UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Bakalářská práce

2017 Lucie Skácelová

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Imunologicky podmíněná neplodnost

Lucie Skácelová

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2014/2015**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Lucie Skácelová**
Osobní číslo:	**C12282**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Název tématu:	**Imunologicky podmíněná neplodnost**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Vypracujte literární rešerši na zadané téma, zaměřte se na popis jednotlivých imunologických příčin neplodnosti (např. autoprotilátky proti spermiím, antifosfolipidové protilátky, buňkami zprostředkované imunitní reakce), dále uveďte diagnostické postupy umožňující jejich odhalení (včetně stručného principu každé metody), a nakonec se zmiňte také o možnostech léčby imunologických poruch plodnosti.
Informace přehledně zpracujte, text doplňte vhodnými obrázky, tabulkami či grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o současném stavu studované problematiky.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **12. prosince 2014**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. července 2015**

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2015

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, která na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne ……..

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat paní Mgr. Barboře Jankovičové, Ph.D., za odborné vedení v průběhu vypracování bakalářské práce, za její čas a velkou ochotu a trpělivost, kterou se mnou projevovala.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá imunologicky podmíněnou neplodností a je vypracována formou literární rešerše. Začátek práce je věnován reprodukci a obecně neplodnosti jako takové. V druhé části jsou potom uvedeny příčiny imunologické neplodnosti zahrnující především různé typy specifických protilátek, popř. buněčné složky imunity. Nakonec jsou zmíněny jednotlivé způsoby diagnostiky a léčby tohoto typu onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

reprodukce, neplodnost, imunologicky podmíněná neplodnost, specifické protilátky

TITLE

Immunologically mediated infertility

ANNOTATION

My bachelor thesis deals with immunologically mediated infertility, and is elaborated in the form of literary research. The beginning of the work is dedicated to reproduction and generally to infertility as such. In the second part, there are presented the causes of immunological infertility, including especially the different types of specific antibodies, or cellular components of immunity, respectively. Finally, the different ways of diagnosis and treatment of this type of illness are mentioned.

KEYWORDS

reproduction, infertility, immunologically mediated infertility, specific antibodies

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ **7**

SEZNAM TABULEK **8**

SEZNAM ZKRATEK **9**

ÚVOD **11**

1 REPRODUKCE **12**

1.1 ŽENSKÝ REPRODUKČNÍ SYSTÉM 12

1.2 MUŽSKÝ REPRODUKČNÍ SYSTÉM 14

1.3 FYZIOLOGIE OPLOZENÍ A TĚHOTENSTVÍ 15

2 NEPLODNOST **18**

2.1 ROZDĚLENÍ NEPLODNOSTI 18

2.2 RIZIKOVÉ FAKTORY NEPLODNOSTI 19

2.3 IMUNOLOGICKÁ NEPLODNOST 19

2.4 IMUNOLOGICKÁ NEPLODNOST U MUŽŮ 20

2.4.1 Protilátky shlukující spermie *21*

2.4.2 Protilátky znemožňující pohyb spermií *22*

2.4.3 Protilátky poškozující spermi *23*

2.5 IMUNOLOGICKÁ NEPLODNOST U ŽEN 24

2.5.1 Protilátky proti spermiím *25*

2.5.2 Protilátky proti zona pellucida *27*

2.5.3 Protilátky proti ovariím *28*

2.5.4 Protilátky proti annexinu V *28*

2.5.5 Protilátky proti plodu *29*

2.5.6 Antifosfolipidové protilátky *29*

2.5.7 Antinukleární protilátky *30*

2.5.8 Buňkami zprostředkovaná imunologická zábrana nidace *30*

3 DIAGNOSTIKA IMUNOLOGICKÉ NEPLODNOSTI **31**

3.1 ZÁKLADNÍ VYŠETŘENÍ DIAGNOSTIKUJÍCÍ NEPLODNOST U ŽEN 32

3.2 ZÁKLADNÍ VYŠETŘENÍ DIAGNOSTIKUJÍCÍ NEPLODNOST U MUŽŮ 36

3.3 VYŠETŘENÍ SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK 40

3.3.1 Test podle Kremera *40*

3.3.2 Mikroaglutinační test *41*

3.3.3 ELISA *41*

3.3.4 Postkoitální test *41*

3.3.5 Test smíšené aglutinační reakce *41*

3.3.6 Immunobead test *42*

3.4 VYŠETŘENÍ BUNĚČNÉ IMUNITY 43

4 LÉČBA IMUNOLOGICKÉ NEPLODNOSTI 44

4.1 NITRODĚLOŽNÍ INSEMINACE 44

4.2 MIMOTĚLNÍ OPLODNĚNÍ 45

4.3 IMUNOTERAPIE 47

5 ZÁVĚR 50

6 POUŽITÁ LITERATURA 51

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Ženská pohlavní soustava 14

Obrázek 2: Struktura spermie…...……...……14

Obrázek 3: Spermatogeneze……...…….……16

Obrázek 4: Shlukování spermií hlavičkami v přítomnosti spermaglutinačních protilátek…..23

Obrázek 5: Pohyb spermií: (A) správná pohyblivost – spermie se pohybuje dopředu, (B) abnormální pohyblivost – spermie se pohybuje v kruhu…….……24

Obrázek 6: Akrozomální reakce……...……...……25

Obrázek 7: Vajíčko……...……...……29

Obrázek 8: Ultrazvukové vyšetření malé pánve: (A) klasický transvaginální ultrazvuk, (B) barevné Dopllerovo barvení …….…...……..…….34

Obrázek 9: Hysterosalpingografie……...……36

Obrázek 10: Hysteroskopie……...…..…….……37

Obrázek 11: Laparoskopie……..……..…….…..38

Obrázek 12: Genetické vyšetření: (A) fyziologický ženský karyotyp, (B) balancovaná reciproká translokace mezi chromozomy 5 a 6 (znázorněné šipkami), tento karyotyp byl diagnostikován u ženy s opakovanými spontánními aborty…….…….39

Obrázek 13: Maklerova komůrka používaná k počítání spermií ve vzorcích spermatu ….…41

Obrázek 14: Spermiogram – preparát umístěný v počítací komůrce – jedná se o fyziologický spermiogram, nejsou vidět žádné patologie spermatu……...……..42

Obrázek 15: Immunobead test – metoda umožňující zjistit typ a lokalizaci protilátek proti spermiím, např. na hlavičce spermií……..….46

Obrázek 16: Nitroděložní inseminace…….48

Obrázek 17: Vývoj embryí na Petriho misce po oplodnění: (A) oplozené vajíčko, (B) oplozené vajíčko se dvěma prvojádry a dvěma pólovými tělísky…….....……49

Obrázek 18: Postup *in vitro* fertilizace…….50

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Přehled nejčastějších příčin neplodnosti na straně muže a ženy……..……18

Tabulka 2: Přehled hormonů stanovovaných v rámci diagnostiky ženské neplodnosti – FSH – folikuly stimulující hormon, LH – luteinizační hormon, E2 – estradiol, DHEAS - dehydroepiandrosteron sulfát, SHBG –globulin vázající pohlavní hormony, TSH – thyreotropin, T3 – trijodtyronin, T4 – thyroxin, TRH – thyreotropin uvolňující hormon……...35

Tabulka 3: Fyziologické hodnoty spermiogramu – přesné údaje převzaty od WHO, vlastní zpracování……...……...…….40

Tabulka 4: Nomenklatura parametrů ejakulátu …….…….42

Seznam zkratek:

ANA	Antinukleární protilátky
AMH	Anti-Mülleriánský hormon
APA	Antifosfolipidové protilátky
C3	C3 složka komplementu
CD 69,101,94	Diferenciační antigen 69,101,94 (z angl. cluster of differentiation)
DHEAS	Dehydroepiandrosteron sulfát
E2	Estradiol
ELISA	Enzymová imunosorbentní analýza (z angl. enzyme – linked immunosorbent assay)
FSH	Folikulostimulační hormon
GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GSF-1	Kolonie stimulující faktor 1
fT4	Volný thyroxin
IBT	Immunobead test
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermie
IgA	Imunoglobulin A
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IUI	Nitroděložní inseminace
IL-3	Interleukin 3
IVF	*In vitro* fertilizace
KIR	Imunoglobulinový receptor zabíječů buněk (z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptor)
LH	Luteinizační hormon
NK	Přirození zabíječi (z angl. natural killers)
MAR test	Test smíšené aglutinace (z angl. mixed agglutination reaction)
PRL	Prolaktin
RTG	Rentgenové vyšetření
SHBG	Globulin vázající pohlavní hormony
T3	Trijodtyronin
T4	Thyroxin
TSH	Thyreotropin

TRH	Thyreotropin uvolňující hormon
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZP 1,2,3	Glykoproteiny zona pellucida 1,2,3

Úvod

Neplodnost je definována jako neschopnost páru dosáhnout početí během jednoho roku nechráněného pohlavního styku či neschopnost ženy udržet těhotenství až do termínu porodu. U žen nad 35 let se za neplodnost považuje neschopnost otěhotnění do půl roku.

Jedná se o závažný celosvětový problém, který je v současné době poměrně frekventovaný. Příčiny neplodnosti jsou různé a bývají ze 40 % na straně ženy a ze 40 % na straně muže, 10 % případů je způsobeno kombinací faktorů u obou partnerů. U 10 % případů pak zatím nelze příčinu jednoznačně stanovit [1]. V České republice se neplodnost týká zhruba 20 % párů [2].

Cílem této bakalářské práce je vytvoření literární rešerše o imunologicky podmíněné neplodnosti se zaměřením na popis jednotlivých imunologických příčin neplodnosti jak na straně ženy, tak na straně muže. Zahrnuta je dále také specifikace diagnostických postupů umožňujících odhalení imunologických poruch plodnosti a možnosti jejich léčby.

1. Reprodukce

Jedním ze základních životních projevů organizmu je schopnost rozmnožování (tj. reprodukce). Jedná se o proces tvorby potomstva kombinací dvou typů pohlavních buněk (tzv. gamet). Pohlavní buňky se vytvářejí v gonádách (varlatech a vaječnících), tj. specializovaných orgánech reprodukčního systému. Varlata tvoří spermie (proces spermatogeneze) a produkují pohlavní hormony (steroidogeneze). Základním hormonem mužského reprodukčního systému je testosteron. Ženský reprodukční systém mimo tvorby pohlavních buněk, tj. vajíček (oogeneze), a steroidogeneze, zajišťuje vývoj nového jedince. Ve vaječnících se tvoří dva hlavní typy pohlavních hormonů, estradiol a progesteron [3].

Po narození jsou gonády v klidu. Zahájení činnosti reprodukčního systému v období puberty předchází adrenarche, tj. zahájení tvorby androgenů v nadledvinkách. U obou pohlaví řídí produkci pohlavních hormonů v gonádách hypotalamo-hypofyzární osy, jejichž aktivace nastává až v pubertě. Nutnou podmínkou pro zahájení činnosti hypotalamo-hypofyzární osy je určitá vyzrálost neuronů, což může být dáno např. expresí receptorů pro jednotlivé hormony, které se podílejí na regulaci činnosti této osy. Vytvořené pohlavní hormony se podílejí nejen na řízení gametogeneze, ale také na regulaci nejrůznějších funkcí v organizmu – od růstu tkání až po produkci červených krvinek a změny chování.

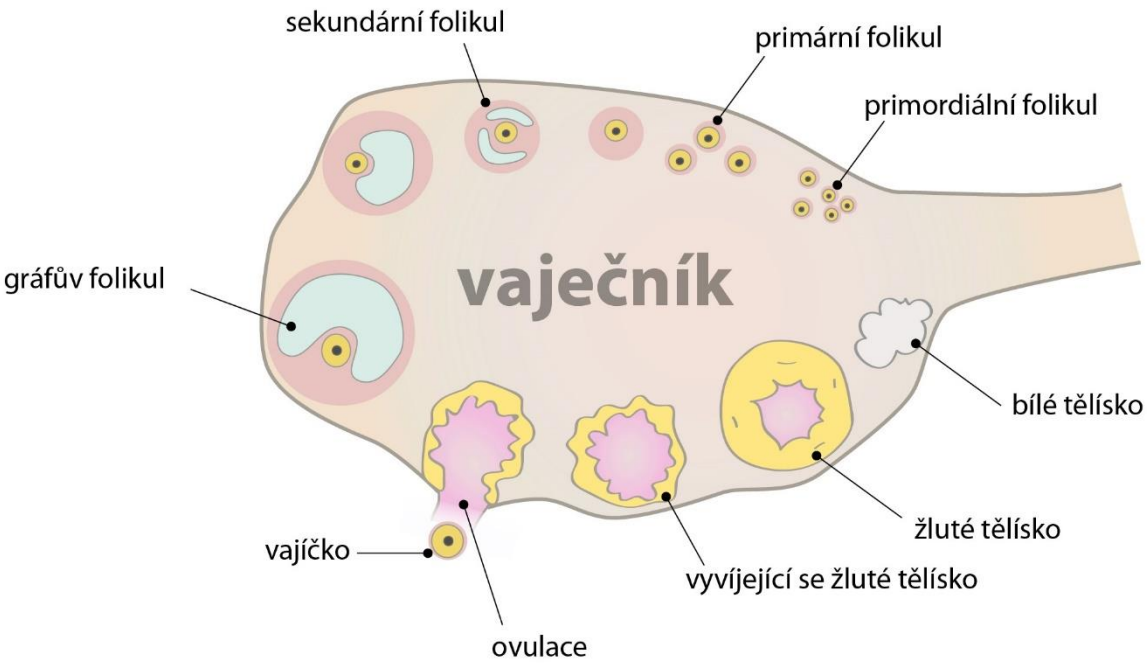
U mužů zůstává činnost reprodukčního systému zachována od puberty po celý život, u žen kolem 50 let ustává a nastupuje období menopauzy [4].

1.1 Ženský reprodukční systém

Ženské pohlavní buňky (tj. vajíčka, oocyty) se tvoří v kůře vaječníků (tj. ovarií) ze zárodečných buněk (tzv. oogonií). Počet oogonií, na rozdíl od spermatogonií, je konečný. Zahájení vývoje vajíčka ve vaječníku (tzv. oogeneze) nastává v primordiálních folikulech mezi 8. – 13. týdnem nitroděložního života, kdy buňky podléhají první fázi prvního redukčního dělení. Další vývoj pokračuje až v pubertě před první ovulací. Jeden z rostoucích folikulů se během folikulární fáze menstruačního cyklu stává dominantním, ostatní podléhají apoptóze. Rostoucí folikul má několik stádií vývoje – primární (jednovrstevný, mnohovrstevný) a sekundární (antrální). S postupným vyzráváním folikulů dochází ke změnám – oocyt se zvětšuje, proliferující folikulární buňky se diferencují a vytvářejí několik vrstev (zona granulosa, theca interna, theca externa), mezi oocytem a folikulárními buňkami se formuje tlustý obal – zona pelucida a vytváří se dutinka vyplněná tekutinou obklopující vajíčko.

Folikulární buňky vajíčko chrání, vyživují a jsou zdrojem estrogenů. Asi 14. den menstruačního cyklu dochází k ovulaci, tzn. že vyzrálý folikul (tzv. Graafův folikul) praská a vypuzené vajíčko je zachyceno v dutině břišní fimbriemi vejcovodu. Po vypuzení z folikulu žije vajíčko asi 70 hodin, ale schopnost oplodnění většinou ztrácí po několika hodinách. Pokud není vajíčko oplodněno, vychází pochvou z těla ven při menstruaci. Během reprodukčního života ženy se uvolní pouze 450 - 500 vajíček, na rozdíl od reprodukčního systému muže, u kterého spermatogeneze probíhá od puberty až do konce života [5].

Prasklý folikul se plní krví a tvoří corpus haemorrhagicum. V buňkách folikulu se postupně hromadí tuk a díky žlutému zabarvení se nazývá „žluté tělísko“ (corpus luteum). Je zdrojem hormonů (estrogenů a progesteronu). Pokud bylo vajíčko oplodněno a dále se vyvíjí, žluté tělísko přetrvává a je zdrojem hormonů do doby, než se vyvine placenta. Pokud vajíčko oplodněno nebylo, buňky tělíska degenerují a jsou nahrazeny vazivem, vzniká „bílé tělísko“ (corpus albicans) (Obrázek č. 1) [6].



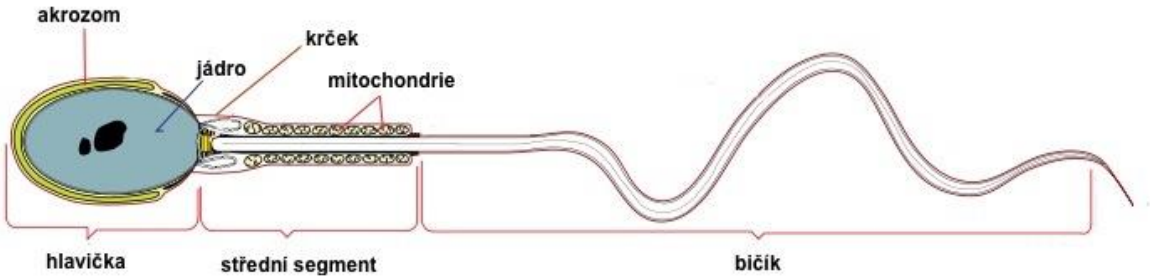
Obrázek č. 1 - Vývoj vajíčka ve vaječníku (tzv. oogeneze) [7].

Pohlavní buňky dokončují první redukční dělení před ovulací. Druhé redukční dělení je zahájeno těsně před prasknutím Graafova folikulu, zastavuje se v metafázi a dokončí se jen v případě, že dojde k oplození. Výsledkem vývoje je zralé lidské vajíčko (ovum), což je kulatá buňka velikosti 100–150 μm, která má ve svém jádře poloviční, tj. haploidní počet chromozomů

– 22 somatických a 1 pohlavní X chromozom. Zrání vajíčka je tedy proces, který je dokončen až po oplození, tzn. může dojít k oplození až 40–45 let „starého vajíčka“. Během tak dlouhého období je proto možné poškození genetické výbavy vajíčka nejrozmanitějšími vlivy prostředí – zářením, chemickými látkami, viry, léky atd. [4].

1.2 Mužský reprodukční systém

Reprodukční systém muže produkuje pohlavní buňky – spermie, tvoří a vylučuje pohlavní hormony a umožňuje pohlavní spojení. Spermie (Obrázek č. 2) se tvoří v semenotvorných kanálcích varlat.



Obrázek č. 2 – Struktura spermie [8].

Varlata jsou uložena mimo břišní dutinu v šourku, kam však musí sestoupit ještě před narozením. Pokud k tomu nedojde, mluvíme o tzv. kryptorchizmu. V takovém případě u chlapců vůbec nedojde k pubertě, mají zakrnělé pohlavní orgány, a nedochází k produkci spermií ani pohlavních hormonů. Tyto změny jsou ireverzibilní. Proto se u novorozenců, jimž nesestoupila varlata, provádí chirurgický zákrok, který tento stav napraví. Důvod, proč v nesestouplých varlatech neprobíhá spermatogeneze, je jednoduchý, spermie se mohou tvořit jen za teploty o 3–4 °C nižší, než je tělesná teplota v dutině břišní [9].

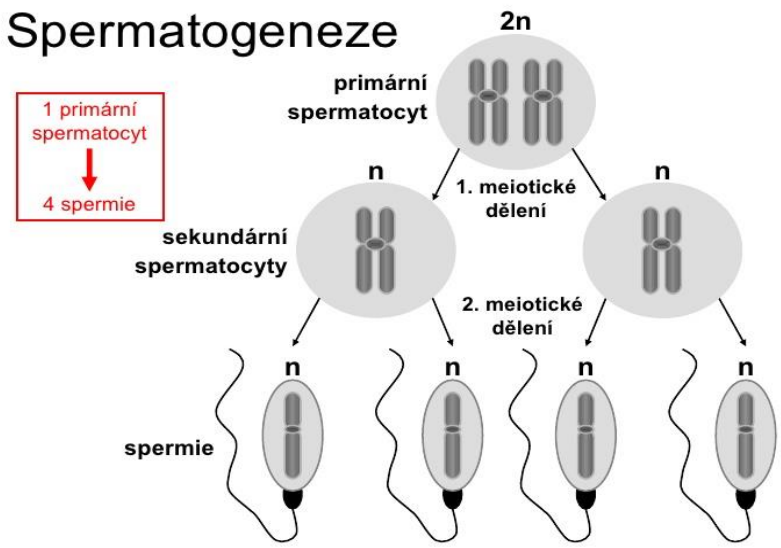
Celý proces spermatogeneze trvá asi 70 dní. Během této doby se z buňky zárodečného epitelu (spermiogonie) vytvářejí dělením spermatocyty, spermatidy a konečné spermie. Během tohoto procesu probíhají následující děje:

1. Dozrávání morfologie spermie do definitivní podoby. Vytvoří se bičík, krček, hlava nesoucí chromozomy a akrozom.

2. Redukce počtu chromozomů (redukční dělení = meióza). Z plného počtu chromozomů zárodečné buňky (46) zůstane ve zralé spermii jen polovina, tj. 22 somatických a 1 pohlavní chromozom X nebo Y.

Pohyb spermie se uskutečňuje bičíkem rychlostí asi 1–4 mm za minutu. Přitom silně závisí na prostředí, ve kterém se spermie pohybuje [9].

Spermatogeneze (Obrázek č. 3) probíhá v tzv. Sertoliho buňkách. Tyto buňky poskytují zrajícím spermiím nezbytnou výživu a chrání je před případnými nepříznivými vlivy. Plní tedy funkci jakési bariéry. Pro správný průběh spermatogeneze je důležitý i dostatek některých vitamínů (např. vitamínu E). Nezbytná je i nižší teplota varlat. Vyšší teplota prostředí, radiační záření, či některé jedy silně poškozují spermatogenezi. Spermatogeneze je proces řízený hormonálně. Testosteron (mužský pohlavní hormon steroidní povahy) je produkován v Leydigových buňkách varlat, které jsou pod vlivem hypofyzárního gonadotropinu LH (luteinizační hormon). Sertoliho buňky jsou zase řízeny gonadotropinem FSH (folikulostimulační hormon) [3].



Obrázek č. 3 – Schéma spermatogeneze [10].

1.3 Fyziologie oplození a těhotenství

Předpokladem vzniku nového jedince pohlavním rozmnožováním je prioritně spojení dvou gamet (tj. pohlavních buněk) opačného pohlaví za vzniku oplodněného vajíčka.

K oplodnění vajíčka dochází obvykle již ve vejcovodu. V oplodněném vajíčku splývají buněčná jádra spermie a vajíčka a vzniká plnohodnotná diploidní buňka disponující standardním počtem 23 párů chromozomů.

Okamžikem úspěšného spojení dvou gamet (vajíčka a spermie) začíná období (272–280 dnů, 40 týdnů) těhotenství, během kterého se bude při fyziologickém průběhu vyvíjet oplozené vajíčko v nového jedince. Během tohoto období prodělává oplodněné vajíčko doslova bouřlivý vývoj, na jehož konci je porod nového člověka, jehož genotyp je složen z genetických informací uložených ve dvou gametách, které se při oplodnění vajíčka spojily. Pohlaví budoucího jedince určuje pohlavní chromozom obsažený ve spermii (X – určuje ženské pohlaví, Y – určuje mužské pohlaví). Neméně bouřlivý průběh mají i změny, které v průběhu těhotenství prodělává organizmus matky.

Období těhotenství dělíme na 3 fáze – trimestry. Pro období prvního trimestru jsou typické tyto změny:

1. Ve vajíčku probíhají ihned po oplodnění buněčné změny. Vajíčko se v této době nachází ještě obvykle ve vejcovodu a jeho výživa je zajištěna ze žloutkového vaku vajíčka. Vajíčko obsahuje dvě prvojádra, která splynou, takže máme již buňku. Tato buňka se počíná dělit na buňky dceřiné. Oplozené vajíčko dále putuje vejcovodem po dobu cca 3–5 dnů, což je umožněno aktivním pohybem řasinek sliznice vejcovodu.
2. Organizmus matky prodělává hormonální změny (žluté tělísko produkuje v proliferační fázi hormon progesteron, který připravuje sliznici dělohy na přijetí vajíčka a jeho další zrání).
3. Vajíčko dorazí po 3–5 dnech od oplození do dělohy. Během své cesty v něm proběhlo již několik fází buněčného dělení, takže jde již o vícebuněčný organizmus (tzv. blastulu). Během 1. trimestru je největší riziko vzniku závažných genetických malformací vlivem nejrůznějších vnějších a vnitřních faktorů.
4. Děložní sliznice je díky hormonální modulaci kyprá a připravená k uložení vajíčka (tzv. sekreční fáze) a k zajištění jeho výživy.
5. Buňky dělohy se začínají spojovat s obalem blastuly a vzniká základ tzv. placenty, která bude během těhotenství tvořit spojovací a přechodný systém mezi matkou a dítětem. Placenta má tři důležité funkce – ochrannou, sekretorickou a zajišťuje výživu.

První trimestr je provázen riziky jak pro matku spojenými s oplodněním, nidací vajíčka v děloze, tvorbou placenty, aj., tak pro plod. Jde o období formování základů jednotlivých orgánů

dítěte – v tomto období je vysoké riziko vzniku těžkých mutací. Další 2 trimestry již nepředstavují pro plod ani matku velké nebezpečí [4].

Ve druhém trimestru dochází k vývoji plodu a dochází k růstu a dozrávání orgánů. V tomto období již funguje placenta, která zprostředkovává výživu plodu z mateřské krve, ale působí i jako nepropustná bariéra pro mnoho škodlivých látek.

Během 3. trimestru plod nabývá na váze, zpevňují se mu kosti a začínají se často projevovat pohyby. Začínají se vyvíjet smysly a plod sestupuje do pánve [9].

2. Neplodnost

Neplodnost je nemoc reprodukčního systému. U člověka ovšem nedochází k otěhotnění snadno ani v situaci, že oba partneři jsou zcela zdraví. Pravděpodobnost dosažení těhotenství u ženy není ani za optimálních podmínek vyšší než 25 % v každém měsíci snažení [1]. K oplodnění dochází, pouze pokud muž produkuje zdravé spermie a z vaječníku ženy se při ovulaci uvolňuje vajíčko schopné oplození. Po oplození vajíčka musí dojít k jeho uhnízdění v děložní sliznici. V souvislosti s neplodností může porucha biologických pochodů nastat v kterékoli části oplodnění. Nalézt a odstranit příčinu může být velmi jednoduché, ale v některých případech také velmi obtížné až nemožné.

2.1 Rozdělení neplodnosti

Neplodnost se podle Světové zdravotnické organizace (WHO) dělí na primární, sekundární a idiopatickou.

Primární neplodnost znamená, že žena nebyla nikdy těhotná a páru se nedaří otěhotnět po dobu minimálně jednoho roku při pravidelném nechráněném pohlavním styku.

Sekundární neplodnost znamená, že žena již byla těhotná, ale páru se nedaří opětovné otěhotnění po dobu minimálně jednoho roku při pravidelném nechráněném pohlavním styku. Za primární a sekundární neplodnost obvykle mohou různé fyzické příčiny (Tabulka č. 1), z nichž jednu kategorii představují právě imunologické příčiny neplodnosti, které jsou předmětem této práce a budou podrobně popsány v následujících kapitolách.

Tabulka č. 1- Přehled nejčastějších příčin neplodnosti na straně ženy a muže [11].

Příčiny neplodnosti u ženy	Příčiny neplodnosti u muže
• Poškození nebo ucpání vejcovodů • Hormonální problémy • Endometrióza • Hustý cervikální hlen • Imunologická rejekce spermatu • Problémy s uhnízděním oplodněného vajíčka • Chromozomální / genetické příčiny • Předčasná menopauza	• Pokles kvality spermatu • Chromozomální / genetické příčiny • Autoimunita k vlastním spermiím • Poškozená DNA spermií • Epididymální blokáda chámovodů • Koitální problémy • Vazektomie • Léky ovlivňující kvalitu spermií

Idiopatická neboli neobjasněná neplodnost je stanovena až po vyloučení všech ostatních příčin neplodnosti. Páru s diagnózou idiopatické neplodnosti je obvykle doporučeno umělé oplodnění [12].

2.2 Rizikové faktory neplodnosti

Rizikovým faktorem neplodnosti u žen je především věk nad 35 let, protože na rozdíl od mužů plodnost ženy klesá v závislosti na věku. Nejvhodnějším obdobím pro otěhotnění je u žen věk 22–30 let. Dále pak plodnost u žen ovlivňují poruchy menstruace a ovulace, časté záněty pohlavních orgánů, neprůchodnost vejcovodů, hormonální nerovnováha, poruchy imunitního systému, genetické vady, menopauza ale i životní styl (např. kouření, nadměrná konzumace alkoholu, užívání drog a léků).

Mezi rizikové faktory neplodnosti u mužů patří například opožděný sestup varlat do šourku při narození, vrozená vývojová vada pohlavního ústrojí, skrytá hormonální porucha, infekční onemocněn pohlavního ústrojí, úraz šourku, prodělaná operace v oblasti šourku nebo genetická vada [3].

2.3 Imunologická neplodnost

Jak již bylo uvedeno neplodnost má mnoho příčin a jednou z nich je i sám imunitní systém, který chrání organizmus před vnějšími škodlivými vlivy. Měl by být schopen rozeznávat cizí částice a účinně je likvidovat a na druhé straně rozpoznávat tkáně vlastního těla a tolerovat je. Při selhání těchto mechanizmů vznikají autoimunitní onemocnění, při nichž jsou různé orgány poškozovány vlastním imunitním systémem.

Některé imunologicky výjimečné orgány jsou chráněny speciální bariérou, aby se k nim buňky imunitního systému vůbec nedostaly. Takovýmto orgánům se říká imunologicky privilegované orgány a patří mezi ně například děloha nebo varle. Ve varleti nedochází k přímé imunologické reakci díky jeho uložení mimo přímý krevní kontakt a omezené mízní drenáži. Chránění dělohy před imunitním systémem je důležité pro reprodukci, protože plod je vnímán jako hemialogenní aloštěp s polovinou transplantačních antigenů získaných od otce [6]. Proto můžeme říci, že těhotenství je imunologicky podmíněný stav. Imunitní systém v tomto případě toleruje nevlastní – cizí. To znamená, že za fyziologických podmínek je mimo jiné v průběhu celého těhotenství snížený počet a funkce imunokompetentních buněk [12].

Imunologická neplodnost vzniká poškozením anebo nefunkčností přirozených bariér v těle muže anebo ženy. Tímto problémem se zabývá reprodukční imunologie, která je v patologickém smyslu slova souborem imunitních reakcí organizmu namířených proti reprodukčním tkáním, reprodukčním buňkám nebo jejich strukturám, případně proti jiným tkáním, buňkám nebo jejich strukturám, které se podílejí nepřímo na procesech souvisejících s plodností (tj. oplodnění, donošení a porod živého a zdravého dítěte). Nejčastěji dochází k útoku imunitního systému proti spermiím, tkáním samotného vajíčka nebo může docházet k narušení spojení vajíčka a spermie při oplodnění. Současně tím může být negativně ovlivněn vývoj zárodku. Až 20 % všech případů neplodnosti může být v souvislosti s poruchami imunitního systému nějakého druhu [12].

Imunologická porucha se může týkat jak buněčné, tak humorální imunity. U poruch buněčné imunity se jedná především o sníženou imunologickou toleranci a výskyt embryocytotoxických cytokinů (CSF-1, GM-CSF, IL-3). Mezi nejčastější humorální příčiny imunologické neplodnosti patří tvorba specifických protilátek. Protilátky mohou vytvářet muži i ženy. Podle posledních výzkumů se rozlišuje až 450 podob těchto protilátek [3], jedná se např. o protilátky proti spermiím, proti zona pellucida, antifosfolipidové protilátky, aj.

2.4 Imunologická neplodnost u mužů

Spermie jsou organizmem rozeznávány jako „cizí“ z důvodu poloviního počtu chromozomů. Pokud se tedy spermie dostane do kontaktu s krví, může dojít k imunitní odpovědi a produkci protilátek proti ní. Spermatogeneze proto probíhá ve varlatech, kde je oddělena hematotestikulární bariérou. Hematotestikulární bariéra je specializovaná buněčná bariéra mezi krví a vyvíjejícími se spermatogenními buňkami v semenotvorných kanálcích varlat. Bariéra chrání zárodečné buňky před toxickými látkami obsaženými v krvi a zároveň vytváří imunologickou bariéru. Imunologická bariéra brání kontaktu imunitního systému s diferencujícími se spermiemi a zabraňuje tak autoimunitní reakci [12].

Imunologická neplodnost u mužů je nejčastěji způsobena porušením této speciální bariéry. To se může stát například vlivem úrazu, zánětu nebo po prodělaném nádorovém onemocnění varlat. Imunitní buňky se tak dostanou ke tkáním, které doposud neznaly a začnou na ně útočit jako na cizí. Vytvářejí protilátky a ty se vážou na spermie. Cílem protilátek jsou specifické antigenní znaky, které se vyskytují jak na hlavičce, krčku, tak i bičíku spermie.

Takto označené spermie se hůře pohybují, takže často ani neprojdou přes hlen v krčku dělohy nebo mohou mít potíže při průniku do vajíčka [9]. Protilátky proti spermiím nenavázané na spermiích prokážeme v tekuté složce ejakulátu nebo v krevním séru. Obecně se hodnotí v jednotlivých imunoglobulinových třídách: v ejakulátu jsou nejčastější protilátky třídy IgG, které nalézáme také v krvi, IgA jsou přítomné v semenné plazmě. Ojediněle můžeme nacházet i protilátky IgE. V sérech poté nejčastěji IgG a IgM [13].

Vybrané druhy protilátek proti spermiím jsou uvedeny v následujících kapitolách.

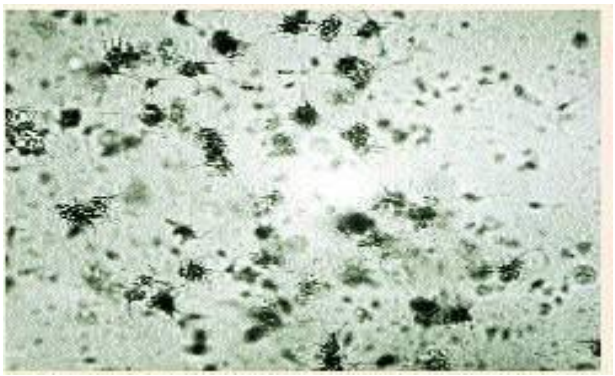
2.4.1 Protilátky shlukující spermie

V roce 1954 Holanďan Rumke prokázal v séru dvou mužů se sníženým počtem spermií v ejakulátu protilátky proti spermiím. Způsobovaly shlukování spermií, tzv. spermaglutinaci, a tento jev se tak stal jedním ze základních vyšetření mužů u neplodného páru [12].

Spermaglutinační protilátky lze prokázat přímo nenavázané na spermiích v tekuté složce ejakulátu. Cílem jsou antigenní znaky, které se vyskytují jak na hlavičce, krčku, tak i bičíku spermie. Z imunologického hlediska je plodnost muže snížená tím více, čím vyšší je koncentrace nežádoucích protilátek a čím větší množství spermií je jimi povlečeno [6].

U této nejčastější poruchy můžeme pozorovat spermie shluklé právě hlavičkami, krčky nebo bičíky. Shluky nejsou schopné normálního pohybu, tudíž jejich omezený kývavý pohyb neumožňuje spermiím cestu do ženského ústrojí [13].

Nejčastějším typem protilátek proti spermiím v České republice jsou ty, které shlukují spermie hlavičkami (viz Obrázek č. 4).



Obrázek č. 4 – Shlukování spermií hlavičkami v přítomnosti spermaglutinačních protilátek (mikroskopický preparát) [14].

2.4.2 Protilátky znemožňující pohyb spermií

Tyto protilátky se označují také jako spermiomobilizační protilátky a jejich nález převládá u mužů v Japonsku, Malajsii a Číně [6]. Spermie, které mají navázané tyto protilátky na většině svého povrchu, nejsou schopné proniknout do hlenu děložního hrdla. Muži, kteří mají vysokou úroveň autoimunity k vlastním spermiím, což odráží podíl protilátkami potažených spermií v jejich ejakulátu, jsou funkčně oligospermičtí. Jejich spermie nemohou vstoupit do reprodukčního traktu ženy a šance, že dosáhnou vajíčka, je snížena [12].

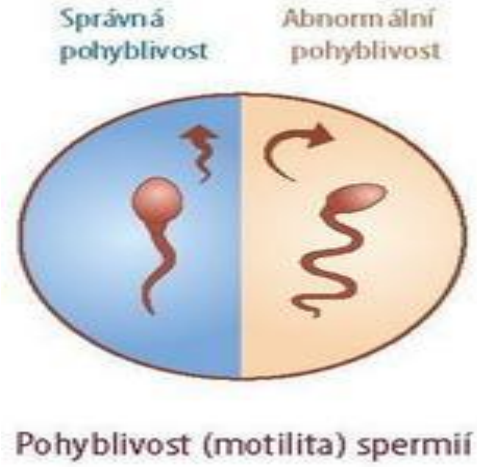
Studie zabývající se schopností spermií proniknout do cervikálního hlenu prokázala, že tato schopnost je výrazně snížena u protilátek (především třídy IgA) namířených proti hlavičce spermií. Oproti tomu u vazby protilátek IgG a IgA na špičku bičíku nebyl prokázán vliv na schopnost spermií pronikat do cervikálního hlenu [15].

Při působení protilátek znemožňujících pohyb spermií je zapojen i další imunologický faktor a to komplement [16]. Komplement je soubor asi 40 sérových a membránových glykoproteinů, které se můžou vázat na komplex antigen – protilátka na povrchu buňky a způsobit lýzu buňky. Komplement slouží jako složka nespecifické humorální imunity.

Podle WHO se pohyblivost (motilita) spermií rozděluje do čtyř kategorií:

a) rychle postupující, rychle se pohybující dopředu,
b) pomalu postupující, pomalu se pohybující,
c) nepostupující, jen lokální pohyblivost (plavou v kruhu),
d) nepohybující se – žádný pohyb.

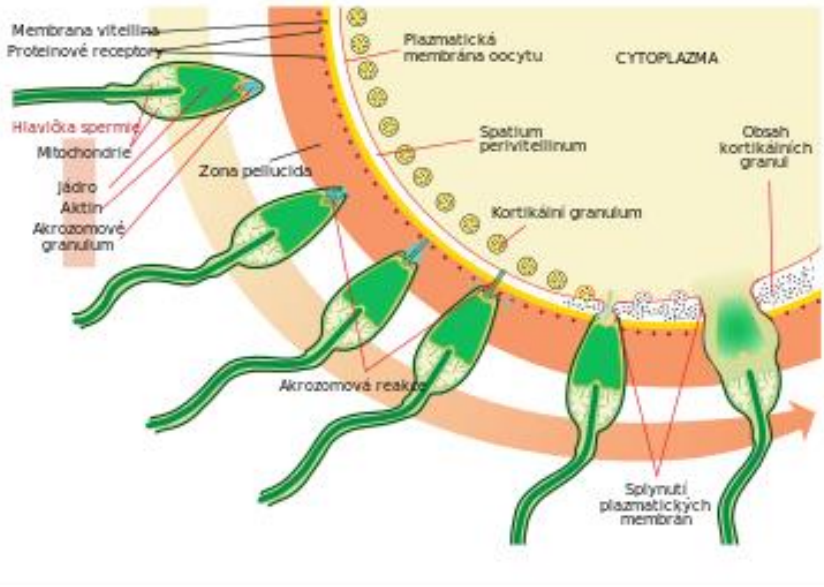
Pohyblivost spermií se považuje za normální (viz Obrázek č. 5), když je více než 25 % rychle se pohybujících spermií (kategorie a) nebo minimálně 50 % pohybujících se spermií (kategorie a + b) [17].



Obrázek č. 5 – Pohyb spermií – správná pohyblivost – spermie se pohybuje dopředu (vlevo), abnormální pohyblivost – spermie se pohybuje v kruhu (vpravo) [18].

2.4.3 Protilátky poškozující spermie

Protilátky poškozující spermie nebo také spermatotoxické protilátky jsou namířeny především proti enzymatickému aparátu části hlavičky spermií, které se říká akrozom. Nález těchto protilátek není častý u Evropských mužů. Spermatotoxické protilátky zabraňují akrozomální reakci (viz Obrázek č. 6), která nastává po vhodném stimulu (tj. kontakt spermie se zonou pellucidou), kdy dochází ke splynutí vnější akrozomální membrány spermie a vajíčka. Obsah akrozomu se uvolní ven a začne enzymaticky štěpit zonu pellucidu. Receptory na vnitřní akrozomální membráně pomáhají udržet spermii přichycenou na zoně pellucidě, zatímco pohyby bičíku pomáhají postupně pronikat do vajíčka [17].



Obrázek č. 6 – Akrozomální reakce [19].

Výzkumy, kdy byly spermie *in vitro* inkubovány se seminální plazmou mužů nebo s hlenem děložního hrdla žen, u kterých byly prokázány spermatotoxické protilátky, prokázaly výrazně sníženou pohyblivost a přežití spermií [20].

2.5 Imunologická neplodnost u žen

Reakce imunitního systému ženy nemusí být namířena pouze proti cizorodým mužským spermiím. Stejně jako se u mužů setkáváme s autoimunitní reakcí vůči vlastním spermiím, může nastat podobná situace u žen, kdy dochází k tvorbě protilátek namířených proti částem vaječníků, cytoplazmě oocytu, žlutému tělísku nebo proti zona pellucida.

Imunitní systém ženy vnímá povrchové znaky oocytu jako vlastní, protože jejich dozrávání je již v době pohlavní diferenciace embrya. Neplatí to však pro další struktury ovaria (zrající folikuly, hormonálně aktivní buňky), které se objevují až v období kolem puberty. Proti nim může vzniknout autoimunita se všemi důsledky pro další vývoj a funkci ovaria.

Další příčinou pak může být tvorba protilátek proti buňkám, které přirozeně obklopují a chrání vyvíjející se vajíčko. Častěji k tomu dochází po opakovaných odběrech vajíček pro *in vitro* fertilizaci (IVF), pravděpodobně vinou mikrotraumat a sterilního zánětu. To je podobná situace jako u muže, kdy je porušena bariéra a imunitní systém se setkává s buňkami, které

doposud neznal. Navázané protilátky tak mohou bránit spermiím v průniku do vajíčka, což pak v řadě případů komplikuje následné otěhotnění [6].

Jednotlivé příčiny imunologické neplodnosti u žen jsou podrobněji popsány v následujícím textu.

2.5.1 Protilátky proti spermiím

Protilátky proti spermiím jsou nejdéle známou imunologickou příčinou poruch plodnosti u žen. Spermie jsou pro ženu antigenně i geneticky zcela cizí. Při normálním fyziologickém pohlavním styku se vyskytuje v blízkosti hrdla děložního asi 200–500 miliónů spermií. Přestože jsou ženy pravidelně vystavovány intravaginálně spermiím během pohlavního styku, nedochází proti nim obvykle k vývoji imunologické reakce. V seminální plazmě byly zjištěny imuno – inhibiční látky, které chrání spermie před imunologickým poškozením a bránírozvoji citlivosti žen k antigenům spermií po pohlavním styku [21].

„Přecitlivělý“ reprodukční trakt ženy je však schopný už při prvním setkání se spermiemi vytvořit protilátky, které zpočátku bývají zjistitelné pouze v hlenu hrdla děložního. Jestliže je žena opakovaně imunizována stykem s antigeny spermií jednoho nebo více jedinců, pak se protilátky začnou tvořit i ve vyšších etážích reprodukčního traktu – tj. dutině děložní, vejcovodech, dutině břišní, a najdeme je i v krevním séru. Tvorba protilátek je tedy u žen lokálního charakteru. Proces imunizace může být usnadněn, když partnerovi chybí v ejakulátu imunosupresivní faktor seminální plazmy [22].

Kritickým místem kontaktu ženiny imunity se spermiemi je děložní hrdlo. Významně se při tom uplatňuje cervikální hlen. Hrdlo děložní odpovídá imunologicky rychleji než např. pochva. V hrdle děložním se nachází jak velké množství plazmatických buněk, které produkují protilátky proti spermiím, tak i T-lymfocyty, které se přemisťují do vyšších etáží reprodukčního traktu. Mohou také být fixované na slizničním povrchu hrdla děložního. T-lymfocyty se účastní buňkami zprostředkované reakce namířené jak proti mikroorganizmům, tak proti pohyblivým spermiím. Reakce bývá cytotoxická [23].

Pro spermie je hostilní už kyselé vaginální prostředí, v němž jsou přítomny všechny typy imunitních buněk a obvykle i IgM a IgG protilátky. Pod epitelem převládají plazmatické buňky tvořící IgA, tvorba IgM a IgG je nízká. Spermie jsou ovšem v pochvě chráněny seminální plazmou obsahující řadu imunosupresivních faktorů (např. enzym transglutaminázu a další polyamidy) a dalších látek (např. lyzozym, C3 složku komplementu, alfa 2-makroglobulin, alfa

1-antitrypsin, beta 2-mikroglobulin, prostaglandiny, atd.), které mají schopnost imunitní systém tlumit a zvýšit tak šanci spermií na oplození vajíčka. Za 8 sekund po ejakulaci se také mění pH pochvy z kyselého na zásadité [16].

Lidská seminální plazma navíc obsahuje celou řadu významných enzymů, které štěpí hlen v hrdle děložním, čímž usnadňují a urychlují pronikání spermií do vyšších oddílů reprodukčního traktu. Protilátková aktivita je u normální zdravé ženy v hlenu nejnižší v období ovulace. Právě v této době se vytvářejí nejlepší podmínky pro přijetí a další transport spermií. Cyklické změny jednotlivých imunoglobulinů a specifických protilátek v hlenu hrdla děložního byly studovány na velkých skupinách opic rodu Rhesus a dobrovolných zdravých žen. Bylo zjištěno, že v období ovulace jsou hladiny imunoglobulinů IgG a IgA až 20 krát nižší než po skončení nebo před začátkem menstruace. Vznik protilátek proti spermiím může být ovlivněn i častým stykem spermií s pohlavními orgány ženy mimo období ovulace [17].

Bylo také zjištěno, že protilátky proti spermiím navázané na bičík neovlivňují průnik do dělohy tak negativně jako protilátky navázané na jejich hlavičky. Před fúzí s plazmatickou membránou vajíčka prodělává spermie sérii biochemických a strukturních změn zakončených ztrátou plazmatické membrány na přední části hlavičky spermie (tj. akrozomová reakce, Obrázek 6). Po odvrhnutí akrozomové čepičky s lytickými enzymy může spermie penetrovat do zona pellucida nebuněčného obalu vajíčka a následně fúzovat s plazmatickou membránou vajíčka. Přítomnost protilátek proti spermiím brání akrozomové reakci a tím zabraňuje oplození [17].

Po nechráněném pohlavním styku zůstávají živé spermie v pochvě až 12 hodin, v hrdle a jeho záhybech dokonce až 8 dnů. Některé spermie se za zcela normálních podmínek dostanou k vajíčku, jiné jsou fagocytovány makrofágy nebo polymorfonukleárními leukocyty už v děložním hrdle. To že pochva a děložní hrdlo hrají dvě role najednou (tj. ochrana jednak proti infekci a jednak proti spermiím), je nejspíš i dílem hormonálního působení. Za normálních fyziologických podmínek nejsou na spermii přístupná všechna místa, proti nimž se vytváří imunologická odpověď. Plné rozvinutí imunitní reakce nezávisí jen na povrchu spermií a látkách obsažených v seminální plazmě, ale především na proměnlivé vnímavosti rozpoznávacích imunitních mechanizmů, kterých je celá řada, a jsou geneticky podmíněné [6].

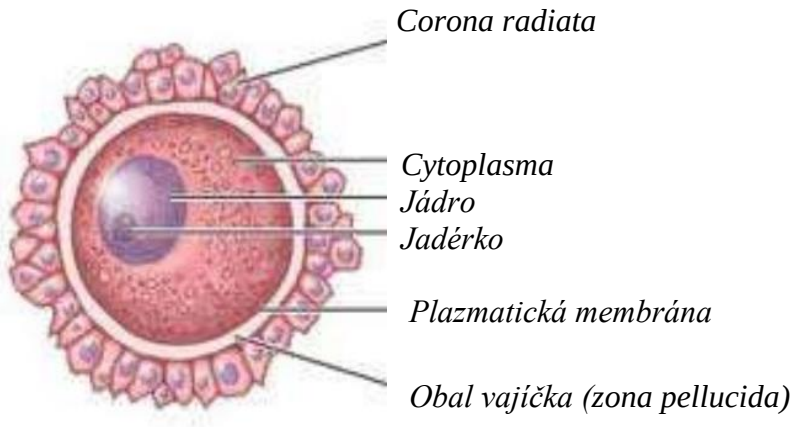
Dalšími faktory ovlivňujícími rozvoj lokální protispermiové imunity jsou zánětlivé změny sliznice exo i endocervixu, v níž jsou zmnožené buňky prezentující antigen, fagocyty a pomocné T lymfocyty. Proto bývá protispermiová imunita častou komplikací chronických kolpitid a neléčených erozí čípku [13].

2.5.2 Protilátky proti zona pellucida

Zona pellucida (Obrázek č. 7) je ochranný obal vajíčka. Probíhají zde zásadní děje umožňující oplození vajíčka spermií. V zona pellucida dochází k selekci spermií, dále zona pellucida zabraňuje tomu, aby vajíčko bylo oplodněno více než jednou spermií. Zona pellucida setrvává okolo vyvíjejícího se zárodku až do stádia blastocytu [21].

Protilátky proti zona pellucida (tzv. antizonální protilátky) jsou namířené proti glykoproteinové matrix, která se nachází na povrchu oocytů a zajišťuje jejich povrchovou ochranu. Pokud žena vytváří protilátky proti zona pellucida, může dojít k situaci, že nedojde ke styku spermie a vajíčka. Antizonální protilátky brání vstupu spermie do vajíčka při přirozené nebo umělé fertilizaci a teoreticky mohou ovlivňovat i časný vývoj zárodku [24].

Protilátky proti zona pellucida mají negativní vliv na fertilizaci a vyšetřují se hlavně při opakovaných potratech, neúspěšné *in vitro* fertilizaci a endometrióze. Zvýšená hladina těchto protilátek se nachází zejména u žen, které jsou opakovaně stimulovány pro odběr vajíček před IVF a u žen s endometriózou. Jejich primární role zatím není zcela objasněna. Koexistují však s jinými autoprotilátkami, které brání otěhotnění, nebo způsobují opakovanou ztrátu plodu. Experimentálním výzkumem na zvířatech bylo zjištěno, že také brání vývoji folikulů [25].



Obrázek č. 7 – Vajíčko (oocyt) [26].

Že protilátky proti třem hlavním proteinům zona pellucida, ZP1, ZP2 a ZP3, mohou ovlivnit plodnost, bylo prokázáno na zvířecích modelech. Očkování pomocí ZP2 a ZP3 vyvolává produkci protilátek inhibujících oplození, zatímco na jiných modelech imunizace ZP1 vyvolala produkci protilátek inhibujících vazbu spermií k zona pellucida. U lidí byl zjištěn vyšší výskyt antizonálních protilátek u pacientek s neznámou příčinou neplodnosti než u pacientek se známou příčinou neplodnosti [27].

2.5.3 Protilátky proti ovariím

Protilátky proti ovariím (tzv. antiovariální protilátky) jsou namířené proti buňkám produkujícím steroidy (tj. folikulární buňky, membrána granulosa, buňky theca foliculi interna a luteinní buňky). Antiovariální protilátky jsou zatím velmi málo prozkoumané. Je nejasné, zda samotná přítomnost protilátek je patogenetická, nebo jedná-li se pouze o následek poškození buněk ovaria.

Mezi nejčastější důsledky imunitní poruchy vaječníků patří předčasné ovariální selhání. Antiovariální protilátky byly však zjištěny i u žen bez zjevných známek předčasného ovariálního selhání. Proto jsou tyto protilátky neustále předmětem zkoumání, např. pro svou předpovědní hodnotu, zda dojde k selhání vaječníků v budoucnosti [21].

Jsou-li autoimunitou napadeny endokrinně aktivní tkáně ovaria, může dojít ke vzniku primární amenorhey (tj. vynechání menstruace) nebo k předčasnému ovariálnímu selhání. Tyto stavy se často neomezují jen na ovarium, ale postihují i jiné endokrinní žlázy (např. tyreoideu) a může se tak rozvinout syndrom autoimunitní polyglandulární endokrinopatie.

Ještě donedávna byla za hlavní efektorový mechanizmus antiovariální autoimunity považována tvorba protilátek. V poslední době se však soustřeďuje pozornost také na antiovariální buněčnou imunitu, která může operovat prostřednictvím výkonných (zabíječských) makrofágů, T lymfocytů a NK buněk spolu se stimulačními cytokiny. Zdá se, že v autoimunitním poškození ovaria hraje rozhodující roli právě buňkami zprostředkovaná imunita [22]. Buněčná imunita se také stále častěji prokazuje jako příčina opakovaných potratů.

Některé studie také poukazují na snížení schopnosti otěhotnění po IVF u pacientek s prokázanými antiovariálními protilátkami [16].

2.5.4 Protilátky proti annexinu V

Annexin V patří do skupiny placentárních antikoagulačních faktorů a je ve velkém množství zastoupen v placentě. Jedná se o kalcium-dependentní protein vázající zejména kyselé fosfolipidy, které se nacházejí v placentě. Fosfolipidy mají účinnou antikoagulační aktivitu působící na krevních destičkách, v buňkách trofoblastu a endoteliálních buňkách. Vysoká koncentrace annexinu V placentárních syncytiotrofoblastech napomáhá mechanizmu zachování krevní fluidity na povrhu placenty a placentární integritě.

U protilátek proti annexinu V se předpokládá interference s antikoagulační funkcí annexinu V. V důsledku jejich působení dochází ke vzniku placentárních trombóz. Protilátky proti annexinu V jsou rovněž spojovány s intrauterinním úmrtím plodu [22].

2.5.5 Protilátky proti plodu

Nejčastěji se jedná o imunoreakci v Rh systému, kdy Rh negativní matka má s Rh pozitivním otcem Rh pozitivní dítě. Krvinky plodu pronikají při porodu do krevního oběhu matky. Imunitní systém matky reaguje na průnik cizích antigenů (D – antigen) tvorbou protilátek (anti – D), které při každém dalším těhotenství prostupují placentou a poškozují červené krvinky plodu. Takovéto poškození může vést k úmrtí plodu ještě v děloze. Jako prevence proti vzniku tohoto typu protilátek slouží poporodní podávání anti-D imunoglobulinů do 72 hodin Rh negativním matkám, jejichž imunitní sytém ještě nestihl vytvořit protilátky. Anti-D protilátky vyvazují zbylé cirkulující senzibilizující erytrocyty plodu po ukončení gravidity. Imunoglobuliny se podávají i při uměle přerušeném těhotenství nebo po potratu [13].

2.5.6 Antifosfolipidové protilátky

Jedná se o skupinu imunoglobulinů namířených proti negativně nabitým buněčným fosfolipidům. Poprvé byly popsány při diagnóze syfilis v roce 1906 doktorem Wassermanem.

Antifosfolipidové protilátky (APA) zahrnují velkou skupinu protilátek, které bývají spojovány nejen s komplikacemi v časné graviditě, ale i s infekčním onemocněním, s některými léky užívanými v psychiatrii, s neurologickým onemocněním, s infarktem myokardu, atd. Předpokládaných mechanizmů účinku nespecifických a heterogenních APA je celá řada. 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 [28].

S nálezem vysokých titrů různých antifosfolipidových protilátek souvisí antifosfolipidový syndrom. Antifosfolipidový syndrom dnes již není záležitost jenom oboru gynekologie a porodnictví, ale i imunologie, alergologie, neurologie a psychiatrie.

Antifosfolipidové protilátky určujeme pomocí ELISA metody proti těmto antigenům: ph(fosfo)-serin, ph-inositol, ph-glycerol, ph-acid, ph-ethanolamin, beta2-glykoprotein I a směsný antigen-kardiolipin (např. 8,16,19). Z posledních výzkumů vyplývá, že s poruchami

plodnosti jsou spojovány nálezy hladin antifosfolipidové protilátky nejen v tradičních biologických tekutinách jako je sérum, ale také v ovulačním hlenu či v peritoneálním a folikulárním sekretu nebo dokonce i v seminální plazmě [29].

Léčba antifosfolipidového syndromu se tradičně opírá o glukokortikoidy z důvodu jejich imunosupresivního působení. Dalším lékem je kyselina acetylsalicylová, která blokuje trombogenní aktivaci. S úspěchem se používá také heparin nebo fraxiparin [30].

2.5.7 Antinukleární protilátky

Antinukleární protilátky (ANA) jsou namířeny proti celému spektru antigenů proteinové / glykoproteinové povahy v jádrech buněk. Nemusí mít klinický význam, avšak mohou být průvodním jevem a patogenetickým faktorem závažných imunopatologických chorob. Vztah mezi poruchami plodnosti a antinukleárními protilátkami zatím nebyl zcela jistě prokázán. Z vědeckého výzkumu bylo zatím prokázáno pouze to, že v populaci žen s opakovanými potraty je zastoupení ANA vysoké. Část vědců si však tento fenomén vysvětluje tím, že s věkem stoupá výskyt ANA, jakožto i výskyt a četnost potratů, tj. že jde o náhodnou koexistenci dvou nezávislých jevů. Jiné studie přinášejí ovšem důkazy pro přímý vliv ANA na vývoj oocytů a embryí [31].

2.5.8 Buňkami zprostředkovaná imunologická zábrana nidace

Uhnízdění zárodku v děloze (tj. nidace) je velice komplexní mnohastupňový proces a na kterémkoliv jeho stupni se mohou objevit poruchy. Jen část z nich však dovedeme přesně určit anebo je cíleně ovlivnit. V poslední době se stále častěji prokazuje jako příčina opakovaných potratů buněčná imunita [32].

Buňkami zprostředkovaná imunita představuje soubor mechanizmů zajišťujících klidový vztah mezi mateřskou imunitou a implantujícím se embryem. Při buňkami zprostředkované imunitě se uplatňují cytotoxické lymfocyty, embryotoxické látky, které nepříznivě ovlivňují embryo a mohou mít za následek i úmrtí plodu, zánětlivé cytokiny, perforiny, adhezní molekuly a další. Zastoupení buněk imunitní soustavy se v periimplantační zóně a v těhotenském endometriu výrazně zvyšuje (až na 35 %). U opakovaně potrácejících žen jsou v děložní sliznici prokázány zvýšené počty leukocytů, především makrofágů a NK buněk (natural killers). Bývá narušená rovnováha mezi pomocnými a tlumivými T-lymfocyty. Tlumivých T-lymfocytů může

být někdy tak málo, že se jejich imunosupresivní aktivitu nedaří prokázat. Bývá naopak prokázána zvýšená hladina aktivovaných T-lymfocytů [16].

NK buňky představují hlavní populaci imunologicky aktivních buněk v děložní sliznici (70 až 80 %). Před implantací embrya jsou většinou v metabolickém klidu, v místě implantace se hromadí a aktivují. Za jejich hlavní úkoly se považují rozpoznávání trofoblastu (HLA –G) a tvorba angiogenních faktorů potřebných k tvorbě spirálních arterií. V těhotenství se cytotoxicita NK v placentě výrazně snižuje, škodlivé efekty na trofoblast a plod nebyly prokázány.

Za nebezpečné se pokládají pouze aktivované NK buňky. Při poruchách nidace a opakovaném potrácení jsou sníženy inhibiční receptory KIR na NK buňkách a zvýšeny aktivované NK povrchové receptory (CD69, CD101, CD94). Vede se diskuze, zda mezi místními a krevními NK buňkami existuje jasná korelace [33].

Při nefyziologickém těhotenství pravděpodobně dochází k tomu, že děloha není připravena přijmout embryo a zabrání normálnímu uhnízdění (implantaci) embrya. Hlavní potíž je v tom, že zbraně buněčné imunity mají ve srovnání s protilátkami mnohem větší "rozptyl" (říkáme, že jsou méně antigenně specifické). V praxi to znamená, že buněčná imunita vyvolaná spermiemi nebo infekcí může v ženském pohlavním ústrojí napadat např. zárodek snažící se uhnízdit v děloze. Jindy je buněčná imunita aktivována přímo tou částí zárodku (trofoblastu), která zprostředkuje jeho nidaci. To vídáme často po mimoděložním těhotenství nebo u žen trpících opakovanými potraty. Taková nežádoucí imunita pak buď zabrání zárodku v usazení v děloze, nebo jej napadne později a způsobí potrat.

Při imunologicky podmíněné zábraně nidace žádná z metod asistované reprodukce nepomůže. Je-li mateřská imunita aktivovaná, napadá zárodek bez ohledu na to, zda se do dělohy dostal přirozenou nebo umělou cestou. Jedinou možností je tudíž utlumit imunitní reakci imunomodulátory (např. enzymy) alespoň do doby, než se zárodek uhnízdí [6].

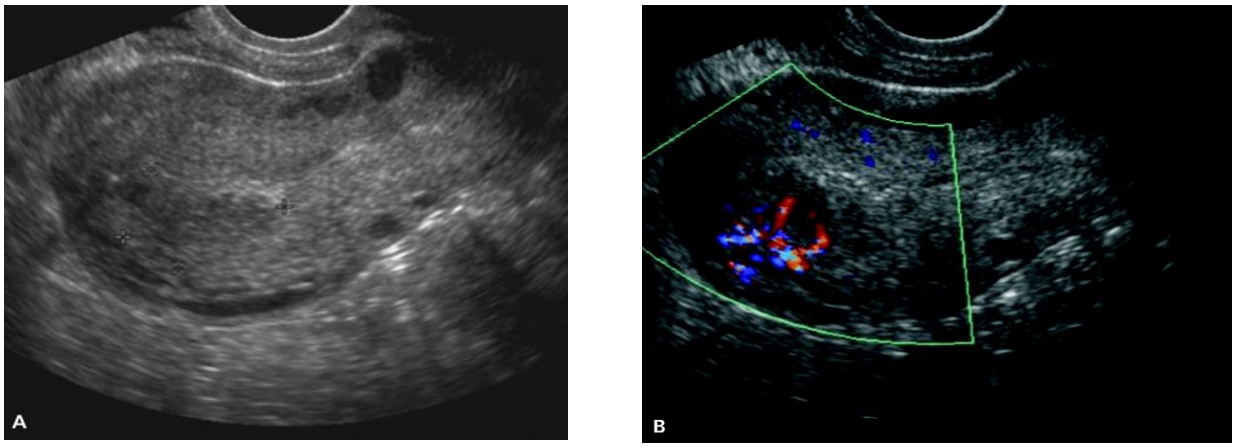
3. Diagnostika imunologické neplodnosti

Hodnocení stavu plodnosti partnerského páru je postupný proces zahrnující řadu vyšetření. Podrobné hodnocení a vyšetření obou partnerů přispívá k odhalení příčiny a typu neplodnosti a k následné úspěšné léčbě. V současné době jsou lékaři schopni pomoci až 95 % neplodných párů. V principu se diagnostický postup ubírá od nejjednodušších vyšetření k těm složitějším. I když jsou v současné době možnosti ohromné, uvádí se, že zhruba u 10 % párů se i přes využití nejmodernějších diagnostických metod příčinu neplodnosti jednoznačně určit nepodaří [6].

Základní vyšetření používané v rámci diagnostiky neplodnosti jsou popsána v následujících kapitolách.

3.1 Základní vyšetření diagnostikující neplodnost u žen

Mezi základní gynekologické vyšetření u žen patří **ultrazvuk malé pánve** (viz Obrázek č. 8). Vyšetření spočívá v provedení transvaginálního ultrazvuku dělohy a vaječníků s ohledem na fázi menstruačního cyklu a následném palpačním gynekologickém vyšetření. Ultrazvukové vyšetření dokáže posoudit velikost a tvar dělohy, přítomnost svalových uzlů (myomů), výšku a kvalitu děložní sliznice, rovněž dává informace o stavu vaječníků, růstu folikulů a přítomnosti cyst nebo endometriózy [34].



Obrázek č. 8 – Ultrazvukové vyšetření malé pánve: (A) klasický transvaginální ultrazvuk, (B) barevné Dopllerovo zbarvení – toto zbarvení určuje rychlost průtoku krve cévou [35].

Dále se provádí **vyšetření hladiny hormonů** v krvi (Tabulka č. 2) v období 1. - 3. dne menstruace. Toto vyšetření podává informace o stavu vaječníků, jejich schopnosti tvořit zralá vajíčka a možné odpovědi na stimulační léky. Vyšetřují se hladiny folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Například ovulaci lze zjistit pomocí

jednostupňového testu, který svou pozitivitou prokazuje vzestup LH jeden až dva dny před ovulací [36]. Lze stanovit i hladinu anti-Mülleriánského hormonu (AMH)**,** který rovněž informuje o zásobě vajíček. Standardní součástí hormonálního vyšetření je i stanovení hladiny prolaktinu (PRL) a hormonů štítné žlázy, tj. thyreotropinu (TSH) a volného thyroxinu (fT4) [6].

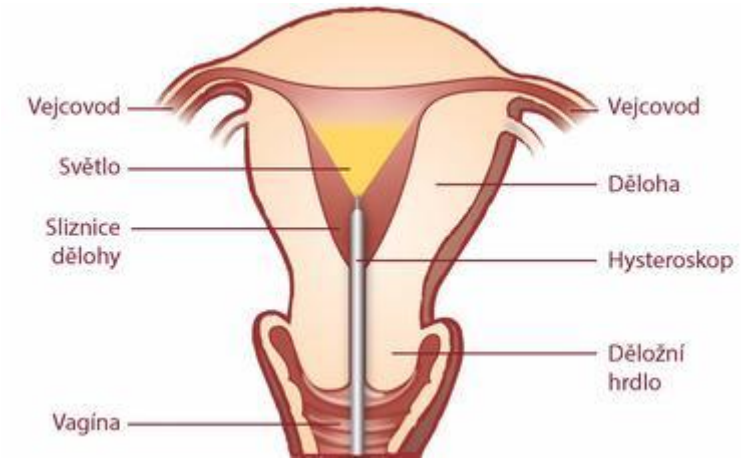
Tabulka č. 2 - Přehled hormonů stanovovaných v rámci diagnostiky ženské neplodnosti – FSH – folikuly stimulující hormon, LH- luteinizační hormon, E2 – estradiol, DHEAS - dehydroepiandrosteron sulfát, SHBG – globulin vázající pohlavní hormony, TSH – thyreotropin, T3 – trijodtyronin, T4 – thyroxin, TRH - thyreotropin uvolňující hormon. Modifikováno dle [13].

Hormon	**Postup vyšetření**	**Diagnóza**
FSH a LH	Měření z krevního séra. Prováděné od 2. do 6. dne menstruačního cyklu	Pomáhá vyloučit selhání vaječníků. Abnormální hladiny FSH a LH mohou ukazovat na neplodnost způsobenou hyperprolaktinémií. Poměr LH – FSH je důležitý pro výběr vhodné léčby
Prolaktin	Měření z krevního séra. Prováděno 2. – 6. den menstruačního cyklu	Vysoká hladina prolaktinu (hyperprolaktinémie) může znamenat nádor hypofýzy. Dále způsobuje menstruační a ovulační poruchy. Hyperprolaktinémie blokuje působení LH a FSH
Estradiol (E2)	Měření z krevního séra. Prováděno 2. – 6. den menstruačního cyklu	Stanovuje funkce vaječníků. Hladiny E2 se užívají ke sledování vývoje folikulů
Testosteron	Měření z krevního séra	Prokazuje přítomnost ovulace
Progesteron	Měření z krevního séra. Prováděno 21. den menstruačního cyklu (7 dní po ovulaci)	Prokazuje přítomnost ovulace. Používá se k rozlišení adekvátnosti luteální fáze
Hladiny androgenů (DHEAS, kortizol, androstendiol, 17-hydroxyprogesteron, SHBG)	Stanovení se provádí z krevního séra, obvykle 2. – 6. den menstruačního cyklu	Ke stanovení produkce androgenů. Příliš vysoké hladiny mohou být důvodem neplodnosti u žen. Příliš nízké hladiny mohou být důvodem mužské neplodnosti
Hormony štítné žlázy (TSH, T3, T4)	Krevní testy k určení hladin sérového thyroxinu (T4), TSH a TRH	Používá se k diagnostice snížené činnosti štítné žlázy, která může vést k málo časté ovulaci

RTG vyšetření dělohy a vejcovodů nebo-li hysterosalpingografie je rentgenové vyšetření dělohy. Ukazuje tvar děložní dutiny a průchodnost nebo neprůchodnost vejcovodů**.** Vyšetření provádí gynekolog, který po zavedení speciálního aparátu do hrdla dělohy aplikuje pozvolna kontrastní látku, jejíž průnik je vidět na rentgenu (viz Obrázek č. 9). Kontrastních látek existuje několik typů, nejčastěji se používá olejová kontrastní látka s obsahem jodu (Lipidol), vodný roztok jodu (Diograst), anebo hydroviskózní kontrastní látky [37].

Obrázek č. 9 – Hysterosalpingografie [38].

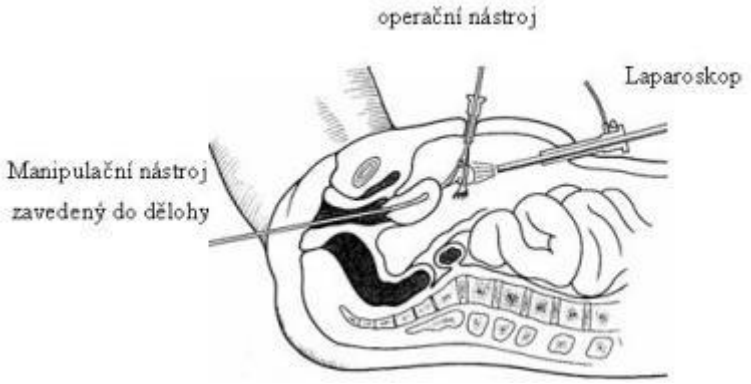
Hysteroskopie je metoda umožňující vizualizaci dutiny děložní a provedení drobných výkonů v dutině a hrdle děložním, např. odstranění polypů, srůstů a sept dělohy. Jedná se o endoskopickou vyšetřovací metodu. Hysteroskopie se provádí v leže na zádech, v gynekologické poloze. Po dezinfekci zevního genitálu a pochvy zavádí lékař gynekologická zrcadla. Po správném umístění je mírně rozevře, tím dochází k fixaci děložního čípku do vhodného postavení. Po zhodnocení čípku zrakem jej uchopí do kleští a opatrně provádí dilataci. Následně zavádí hysteroskop (Obrázek č. 10). Aby bylo možné dělohu dobře prohlédnout, napouští se na začátku vyšetření speciálním roztokem, který oddálí děložní stěny od sebe. Tak se získá větší prostor pro manipulaci s hysteroskopem a dalšími nástroji. Optické zařízení umožní prohlédnout dutinu děložní pod velkým zvětšením. Je-li to potřebné, odebírají se vzorky na vyšetření, odstraňují se polypy, myomy (ty, které jsou v dutině děložní), rozrušují srůsty nebo se odstraňuje celá sliznice dutiny děložní. Případně je možné suspektní (podezřelá) místa fotograficky nebo kamerou zdokumentovat [22].



Obrázek č. 10 - Hysteroskopie [39].

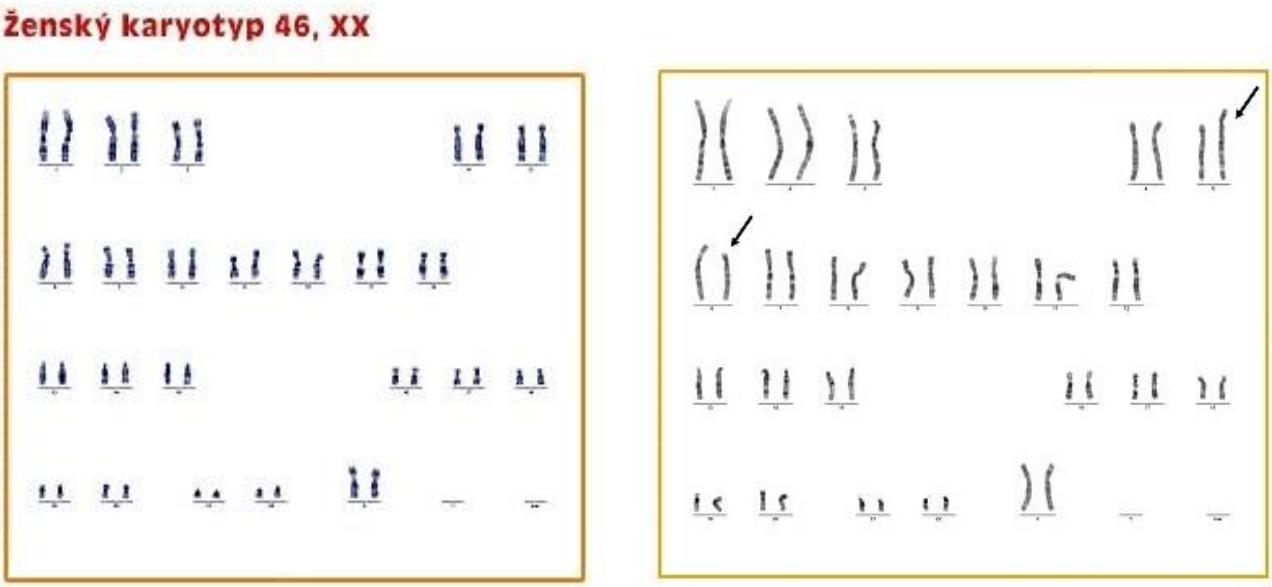
Laparoskopické vyšetření je metoda, která umožňuje šetrně prohlédnout dutinu břišní a ověřit průchodnost vejcovodů. Laparoskopie spadá do tzv. minimálně invazivní chirurgie, kdy pomocí speciálních nástrojů a techniky lze několika vpichy zobrazit dutinu břišní a provést zde potřebný operační zákrok, aniž by bylo nutné břišní dutinu otevřít (viz Obrázek č. 11). Pupíkem se zavádí kamera, která snímá operační pole.

Poté se provádí další 1-3 drobné řezy (cca 1 cm), kterými se do břicha zavádí potřebné operační nástroje. Laparoskopie se provádí za účelem diagnostickým nebo léčebným [36].



Obrázek č. 11 – Laparoskopie [40].

Genetické vyšetření chromozomů nám dá informaci o genetické výbavě obou partnerů**.** Vyšetřuje se karyotyp obou partnerů. U žen se často vyšetřují trombofilní mutace, které způsobují vrozený zvýšený sklon ke srážení krve – zejména při opakovaných samovolných potratech. Dle rodokmenu se pak může doplnit další speciální vyšetření DNA, např. mutace způsobující metabolické vady, krevní, svalové nebo kostní postižení, aj. Abnormální nálezy mohou být jednou z příčin neplodnosti, mohou vést k selhání metod asistované reprodukce, případně k opakovaným potratům (Obrázek č. 12) [41].



Obrázek č. 12 - Genetické vyšetření – fyziologický ženský karyotyp (vlevo), balancovaná reciproká translokace mezi chromozomy 5 a 6 (vpravo, znázorněné šipkami), tento karyotyp byl diagnostikován u ženy s opakovanými spontánními aborty [42].

3.2 Základní vyšetření diagnostikující neplodnost u mužů

Mužská plodnost nejvíce závisí na kvalitě spermatu. U některých mužů může dojít ke snížení počtu spermií, snížení jejich pohyblivosti nebo k odchylkám ve tvaru spermií. U takto poškozených spermií dochází ke ztrátě schopnosti proniknutí děložním hrdlem, spermie nejsou dále schopny putovat pohlavním traktem ženy a oplodnit vajíčko.

U mužů patří mezi základní vyšetření **spermiogram**. Jde o kvantitativní mikroskopický rozbor ejakulátu získaného většinou masturbací po krátké, 2-3 denní pohlavní abstinenci. Sperma muž odebírá do speciální nádobky nebo kelímku s víčkem. Nádobka nesmí obsahovat zbytky dezinfekčních činidel, která by mohla spermie poškodit.

Spermiogram je první vyšetření, které se při podezření na neplodnost provádí. Od výsledků spermiogramu se následně odvíjí další vyšetření.

Mezi základní parametry hodnocené při vyšetření spermatu patří stanovení objemu, pH, zkapalnění, dále pak stanovení počtu spermií, jejich pohyblivosti a tvaru [43]. Fyziologické hodnoty spermiogramu jsou uvedeny v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3- Fyziologické hodnoty spermiogramu – přesné údaje převzaty od WHO, vlastní zpracování [44].

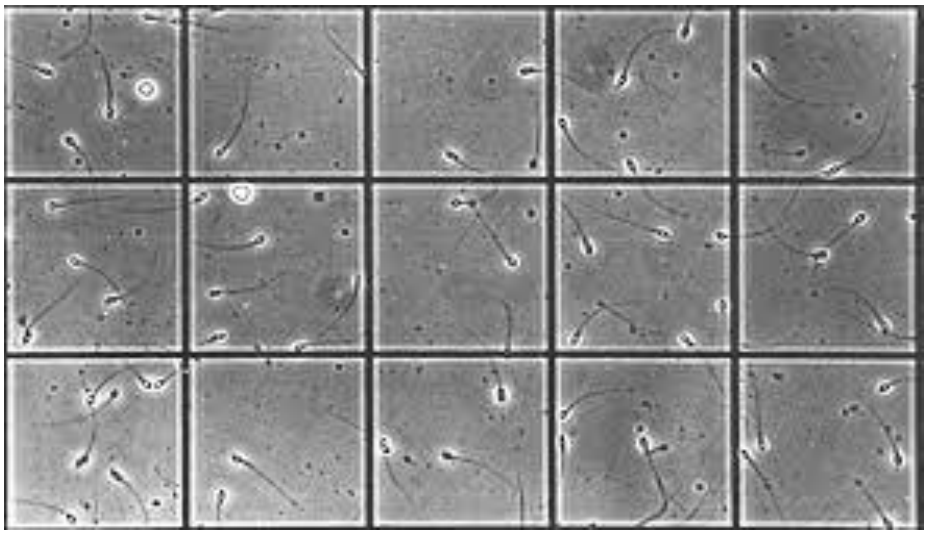
Objem spermatu	1,5 – 2 ml a více
pH	7,7-7,8
Koncentrace spermií	20 miliónů/ml a více
Celkový počet spermií	40 miliónů a více
Vitalita (počet živých spermií)	Minimálně 75 %
Pohyblivost (počet pohyblivých spermií)	Minimálně 50 %
Leukocyty	Méně než 1 milión na ml
Morfologie (počet spermií s normální morfologií)	Více než 4 %

První hodnocení spermatu se provádí bezprostředně po odběru. Nejdříve se posuzuje vzhled spermatu, především jeho barva, která je většinou bílá. V ejakulátu by neměla být přítomna krev ani vločkovitý materiál, který by poukazoval na přítomnost infekce v pohlavním traktu. Hodnotí se také přítomnost leukocytů, bakterií, krystalů či cizorodých vláken [21]. Sperma se nechá 30 minut zkapalnit. Poté se měří jeho objem buď v odměrném válci, nebo natažením do injekční stříkačky, případně se zváží na přesných digitálních vahách [6].

Sperma se následně opakovaným nasátím do pipety nebo injekční stříkačky a vypuštěním zpět do kelímku promíchá a nejdříve se stanovuje jeho pH, tak že se kapka spermatu nanese na pH papírek. Následně se pipetou odebere malá kapka spermatu a nanese se na spodní sklo Maklerovy komůrky (Obrázek č. 13). Komůrka se skládá ze dvou sklíček, která jsou přesně zabroušená tak, že je mezi nimi malá mezírka o tloušťce 10 μm. Do krycího víčka je vyryta mřížka. Díky tomu se v každém čtverci mřížky ukazuje tak malý počet spermií, že ho lze dobře spočítat v nativním spermatu, není třeba sperma ředit.

Obrázek č. 13 – Maklerova komůrka používaná k počítání spermií ve vzorcích spermatu [45].

Při počítání se spermie pohybují. Sice je možné spermie znehybnit, ale nejdůležitějším údajem spermiogramu (Obrázek č. 14) je koncentrace pohyblivých spermií a kvalita jejich pohybu. Počítání spermií pohybujících se v zorném poli mikroskopu relativně vysokou rychlostí je tedy jen přibližné, ale pro praktické využití to nevadí. Existují i počítačem řízené analyzátory, které však mají vysokou pořizovací cenu [46].



Obrázek č. 14 - Spermiogram – preparát umístěný v počítací komůrce, jedná se o fyziologický spermiogram, nejsou vidět žádné patologie spermatu [47].

Nepohyblivé spermie se většinou považují za mrtvé, ale ne vždy to tak musí být. Skutečně mrtvé spermie lze odlišit od živých, ale nepohyblivých spermií speciálním barvením, kdy se mrtvé spermie obarví, v důsledku porušení cytoplazmatické membrány. Toto porušení dovolí barvivu pronikat do spermií. K barvení se používá buď eozin na vlhkém preparátu, nebo kombinace eozinu a negrozinu na suchém preparátu. U živých spermií nedochází k pronikání barviva přes membránu. Dalším parametrem je morfologie spermií (tabulka č. 4), tedy zhodnocení, jaké patologické tvary a v jakém počtu se v ejakulátu vyskytují. Odchylek od normálního tvaru spermií existuje celá řada např. dvojitá hlavička, dvojité bičíky, deformace hlaviček, krčku, odtržení bičíku [22].

Tabulka č. 4 - Nomenklatura parametrů ejakulátu [48].

Normospermie	Parametry ejakulátu jsou v mezích normy
Oligozoospermie	Koncentrace spermií je nižší než 15miliónů/ml
Teratozoospermie	Méně než 4 % spermií má normální stavbu
Astenozoospermie	Méně než 40 % spermií s celkovou motilitou nebo méně než 32 % spermií s progresivní motilitou
Azoospermie	V ejakulátu nejsou žádné spermie
Aspermie	Při orgasmu nedochází k ejakulaci
Nekrozoospermie	Nízké procento živých spermií, vysoké procento nepohyblivých spermií v ejakulátu
Kryptozoospermie	Malý počet spermií, nejsou zjistitelné v čerstvém vzorku, ale až po centrifugaci

Vyšetření může vyloučit nebo potvrdit patologie spermatu, avšak nemůže potvrdit, že muž je opravdu plodný. I když má muž spermiogram zcela fyziologický, nevylučuje to možnost dalších faktorů, které mohou zabraňovat oplození vajíčka [22].

Dále se provádí **klinické vyšetření**, kdy lékař zjišťuje, zda pacient prodělal operace na genitáliích, virová onemocnění, pohlavní choroby, či cévní a mozková onemocnění. Klinické vyšetření může také odhalit abnormality pohlavních orgánů, např. varikokélu (rozšíření žil v oblasti šourku) nebo atrofii varlat [46].

Stejně jako u žen se provádí **hormonální vyšetření**, kdy se stanovují sérové hladiny gonadotropinů, folikuly stimulujícího hormonu (FSH), luteinizačního hormonu (LH) a plazmatického testosteronu. Se stoupající hodnotou FSH spermatogeneze obvykle klesá [13].

3.3 Vyšetření specifických protilátek

Imunologické vyšetření patří mezi základní vyšetření plodnosti u žen i mužů. Vyšetřují se specifické protilátky (např. proti spermiím, vajíčkům a embryím, antifosfolipidové protilátky), které jsou hlavní příčinou imunologické neplodnosti. Ke zjištění jejich přítomnosti se provádí vyšetření cervikálního hlenu u žen, popř. séra nebo seminální plazmy u mužů. Přehled používaných testů je uveden v následujících kapitolách [49].

3.3.1Test podle Kremera

Jedná se o test pronikání spermií kapilárou s cervikálním hlenem. Pozorování se provádí pod inverzním mikroskopem. Úkolem je posoudit vzdálenost, kterou urazí spermie v ovulačním hlenu za jednotku času. Důležité je všimnout si také počtu pohyblivých spermií, posoudit charakter jejich pohybu a případné změny na hlavičkách spermie. Test posuzuje základní penetrační schopnosti spermií v ovulačním hlenu za jednotku času, modeluje tak situaci *in vivo*. Screeningovým Kremerovým testem je možné zachytit i aglutinaci spermií způsobenou např. vazbou protilátek [22].

3.3.2 Mikroaglutinační test

Tento test zjišťuje přítomnost protilátek proti spermiím v ovulačním hlenu. Ovulační hlen se upravuje pomocí enzymu bromelinu. Zkapalněný hlen se pak rozdělí do zkumavek a naředí geometrickou řadou. Do speciálních komůrek se přenesou jednotlivá mikromnožství zkapalněného hlenu a promytých spermií, překryjí se parafínovým olejem, aby nedocházelo k vyschnutí, a po dvou hodinách se pozorují pod inverzním mikroskopem. V případě, že ovulační hlen neobsahuje protilátky proti spermiím, spermie zcela volně proplouvají svým charakteristickým pohybem, v opačném případě jsou nahloučené k sobě. Záleží na tom, která protilátková aktivita převažuje, zda proti hlavičkám (převažuje protilátková aktivita proti hlavičkám spermií), či proti bičíkům (převažuje protilátková aktivita proti bičíkům spermií), nebo společně proti hlavičkám a bičíkům [22].

3.3.3 Enzymová imunosorbentní analýza

Metoda ELISA (tj. enzymová imunosorbentní) využívá sekundární detekční protilátky proti specifickým izotypům imunoglobulinů, které jsou kovalentně navázány na enzym a přidány ke vzorku v mikrotitrační destičce. Vzorkem může být sérum, hlen děložního hrdla, seminální plazma. Je-li ve vzorku přítomen daný imunoglobulin (např. protilátka proti spermiím), vytvoří se komplex sekundární protilátka – enzym – imunoglobulin, který je detekován přidáním specifického enzymového substrátu, což má za následek změnu zbarvení, kterou lze kvantifikovat. Další výhodou této metody je její specifita. Hlavní nevýhodou této metody je, že vzorky jsou fixovány (tj. navázány na stěnu mikrodestičky, buď pouhou absorpcí, nebo chemicky pomocí různých vazeb např. kovalentních) a to může způsobit narušení plazmatické membrány a následně i vnitřních antigenů. Použité protilátky se mohou také vázat nespecificky a metoda pak poskytuje falešně pozitivní výsledek [34].

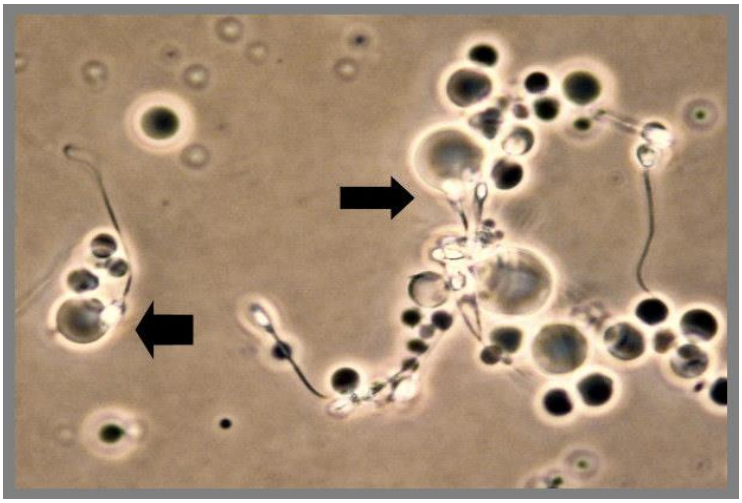
3.3.4 Test smíšené aglutinační reakce

Test smíšené aglutinační reakce (tzv. MAR test - mixed agglutination reaction) je jedním z nejužívanějších testů při vyšetření protilátek proti spermiím. Vyšetření se provádí ze séra nebo seminální plazmy. Čerstvý ejakulát je smíchán s latexovými částicemi nebo ovčími erytrocyty, značenými IgA nebo IgG. Přidáním imunospecifického IgG antiséra cíleného proti lidským proteinům se vytváří smíšené aglutinace mezi částicemi a pohyblivými spermiemi jako důkaz navázání IgG protilátek na spermie [50]. Spermie s navázanými protilátky a antisérem

aglutinují, zatímco spermie bez protilátek ne. Hodnotí se poměr aglutinovaných částic a spermií. Pokud se po aglutinaci zjistí napadení pouze 10 – 30 % spermií je MAR test hodnocen pozitivně, situace ale ještě není kritická. Početí je v tomto případě ještě stále možné, protože zbytek spermií je schopen oplodnění vajíčka. Pokud je ale pokryto více než 50 % spermií protilátkami, bude výsledek MAR testu kritický. To znamená, že je diagnostikována imunologická neplodnost [34].

3.3.5 Immunobead test

Immunobead test (IBT) je druhým testem nejčastěji používaným k vyšetření protilátek proti spermiím. Využívá polyakrylamidové korálky (immunobeads) potažené protilátkami proti lidským IgG, IgM a IgA, které jsou inkubovány s čerstvými pohyblivými spermiemi pacienta (přímý test) nebo s normálními spermiemi dárce, které byly předtím inkubovány s tekutinou pacienta, například seminální plazmou (nepřímý test). Předností IBT je, že lze kvantifikovat typ protilátek, procento spermií s navázanými korálky a jejich lokalizaci (Obrázek č. 15). Nevýhodou této metody jsou náklady na činidla, časová náročnost a nespecifické vazby. Ty mohou vzniknout při použití vysoké sérové koncentrace při nepřímém test [51].



Obrázek č. 15 – Immunobead test - metoda umožňující zjistit typ a lokalizaci protilátek proti spermiím, např. na hlavičce spermií (označeno šipkou), pomocí polyakrylamidových korálků (immunobeads) potažených protilátkami proti lidským IgG, IgM a IgA [52].

3.4 Vyšetření buněčné imunity

Buněčná imunita je soustava několika druhů bílých krvinek, které svými různorodými funkcemi zabezpečují obranyschopnost organizmu proti nežádoucím vnějším i vnitřním vlivům. Bílé krvinky zrají z velké části v kostní dřeni. V případě, že bílé krvinky nesplní svou funkci dostatečně, je lidské tělo náchylné k autoimunitnímu nebo imunodeficientnímu onemocnění.

V indikovaných případech (opakované potrácení, opakovaně neúspěšná léčba metodami asistované reprodukce, aj.) se provádí vyšetření buněčné imunity. Vyšetřují se především NK buňky. NK buňky jsou cytotoxické buňky řadící se k nespecifické imunitě. Jsou schopny lyzovat („zabíjet“) jiné buňky pomocí granulí obsahujících perforin a granzymy. Rozeznávají buňky, které mají na povrchu abnormálně málo MHC I. třídy. Jejich zvýšená přítomnost v dutině děložní může mít i fatální následky pro vyvíjející se zárodek. Odběr materiálu se provádí v rámci hysteroskopického vyšetření, které umožní cílený odběr i vyšetření celé dutiny děložní.

Zpracování materiálu se provádí průtokovou cytometrií, při které jsou NK buňky 48 hodin stimulovány různými stimuly (buňky K562, JAR buňky, partnerské spermie). Zjišťujeme schopnost aktivace NK buněk po stimulaci měřením zvýšené exprese aktivačního znaku CD69. Ten se začíná projevovat na povrchu buněk po 18-48 hodinách. Výsledkem jsou procenta stimulovaných NK buněk [52]. Při včasném odhalení poruchy je možné nasadit cílenou infuzní léčbu, která dokáže aktivitu NK buněk snížit a výrazně tak zlepšit podmínky pro zdárný vývoj embrya [51].

4. Léčba imunologické neplodnosti

Z usnesení Světové zdravotnické organizace z roku 1978 v článku 16 vyplývá, že muži a ženy zralého věku mají právo bez omezení rasy, národnosti nebo náboženství uzavřít sňatek a založit rodinu. Pomoc medicíny v léčbě neplodného páru se uplatňuje stále více a vzrůstá i zájem párů o tuto léčbu. V posledních letech diagnostika a léčba neplodnosti zaznamenává stále větších úspěchů [21].

Při neplodnosti existují dva rozdílné způsoby léčby pacientů. Jeden ze způsobů je založen na etiologické léčbě, která chápe neplodnost jako nemoc, a druhý způsob je založen na zvýšení četnosti přirozeného početí. Tento způsob chápe neplodnost jako hru náhody a využívá techniky, které byly vyvinuty v posledních třech desetiletích – nitroděložní inseminaci (IUI), *in vitro* fertilizaci (IVF) a intracytoplazmatickou injekci spermie (ICSI). Setkat se můžeme také s různými postupy imunoterapie [53].

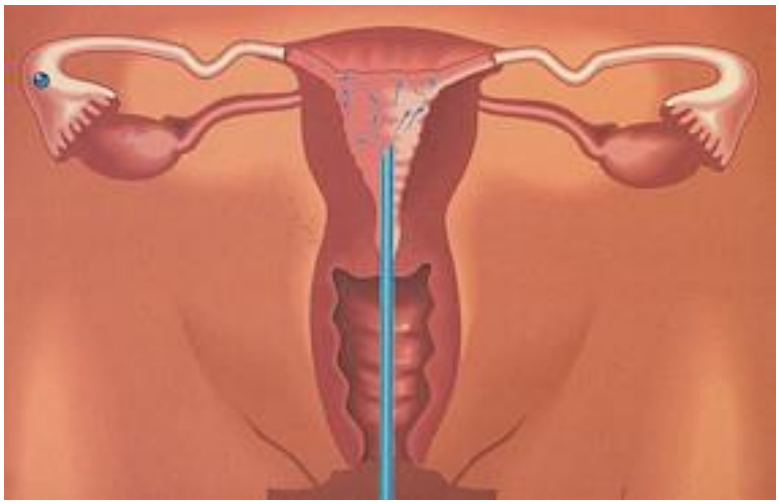
4.1 Nitroděložní inseminace

Nitroděložní inseminace (IUI) je technika asistované reprodukce, kterou lze využít při léčbě neplodnosti, když má žena průchodný alespoň jeden vejcovod. Důvodem k provedení inseminace je snížený počet nebo pohyblivost spermií u muže. V případě imunologické neplodnosti se využívá toho, že odebrané spermie muže se vpraví přímo do dělohy ženy, čímž se zamezí jejich styku s protilátkami v hlenu děložního krčku (viz Obrázek č. 16). Metoda se zakládá na přirozené schopnosti spermií oplodnit vajíčko v pohlavním traktu ženy [54]. Studie dokazují, že tato metoda je neefektivní v případech, kdy sperma partnera má nízkou koncentraci spermií nebo spermie mají špatný tvar. V případech, kdy nelze použít sperma partnera, je možná umělá inseminace spermatem anonymního vyšetřeného dárce. Úspěšnost metody IUI je od 5 % až do 15 % na cyklus v závislosti na věku ženy. Partnerský pár může podstoupit několik cyklů inseminace, nejčastěji se doporučují 3 cykly. Pokud nedojde k oplodnění, lékař obvykle doporučí účinnější léčbu metodou IVF. Výhodou metody IUI je, že nevyžaduje odběr vajíčka a celkovou anestezii [55].

Inseminace se provádí v několika krocích [6]:

1. Provedení IUI předchází nejčastěji stimulace vaječníků Clomiphen citrátem v dávce 1-2 tablety denně od 3. do 7. dne cyklu nebo podáním injekce gonadotropinu. IUI je možné provést i v přirozeném cyklu, bez předchozí stimulace.

2. Monitorování léčby se provádí měřením velikosti folikulů a výšky děložní sliznice. Cílem stimulace před IUI je obvykle dozrání 1 až 3 folikulů.
3. Když folikuly dosáhnou požadované velikosti, aplikuje se podkožně injekce Pregnylu (5 000 IU) a plánuje se provedení IUI.
4. V den ovulace partner poskytne sperma, které se připraví k inseminaci. Čerstvé sperma se po odběru a zkapalnění propere a zkoncentruje. Příprava spermatu k inseminaci trvá asi 2-3 hodiny. Poté lékař pomocí jemného katetru zavede připravené sperma přes hrdlo až do dělohy. Celý proces je bezbolestný [12].

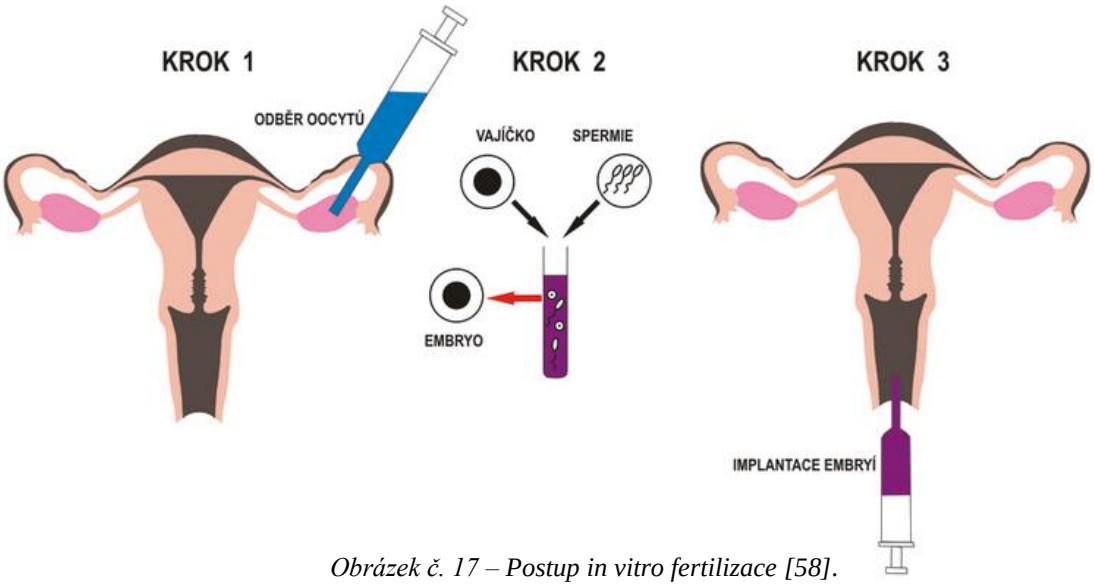


Obrázek č. 16 – Nitroděložní inseminace [56].

4.2 Mimotělní oplodnění

Mimotělní oplodnění (IVF – *in vitro* fertilizace) představuje zásadní metodu v léčbě neplodnosti. První pokus s umělým oplodněním byl poprvé úspěšný v roce 1978, kdy se díky lékařům R. Edwarsovi a P. Steptoaeovi narodilo první dítě na světě metodou IVF (Louise Brownová – Velká Británie). V České republice se narodilo první „dítě ze zkumavky“ v roce 1982 v Brně pod vedením profesora Pilky. Ve světě se ročně narodí více než 3,7 miliónů dětí, které byly počaty metodami asistované reprodukce. Úspěšnost IVF je 20 % - 45 % na jeden léčebný cyklus [57].

Umělé oplodnění spočívá ve spojení zárodečných buněk (spermie a vajíčka) mimo tělo ženy, sledování vývoje vzniklých zárodků v laboratoři, výběru nejkvalitnějších embryí a jejich zpětném zavedení do děložní dutiny ženy příjemkyně (viz Obrázek č. 17) [12].



Obrázek č. 17 – Postup in vitro fertilizace [58].

IVF zahrnuje několik kroků:

1. Hormonální stimulace

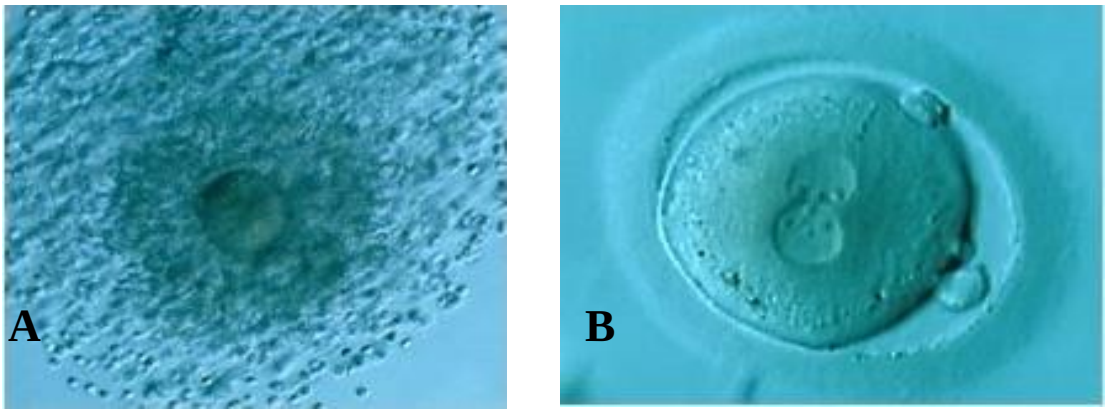
Spočívá v aplikaci hormonů stimulujících vaječníky, aby bylo možno získat více zralých vajíček. Dále v aplikaci hormonů zabraňujících předčasné, samovolné ovulaci. Tato fáze je kontrolována nejčastěji ultrazvukem, kdy lékař sleduje růst folikulů obsahujících vajíčko ve vaječníku. Tato fáze trvá obvykle 1 – 3 týdny [59].

2. Ambulantní odběr vajíčka

Tento krok probíhá při celkové anestezii přes pochvu ženy za kontroly ultrazvukem.

3. Mimotělní oplození vajíčka v laboratoři

Fertilizace vajíček probíhá buď klasickou metodou, tj. přidáním spermií do kultivačního média, nebo některou mikroinseminační metodou. Nejčastěji se používá mikromanipulační metoda ICSI (tj. intracytoplazmatická injekce spermie). Tato metoda spočívá v přímém vpravení jediné spermie do vajíčka. Zatímco při klasické metodě je zapotřebí několik set tisíc kvalitních spermií na oplození jednoho vajíčka, v tomto případě je zapotřebí pouze jedna spermie. Tím metoda ICSI dává šanci mít vlastní dítě i mužům s těžkou poruchou plodnosti, kdy je získáván malý počet spermií. Následuje kultivace embryí v přísně kontrolovaném prostředí (inkubátoru), které zajišťuje potřebné podmínky pro jejich metabolismus a funkce spojené s jejich vývojem (viz Obrázek č. 18). V laboratorních podmínkách můžeme embrya nechat růst do 120 hodin (5 dnů), poté musí být přenesena do dělohy nebo zmrazena [60].



Obrázek č. 18 – Vývoj embryí na Petriho misce po oplodnění [61] – obrázek A zobrazuje oplozené vajíčko, obrázek B oplozené vajíčko se dvěma prvojádry a dvěma pólovými tělísky.

4. Embryotransfer

Provádí se pomocí speciálních transferových souprav. Jedno embryo s malým množstvím tekutiny (média, živného roztoku) jsou vstříknuta skrz čípek děložní do dutiny děložní. Důvodem k zavedení pouze jednoho embrya je to že úspěšnost nezvyšuje počet embryí zavedených najednou, ale počet transferů [50].

5. Režimová opatření po transferu

Po transferu se doporučuje klidový režim (tj. žádná nadměrná fyzická aktivita, pohlavní styk, atd.) po dobu 1-2 týdnů. Během této fáze se musí pravidelně užívat hormonální tablety, aby byla podpořena luteální fáze.

6. Průkaz a sledování těhotenství

Těhotenství se prokazuje při ultrazvukovém vyšetření v kombinaci s těhotenským testem. Do prokázání gravidity se doporučují užívat gestageny. Pokud se gravidita potvrdí, je nutné užívat gestageny ještě po dobu 8 týdnů z důvodu přípravy těla na těhotenství [54].

4.3 Imunoterapie

Imunoterapie je v reprodukční imunologii definována jako přímé navození přirozené obranyschopnosti organizmu vedoucí k omezení tvorby protilátek proti spermiím, vajíčku nebo k úplnému vyloučení jejich produkce. Využívá se buď celková nespecifická terapie, popř. lokální specifická terapie k utlumení imunitního systému vedoucímu ke snížení produkce protilátek, nebo plazmaferéza k odstranění protilátek ze séra [32].

Utlumení imunitního systému se obecně používá při autoimunitních onemocněních. Tato onemocnění jsou důsledkem komplexních patologických pochodů, charakterizovaných

abnormální reakcí na vlastní antigeny (tzv. autoantigeny) kombinovanou s působením zevních činitelů a patří mezi nejzávažnější choroby imunitního systému [54]. Jedná se o sebedestruktivní proces, kdy imunitní systém vytváří protilátky, které napadají vlastní tkáň. Patří sem tedy i imunologická neplodnost, kdy se vytváří protilátky proti vlastním strukturám [15].

Onemocnění často postihuje ženy v reprodukčním období, obvykle mezi 12–45 lety. Tento fakt nepřímo ukazuje na důležitost hormonálních vlivů na funkci imunitního systému a také na to, že ženské hormony autoimunitu podporují. První projevy se mohou u žen objevit s nástupem menstruace. Některé pacientky onemocněly v důsledku používání hormonální antikoncepce. Těhotenství samo o sobě má pozoruhodný vliv na autoimunitní choroby. Asi u třetiny žen dochází během těhotenství k exacerbacím autoimunity, u druhé třetiny naopak k jejímu útlumu, u zbývající třetiny pak těhotenství nemá žádný vliv na průběh choroby [12].

K tlumení imunitního systému se používají imunosupresiva, což jsou léky, které omezují nebo blokují činnost imunitního systému. Imunosupresiva nemají vliv na průběh těhotenství a nejsou nebezpečná pro plod [4].

Při celkové nespecifické terapii jsou využívány kortikoidy. Kortikoidy jsou syntetické kopie kortikosteroidů, hormonů kůry nadledvin a jsou užívány k potlačení imunitního systému. Podávají se ve formě tabletek po dobu 3 měsíců. Doba dávkování se upravuje podle hladin protilátek proti spermiím v děložním hrdle [22]. Vzhledem k celé řadě nežádoucích vedlejších účinků musí být pacientka nebo pacient před touto léčbou řádně vyšetřen a během ní pečlivě sledován [21]. Celková imunosuprese bývá úspěšná u izolované neplodnosti z imunologických příčin. Často je používána také při léčbě jiné příčiny neplodnosti, kdy se přistupuje k *in vitro* fertilizaci [22].

Lokální specifická terapie spočívá v lokálním využití kortikoidů a je určena neplodným ženám, u kterých jsou jedinou příčinou neplodnosti protilátky proti spermiím v děložním hrdle. Dalšími podmínkami tohoto způsobu léčby jsou normální spermiogram partnera, fyziologické hladiny hormonů, průchodné vejcovody a vyloučení protilátek proti spermiím v séru [21].

Plazmaferéza je drahá, bezpečná, většinou dobře tolerovaná léčebná metoda, při které dochází k oddělení plazmy od krevních buněk [53]. Lze provést dvěma způsoby, a to buď pomocí membrány (využívá k filtrování polopropustnou membránu) a nebo centrifugací (využívá odstředivou sílu pro rozdělení látek s různou hustotou). U pacientek s vysokými titry protilátek proti spermiím v séru lze plazmaferézou účinně, ale bohužel jen dočasně, snížit

protilátkovou aktivitu. Tento léčebný postup je většinou kombinován s další léčbou, nejčastěji s celkovou imunosupresí [34].

5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá imunologicky podmíněnou neplodností. Neplodnost se definuje jako neschopnost otěhotnění po roce pravidelného a nechráněného pohlavního styku.

Každý rok přibývá v ČR i ve světě počet párů, kteří kvůli neplodnosti nemohou počít dítě přirozeně. Z velké části za to může životní styl, neustálý stres, špatné životní prostředí ale i skutečnost, že v moderní době se početí dítěte stále více odkládá.

V mé bakalářské práci jsem se zaměřila na neplodnost způsobenou poruchami imunitního systému. Mechanismy, kterými může porucha imunity zaútočit je mnoho. Některé jsou dobře známé, jiné jsou zatím jen předpokládány a o některých zatím vůbec nevíme. Mezi nejčastější příčiny imunologické neplodnosti patří specifické protilátky buď vytvářené mužem (např. protilátky shlukující spermie, protilátky znemožňující pohyb spermií, a nebo poškozující spermie), nebo ženou (např.protilátky proti spermiím, protilátky proti zona pellucida nebo proti ováriím), popsána je ale také účast buněčné imunity reprezentované NK buňkami.

Pro odhalení imunologicky podmíněné neplodnosti je k dispozici celá řada imunoanalytických vyšetřovacích metod (např. ultrazvuk malé pánve, spermiogram, vyšetření hladiny hormonů). Reprodukční medicína od narození prvního dítěte ze zkumavky v roce 1978 prošla velmi dynamickým vývojem. Ale i přesto v dnešní době existuje spousta párů, kterým nejsme schopni pomoci. Léčba neplodnosti je velmi náročná jak finančně, tak i psychicky, a pokud dojde k selhání IVF, měl by pár vyhledat pomoc imunologa. Podle nejnovějších poznatků je totiž u tzv. nevysvětlitelné neplodnosti na vině právě imunita.

6. Použitá literatura

1. *Neplodnost* [online]. Zlín [cit. 2015-03-28]. Dostupné z: http://www.ivf-zlin.cz/24794-priciny-a-diagnostika-neplodnosti.
2. *IVF s vlastními vajíčky* [online]. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.fertility-ivf.eu/new/cs/metody/ivf/.
3. KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
4. LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
5. RUMPÍK, MUDr. David. Fakta o neplodnosti. In: *Stop neplodnosti* [online]. Praha [cit. 2015-02-9]. Dostupné z: http://www.stopneplodnosti.cz/o-neplodnosti/fakta-o-neplodnosti.
6. MADAR, Jindřich a Zdenka ULČOVÁ-GALLOVÁ. *Imunologie a imunopatologie lidské reprodukce: vybrané kapitoly*. Praha: Mladá fronta, 2016. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3901-7.
7. Funkce buněk a lidského těla [online]. [cit. 2015-06-12]. Dostupné z: http://fblt.cz/skripta/viii-rozmnozovaci-soustavy/1-zenske-pohlavni-organy-tehotenstvi-a-porod/.
8. Podpora plodnosti [online]. [cit. 2015-06-01]. Dostupné z: http://www.podpora-plodnosti.cz/JAK-FUNGUJI-SPERMIE-a5_65.htm.
9. Immune system disorders [online]. [cit. 2015-02-12]. Dostupné z: http://www.fertility-health.com/immune-system-disorders.html.
10. SlideShare [online]. [cit. 2016-22-06]. Dostupné z: https://pt.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-cytogenetika-i?nomobile=true.
11. Přehled nejčastějších příčin neplodnosti na straně ženy a muže modifikováno dle: Ženská neplodnost [online]. [cit. 2016-23-06] Dostupné z: http://www.zenska-neplodnost.cz/typy-a-priciny.
12. ROZTOČIL, Aleš a Pavel BARTOŠ. *Moderní gynekologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2832-2.
13. TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

14. Zdravotnictví a medicína [online]. [cit. 2016-23-06] Dostupné z: http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/imunologie-v-reprodukcni-medicine-134343.
15. CITTERBART, K., ČECH, E., DONÁT, J., HALAŠKA, M., HOŘEJŠÍ, J., KRAUS, I., KUDELA, M., KUŽEL, D., LIPPERT, P., PILKA, L., ROB, L., ROKYTA, Z., ŘEZÁČOVÁ, J., STRNAD, P., TOŠNER, J., VENTRUBA, P., ŽIVNÝ, J. *Gynekologie.* Praha: Galén, 2001. ISBN 80-7262-094-0.
16. BRONSON, R.A. 2000. *Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines.* Journal of Reproductive Immunology. 45: 159-183.
17. CHIU, W.W.C., CHAMLEY, L.W. 2004. *Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies.* Fertility and Sterility. 82: 529-535.
18. Hope Fertility Lab [online]. [cit. 2015-03-12].Dostupné z: http://www.hopefertilitylab.com/fertility-information.html.
19. Wikiskripta [online]. [cit. 2016-04-02] Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Akrozomov%C3%A1_reakce.
20. VENTRUBA, P., ŽÁKOVÁ, P., VIŠŇOVÁ, H. 2002. *Metody a techniky asistované reprodukce*. Moderní gynekologie a porodnictví. 11 (4), s. 572-579. ISSN 1211-1058.
21. FEJFAROVA, Veronika. *Imunologická neplodnost* [online]. [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: http://cs.medixa.org/nemoci/imunologicka-neplodnost.
22. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka a Petr LOŠAN. *Neplodnost: útok imunity*. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2013. Zdraví & životní styl. ISBN 978-80-247-4555-8.
23. MAZUMDAR, S., LEVINE, A.S. 1998. *Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment.* Fertility and Sterility. 70: 799-810.
24. SMITH, Hosid S. 1994. *Předčasné ovariální selhání spojeno s autoprotilátkami proti Zona pellucida.* International Journal of Fertility and menopausal studies. 39:316-319.
25. GUPTA S.K. & BHANDARI B. 2011. *Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins.* Asian Journal of Andrology. 13(1): 97-105.
26. Slideplayer – oplodnění [online]. [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: http://slideplayer.cz/slide/2844017/.
27. FLORMANN H.M., JUNGNICKEL M.K. & SUTTON K.A. 2008. *Regulating the acrosome reaction.* The International Journal of developmental Biology. 52(5-6): 503-10. Review.

28. KOVÁCS, Mónika, Marianna HARTWING, Magdolna ALEKSA, Marianna TIHAYNI, Tatjána NAGY ,Gyorgy VAJDA, József DARU, Beáta GASZTOYI 2012. *Antiphospholipid antibodies in relation to sterility/infertility.* Human Immunology, 73.7: 726-731.
29. GIRARDI, G., KOCKSHIN, M. D., SALMON, J. E. 2007. *The antiphospholipid syndrome as a disorder initiated by inflammation: implications for the therapy of pregnant patiens.* Nature Clinical Practice Rheumatology, 3: 140 – 147.
30. LEVINE, Jerrold S.; BRANCH, D. Ware; RAUCH, Joyce. 2002. *The antiphospholipid syndrome.* New England Journal of Medicine, 346.10: 752-763.
31. TICCONI Carlo, Federica ROTONDI, Manuela VEGLIA, Adalgisa PIETROPOLLI, Sergio BERNARDINI, Francesco RIA, Alessandro CARUSO, Nicoletta DI SIMONE. 2010. *Antinuclear autoantibodies in women with recurrent pregnancy loss.* American Journal of Reproductive Immunology, 64.6: 384-392.
32. KRAUSE, Walter, ed. *Immune infertility*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-3-642-01378-2.
33. MOR, Gil. *Immunology of pregnancy*. New York: Springer Science+Business Media, c2006. Medical intelligence unit (Unnumbered: 2003). ISBN 0387306129.
34. MARDEŠIĆ, Tonko. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4458-2.
35. Prezi [online]. [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: http://www.jultrasoundmed.org/content/27/3/343/F3.expansion.
36. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
37. De Sutter, P. 2006. *Rational diagnosis and treatment in infertility.* Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 20: 647-664.
38. Almaradiologie [online]. [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: http://www.almaradiologie.be/Onderzoeken/Radiografie/hysterografie%20hysterosalpingografie.html.
39. *Modrý koník* [online]. [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: http://www.gennet.cz/en/hysteroskopie-laparoskopie-1404036733.html.
40. Nemocnice Havlíčkův Brod [online]. [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: http://www.onhb.cz/article.asp?nArticleID=151&nLanguageID=1.
41. GOTTARDO, F.; KLIESCH, S. 2011. *Semen analysis: spermiogram according to WHO 2010 criteria.* Deuschen Urologen Abkurzung A, 50.1: 101-108.

42. Vrozené chromosomové aberace [online]. [cit. 2017-03-18] Dostupné z: http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/genetika/res/f/2-vrozene-chromosomove-aberace.pdf.
43. *Infertility definitions and terminology.* World Health Organization [online]. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/.
44. Sefi medical instruments [online]. [cit. 2017-03-17]. Dostupné z: *http://www.fertaid.com/IVFDaily/Manuals/MaklerChamberInstructionBooklet_Ver3.pdf.*
45. ŘEŽÁBEK, K. Léčba neplodnosti 3., aktualizované vydání. Praha: Grada, 2004. 120 s. ISBN 80Y247Y1010Y2.
46. Centrum asistované reprodukce [online]. [cit. 2017-03-15]. Dosupné z: http://www.ivfbrno.cz/neplodnost-muze/t1085.
47. SADLER, Thomas, *Langmanova lékařská embryologie: Učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka.* 1. české vydání. Praha: Grada, 2011. 414 s. ISBN 978-80-247-2640-3.
48. McLachlan, M.I. 2002. *Basis, diagnosis and treatment of immunological infertility in men.* Journal of Reproductive Immunology. 57: 35-45.
49. IAMMARONNE, E., BALET, R., LOWER, A.M., GILLOT, C., GRUDZINSKAS, J.G. 2003. *Male infertility.* Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 17: 211-229.
50. ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka. *Neplodnost - útok imunity: metody vyšetření, příčiny neplodnosti, důvody potrácivosti, metody léčby, nejčastější otázky*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1493-0.
51. Loma Linda University [online]. [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: http://lomalindahealth.org/health-care/our-services/fertility/conditions-and treatments/andrology-tour.page>.
52. SHOENFELD, Yehuda, Terezie FUČÍKOVÁ a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-2044-9.
53. ŘEŽÁBEK, Karel. *Asistovaná reprodukce*. 2., aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Maxdorf, c2014. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-396-1.

54. MILLER, D.C., HOLLENBECK, B.K., SMITH, G.D., RANDOLPH, J.F., CHRISTMAN, G.M., SMITH, Y.R., LEBOVIC, D.I., OHL, D.A. 2002. *Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination.* Urology. 60: 497-501.
55. Fertimed [online]. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z*:* http://www.fertimed.cz/iui-intrauterinni-inseminace/.
56. MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. 2008. *In vitro evaluation of sperm quality.* Animal Reproduction Science. 105: 104-118.
57. Fertimed [online]. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z*:* http://www.fertimed.cz/iui-intrauterinni-inseminace/.
58. OLA, B., LEDGER, W.L. 2005. *In vitro fertilisation.* Current Obstetrics & Gynaecology. 15: 314-323.
59. In vitro fertilizace [online]. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Ivf.png.
60. CIBULA D., Henzl M.R., ŽIVNÝ J. *Základy gynekologické endokrinologie. 1.* vydání Praha: Grada Publishing, spol.s.r.o., 2002. 288 s. ISBN 80-247-0236-3.
61. Sanus [online]. [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: https://www.sanus.cz/metody-in-vitro-fertilizace-mimotelniho-oplozeni.