalitu nabízí plazmaferéza [44].

## 2.7 ASA a asistovaná reprodukce

Jsme stále bohatší o zkušenosti se vztahem ASA positivity a asistované reprodukce. Ačkoliv efektem asistované reprodukce je (mimo jiných faktorů) i minimalizace vlivu ASA (např. inseminací potlačený cervikální faktor IUI – Intra Uterine Insemination), ASA se mohou stát limitujícím faktorem úspěšnosti asistované reprodukce ať už vyjádřené pomocí fertilisation rate (FR – úspěšnost oplodnění), nebo pregnancy rate (PR – úspěšnosti vlastního otěhotnění). Tyto aspekty jsou publikovány ve vztahu k metodám, jako umělé oplodnění, nebo též oplodnění „ve zkumavce“ (IVF – In vitro Fertilisation) a ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection – vpravení spermie do přímo do cytoplasmy vajíčka).

## 2.8 Lidská spermie – vznik antigenní entity

### 2.8.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze u člověka trvá přibližně 72 dní, dalších cca 12 dní dochází k maturaci v nadvarleti. Pro správný průběh spermatogeneze je zapotřebí dostatečná stimulace pohlavními hormony (zejména testosteronem) [45] a dále nižší teplota, kterou za fyziologických podmínek zajišťuje umístěním varlat v šourku, kde na teplotní změny termostaticky reaguje musculus cremaster.

Spermatogeneze probíhá od puberty do individuálně vysokého věku a odhaduje se, že muž za svůj život vyprodukuje cca 12 biliónů spermií.

### 2.8.2 Spermioogeneze a epididymální maturace

Spermioogeneze znamená postupné úpravy haploidní spermatidy na morfologicky zralou spermii. Na konci spermioogeneze stojí sice morfologicky zralá spermie, není však dosud schopná interakce s oocytem. Tyto schopnosti získává v následujících maturačních procesech. Intenzivní posttranslační modifikaci povrchových glykokonjugátů podstupují spermie v oblasti těla a ocasu nadvarlete, kde zůstávají do okamžiku ejakulace.

### 2.8.3 Ejakulace

Během ejakulace dochází k promíchání epididymálních spermií se sekrety přidavných pohlavních žláz, tvoří se ejakulát. Ejakulát obsahuje na 500 bílkovinných a peptidových složek, přičemž některé jsou schopny indukovat vytváření protilátek [1, 46].

### 2.8.4 Kapacitace

Po ejakulaci je spermie neschopná oplodnění. Změny ve složení cytoplazmatické membrány vedou k destabilizaci membrány a tím připravují spermii na akrosomální reakci a fúzi s vajíčkem.

### 2.8.5 Akrosomální reakce

Poslední strukturální změny prodělává spermie při interakci se zónou pellucidou vajíčka. Povrchové struktury spermie zodpovědné za vazbu se zónou pellucidou se v průběhu kapacitace vlivem zvýšené fluidity plazmatické membrány kumulují z různých částí povrchu spermie, a sice převážně v oblasti apikálního hřebene hlavičky [47]. Spíše než specializované receptory vznikají touto kumulací vazebné komplexy obsahující pravděpodobně i složky indukující vlastní akrosomální reakci.

## 2.9 Imunologie reprodukce ve službách antikoncepce

### 2.9.1 Antikoncepční vakcína

Jedním ze základních motivů k vývoji antikoncepční vakcíny je využití znalostí imunologických mechanismů, které početí brání a obrátit je v náš prospěch tam, kde je početí méně žádoucí. Dostáváme se tak opět na pomezí komplementarity protichůdných tendencí a vztahů mezi chtěným a nechtěným, sluhou a pánem, antigenem a protilátkou.

Z imunologického hlediska se nabízí několik skupin cílů možného protilátkového zásahu. Obecně lze uvažovat tyto kategorie: inhibice tvorby pohlavních buněk (protilátky proti hormonům a/nebo jejich receptorům – GnRH, FSH, LH), ovlivnění funkce gamet (vyřazení povrchových struktur nutných ke vzájemné interakci spermie a vajíčka, eliminace fertilizačního potenciálu spermií, cytotoxické působení), znemožnění implantace (protilátky proti hCG) [48].

### 2.9.2 Vakcína proti spermiím – dosažitelná realita?

Pro vývoj antikoncepční vakcíny založené právě na spermatozoidálních antigenech je několik racionálních důvodů. Spermie je imunogenní v mužském i ženském organismu a skýtá vhodný časoprostorový cíl pro ASA. Etiopatogene ASA, možné procesy imunizace mužského a ženského organismu proti spermiím, je diskutována výše. Tentokrát však o ASA uvažujeme z hlediska žádoucí tvorby protilátek a jejich kontracepčního potenciálu, je však nutné vyřešit mechanismus jejich cílené tvorby a možnosti její regulace.

## 2.10 Spermatozoidální antigeny – základy proteomiky

Ke studiu spermatozoidálních antigenů využíváme rámcově dvou základních proteomických přístupů, které danou problematiku definují z protilehlých stran:

1) cílenou syntézou uvažovaných antigenů, peptidů a proteinů získaných na základě našich znalostí o příslušných částech genomu, kde jsou kódovány.

2) metody založené na extrakčních postupech, kdy získáváme potenciálně antigenní směs přímo rozpouštěním spermatických buněk.

### 2.10.1 Phage display

Jedním z doslova revolučních přístupů k hledání kontracepčních vakcinogenů je metoda phage display – technologie prezentace (potencionálně vazebných) molekul na povrchu viru – fága – byla sice prezentována již v roce 1985 [49], ve výzkumu povrchových spermatozoidálních antigenů začala být využívána až poměrně nedávno.

### 2.10.2 Knock out

Jinou perspektivní technikou funkčního mapování spermatozoidálních antigenů je metoda genového knockoutu. U (zpravidla) myšičího klonu s cíleně vyřazeným genem se sleduje fenotypový projev tohoto vyřazení – knockoutu. Bylo takto popsáno několik desítek nových testikulárních a spermatozoidálních genů/proteinů významným způsobem ovlivňujících fertilitu [50].

### 2.10.3 Extrakční postupy

Náš výzkum je založen na postupech extrakčních, proto jim bude věnována zvláštní pozornost ve speciální části, kde budou uvedeny v použitých modifikacích. Na tomto místě je zmiňujeme pro úplnost přehledu.

#### 2.10.3.1 Sodiododecylsulfátová polyakrylamidová gelová elektroforéza

Sodiododecylsulfátová polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) je současným standardem pro dělení neznámé proteinové směsi.

#### 2.10.3.2 Dvourozměrná elektroforéza

Doslova rozměr navíc vnáší do elektroforézy předchozí izoelektrická fokusace (IEF). Tímto postupem se proteinová směs nejdříve rozdělí (horizontálně) podle kritéria isoelektrického bodu (pI) jednotlivých molekul; teprve poté dojde k rozvrstvení v el. poli podle molekulových hmotností.

#### 2.10.3.3 Western blotting

Western blotting (originální název), western blot, potažmo immunoblotting, nebo též imunoblot představuje následný krok, další úroveň detekce hledaných proteinů. Při hledání potenciálních spermatozoidálních vakcinogenů sehrává tato metoda veskrze klíčovou roli. Vychází z předchozí elektroforézy (1 či 2 D). Proteinová spektra jsou nejdříve přenesena z polyakrylamidového gelu na membránu (nitrocelululóza, polyvinyliden fluorid). Následnou imunodetekcí hledáme struktury, které mohou potencovat tvorbu použité protilátky nebo protilátek.

#### 2.10.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time-of-Flight) může být korunou identifikace proteinu zachyceného na 2D gelu (nebo získaného jako frakce při HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie).



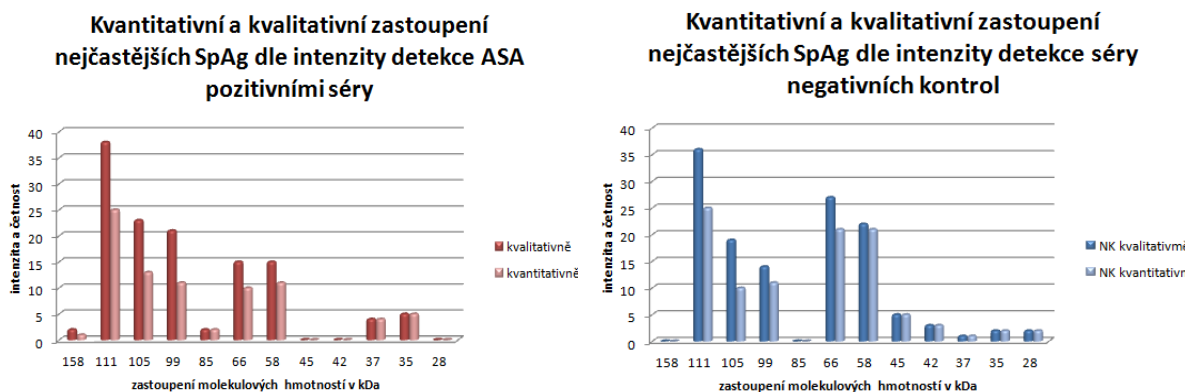
### 3 Experimentální část

#### 3.1 Příprava antigenů z lidských spermií pro immunoblotting

Cibulka, J., Ulčová-Gallová, Z., Balvín, M., Krauz, V., Reischig, J., Bibková, K., Mičanová, Z., and Rokyta, Z. (2005). Isolation and immunological identification of serum spermagglutinating antibody from infertile woman. Abstr. book XIth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 15.

Cíl studie: cílem této pilotní studie bylo nalézt optimální lyzovací postup, který by kombinoval dobrou výtěžnost spermatozoidálních proteinů s vyvážeností proteinového spektra hodnoceného po barvení v gelu SDS-PAGE ve sledovaném rozsahu 15 – 300 kDa. Metodika: spermie jsme separovali z ejakulátů metodou swim-up. Spermie jsme zamrazili k dalšímu použití. Po rozmrazení suspenze spermií v Backerově roztoku jsme mikroskopicky stanovili jejich průměrnou koncentraci ( $3 \times 10^7/\text{ml}$ ). Suspenzi jsme pak rozpípetovali po 2ml a centrifugovali (3 minuty při 5000 otáčkách za minutu – rpm (průměr rotoru 20cm) a  $4^\circ\text{C}$ ). Získanou peletu jsme následně resuspendovali ve fosfátovém pufru (PBS) s obsahem koktejlu proteázových inhibitorů (1:1000) a opět centrifugovali za stejných podmínek. Promývací protokol jsme zopakovali celkem 2x. Výslednou promytou peletu jsme resuspendovali v 500 $\mu\text{l}$  lyzovacího roztoku 1% Triton X-100 a 1% deoxycholátu sodného s inhibitory proteáz (1:100). Vlastní lyzi spermií jsme následně provedli 4 hodinami stálého kývání na ledu za a občasného vortexování. Suspenzi jsme po 4 hodinách centrifugovali po dobu 10 minut při 10000 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . Následovala SDS-PAGE. Proteinová spektra jsme blotovali na nitrocelulózovou membránu a antigeny v nich obsažené jsme detekovali séry s prokázanou ASA aktivitou.

Výsledky: hodnoty molekulových hmotností detekovaných proužků jsme vynesli do grafů vyjadřujících jejich absolutní četnost (kvantitu). Intenzitu každého proužku jsme dále ohodnotili stupni 1 – 3 a vynesli do grafu jako jejich kvalitativní vyjádření. Všechny tyto modalities jsou vyjádřeny zvlášť pro ASA pozitivní séra, tak pro negativní kontroly; v posledním grafu jsou hodnoty zobrazeny dohromady pro lepší názornost.

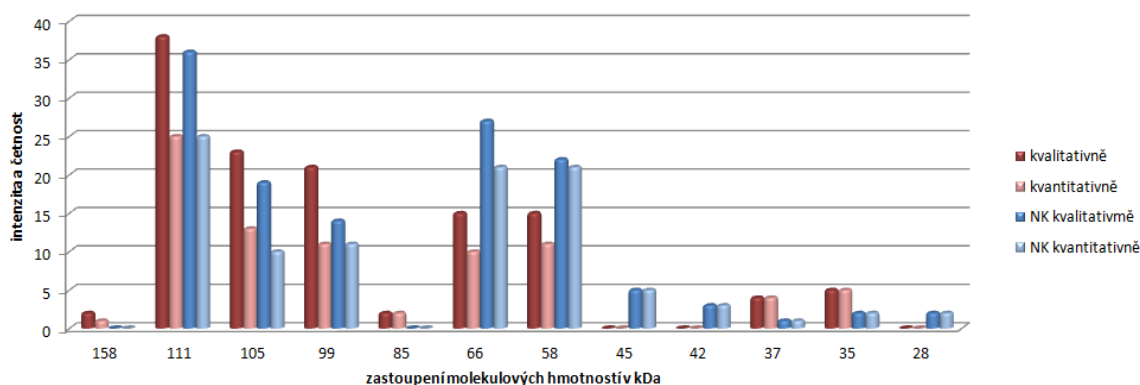


Obrázek 10a – Výsledky detekce ASA pozitivními séry

Obrázek 10b – Výsledky detekce séry negativních kontrol



### Srovnání výsledků imunodetekce ASA+ a NK



Obrázek 10c – Srovnání výsledků detekce ASA pozitivními séry a séry negativních kontrol

Lyzát připravený výše uvedeným způsobem vykazuje silnou reaktivitu s krevním sérem zejména v molekulových hmotnostech kolem 111, 105, 99 a dále pak 66 a 58 kDa. Tyto reakce však nejsou specifické pro séra typizovaná na základě jejich schopnosti shlukovat spermie byť i ve vysokém naředění (titru) (obrázek 10a – c).

Závěr: touto studií jsme získali četné cenné zkušenosti, které zúročíme v dalších výzkumných etapách. Je nutné lépe typizovat séra s ohledem na jejich antispermatozoidální aktivitu. Velký důraz budeme klást na modifikace lyzovacího protokolu. Budou provedeny srovnávací studie s proměnnými na straně času lyzovacího procesu a koncentrace extrakčních činidel, jako je Triton X-100 a deoxychlát sodný s ohledem na stav a zachování spermie a výtěžnost povrchových proteinů.

### 3.2 Izolace a imunologická identifikace spermaglutinujících protilátek z lidského séra

Cibulka J, Ulčová-Gallová Z, Balvín M, Bibková K, Mičanová Z.: Isolation and immunology identification of spermagglutinating antibodies from human serum. *Ceska Gynekol.* 2009 Jun;74(3):201-8.

**Cíl studie:** cílem studie bylo stanovit spermaglutinační parametry ASA pozitivních lidských sér (Poradna reprodukční imunologie při Gyn.-por. klinice LF a FN v Plzni) pomocí metod Fribergova testu (též Tray Agglutination Test – TAT), nepřímého a přímého smíšeného antiimmunoglobulinového testu (i-MAR test) a doplňkově i radiální imunodifúzí (RID) u plných sér a jejich chromatografických frakcí.

**Metodika:** Čtyři vzorky neaktivnějších sér (titry 1 : 512 až 1:1024) jsme chromatograficky rozdělili, odsolili a jednotlivé frakce zkoncentrovali natolik, že byla opět hodnotitelná jejich spermaglutinační aktivita, doplňkově byla zařazena i radiální imunodifúzí (RID).

**Výsledky:** chromatografickým rozdělením jednotlivých ASA pozitivních sér jsme u každého séra získali celkem 20 frakcí, z toho 10 frakcí prokazatelně obsahujících sérové proteiny v závislosti na jejich molekulových hmotnostech. Fribergovým testem jsme ověřovali spermaglutinační aktivitu jednotlivých frakcí. Výsledky RID jsou pouze orientační vzhledem k nespecifičnosti testu. Ukazují pouze na koncentraci imunoglobulinů dané třídy ve frakcích a v plném séru, nikoliv na jejich ASA aktivitu. Pomocí radiální imunodifúze jsme ověřili, že hladiny celkového sérového IgG a IgM nejsou nijak znatelně

ovlivněny přítomností spermaglutinujících ani ostatních ASA ve srovnání s ASA neaktivní kontrolou přesto že se jedná o pacienty s klinicky signifikantními titry ASA.

Závěr: pomocí vyšetřovaných imunoglobulinů třídy IgG a IgM jsme u čtyř vybraných sér zdokumentovali možná stádia imunizace od právě probíhajícího s jednoznačnou a výraznou aktivitou IgM, přes přechodné/chronické (IgG a IgM), až po stádium anamnestických titrů IgG. Tato zjištění nám mohou pomoci při volbě adekvátního terapeutického přístupu. Vylučovací kapalinová chromatografie je účinnou, leč nespecifickou metodou izolace některých sérových protilátek. Přítomnost ASA neovlivňuje chromatografické spektrum sérových proteinů.

Izolace a identifikace spermaglutinačních ASA tvoří základ pro další experimenty založené na technice imunoblotingu a pro lepší pochopení interakcí mezi ASA a spermatozoidálními antigeny.

### **3.3 Příprava panelu směsných antigenů lidské spermie pro immunoblotting – imunofluorescenční studie**

Cibulka, J., and Ulčová-Gallová, Z. (2008). Preparation of mixed antigens of human spermatozoa for immunoblotting-immunofluorescent study. Abstr. book XIVth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 37.

Východisko: význam spermaglutinačních protilátek (ASA) je předmětem širokého výzkumu. Zatímco v klinické praxi řešíme jejich úlohu z pohledu reprodukční imunologie, tedy faktoru neplodnosti, základní výzkum zkoumá i jejich potenciál v možnostech nehormonální kontracepce. Příprava kvalitního panelu zejména povrchových antigenů z lidských spermií je klíčová k pochopení imunitních interakcí v procesu fertilizace.

Cíl: dlouhodobým cílem naší studie je příprava kvalitního směsného spermatozoidálního antigenu pro potřeby immunoblottingu. Pomocí této metody chceme identifikovat a dále charakterizovat imunodominantní spermatozoidální antigeny za použití ASA pozitivních vzorků sér.

Metodika: používáme promyté, vitální spermie získané z čerstvého, plného ejakulátu metodou swim-up. K přiblížení se podmínkám in vivo jsme vypracovali metodiku eliminující maximum vlivů vedoucím k nešetrné destrukci spermií a jejich antigenních struktur. Vzorky zpracováváme okamžitě pod neustálou mikroskopickou kontrolou vitálních projevů spermií. Proces promývání i solubilizace jsme sledovali v čase fluorescenčním mikroskopem pomocí monoklonálních, fluoresceinem značených protilátek (HS-8, HS-14 a HS-36) se specifitou vůči akrozomálním proteinům. K solubilizačně-extrakčnímu postupu jsme použili pufrovaný 0,5% a 0,25% Triton X-100 spolu s 1% deoxycholátem sodným (0,01M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15M NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholát sodný, inhibitory proteáz). Lyzi spermií jsme zastavovali padesátinásobným naředěním v PBS v časových intervalech 0, 0,5, 1, 2 a 4 minuty a okamžitou centrifugací s opětovným promytím. Následovala inkubace se značenými protilátkami a odečítání fluorescence.

Výsledky: lyzovací pufr o 1% koncentraci Tritonu X-100 s 1% deoxycholátem sodným způsobí ztrátu signálu akrozomu a většiny povrchového signálu (s výjimkou bičíku) do 30 sekund. Poloviční a čtvrtinová koncentrace lyzovacího pufru má obdobný efekt až po 4,

respektive po 8 minutách. Nejcitlivější strukturou lidské spermie vůči chemickému poškození je akrozom, dále ekvátor a s ním pravděpodobně i plazmatická membrána; nejodolnější se jeví struktury bičíku. Opakované promývání v PBS (4°C) a centrifugace (3500rpm x 5') nemají pozorovatelný vliv na poškození akrozomu, ani evidentně nevedou k předčasné akrozomální reakci (viz tabulka 10). Pro pozorování se jako nejvhodnější ukázala monoklonální protilátka HS-8; protilátky HS-14 a HS-36 poskytovaly obtížně hodnotitelné výsledky. Šetrná lyze doplněná razantní centrifugací poskytuje přehledné, dobře separované spektrum proteinů i vysokých molekulových hmotností o dobře zpracovatelné koncentraci proteinu kolem 600µg/ml.

Závěr: ačkoliv nepatří akrozomální proteiny mezi povrchové spermatozoální antigeny, posloužily nám k včasné detekci destrukce spermie v procesu uvolňování jejich povrchových struktur do lyzovacího roztoku. Získali jsme tak informace, díky kterým můžeme předejít uvolňování intracelulárních proteinů a vyhnout se tak potenciálním zkříženým reakcím zvyšujícím šum při další imunodetekci (immunoblotting). Předpokládáme, že optimalizace ve smyslu zkrácení lyze povede k uchování většího množství i těch nejchoulostivějších zejména u konfirmačních antigenů.

### **3.4 Rozlišení povrchových antigeů lidské spermie metodou biotinového značení.**

Cibulka, J., Kamieniczna, M., Ulčová-Gallová, Z., Bibková, K., and Mičanová, Z. (2009). Discrimination of the surface human spermatozoidal antigens by the method of biotin labeling. Abstr. book XVth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 24.

Východisko: povrchové antigeny lidské spermie podstupují od samého počátku spermiogeneze do oplodnění oocyty četnými posttranslačními modifikacemi (maturace, kapacitace, akrozomální reakce). Tato skutečnost komplikuje jejich výzkum cestou i těch nejmodernějších proteomických postupů. Základem výzkumu zůstává analýza komponent spermie pomocí některého z lyzovacích postupů, zpětné testování jejich biologické aktivity a konečně jejich identifikace.

Cíl: pro náš výzkum jsme zvolili postupy, které by měly na straně jedné šetrně odloučit jen povrchové spermatozoidální antigeny, na straně druhé předejít nadbytečné kontaminaci intracelulárním obsahem.

Metodika: používáme promyté, vitální spermie získané z čerstvého, plného ejakulátu metodou swim-up. Promyté spermie jsme inkubovali v roztoku biotinu dle pokynů výrobce kitu (ECL Protein Biotinylation Module, Amersham) po dobu 30minut. Po důkladném promytí spermií následuje lyze (0,01M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15M NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholát sodný, inhibitory proteáz) po dobu nepřesahující 2 minuty při 0°C. Supernatant po centrifugaci (10 000 rpm) jsme inkubovali se vzorkovým pufrům bez redukčního činidla (H<sub>2</sub>O, 0,5M TrisHCl pH 6,8, glycerol, 10% SDS, 0,5% bromfenolová modř) a rozdělili pomocí SDS PAGE (10% PA gel, 15mA/gel). Proteiny jsme přeblotovali na nitrocelulózoovou membránu (25mM Tris base, 192mM glycin a 10% methanol při 100 V na 120 min). Povrchové, biotinylované proteiny jsme na části membrány detekovali pomocí streptavidinu (konjugát s peroxidázou – AEC Staining Kit, Sigma). Zbytek membrány jsme znovu biotinylovali a rovněž vyvolali pomocí streptavidinu k vyjádření celkového proteinu.

Výsledky: z výsledků je zřejmé, že krátká lyze do 2 minut významně zachovává povrchové struktury (pozitivní signál) a předchází nadměrnému uvolňování nitrobněčného obsahu (vysoká míra shody s celkovým proteinem). Srovnáním proteinových spekter z elektroforézy a biotinylovaných proteinů jsme dosáhli vysoké míry shody, zejména v molekulových hmotnostech 150, 100, 88, 75, 67, dále pak v rozmezích 55 – 37, méně zřetelně v pásmu 37 – 25 kD.

Modifikací metody swim-up jsme dosáhli vysokého počtu spermií v peletě (cca 150 mil.) a díky tomu i při čtvrtinové koncentraci extrakčních činidel oproti původnímu rozpisu a lyzovacímu času 30 sekund jsme naměřili koncentraci bílkovin kolem 800 µg/ml.

Závěr: dosavadní i budoucí výsledky imunoblotingu tohoto lyzátu budeme filtrovat výhradně spektrem proteinů, které vykazují značení biotinem. Pouze tyto proteiny můžeme považovat za povrchové, tedy relevantní pro další výzkum.

### **3.5 Mapování povrchových antigenů lidské spermie protilátkami spermaglutinačních sér**

Cibulka, J., Mičanová, Z., Bibková, K., and Ulčová-Gallová, Z. (2010). Mapping of the human sperm surface antigens by antibodies from spermagglutinating human sera. Abstr. book XVIth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 61.

Východisko: přítomnost antispermatozoidálních protilátek (ASA) je známou možnou příčinou neplodnosti u mužů i žen. Pro rutinní vyšetření u neplodných párů jsou nejdostupnější testy na přítomnost sérových ASA, dále pak testy analyzující jejich přítomnost v ovulačním cervikálním hlenu; obdobně je možné vyšetřovat i další tělní tekutiny. Základní vyšetření séra na přítomnost ASA zahrnuje tzv. spermaglutinační testy.

Cíl: úkolem naší poslední studie je zmapovat povrch lidské spermie pomocí protilátek přítomných ve spermaglutinujících (tedy ASA pozitivních) sérech a zpřesnit tak interpretaci našich dosavadních výsledků Western blotů na lyzátech lidských spermií.

Metodika: pro náš záměr jsme vybrali 30 sér vykazujících signifikantní titry (1:16 – 1:64) spermaglutinujících protilátek dle výsledků Fribergova testu. Dále jsme použili živé, promyté spermie dárců s hodnotami normospermiogramu dle WHO. K detekci navázaných protilátek byly paralelně použity fluoresceinem značené kozí protilátky proti lidskému IgG a sice proti Fc konci a proti celé molekule IgG.

Používáme promyté, vitální spermie získané z čerstvého, plného ejakulátu metodou swim-up. Vzorek roztoku spermií byl v objemu 50 µl přidán ke stejnému objemu ASA pozitivního séra a inkubován při 37°C po dobu jedné hodiny. Následovala inkubace se sekundární protilátkou dle pokynů výrobce (SigmaAldrich).

Výsledky: ASA poskytované vyšetřovanými séry vytvářely na povrchu spermií formace proužkovitého charakteru zejména v oblasti ekvátoru a to jak jednotlivé, tak několikanásobné. Dalšími nejčastějšími lokalizacemi byly akrozom a baze hlavičky s krčkem – samostatně, nebo v kombinacích s výše uvedenými v různém poměru ke spermiím neznačeným. Rozdíly ve značení Fc a celé molekuly nebyly významné.

Závěr: tyto výsledky poukazují na skutečnost, že v ejakulátu se nachází spermie různého stáří a různého stupně epididymální maturace, což se nutně odráží na skladbě jejich povrchových antigenů. Těmito nálezy připomínáme význam postranlačních modifikací povrchových komponent spermatické buňky a nezastupitelnost solubilizačně-extrakčních

metod jako způsobů jejich zkoumání. S využitím stávajícího vybavení naší laboratoře a po implementaci drobných modifikací do rutinních vyšetřovacích metod jsme vytvořili postup, který nám poskytl další rozměr hodnocení kvality ASA a tedy další kritéria k výběru sér vhodných k imunodetekci. Význam zaznamenaných imunofluorescenčních vzorů na povrchu spermií je pro nás zatím nejednoznačný, ale domníváme se, že je jistě hodný dalšího výzkumu. Korelovat tyto povrchové vzory s klinickou významností by přineslo nové možnosti v diagnostice ASA.

Takto otypovaná séra byla použita ve studii autorů z Polské Akademie věd v Poznani [51] nebo v práci autorů z VŠCHT v Praze [52].

## 4 Závěr

Zkoumáním vztahů lidské spermie k protilátkám z patientských sér jsme byli konfrontováni se skutečnostmi, které bychom mohli shrnout do následujících závěrů:

Solubilizačně-extrakční metody jsou přes nepřehlednou škálu možností vstupních parametrů metodami volby k uchopení problematiky antigenních vlastností lidské spermie. Přes všechny své limity mají největší šanci k izolaci a identifikaci hledaných antigenů, zejména těch povrchových.

Stejně tak však zůstává mnoho otázek, nakořik jsou tyto postupy schopné zejména u složitějších antigenů zachovat antigenicitu nebo dokonce imunogenicitu danou konformací (viz kvartérní struktura) molekuly.

Není jednoznačně zodpovězena otázka etiologie sérových ASA, ani jejich klinický význam. Naši pozornost by si v dalším výzkumu rozhodně zasloužila antispermatozoidální aktivita slizniční, tedy IgA zprostředkovaná, zejména v cervikálním ovulačním hlenu.

Naše klinická i laboratorní zkušenost ukazuje na velkou perspektivu dalšího výzkumu v imunologické analýze interakce seminální plazmy a ovulačního cervikálního hleny. Naše dosud nepublikované výsledky imunoblotu seminální plazmy za použití vybraných ASA pozitivních sér vykazují obdobnou škálu interakcí jako lyzátní přípravený ze spermií. Tato předběžná zjištění naznačují, že seminální plazma přinejmenším sama přispívá k imunogenicitě spermie, přičemž je navíc možným rezervoárem fragmentů jejich povrchových antigenů. Zdrojem detekujících protilátek by pak určitě měl být ovulační cervikální hlen s analýzou ve třídě IgA.

Nepřímo tak docházíme k závěru, že výzkum slizniční imunity genitálního traktu ženy znamená sice náročnější odběr biologického materiálu (časování odběru a samotý odběr ovulačního cervikálního hleny), může však poskytnout výsledky s jednoznačnější interpretací i klinickou relevancí. Pokud by se potvrdil signifikantní výskyt spermatozoidálních antigenů v seminální plazmě, otevře se prostor pro jejich analýzu bez potřeby solubilizačně-extrakčních postupů.

## 5 Souhrn

Otázka lidské neplodnosti je stále naléhavější zejména v tzv. průmyslově vyspělých zemích. Formálně můžeme rozdělit atributy neplodnosti mezi muže a ženu (jako mužský a ženský faktor), ale problém nakonec ovlivňuje celý rodičovský pár. Snad právě díky složitosti ženského reprodukčního traktu se odhaduje, že více než 40% poruch plodnosti je skryto v jedné nebo více jeho částí. Obdobně "silná stránka" mužského faktoru je odvozena od patologického spermioqramu. U zbývajících 15 až 20% nedokážeme příčinu konstatovat jistě, nebo vůbec. Hovoříme zde o jinak nevysvětlitelná neplodnost, která může být způsobena až z 30% imunologicky.

Vzhledem k širokému pojetí imunologie reprodukce jsme se rozhodli do této problematiky vyslat doslova jako sondu ve všech ohledech jedinečnou spermatickou buňku, která představuje nejen nositelku genetické informace, ale rovněž řadu antigenních struktur. Tato buňka se zdá být ideální pro tento úkol pro její dostupnost i vhodnost pro většinu základních laboratorních technik.

Budeme se snažit seznámit se s některými z překážek, které mohou předčasně ukončit její poslání, a to zejména s protilátkami proti jejím antigenním strukturám (ASA - protilátek proti spermii).

Dlouhodobým cílem naší práce bylo porozumět antigenní povaze povrchu lidské spermie. Toto poznání vedlo k přípravě bílkovinného extraktu z jejích struktur, který představuje reprezentativní antigenní mozaiku této buňky. Takový extrakt (nebo též antigenní panel) jistě najde své uplatnění především v diagnostice ASA a má potenciál přispět ke zlepšení současné ELISA v detekci ASA. Další využití se nabízí ve výzkumu buněčné imunity.

Naše hlavní nástroje pro práci s tímto úkolem jsou metody SDS-PAGE a následného Western blottingu s imunodetekcí pomocí sérových ASA infertilních mužů a žen.

Vytvořili jsme racionální lyzovací protokol s výsledky podpořenými dalšími doplňkovými studiemi a rozšířili naši diagnostiku ASA v pozitivních polyvalentních sérech.

## 6 Summary

The issue of human infertility is becoming increasingly pressing, especially in so-called industrially developed countries. Formally, we can share the infertility attributes between the male and the female partner (as a male and female infertility factor), but the problem finally affects the whole parental couple. Perhaps, due to the complexity of the female reproductive tract, it is estimated that over 40% of the reproductive failure is hidden in one or more of its parts. The "strong point" of the male factor is derived from the pathological sperm count. For the remaining 15 to 20% of causes, whether morphological



or functional, cannot be to find either clearly or not at all. We talk about the otherwise unexplained infertility, that can be caused in up to 30% immunologically.

Due to broad concept of immunology of reproduction, we have chosen literally as a probe into this issue in all respects unique spermatic cell that represents not only a carrier of genetic information, but also a set of antigenic structures. This cell seems to be perfect for this task, because of its availability to most basic laboratory techniques.

We will try to familiarize ourselves with some of the obstacles that may prematurely end its mission, especially with the antibodies against its antigenic structures (ASA – antisperm antibodies).

The long-term objective of our work was to understand the antigenic nature of the surface of human sperm and preparation of such protein extract from human spermatozoa, which would represent the best possible antigenic mosaic of cells as a result. This extract (or antigenic panel) would find its application especially in the diagnostics of ASA and would improve contemporary ELISA kits. It would also play an important role in further research of cellular immunity. Our main tools for handling this task are the methods of SDS-PAGE and subsequent Western blotting with immunodetection using ASA from sera of infertile men and women.

We created rational lysis protokol with results supported by other complementary studies and diversified our diagnostics of polyvalent ASA.

## 7 Seznam použité literatury

1. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Neplodnost - Útok imunity. Grada: Praha, 2006, 1. vydání
2. KRAUSE, W.K.H., NAZ, R.K. a EDS. Immune Infertility: The Impact of Immune Reactions on Human Infertility. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
3. MADAR, J., SVOBODA, J., RUZICKOVA, Z., et al. FACS analysis of NK cells in IVF-treated patients. Journal of Reproductive Immunology, 2009, **81**(2), 156-157.
4. DOHLE, G.R., COLPI, G.M., HARGREAVE, T.B., et al. EAU Guidelines on Male Infertility. European Urology, 2005, **48**(5), 703-711.
5. SCHENKEN, R.S. a GUZICK, D.S. Revised endometriosis classification. Fertility & Sterility, 1997, **67**, 815-816.
6. THONNEAU, P., MARCHAND, S., TALLEC, A., et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Human Reproduction, 1991, **6** 811-816.
7. EVERS, J.L. Female subfertility. Lancet, 2002, **360**, 151-159.

8. WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen - fifth edition. Department of Reproductive Health and Research, 2010.
9. COLLINS, J.A., BURROWS, E.A. a WILLAN, A.R. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil. Steril.*, 1995, **64**, 22.
10. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., KRAUZ, V. a ULČ, I. Chování spermatozoidálních frakcí v mikroaglutinačním testu a v jiných imunochemických metodách, nové směry v léčbě sterility. Eds., 1985.
11. SEDLÁČKOVÁ, T., ZÍDKOVÁ, J., BRÁZDOVÁ, A., et al. Protilátky proti spermii. *Chem. Listy*, 2010, **104**, 3-6.
12. MAZUMDAR, S. a LEVINE, A.S. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertility and Sterility*, 1998, **70**(5), 799-810.
13. BRONSON, R.A. Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. *Journal of Reproductive Immunology*, 2000, **45**(2), 159-183.
14. CARP, H.J.A., SELMI, C. a SHOENFELD, Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *Journal of Autoimmunity*, 2012, **38**(2-3), J266-J274.
15. TWIG, G., SHINA, A., AMITAL, H., et al. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 2012, **38**(2-3), J275-J281.
16. CALONGOS, G., HASEGAWA, A., KOMORI, S., et al. Harmful effects of anti-zona pellucida antibodies in folliculogenesis, oogenesis, and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology*, 2009, **79**(2), 148-155.
17. ULCOVA-GALLOVA, Z. Repeated miscarriages with antiphospholipid syndrome and genetically impaired embryos. *Journal of Reproductive Immunology*, 2012, **94**(1), 79.
18. BUCKINGHAM, K.L. a CHAMLEY, L.W. A critical assessment of the role of antiphospholipid antibodies in infertility. *Journal of Reproductive Immunology*, 2009, **80**(1-2), 132-145.
19. AYVALIOTIS, B., BRONSON, R., ROSENFELD, D., et al. Conception rates in couples where autoimmunity to sperm is detected. *Fertil. Steril.*, 1985, **43**, 739-742.
20. COLLINS, J.A., BURROWS, E.A., YEO, J., et al. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum. Reprod.*, 1993, **8**, 592-598.
21. KAMIENICZNA, M., DOMAGAŁA, A. a KURPISZ, M. The frequency of antisperm antibodies in infertile couples - a Polish pilot study. *Med. Sci. Monit.*, 2003, **9**(4), 194-201.



22. MADAR, J., URBÁNEK, V., CHALOUPKOVÁ, A., et al. Role of sperm antibodies and cellular autoimmunity to sperm in the pathogenesis of male infertility. *Ceska Gynekol.*, 2002, **67**(1), 3-7.
23. OHL, D.A. a NAZ, R.K. Infertility due to antisperm antibodies. *Urology*, 1995, **46**, 591-602.
24. GRUNDY, C.E., KILLICK, S.R., HAY, D.M., et al. A prospective clinical trial investigating the efficacy of a method of preparing subpopulations of antibody-free spermatozoa from the ejaculates of antibody-positive patients. *Int. J. Androl.*, 1998, **21**, 261-270.
25. HEKMAN, A. a RÜMKE, P. Auto- and Iso-Immunity against spermatozoa. In: *Textbook of Immunopathology*, 1976, **2nd ed. New York, Grune & Stratton**, 947-961.
26. BOHRING, C., SKRZYPEK, J. a KRAUSE, W. Influence of antisperm antibodies on the acrosome reaction as determined by flow cytometry. *Fertil. Steril.*, 2001, **76**, 275-280.
27. EGGERT-KRUSE, W., BOCKHEM-HELLWIG, S., A DOLL, G.R., et al. Antisperm antibodies in cervical mucus in an unselected subfertile population. *Hum. Reprod.*, 1993, **8**, 1025-1031.
28. FRANCAVILLA, F., ROMANO, R., SANTUCCI, R., et al. Interference of antisperm antibodies with the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and its relationship with the inhibition of ZP binding. *Fertility and Sterility*, 1997, **67**(6), 1128-1133.
29. BRONSON, R.A., FUSI, F., COOPER, G.W., et al. Antisperm antibodies induce polyspermy by promoting adherence of human sperm to zona-free hamster eggs. *Hum. Reprod.*, 1990, **5**, 690-696.
30. RAJAH, S.V., PARSLOW, J.M., HOWELL, R.J.S., et al. The effects on in-vitro fertilization of autoantibodies to spermatozoa in subfertile men. *Hum. Reprod.*, 1993, **8**, 1079-1082.
31. MANDELBAUM, S.L., DIAMOND, M.P. a DECHERNEY, A.H. Relationship of antibodies to sperm head to etiology of infertility in patients undergoing in vitro fertilization/embryo transfer. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 1989, **19**, 3-5.
32. WITKIN, S.S. a CHAUDHRY, A. Association between recurrent spontaneous abortions and circulating IgG antibodies to sperm tails in women. *J. Reprod. Immunol.*, 1989, **15**, 151-158.
33. ALEXANDER, N.J. a ANDERSON, D.J. Vasectomy consequences of autoimmunity to sperm antigens. *Fertil. Steril.*, 1979, **32**, 253-260.

34. MANDELBAUM, S.L., DIAMOND, M.P. a DECHERNEY, A.H. The impact of antisperm antibodies on human infertility. *J. Urol.*, 1987, **138**, 1-8.
35. CUNNINGHAM, D.S., FULGHAM, D.L., RAYL, D.L., et al. Antisperm antibodies to sperm surface antigens in women with genital tract infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1991, **164**, 791-796.
36. BRONSON, R., COOPER, G. a ROSENFELD, D. Sperm antibodies their role in infertility. *Fertil. Steril.*, 1984, **42**, 171-183.
37. CLARK, G.N., ELLIOTT, P.J. a SMAILA, C. Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: survey of 813 consecutive patients. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 1985, **7**, 118-123.
38. HENDRY, W.F. a STEDRONSKA, J. Mixed erythrocyte-spermatozoa antiglobulin reaction (MAR Test) for the detection of antibodies against spermatozoa in infertile males. *J. Obstet. Gynecol.*, 1980, **1**, 59-62.
39. JAGER, S., KREMER, J. a SLOCHTEREN-DRAAISMA, T.V. A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male. *Int. J. Fertil.*, 1978, **23**, 12-21.
40. FRIBERG, J. A simple and sensitive micro-method for demonstration of sperm agglutinating antibodies in serum from infertile men and women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.*, 1974, **36**, 21-29.
41. KREMER, J. a KROEKS, M.V. Modifications of the in vitro spermatozoal penetration test by means of the sperm penetration meter. *Acta Eur. Fertil.*, 1975, **6**, 377-380.
42. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., MRÁZ, L., PLÁNIČKOVÁ, E., et al. Local Hydrocortisone Treatment of Sperm Agglutinating Antibodies in Infertile Women. *Int. J. Fertil.*, 1988, **33**(6), 421 - 426.
43. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., MRÁZ, L., PLÁNIČKOVÁ, E., et al. Prognóza dalšího těhotenství po lokální imunosupresi hydrokortizonem. *Čes. Gynek.*, 1990, **1**, 41 - 44.
44. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., OPATRŇY, K.J., KRAUZ, V., et al. Plazmaferéza - léčebná metoda imunologické příčiny neplodnosti? *Čas. Lék. čes*, 1990, **129**(4), 104 -108.
45. SOFIKITIS, N., GIOTITSAS, N., TSOUNAPI, P., et al. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, **109**(3-5), 323-330.
46. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., KRAUZ, V., MOHAMED, A.M., et al. Immunity to spermatozoa and male fertility. *Andrologia*, 1999, **31**, 318-319.

47. VAN GESTEL, R.A., BREWIS, I.A., ASHTON, P.R., et al. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol. Hum. Reprod*, 2005, **11**, 583-590.
48. NAZ, R.K. Contraceptive vaccines. *Drugs*, 2005a, **65**, 593 -603.
49. SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, **228**(4705), 1315-1317.
50. NAZ, R.K. a RAJESH, C. Novel testisperm-specific contraceptive targets identified using gene knockout studies. *Front. Biosci.*, 2005a, **10**, 2430 -2446.
51. NOWICKA, K., KAMIENICZNA, M., CIBULKA, J., et al. Human sperm antigens recognized by antibodies obtained from IBT-positive and IBT-negative sera samples—proteomic analysis. *Journal of Reproductive Immunology*, 2011, **90**(2), 175.
52. BRÁZDOVÁ, A., ZÍDKOVÁ, J., SENECHAL, H., et al. Female serum immunoglobulins g, a, e and their immunological reactions to seminal fluid antigens. *Folia Biol.*, 2012, **58**(6), 251-255.

## 8 Přílohy

### 8.1 Publikační činnost autora

#### Impaktované časopisy

SEDLÁČKOVÁ, T., ZÍDKOVÁ, J., BRÁZDOVÁ, A., MELČOVÁ, M., ŠKOP, V., **CIBULKA, J.** a ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Protilátky proti spermiím. *Chem. Listy.*, 2010, **104**, 3-6. **IF 0.620** (2010 JCR Science Edition) 5-Year Impactor Factor 0.569

BRÁZDOVÁ, A., ZÍDKOVÁ, J., SENECHAL, H., PELTRE, G., **CIBULKA, J.** a ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Female serum immunoglobulins g, a, e and their immunological reactions to seminal fluid antigens. *Folia Biol.*, 2012, **58**(6), 251-255. **IF 1.151** (2011 JCR Science Edition) 5-Year Impactor Factor 1.183

KVERKA, M., ULCOVA-GALLOVA, Z., BARTOVA, J., **CIBULKA, J.**, BIBKOVA, K., MICANOVA, Z. a TLASKALOVA-HOGENOVA, H. Sperm cells induce distinct cytokine response in peripheral mononuclear cells from infertile

women with serum anti-sperm antibodies. PLoS One, 2012, **7**(8), e44172. **IF 4.092**  
(2012 JCR Science Edition) 5-Year Impactor Factor 4.537

### Recenzované časopisy

CIBULKA, J., ULCOVA-GALLOVA, Z., BABCOVA, K., KRAUZ, V., BALVIN, M., BIBKOVA, K., MICANOVA, Z. a ROKYTA, Z. [Electrophoretic analysis (SDS PAGE) of ovulatory cervical mucus in patients with fertility failure and after unsuccessful IVF]. Ceska Gynekol, 2005, **70**(5), 331-335.

CIBULKA, J., ULCOVA-GALLOVA, Z., BALVIN, M., BIBKOVA, K. a MICANOVA, Z. [Isolation and immunology identification of spermagglutinating antibodies from human serum]. Ceska Gynekol, 2009, **74**(3), 201-208.

### Konference – zahraničí (aktivní účast)

CIBULKA, J., BALVÍN, M., KONTROVÁ, K., ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., ZÍDKOVÁ, J., BIBKOVÁ, K. a MIČANOVÁ, Z. Human Sperm Antigen Panel for Immunoblotting Techniques. Abstr. book of International Congress of Andrology, Varna, Bulgaria, 2007, 108-111.

### Postery – mezinárodní konference

NOWICKA, K., KAMIENICZNA, M., **CIBULKA, J.**, ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. a KURPISZ, M. Human sperm antigens recognized by antibodies obtained from IBT-positive and IBT-negative sera samples—proteomic analysis. Abstr. book of 9.th Congress of European Society for Reproductive Immunology and European Society for Human Reproduction and Embryology Early Pregnancy Special Interest Group, Copenhagen, Denmark, 2011.  
v Journal of Reproductive Immunology, 2011, **90**(2), 175.

CIBULKA, J., ULCOVA-GALLOVA, Z., BABCOVA, K., KRAUZ, V., BALVIN, M., NOVAKOVA, P., BIBKOVA, K., MICANOVA, Z. a ROKYTA, Z. Electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of ovulatory cervical mucus in patients with IVF failure and with local sperm antibodies. . Abstr. book European Congress of Reproductive Immunology (ECRI), Pilsen, Czech Republic, 2004, abstr. p. 491.

### Konference – ČR (aktivní účast)

CIBULKA, J., ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., BALVÍN, M., KRAUZ, V., REISCHIG, J., BIBKOVÁ, K., MIČANOVÁ, Z. a ROKYTA, Z. Isolation and immunological identification of serum spermagglutinating antibody from infertile woman. Abstr. book XIth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 2005, 15.

CIBULKA, J., BALVÍN, M., KONTROVÁ, K., ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., ZÍDKOVÁ, J., BIBKOVÁ, K. a MICHNOVÁ, Z. Human Sperm Antigens for Immunoblotting. Abstr. book XIIth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 2006, 24.

CIBULKA, J., ZIMOLOVA, M., BALVIN, M., ULCOVA-GALLOVA, Z., ZIDKOVA, J., BIBKOVA, K. a MICANOVA, Z. Identification of Sperm Immunodominant Fractions by the Western Blotting Methods. Abstr. book XIII th Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 2007, 33.

CIBULKA, J. a ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Preparation of mixed antigens of human spermatozoa for immunoblotting-immunofluorescent study. Abstr. book XIVth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 2008, 37.

CIBULKA, J., KAMIENICZNA, M., ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z., BIBKOVÁ, K. a MIČANOVÁ, Z. Discrimination of the surface human spermatozoidal antigens by the method of biotin labeling. Abstr. book XVth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 2009, 24.

CIBULKA, J., MIČANOVÁ, Z., BIBKOVÁ, K. a ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Mapping of the human sperm surface antigens by antibodies from spermagglutinating human sera. Abstr. book XVIth Symposium of Czech Reproductive Immunologists with International Participation, Zdar nad Sazavou, 2010, 61.