

Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta

Ústav experimentální biologie

Oddělení imunologie a fyziologie živočichů

**Problematika lidské reprodukce se zaměřením
na imunologické aspekty**

Diplomová práce



Autor: Jana Vlašínová

2011

Vedoucí práce: Mgr. Monika Dušková, PhD.

Prohlášení

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu, z níž jsem při zpracování své práce čerpala, řádně cituji a je uvedena v seznamu použité literatury.

V Brně 5. května 2011

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Mgr. Monice Duškové, PhD., za cenné rady a připomínky, odborné vedení, ochotné jednání a poskytnuté materiály při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Vítu Hubinkovi za konzultace a informace z praxe k dané problematice.

OBSAH

1. Abstrakt	7
2. Abstract	7
3. Úvod	8
4. Reprodukční soustava	8
4.1. Mužský pohlavní systém	9
4.1.1. <i>Varle (testis)</i>	9
4.1.1.1. Spermatogeneze.....	11
4.1.1.2. Ejakulát - sperma.....	11
4.1.1.3. Spermie.....	12
4.1.1.4. Seminální plazma.....	14
4.1.2. <i>Vývodné pohlavní cesty a přídatné žlázy</i>	15
4.1.3. <i>Zevní pohlavní orgány</i>	16
4.2. Ženský pohlavní systém	17
4.2.1. <i>Vaječník (ovarium)</i>	17
4.2.1.1. Oocyt a zona pellucida.....	19
4.2.1.2. Folikulární tekutina.....	20
4.2.1.3. Oogeneze.....	20
4.2.2. <i>Vejcovod (tuba uterina)</i>	21
4.2.3. <i>Děloha (uterus)</i>	21
4.2.4. <i>Pochva (vagina)</i>	22
4.2.5. <i>Zevní pohlavní orgány</i>	23
4.2.6. <i>Imunologické parametry ženského pohlavního traktu</i>	23
4.2.7. <i>Menstruační cyklus</i>	25
4.2.8. <i>Ovulace</i>	27
5. Spermie v ženském pohlavním traktu	29
6. Neplodnost	36
6.1. Neplodnost mužů	36
6.1.1. <i>Porucha pohlavní aktivity</i>	37
6.1.2. <i>Genetické příčiny mužské neplodnosti</i>	37
6.1.3. <i>Varikokéla</i>	38
6.1.4. <i>Poruchy endokrinního systému</i>	39
6.1.5. <i>Infekce a zánětlivá onemocnění</i>	39
6.1.6. <i>Úrazy a chirurgická poranění genitálií</i>	40

6.1.7. <i>Vliv toxických látek</i>	40
6.1.8. <i>Imunologické příčiny mužské neplodnosti</i>	41
6.1.8.1. <i>Protilátky shlukující spermie</i>	43
6.1.8.2. <i>Protilátky znemožňující pohyb spermíí</i>	44
6.1.8.3. <i>Protilátky poškozují spermie</i>	45
6.1.8.4. <i>Buněčná imunita proti spermíím</i>	45
6.1.9. <i>Vyšetřovací metody</i>	45
6.1.9.1. <i>Spermigram</i>	45
6.1.9.2. <i>Anamnéza a klinické vyšetření</i>	48
6.1.9.3. <i>Hormonální vyšetření</i>	49
6.1.9.4. <i>Vyšetření protilátek proti spermíím</i>	49
6.2. <i>Ženská neplodnost</i>	51
6.2.1. <i>Ovariální faktor</i>	51
6.2.2. <i>Tuboperitoneální faktor</i>	52
6.2.3. <i>Endometrióza</i>	52
6.2.4. <i>Děložní faktor</i>	54
6.2.5. <i>Cervikální faktor</i>	54
6.2.6. <i>Poševní faktor</i>	55
6.2.7. <i>Věk</i>	55
6.2.8. <i>Psychogenní faktor</i>	55
6.2.9. <i>Imunologický faktor</i>	55
6.2.10. <i>Vyšetřovací metody</i>	58
6.2.10.1. <i>Anamnéza</i>	58
6.2.10.2. <i>Měření bazální teploty</i>	58
6.2.10.3. <i>Zobrazovací metody</i>	59
6.2.10.4. <i>Hormonální vyšetření</i>	59
6.2.10.5. <i>Imunologická vyšetření</i>	59
6.3. <i>Léčba neplodnosti</i>	60
6.3.1. <i>Kondomová terapie</i>	61
6.3.2. <i>Imunoterapie</i>	61
6.3.3. <i>Inseminace</i>	62
6.3.4. <i>In vitro fertilizace</i>	64
6.3.5. <i>Intracytoplazmatická injekce spermie</i>	69
7. <i>Závěr</i>	72
8. <i>Seznam zkratk</i>	73

9. Seznam použité literatury	74
10. Seznam internetových odkazů	80

1. ABSTRAKT

Lidská reprodukce je velmi složitý proces, jehož cílem je splynutí pohlavních buněk, gamet, a vznik nového jedince. Úspěch reprodukčního procesu je dán normální stavbou a činností pohlavních soustav muže a ženy a také mikroprostředím uvnitř pohlavních soustav. Nedojde-li po pravidelném pohlavním styku do jednoho roku k těhotenství, označuje se tento stav jako neplodnost. Mezi příčiny neplodnosti patří genetické a hormonální poruchy, anatomické abnormality a také imunologické faktory, např. protilátky proti spermiím. V dnešní době se s rozvíjející technikou neustále zdokonalují diagnostické metody a možnosti léčby neplodnosti. Metody asistované reprodukce (*in vitro* fertilizace, intrauterinní inseminace) jsou při léčbě neplodnosti využívány stále častěji.

2. ABSTRACT

Human reproduction is a complex process, whose aim is the fusion of sex cells, gametes, and a conception of a new individual. Success of the reproductive process is determined by the normal anatomy of reproductive system from man and woman and by the microenvironment within reproductive system. If there is no pregnancy after regular sexual intercourse within a year, is the state as infertility classified. The causes of infertility include genetic and hormonal disorders, anatomic abnormalities and immunological factors, such as antibodies against sperm. Today with technology development are diagnostic methods and treatment possibilities improved. Methods of assisted reproduction (*in vitro* fertilization, intrauterine insemination) become in infertility treatment more common used.

3. ÚVOD

Lidská reprodukce je velmi složitý komplex psychických a fyzických procesů, jejichž cílem je zplodění potomka. Každý člověk má právo na založení rodiny, avšak v dnešní době se stále častěji setkáváme s případy, kdy páry nejsou schopny dosáhnout těhotenství přirozenou cestou a vyhledávají lékařskou pomoc. Stav, kdy páry nedosáhnou těhotenství pravidelným pohlavním stykem za dobu jednoho roku, se označuje jako neplodnost. Neplodnost postihuje 10 až 15 % partnerských dvojic.

Cílem této diplomové práce je formou literární rešerše zpracovat problematiku lidské reprodukce. První část práce je zaměřena na popis stavby pohlavních systémů muže a ženy a zabývá se také jejich mikroprostředím. Popsána je rovněž morfologie a vývoj pohlavních buněk. Práce se zabývá cyklickými změnami v pohlavním systému ženy a pojednává o procesech spojených se vznikem embrya, oplozením, tedy cestou spermií pohlavním traktem ženy a vlastní interakcí spermie s oocytem. Pozornost je věnována přítomnosti složek imunitního systému v reprodukčních soustavách muže a ženy a jejich úloze při procesu reprodukce.

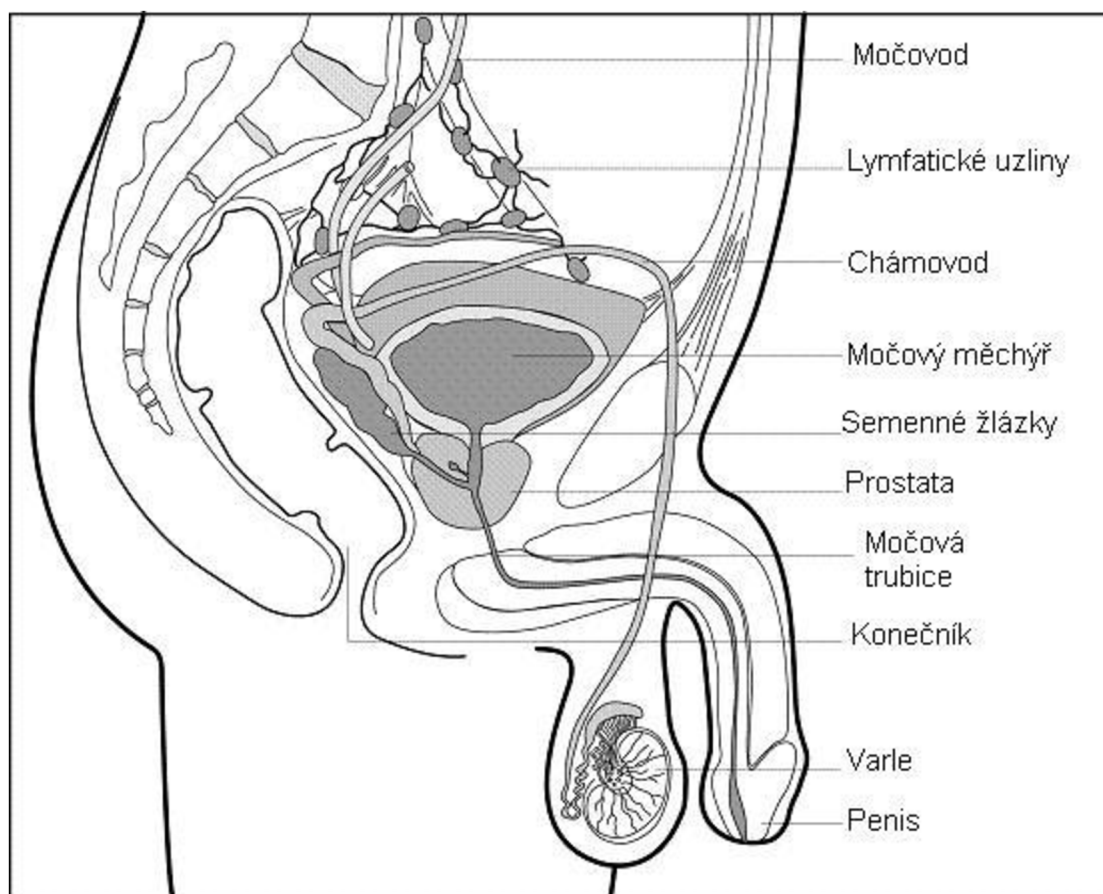
Druhá část diplomové práce se zabývá jedním z problémů souvisejících s reprodukcí, a to neplodností. Popisuje nejvýznamnější příčiny neplodnosti ze strany muže a ženy a jejich diagnostiku. Podrobněji jsou rozebrány imunologické příčiny neplodnosti. Uvedeny jsou některé významné způsoby léčby neplodnosti, především moderní metody asistované reprodukce.

4. REPRODUKČNÍ SOUSTAVA

Z biologického hlediska zajišťuje reprodukční soustava pohlavní rozmnožování, tj. splynutí ženských a mužských pohlavních buněk a vytvoření zygoty, která se stává základem nového jedince. Reprodukční orgány muže i ženy jsou přizpůsobené specifickým úlohám, které v procesu rozmnožování plní. Nezastupitelnou roli sehrává sekrece pohlavních hormonů pohlavními žlázami, včetně produkce řady regulačních hormonů u ženy v průběhu těhotenství (Merkunová, Orel, 2008).

4.1. Mužský pohlavní systém

K mužskému pohlavnímu systému patří jednak vlastní pohlavní žláza, varle, které produkuje pohlavní buňky, spermie, a kromě toho má funkci endokrinní žlázy, produkující testosteron. Další součástí mužského pohlavního systému jsou vývodné cesty pohlavní, do kterých vyúsťují přídatné žlázy.



Obr. č. 1: **Mužský pohlavní systém**

Převzato a upraveno podle URL 1

4.1.1. Varle (testis)

Na povrchu je varle obaleno tuhou vazivovou blánou, tunica albuginea testis, na kterou ze zevní strany naléhá viscerální list tunica vaginalis. Pod tunica albuginea je tenká tunica vasculosa, tvořená řídkým kolagenním vazivem s krevními cévami. Z tunica albuginea vybíhají do varlete tenké vazivové přepážky septula testis, které rozdělují varle asi na 200 –

300 lalůčků, lobuli testis. V lalůčcích probíhají stočené semenotvorné kanálky, tubuli seminiferi contorti. V každém lalůčku jsou 1 – 4 kanálky (Malínský a kol., 2004).

Intersticiium varlete je tvořeno řídkým kolagenním vazivem, které je bohatě zásobeno cévami. Důležitou součástí intersticiálního vaziva jsou endokrinní intersticiální **Leydigovy buňky**. Tyto buňky mají velké oválné jádro, bohatě vyvinuté hladké endoplazmatické retikulum, tubulární mitochondrie, tukové kapénky a proteinové inkluze označované jako Reinkeho krystaly. Leydigovy buňky syntetizují a produkují mužský pohlavní hormon, testosteron.

Stočené semenotvorné kanálky jsou vystlány zárodečným epitelem, který je tvořen podpůrnými Sertoliho buňkami a semenotvornými buněčnými elementy. **Sertoliho buňky** jsou velké buňky s nepravidelným jádrem, hladkým endoplazmatickým retikulem, lipidovými kapénkami a proteinovými krystaloidními inkluzemi, označovanými jako krystaly Charcot-Boettcherovy). V bazální části jsou boční stěny sousedních Sertoliho buněk spojeny pevnými spoji – zonulae occludentes. Cytoplazma Sertoliho buněk obklopuje semenotvorné buněčné elementy, především spermatidy, které jsou zanořeny do její apikální části a v tomto místě dochází k jejich dozrávání a přeměně na spermie (Malínský a kol., 2004). Sertoliho a zárodečné buňky produkují řadu cytokinů, např. interleukiny IL-1, IL-6, IL-11, tumor nekrotizující faktor (TNF), interferony. Tyto cytokiny zajišťují komunikaci mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami, aby usnadnily pohyb zárodečných buněk zárodečným epitelem, a jinými buněčnými elementy v epitelu například během diferenciací zárodečných buněk. Např. TNF- α hraje roli při regulaci apoptózy zárodečných buněk, remodelaci spojů a produkci steroidů Leydigovými buňkami (Xia a kol., 2005).

Semenotvorné buňky zárodečného epitelu se diferencují již v raném embryonálním období z nediferencovaných kmenových buněk – gonocytů. Tyto buňky intenzivně proliferují a procházejí mnoha generacemi buněčného cyklu. Po pubertě, kdy začíná spermatogeneze, dochází během buněčného cyklu k postupnému diferencování spermatogonií na tři typy. Nejstarší buněčný element představuje tmavá spermatogonie A. Má rezervní význam, většinou dočasně neproliferujících elementů. Světlá spermatogonie A pokračuje v proliferaci, prochází opakovaně buněčným cyklem a udržuje konstantní populaci těchto elementů v zárodečném epitelu. Spermatogonie B se vyčleňují z buněčného cyklu a zahajují proces spermatogeneze.

4.1.1.1. Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, během kterého vznikají haploidní mužské pohlavní gamety z diploidních spermatogonií. Spermatogeneze je rozdělena do dvou fází – spermatocytogeneze a spermatohistogeneze.

V průběhu spermatocytogeneze dochází nejdříve k mitotickému rozmnožování spermatogonií, které se postupně diferencují přes dva typy spermatogonií na spermatogonie B. Spermatogonie B prochází poměrně dlouhou S fází buněčného cyklu a diferencuje se na primární spermatocyt. Následuje první zrací dělení, meiotické dělení. Výsledkem této fáze jsou dva sekundární spermatocyty s haploidním počtem chromosomů. Druhé zrací dělení navazuje bezprostředně na předchozí, probíhá obdobně jako mitóza. Výsledkem jsou čtyři spermatidy, dvě spermatidy obsahují chromosom X a další dvě chromosom Y.

Spermatohistogeneze je proces, kdy již nedochází k dělení buněk, ale k diferenciaci spermatidy na zralé spermie. Jaderný chromatin silně kondenzuje a jádro se přeměňuje na hlavičku spermie. Z Golgiho komplexu vzniká akrosom (Malínský a kol., 2004).

4.1.1.2. Ejakulát – sperma

Sperma má dvě složky – vlastní gamety, spermie, a seminální plazmu, která je tvořena sekrety stočených kanálků, nadvarlete, semenných váčků, prostaty a bulbouretrálních žláz.

Ejakulát není homogenní tekutina, má tři složky:

1. První složka je tvořena především sekretem prostaty. Je řídká, mléčného vzhledu. Obsahuje kyselou fosfatázu a fibrinolysin.

2. Druhá složka je objemově největší a obsahuje ve velkém množství normální spermie.

3. Třetí složka je tvořena především sekrety semenných váčků. Je rosolovité povahy, obsahuje fruktózu a prostaglandiny a převážně nefunkční a převážně abnormální formy spermií (Malínský a kol., 2004).

4.1.1.3. Spermie

Spermie je vysoce specializovaná buňka, která je svou stavbou přizpůsobena k přenosu genetické informace při oplození. Jaderný chromatin je velmi koncentrován v hlavičce, cytoplazmatické složky se značně redukovaly a transformovaly v bičík, sloužící aktivní lokomoci. Spermie (obr. č. 2) se skládá z hlavičky, středního oddílu (tvořený krčkem a spojovacím oddílem) a bičíku (tvořený hlavní a terminální částí) (Malínský a kol., 2004).

Hlavička mužské spermie má oválný tvar, je oploštělá. Její hlavní součást tvoří jádro se silně kondenzovaným chromatinem. Na povrchu je kryta cytoplazmatickou membránou a pod ní se nachází vakovitý útvar, akrosom, který čepičkovitě nasedá na apikální oploštělou část jádra. Akrosom vzniká z Golgiho komplexu a obsahuje velké množství lytických enzymů, které při oplození umožňují spermií proniknout do vajíčka. Při bazální části hlavičky je obdobný světlejší útvar, označovaný jako postakrosomální pochva. Ohraničení hlavičky proti krčku tvoří bazální ploténka (Malínský a kol., 2004).

Hlavní součástí krčku je proximální centriol, kolem kterého je uloženo 9 příčně žíhaných provazů označovaných jako segmentované chordy krčku. Na hranici se spojovacím oddílem je distální centriol, který představuje bazální tělísko osového vlákna bičíku, axonemy.

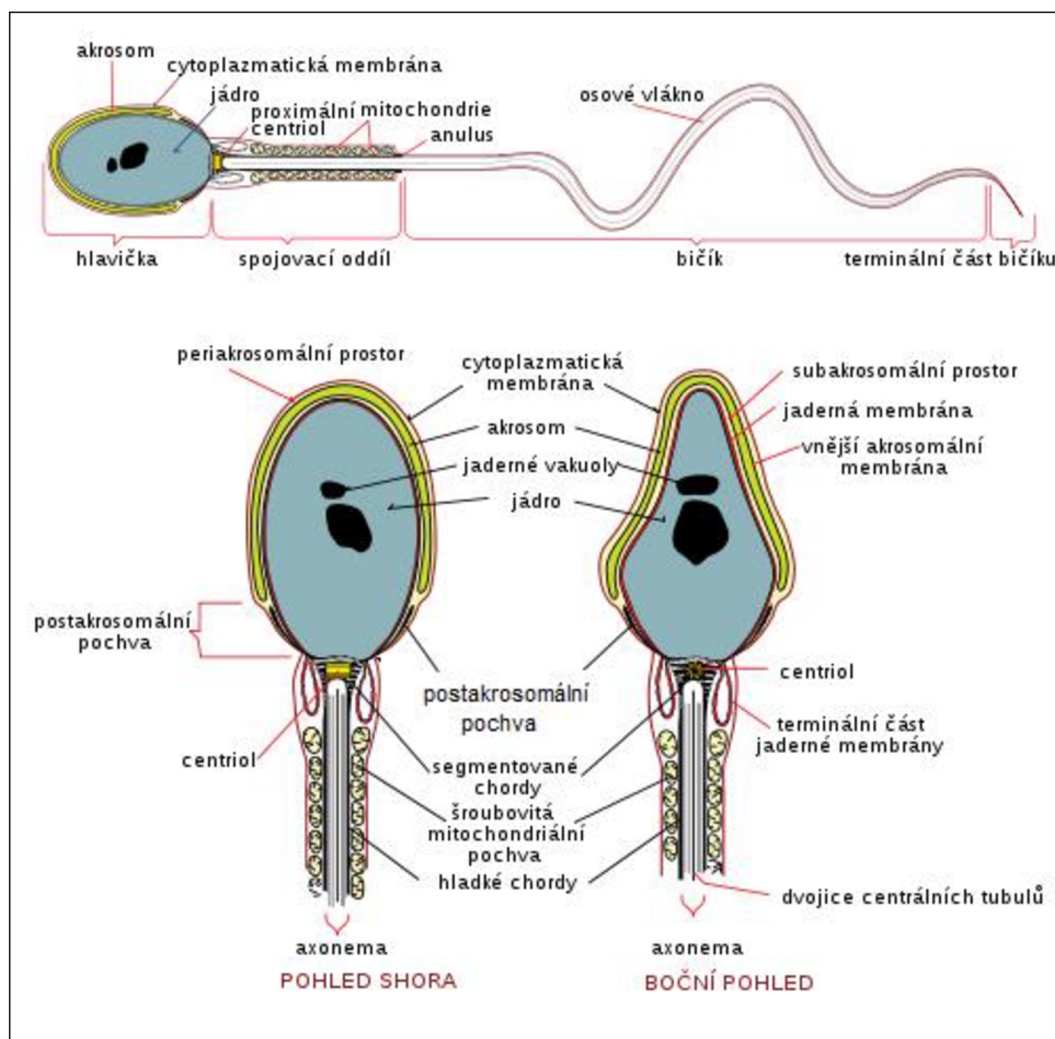
Středem spojovacího oddílu probíhá osová vlákna – axonema. Axonemu tvoří na obvodu 9 párů mikrotubulů a uprostřed dvojice centrálních tubulů. K periferním dvojicím mikrotubulů se přikládá 9 podélně probíhajících tmavých provazců – hladké chordy, které jsou pokračováním žíhaných chord v krčku. Hladké chordy se uplatňují při pohybu bičíku. Zevně od hladkých chord jsou uloženy mitochondrie, které tvoří souvislou vrstvu šroubovitě probíhající v celém spojovacím oddíle a označovanou jako mitochondriální pochva (Malínský a kol., 2004).

Hlavní část bičíku má v osové části stejné uspořádání jako spojovací oddíl. V zevní vrstvě se nachází místo mitochondrií fibrózní pochva, která se skládá ze dvou poloobloukovitých žeber. S žebry splývají dvě hladké chordy a tvoří dva podélné sloupce, které rozdělují hladké chordy na dvě asymetrické poloviny. Toto uspořádání způsobuje při kontrakci vlnitý pohyb bičíku.

Terminální část bičíku je tvořena pouze axonemou a na povrchu ohraničena cytoplazmatickou membránou (Malínský a kol., 2004).

Bičík spermie je dlouhý asi 65 μm a široký 1 μm . Umožňuje progresivní pohyb celé spermie kupředu. Bičík spermie se „mrskne“ desetkrát za sekundu, ale forma pohybu celé

spermie je velmi různorodá a postupuje od báze k vrcholu bičíku. V ejakulátu se rychlost spermií uvádí 10 – 60 μm za sekundu (Ulčová-Gallová, 2006).



Obr. č. 2: Schéma spermie

Převzato a upraveno podle URL 2

V laboratorních podmínkách se pohyblivost spermií dařilo zvyšovat použitím malých koncentrací látek obsažených v čaji, kávě, čokoládě. Progresivnímu pohybu spermií naopak škodí peroxid vodíku nebo přítomnost lidské sliny. Z praktického hlediska tedy není dobré, aby neplodné páry používaly sliny, jako zvlhčovalo pochvy. Slina totiž obsahuje vedle celé řady choroboplodných zárodků také amylázu štěpící škroby, a lysozym, které snižují pohyb spermií.

Pohyblivost spermií zvyšuje nižší teplota. Nedojde-li k sestupu varlat původně uložených v dutině břišní do šourku, je vývoj spermií také poškozen, protože pro vyzrání varlat a spermií je zapotřebí teploty o 2 °C nižší, než je teplota těla. Zralé spermie proto

mohou za normálních okolností produkovat pouze varlata uložená mimo břišní dutinu. Pacientům se zhoršenými parametry spermiogramu se proto doporučuje nosit volné kalhoty, aby se třením v těsném oblečení nezvyšovala teplota v oblasti šourku. Také se nedoporučují koupele v horkých lázních, pobyt v sauně, notebook na klíně.

Mezi další prvky, které snižují pohyblivost spermií, patří alkohol, nikotin, drogy, kořeněná jídla, práce s těžkými kovy a pobyt v ionizujícím záření (Ulčová-Gallová, 2006).

4.1.1.4. Seminální plazma

Tekutina, ve které se pohybují spermie, se nazývá seminální plazma. Patří mezi zcela přirozené prostředí pro spermie a může některými vlastnostmi ovlivnit oplodňovací schopnost spermií. Seminální plazma je složena ze 100 – 200 bílkovin, obsahuje výměšky seminálních váčků, prostaty a přídatných žlázek. Tyto výměšky jsou složeny z bílkovin, lipidů a sacharidů. Látkové složení je velmi podobné složení lidské krevní plazmy, liší se v obsahu sacharidů. V seminální plazmě je vyšší obsah fruktózy a nižší obsah glukózy. Fruktóza je považována za hlavní zdroj energie pro spermie. Prostatická složka seminální plazmy chrání spermie před toxickým poškozením, protože obsahuje antioxidantní látky, vápník, hořčík a zinek. Seminální plazma mužů s nižším počtem spermií obsahuje více cholesterolu (Ulčová-Gallová, 2006).

Seminální plazma je obvykle považována za médium pro transport a výživu spermií. Ale přibývají důkazy, že vstup seminální plazmy do pohlavního traktu žen je spojen s výsledky těhotenství. Tento efekt zřejmě souvisí s vysokými koncentracemi signálních látek, jako jsou prostaglandiny, cytokiny a růstové faktory, které jsou sekretovány seminálními žlázami a prostatickou žlázou. Tyto molekuly mají různé funkce, např. interakce s epiteliálními buňkami v děložním krčku a uvnitř děložní dutiny. U lidí sperma vyvolává infiltraci epiteliálních a hlubokých vrstev stromatu děložního krčku makrofágy a lymfocyty. Regulace infiltrace krčku leukocyty probíhá aktivací pro-zánětlivých cytokinů interleukinu-6 (IL-6), IL-8 a jiných. Seminální plazma stimuluje expresi T_H1 cytokinů v epiteliálních buňkách endometria, které jsou považovány za relevantní v lidské implantaci, např. IL-6, zatímco T_H2 cytokiny, které zřejmě nepodporují implantaci, např. TNF- α , nejsou stimulovány. Proto bylo uvažováno, že seminální plazma prostupuje děložním krčkem a mění vnímavost endometria (Von Wolff a kol., 2007).

Několik studií se zabývalo zjišťováním koncentrací cytokinů a růstových faktorů v seminální plazmě plodných a neplodných mužů. Byly však zjištěny rozporuplné výsledky se zvýšenými, sníženými nebo shodnými koncentracemi cytokinů ve spermatu neplodných mužů (Von Wolff a kol., 2007).

Dalším imunologickým faktorem, jehož přítomnost a funkce v seminální plazmě je diskutována, je komplement (C). Přítomností komplementu v seminální plazmě se zabývalo několik studií a získaná data jsou často matoucí a protichůdná. Přítomnost C3 a C4 byla opakovaně dokumentována v normální i patologické seminální plazmě, ale jejich přesné hladiny nebyly stanoveny. I přes přítomnost komplementu v seminální plazmě existuje pouze málo důkazů pro funkční činnost komplementu v této tekutině (Harris a kol., 2006).

Přítomnost komplementu, lysozymu a dalších faktorů většinou svědčí o účasti zánětlivého procesu, který může být příčinou snížené funkce spermií. Na druhou stranu obsahuje seminální plazma imunosupresivní látku, která zase navozuje imunologickou snášenlivost ke geneticky nepodobným buňkám, jako je např. vajíčko (Ulčová-Gallová, 2006).

Skutečně existuje hojná literatura, která se datuje více než 25 let zpět, která ukazuje silnou anti-komplementovou aktivitu v seminální plazmě. Je dobře popsána imunosupresivní aktivita v seminální plazmě a anti-komplementová aktivita přispívá k imunosupresivní kapacitě této tekutiny (Harris a kol., 2006). Imunosupresivní látka je neustále předmětem zkoumání. Genetická různorodost ve velikosti imunosupresivního účinku může z části vysvětlit tvorbu protilátek proti spermiím v ženském reprodukčním traktu nebo slabou protilátkovou a buněčnou odpověď k infekcím pohlavního a močového ústrojí u muže. V neposlední řadě může mít vztah i k častějšímu nálezů nádorů prostaty (Ulčová-Gallová, 2006). Silné imunosupresivum nacházející se ve vysoké koncentraci v seminální plazmě je 19-hydroxyprostaglandin E. K dalším imunosupresivním faktorům patří polyaminy a transglutamináza (Bronson, 2000).

Seminální plazma je tedy také považována za prostředek pro komunikaci mezi mužskými a ženskými reprodukčními tkáněmi. Ovlivněná biologická aktivita seminální plazmy může přispět k neplodnosti (Von Wolff a kol., 2007).

4.1.2. Vývodné pohlavní cesty a přídatné žlázy

Vývodné pohlavní cesty muže tvoří nadvarle, chámovod, semenný provazec, močová trubice. K přídatným žlázám patří semenné váčky, předstojná žláza a bulbouretrální žlázy.

Nadvarle (epididymis) naléhá na horní a zadní plochu varlete. Tvoří jej stočený vývod (ductus epididymis), do které se spermie přesouvají ze semenotvorných kanálků varlat, hromadí, mísí s hlenovitým sekretem výstelky vývodu a dále dozrávají, tj. získávají hybnost.

Chámovod (ductus deferens) je vývodem nadvarlete a má délku přibližně 40 cm. Tříselným kanálem proniká do dutiny břišní, otáčí se směrem do pánve, běží po zadní stěně

močového měchýře, spojuje se vývodem semenných váčků a společně ústí do močové trubice v místě, kde prochází předstojnou žlázou (Merkunová, Orel, 2008).

Semenný provazec (funiculus spermaticus) označuje útvar, ve kterém probíhá chámovod do dutiny břišní společně s tepnou varlete, žilní pletení, mízními cévami a podélně uloženým svalem.

Močová trubice (uretra) u muže je společnou vývodnou cestou pro moč i ejakulát. Po výstupu z močového měchýře prochází prostatou, pokračuje přes svaly pánevního dna a nejdelší úsek probíhá penisem.

Semenné váčky (vesiculae seminales) jsou také označovány termínem měchýřkovité žlázy. Jedná se o párové žlázy, které přiléhají k močovému měchýři. Vydávají hojný, vazký sekret, který přispívá především k výživě, podpoře životnosti a pohyblivosti spermií. Vývody žlázek se spojují s koncovou částí chámovodu.

Předstojná žláza (prostata) je útvar velikosti kaštanu ležící pod močovým měchýřem. Obkružuje prostatickou část močové trubice. Prostata je rozdělena na několik laloků se samostatnými vývody, které ústí jednotlivě do močové trubice. Produktem této žlázy je sekret, který plní funkci zdroje živin, má antibakteriální efekt a zásaditou reakci, která podporuje pohyblivost spermií.

Bulbouretrální žlázy (glandulae bulbouretrales) jsou párové žlázy s dlouhými vývody, které ústí do močové trubice v oblasti penisu. Během pohlavního vzrušení produkují hlenový sekret, který činí konec penisu kluzkým (Merkunová, Orel, 2008).

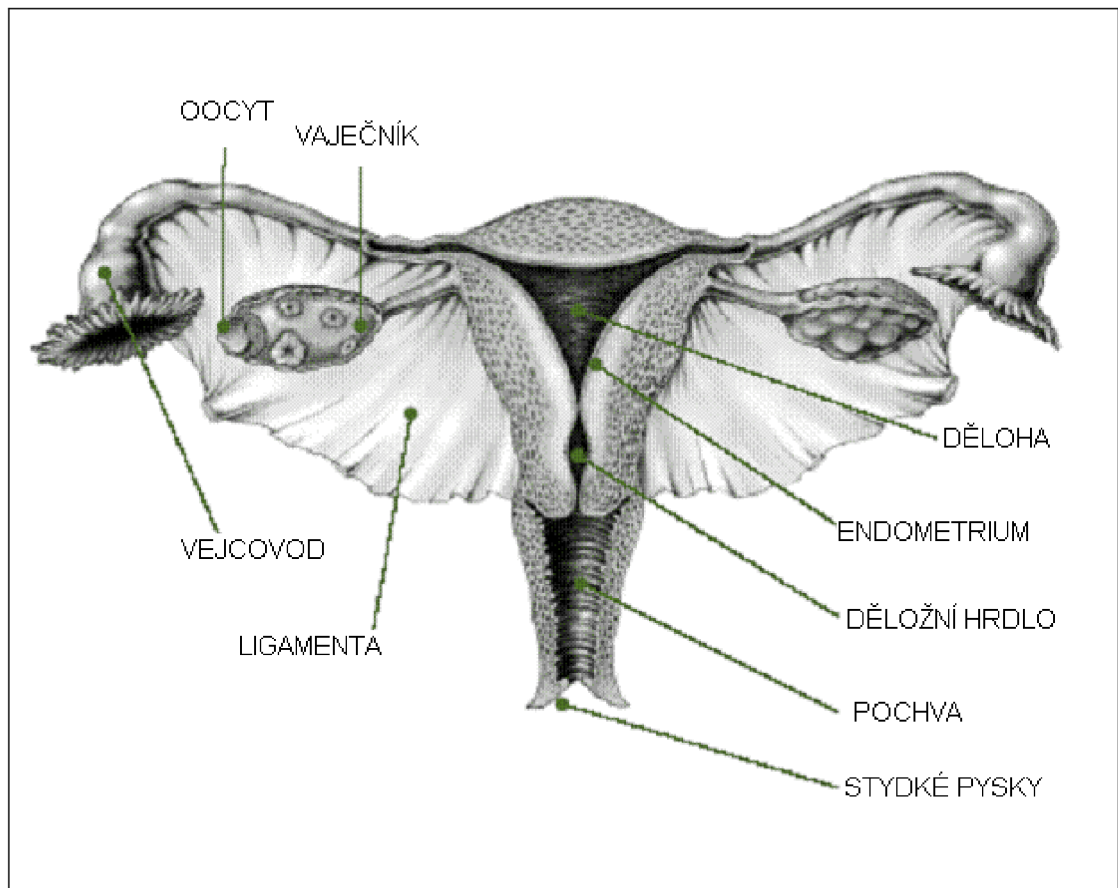
4.1.3. Zevní pohlavní orgány

Šourek (scrotum) je kožní vak, od puberty ochlupený. V podkoží a středové přepážce šourku se nachází snopečky hladké svaloviny. Přepážka rozděluje šourek na dvě poloviny, v každé z nich je uloženo jedno varle s nadvarletem a začátek chámovodu. Poloha šourku zajišťuje varlatům teplotu o 2 – 4 °C nižší, než je v dutině břišní. Stah svaloviny šourku nebo ochabnutí ovlivňuje tepelné ztráty jeho povrchem a upravuje teplotu varlat.

Pyj (penis). Mužský pohlavní úd má válcový tvar, je pokrytý kůží a jeho středem prochází močová trubice. Tělo penisu je tvořeno třemi pruhy topořivé tkáně, kryté vazivovým obalem, pod kterým je vrstva hladké svaloviny a elastické vazivo. Žalud penisu je koncová, rozšířená část houbovitého tělesa, která obkružuje zevní ústí močové trubice. Kožní kryt žaludu tvoří rezervní, volně posunovatelná řasa zvaná předkožka (praeputium) (Merkunová, Orel, 2008).

4.2. Ženský pohlavní systém

Ženský pohlavní systém (obr. č. 3) je tvořen vlastní gonádou, vaječníkem, a vývodními cestami, které neslouží pouze k transportu gamet, ale zajišťují vývoj a výživu plodu.



Obr. č. 3: **Ženský pohlavní systém**

Převzato a upraveno podle URL 3

4.2.1. Vaječník (ovarium)

Vaječník je párový oválný útvar uložený v malé pánvi. Histologická stavba ovaria dospělé ženy je složitá a vykazuje cyklické změny. Povrch ovaria je kryt jednovrstevným epitelem (mezotelem), pod nímž se nachází hustá vrstva vaziva, tunica albuginea. Vlastní stroma vaječnicku se dělí na kůru (cortex ovarii) a cévnatou vazivovou dřeň (medulla) (Citterbart a kol., 2001). Dřeň je tvořena řídkým kolagenním vazivem, ve kterém probíhají krevní a lymfatické cévy a nervy. V oblasti hilu vaječnicku se nachází tzv. buňky hilové, které produkují androgeny. Kůra je tvořena vazivem, které je velmi buněčné a obsahuje málo

základní hmoty. V kůře se nachází vaječné folikuly v různém stupni vývoje, žlutá a bílá tělíska (Malínský a kol., 2004).

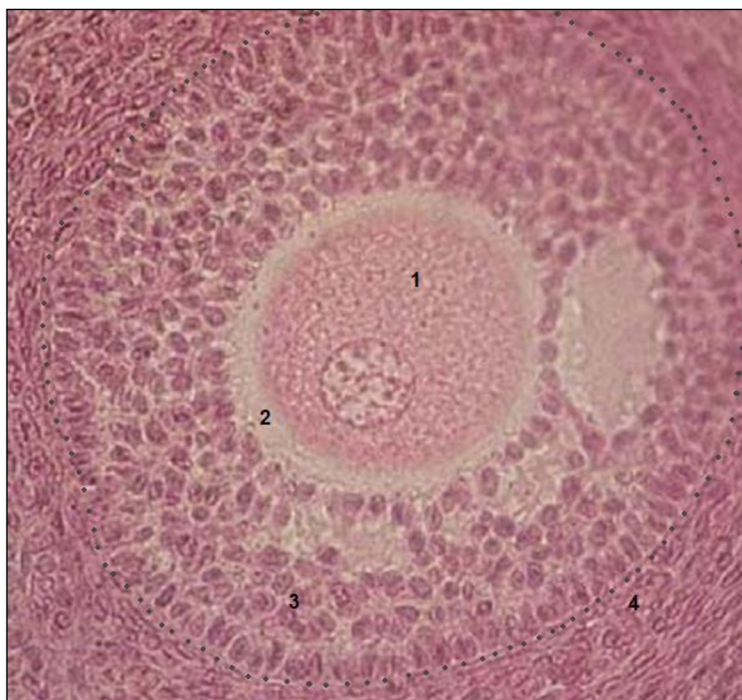
Největší počet folikulů (6 – 7 miliónů v obou ovarích) je u plodu v 5. – 6. měsíci těhotenství, při narození již pouze 1 – 2 milióny a v období menarche (první menstruace) kolem 500 000 (Citterbart a kol., 2001).

Primordiální folikul – jeho průměr je zhruba 30 μm . Je tvořen vlastní vaječnou buňkou, oocytem, obklopeným folikulárními buňkami, tvořícími vrstvu podobnou jednovrstevnému plochému epitelu. Primordiální folikuly vznikají v enormním množství již v prenatálním vývoji, po narození se již netvoří a po pubertě probíhá jejich dozrávání.

Primární folikul – jeho velikost se zvětšuje až na 400 μm . Oocyt je větší, obklopen jednou vrstvou folikulárních buněk. Takové folikuly se označují jako unilamelární. Folikulární buňky postupně proliferují a tvoří několik vrstev, takový folikul se označuje jako multilamelární. Folikulární buňky se v tomto a dalších stádiích označují jako buňky granulózní. Na povrchu oocytu se začíná tvořit sklovitá membrána, zona pellucida, a vazivo obklopující folikul vytváří obal, theca folliculi.

Sekundární folikul s dutinou (obr. č. 4) – folikul zvětšuje svou velikost, přibývá granulózních buněk a tyto se rozestupují. Uvnitř folikulu se vytvoří dutina, antrum folliculi, která je vyplněna serózní tekutinou, liquor folliculi. Thekální obaly se začínají rozdělovat na dvě vrstvy, theca folliculi interna a externa.

Terciární, zralý (Graafův) folikul – útvar velikosti 10 – 15 mm s velkou dutinou vyplněnou likvorem. Stěna folikulu je tvořena několika vrstvami: stratum granulosum je vrstva folikulárních buněk, které vystylají dutinu folikulu a nasedají na tenkou bazální membránu. Následuje theca folliculi interna, tvořená modifikovanými vazivovými buňkami prostoupená četnými krevními kapilárami. Na povrchu obaluje folikul theca folliculi externa, tvořená vazivovými buňkami a kolagenními vlákny. Do dutiny folikulu vyčnívá útvar zvaný vaječný hrbolek, cumulus oophorus. Obsahuje vlastní vaječnou buňku. Tento zralý oocyt je značně velký a má průměr 100 – 150 μm . Na povrchu ho obklopuje výrazná sklovitá blanka, zona pellucida, na kterou nasedá jedna vrstva radiálně uspořádaných folikulárních buněk, corona radiata (Malínský a kol., 2004).



Obr. č. 4:
Sekundární folikul
 vyznačený na snímku
 histologického preparátu:
 1 – oocyt, 2 – zona
 pellucida, 3 – granulózní
 buňky, 4 – thekální
 buňky. Převzato a
 upraveno podle URL 4

4.2.1.1. Oocyt a zona pellucida

Oocyt je vysoce specializovaná buňka, jejíž diferencovaný fenotyp podporuje oplození a raný vývoj embrya. Obsahuje velké množství organel typických pro eukaryotické buňky, např. endoplazmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát, ale také disponuje organelami jedinečnými pro oocytární funkce (Song, Wessel, 2005). Pod povrchovou membránou oocytu jsou speciální kortikální granula, která při procesu oplození vyvolají kortikální reakci (Malínský a kol., 2004). Kromě toho je ještě oocyt obklopen extracelulární matrix. U savců je oocyt obklopen hustou sítí, zvanou zona pellucida (Song, Wessel, 2005). Mezi zona pellucida a povrchovou oolemou je úzký periviteliní prostor, do kterého vybíhají jednak mikroklyky oocytu a z druhé strany cytoplazmatické výběžky folikulárních buněk (Malínský a kol., 2004).

Zona pellucida (ZP) je tvořena v průběhu oogeneze a její tloušťka se zvětšuje s růstem oocytu. Při oplození se spermie musí navázat a proniknout ZP, aby se sloučil s plazmatickou membránou oocytu (Song, Wessel, 2005). Lidská zona pellucida je složena ze 3 hlavních glykoproteinů, které jsou označovány jako ZP1, ZP2 a ZP3. Zona pellucida hraje rozhodující roli při oplodnění savců. Její význam spočívá v druhově specifickém rozpoznání a vazbě spermií a indukci akrozomální reakce. Brání polyspermii a předčasné implantaci blastocysty. Vzhledem k důležitosti glykoproteinů ZP v procesu oplodnění jsou tyto předmětem zájmu při vývoji antikoncepce na imunologické bázi (Gupta a kol., 2004).

4.2.1.2. Folikulární tekutina

Folikulární tekutina představuje velmi důležité mikroprostředí vyvíjejícího se oocytu. Vzniká jako produkt přestupu složek krevní plazmy přes bariéru krev – folikul a také vlastní sekrecí granulózními a thekálními buňkami. Je opodstatněné domnívat se, že biochemické vlastnosti folikulární tekutiny hrají významnou roli při ovlivňování kvality oocytů a jejich následující schopnosti dosáhnout oplození a při vývoji embrya (Revelli a kol., 2009). Bývá slabě nažloutlé barvy, obsahuje sodík, draslík, hořčík, zinek, jednoduché i složitější sacharidy a protilátky třídy IgG a IgA (Ulčová-Gallová, 2006). Dále jsou ve folikulární tekutině přítomny hormony, růstové faktory, interleukiny, reaktivní formy kyslíku, prostanoidy a anti-apoptotické faktory. Přítomnost prozánětlivých cytokinů je výsledkem místní ovariální syntézy a uvolňování v průběhu zrání folikulů a ovulace (Revelli a kol., 2009). Různé studie se zabývají množstvím a rozdíly mezi jednotlivými buňkami a cytokiny u žen s poruchami plodnosti, endometriózou nebo jinými onemocněními, jako je např. cukrovka (Ulčová-Gallová, 2006).

4.2.1.3. Oogeneze

Oogeneze probíhá v podstatě obdobně jako spermatogeneze, ale má několik odlišností. U savců je oogeneze zahájena již v začátku vývoje plodu a ukončena je o měsíce až roky později v pohlavní dospělosti. Oogeneze je zahájena na úrovni primordiálních zárodečných buněk. Tyto prekursorů oocytů jsou velmi pohyblivé a mohou reagovat na chemotaktické podněty, které jim umožňují migrovat z místa původu do základů pohlavních orgánů. Poté, co osídlí vyvíjející se vaječníky, ztrácí pohyblivost a jsou označovány jako *oogonie*. Tyto kmenové buňky rozšiřují populaci zárodečných buněk prostřednictvím vysoké frekvence mitotických dělení a nakonec podstoupí poslední replikaci DNA před zahájením meiózy a přeměnou na oocyt (Picton a kol., 1998). Vzniká tak *primární oocyt*, který vstupuje do meiózy.

V lidském vaječníku je meiotické dělení zahájeno na konci prvního trimestru těhotenství. Tento proces však není synchronní a vaječník plodu v polovině těhotenství tak obsahuje kompletní spektrum oogonií a oocytů v profázi. (Picton a kol., 1998). Oocyty vstoupí do profáze, homologní chromozomy podstoupí párování, synapsi a výměnu genetického materiálu v procesu známém jako rekombinace nebo crossing-over. Profáze proběhne až do diplotenního stadia a v této fázi je vývoj oocytu pozastaven. Tato fáze se nazývá také jako fáze diktyotenní. Současně je oocyt obkloповán vrstvou somatických buněk

(pregranulózniích) a vytváří se primordiální folikul. Mnoho oocytů je ztraceno v průběhu tvorby folikulů. Vaječník novorozence obsahuje jen zlomek oocytů, které vstoupily do meiózy ve fetálním vaječníku. Primordiální folikuly zůstávají nečinné po dobu několika let, než zahájí proces růstu. U pohlavně zralé ženy je vývoj folikulů ovlivňován gonadotropiny, folikuly stimulují hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH). Růst folikulů u člověka trvá 85 dní a mnoho z nich je během růstu ztraceno (Hunt, Hassold, 2008).

V reakci na LH je dokončeno meiotické dělení a jeho výsledkem je *sekundární oocyt* a polocyt. Ihned po ukončení prvního meiotického dělení se vytvoří dělicí vřetenko druhého meiotického dělení. Chromozomy se seřadí v ekvatoriální rovině oocytu, oocyt v metafázi druhého meiotického dělení je znám jako vajíčko. Dělení je zastaveno, dokud není oocyt oplodněn. Splynutí plazmatické membrány spermie a vajíčka je spuštěno pokračování druhé meiózy. Polovina chromozomů zůstane ve vajíčku a druhá polovina je v druhém polocytu. Po druhém dělení se vytvoří oddělené jaderné obaly kolem chromozomů vajíčka a chromozomů ze spermie, vytvoří se zygota. Chromozomy mateřského a otcovského prvojádra podstoupí replikaci a připraví se k prvnímu mitotickému dělení (Hunt, Hassold, 2008).

4.2.2. Vejcovod (tuba uterina)

Vejcovod je trubicovitého tvaru, délky 10 – 12 cm a tloušťky asi 0,5 cm. Mediální konec vejcovodu prochází děložním rohem (pars interstitialis), pak následuje úzký istmus, který se rozšiřuje v ampulu zakončenou laterálně infundibulem. Infundibulum je nálevkovité vyústění s řasnatými fimbriemi, kterým se vejcovod volně otvírá do dutiny peritoneální.

Stěna vejcovodu se skládá ze tří vrstev: vnitřní sliznice (endosalpinx) je členěná do bohatého systému řas. Povrch sliznice tvoří jednovrstevný cylindrický epitel s řasinkami kmitajícími směrem k děloze. Řasinkové i sekreční buňky sliznice mění svou morfologii v průběhu cyklu, mění se i směry kmitání řasinek. Středí vrstva vejcovodu je tvořena hladkou svalovinou s vnitřní vrstvou cirkulární a vnější longitudinální. Zevně je vejcovod kryt serózou (Citterbart a kol., 2001).

4.2.3. Děloha (uterus)

Děloha je dutý svalový orgán uložený v centru pánve. U dospělé ženy má tvar předozadně zploštělé hrušky. Na děloze jsou rozeznávány dvě základní části – tělo a hrdlo. Tyto dvě části se liší morfologií, funkcí a citlivostí na pohlavní hormony. Mezi tělem a hrdlem dělohy je malý spojovací úsek, istmus uteri.

Tělo dělohy (corpus uteri) má přední a zadní stranu, které v sebe přecházejí na bocích hranami, v horní části dnem (fundus) a ve spodní části přechází v hrdlo děložní. Děložní fundus vybíhá v děložní rohy, z každého odstupuje jeden vejcovod. Děložní dutina kopíruje tvar těla, má proto zhruba plochý trojúhelníkovitý tvar. **Hrdlo** netěhotné **dělohy** (cervix uteri) má tvar válce. Zaobleným koncem směřuje do pochvy. Této části se říká čípek děložní. Má přední a zadní pysk, mezi nimi je zevní branka, kterou vyústí kanál hrdla spojující děložní dutinu s pochvou (Citterbart a kol., 2001).

Děložní stěna je složena ze tří vrstev:

- Povrchová vrstva je tvořena kolagenním vazivem, které je v části, kde děloha vyčnívá do peritoneální dutiny kryt mezotelem, takže představuje serózní povlak, perimetrium. Zbývající část, která není kryta serózou, se označuje jako parametrium. Tvoří závěsný aparát dělohy.

- Svalovina – myometrium, je tvořena hladkými svalovými buňkami, které v těhotenství hypertrofují. Svalové buňky jsou uspořádány ve vrstvách. Někteří autoři uvádějí, že svalovina je uspořádána do dvou navzájem se křížících spirálovitých vrstev, vycházejících od obou děložních rohů a v oblasti krčku se stýkajících v cirkulární vrstvě.

- Sliznice – endometrium, je na povrchu kryta jednovrstevným epitelem, který nasedá na vazivové stroma, ve kterém jsou uloženy děložní žlázy. V endometriu se rozlišují dvě vrstvy, stratum basale, která je více buněčná, obsahuje bazální části žlázek a neúčastní se výrazně cyklických změn. Druhá vrstva, stratum functionale, prodělává velké změny během menstruačního cyklu. V sekreční fázi v ní rozlišujeme dvě vrstvy, povrchovou pars compacta a hlubší širokou pars spongiosa (Malínský a kol., 2004).

4.2.4. Pochva (vagina)

Pochva je odvodná pohlavní cesta a kopulační orgán. Má tvar trubice, která se v horní části upíná na děložní hrdlo, v dolní části se otevírá navenek jako ostium vaginae mezi malé stydké pysky do poševního vchodu. Pochva je předozadně oploštělá. Upíná se na děložní hrdlo tak, že vzadu vytváří hlubokou zadní klenbu a mělkou přední klenbu (Citterbart a kol., 2001). Stěna pochvy se skládá ze tří vrstev:

- Sliznice – je tvořena mnohvrstevným dlaždicovitým epitelem, u kterého se rozlišují tři vrstvy: bazální, střední a povrchová. Buňky v povrchové vrstvě obsahují velké množství glykogenu. Na povrchu epitelu saprofytyují tyčinkovité bakterie *Lactobacillus vaginalis*, které štěpí glykogen na kyselinu mléčnou, jejíž přítomnost způsobuje nízké pH uvnitř pochvy, což má ochrannou funkci proti pronikání patogenních organizmů.

- Svalovina – je uspořádána ve dvou vrstvách. Vnitřní podélná vrstva je tvořena hladkou svalovinou. Zevní, cirkulární svalová vrstva je tvořena příčně pruhovaným svalstvem. Při orgasmu dochází ke kontrakci cirkulární svaloviny a vytváří se tzv. orgastická manžeta.

- Adventicie – je vazivový obal, ve kterém jsou četné žilní pleteně (Malínský a kol., 2004).

4.2.5. Zevní pohlavní orgány

Mezi ženské zevní pohlavní orgány se řadí velké a malé stydké pysky, poštváček a poševní vchod, do kterého ústí Bartholiniho žlázy.

Velké stydké pysky, labia majora, jsou kožní řasy, jejichž podklad tvoří podkožní tukové vazivo. Ze zevní plochy jsou kryty chlupy, nachází se zde mazové a apokrinní kožní žlázy.

Malé stydké pysky, labia minora, jsou na povrchu kryty velmi tenkou kůží bez chlupů, která má charakter sliznice a obsahuje četné samostatné mazové žlázy.

Poštváček, clitoris, má erektilní schopnost, morfologicky odpovídá corpus spongiosum penis (Malínský a kol., 2004).

Poševní vchod, vestibulum vaginae, je prostor ohraničený malými stydkými pysky a poštváčkem. V centru poševního vchodu je vlastní vstup do pochvy, u panen částečně uzavřený panenskou blánou, hymenem (Citterbart a kol., 2001).

4.2.6. Imunologické parametry ženského pohlavního traktu

Prostředí ženského pohlavního traktu může být z imunologického hlediska rozděleno do tří částí: nesterilní pochva a ektocervix, sterilní děloha a vejcovody, a endocervix, jehož sterilita je závislá na fázi menstruačního cyklu. Velmi zajímavým je endocervix, jehož buňky produkují hlen děložního hrdla. Denně je produkováno přibližně 20 až 60 mg hlenu. Tvoří ochrannou vrstvu děložního hrdla a pochvy a bariéru pro spermie a patogeny, aby nemohly prostoupit do dělohy. Hlen prochází změnami v průběhu menstruačního cyklu v závislosti na estrogenu. V období ovulace se mění z viskózní tekutiny na vodnatou alkalickou tekutinu, do které mohou prostoupit spermie. Složky hlenu děložního hrdla jsou voda (90 -98 %), nízkomolekulární složky zahrnující organické sloučeniny, anorganické ionty, a vysokomolekulární složky, např. plazmatické proteiny, sekreční imunoglobuliny, enzymy, baktericidní a bakteriostatické molekuly (Quayle, 2002).

Ženský pohlavní trakt je unikátní imunologické místo. Je zapotřebí chránit sliznici před řadou patogenů, ale nesmí být ohrožen vývoj alogenního plodu. Hormonální změny v průběhu menstruačního cyklu regulují imunitní systém v celém pohlavním traktu a optimalizují podmínky pro úspěšný pohyb spermií, oplození, implantaci a těhotenství.

Buňky IS, které jsou v pohlavním traktu ženy přítomny, jsou makrofágy a dendritické buňky. Makrofágy představují 10 % všech leukocytů přítomných v pohlavním traktu. Nejvyšší počet makrofágů je ve stromatu endometria a pojivové tkáni myometria. Pohyb makrofágů do endometria je řízen pomocí estradiolu a progesteronu, přičemž nejvyšší počet makrofágů je před menstruací. Naopak počet makrofágů ve tkáních pochvy je v průběhu menstruačního cyklu stabilní. Makrofágy a dendritické buňky jsou zodpovědné za fagocytózu patogenů a jejich prezentaci T lymfocytům (Hickey a kol., 2011).

Dalšími významnými buňkami v pohlavním traktu žen jsou NK buňky (natural killers). NK buňky vykazují cytotoxickou aktivitu. Představují přibližně 10 % systémových leukocytů, ale až 70 % leukocytů ve sliznici dělohy. NK buňky jsou zapojeny do několika procesů, včetně implantace a těhotenství. Množství NK buněk v endometriu je také závislé na fázi menstruačního cyklu. Dosahuje píku 70 % celkové populace leukocytů během sekreční fáze cyklu. NK buňky produkují řadu prozánětlivých cytokinů, např. IL-10, IL-8 a interferon γ (IFN) a tím podporují zánětlivou reakci, aktivaci makrofágů a generaci cytotoxických T buněk (Hickey a kol., 2011).

Antigen prezentující buňky, mezi které se řadí makrofágy, dendritické buňky, Langerhansovy buňky a také epiteliální buňky děložního hrdla a endometria, předkládají antigeny a stimulují T lymfocyty. Odpověď T_H1 lymfocytů představuje buněčně zprostředkovanou imunitní reakci a zahrnuje zničení intracelulárních parazitů. Imunitní odpověď prostřednictvím T_H2 lymfocytů je charakterizována produkcí protilátek (Hickey a kol., 2011). Na rozdíl od jiných slizničních povrchů, např. gastrointestinálního, kde převažuje třída protilátek IgA, v ženském pohlavním traktu převládá sekrece IgG a sekrečního IgA imunoglobulinu (Hickey a kol., 2011).

V ženském pohlavním traktu (v endometriu, epitelu děložního krčku, výstelce vejcovodu) byla také prokázána přítomnost komplementu a membránových regulátorů (CR). Ty byly popsány také na povrchu spermií (např. membránový kofaktorový protein MCP, CD59) a povrchu oocytů (např. MCP, CR1). Syntéza několika složek komplementu a receptorů je ovlivněna hormonální regulací, mění se v průběhu menstruačního cyklu a přispívá tak k normálním reprodukčním procesům (Mastellos, Lambris, 2002). Zajímavá je možnost účasti komplementu na interakci spermie s oocytem. Spermie, které projdou akrozomální reakcí na svém povrchu exprimují receptory MCP. Spermatické MCP mají pravděpodobně různé

funkce při interakci s oocytem. V pokusech bylo prokázáno, že protilátky namířené proti MCP mohou inhibovat proniknutí lidských spermií do oocytů křečka (Mastellos, Lambris, 2002).

Složka komplementu C3 by se mohla podílet na prvních krocích interakce mezi spermií a oocytem. Akrozomální enzymy uvolňované v průběhu akrozomální reakce mohou štěpit C3, a to vedlo k hypotéze, že fragmenty odvozené z C3, např. C3b a iC3b, mohou sloužit jako přemostění mezi MCP receptory exprimovanými na spermií a C3 receptory přítomnými na plazmatické membráně oocytu. Takto by C3 a C3-vazebné proteiny usnadnily fúzi membrán gamet a podpořily proniknutí spermie do oocytu (Mastellos, Lambris, 2002).

4.2.7. Menstruační cyklus

Na rozdíl od reprodukčního systému u mužů vykazuje reprodukční systém u žen cyklické změny, které jsou považovány za opakovanou přípravu tohoto systému k oplodnění a k těhotenství. Délka cyklu není u všech stejná, kolísá v rozmezí 24 – 36 dnů. Toto rozmezí je ještě považováno za fyziologické. Cyklické změny prodělávají vaječníky, děložní sliznice, hlen děložního hrdla a také epitel pochvy (Citterbart a kol., 2001).

Nejvýraznější jsou cyklické změny na děložní sliznici. Cyklus je rozdělen do několika fází:

- Menstruační fáze – dochází k protržení stěny arterií a kapilár, krvácení do endometria a nakonec k odloučení celého stratum functionale. Ke konci této fáze, která trvá zpravidla 3 – 5 dní probíhá regenerace povrchového epitelu proliferací ze žlázek ve stratum basale.

- Proliferační fáze – tato fáze probíhá od 6. do 14. dne cyklu a během ní dochází k růstu sliznice do tloušťky až 3 mm. Ve sliznici se nachází žlázy, které jsou rovné. V povrchovém epitelu, ve žlázách i stromatu se nachází četné mitózy.

- Sekreční fáze je charakterizována růstem sliznice až na 6 – 7 mm. Stratum functionale se rozděluje na dvě vrstvy – stratum compactum (úzká povrchová vrstva) a stratum spongiosum (široká vrstva obsahující dlouhé žlázy, které se šroubovitě stáčejí). Tato fáze trvá od 15. do 26. dne cyklu.

- Ischemická fáze se projevuje krátkou kontrakcí cév, která vede k ischemii, následnému poškození cévní stěny a k ruptuře krevních kapilár. Probíhá v období 27. – 28. dne cyklu a po ní následuje další menstruační fáze (Malínský a kol., 2004).

Také v ovariu dochází v průběhu cyklu ke změnám. Na počátku každého cyklu se zvětšuje několik folikulů. U ženy pouze jeden folikul a pouze v jednom ovariu začíná růst

rychleji asi kolem šestého dne cyklu a vzniká folikul dominantní. Ostatní folikuly podléhají regresivním změnám, atrezii a vznikají folikuly atretické. Vznik a vývoj folikulů a vznik atretických folikulů je ovlivňován steroidy a gonadotropiny – folikuly stimulujícím hormonem (FSH) a luteinizačním hormonem (LH). FSH a LH regulují tvorbu pohlavních steroidů v thekálních a granulózových buňkách. Tento děj zahrnuje tvorbu androgenů v thekálních buňkách, který je ovlivňován LH. Androgeny jsou konvertovány v granulózových buňkách na estrogény a tento děj je ovlivňován FSH (Citterbart a kol., 2001).

6. – 7. den menstruačního cyklu se rozhoduje o osudu folikulů. Při zvýšené koncentraci LH v krvi se zvyšuje syntéza androgenů v thekálních buňkách, které inhibují vývoj folikulů nebo dokonce způsobují atrezii. Poměr koncentrace FSH:LH ve folikulu rozhoduje o tom, zda se folikul bude dále vyvíjet nebo zda nastane atrezie. Při vyšší koncentraci FSH než LH folikul roste. V Graafově folikulu se může tvořit malé množství progesteronu. Progesteron na konci folikulární fáze aktivuje některé enzymy a prostaglandiny, praská stěna folikulu a nastává ovulace. K ovulaci dochází kolem 14. dne menstruačního cyklu a vajíčko je vypuzeno do břišní dutiny. Pak je uchopí fimbrie vejcovodu a dopraví do dělohy. Nebylo-li vajíčko oplodněno, degeneruje a je vypuzeno do pochvy (Citterbart a kol., 2001).

Prasklý folikul je vyplněn krví a nazývá se corpus haemorrhagicum. Thekální a granulózoové buňky prolifерují a vytvářejí corpus luteum (žluté tělísko) (Citterbart a kol., 2001). Žluté tělísko produkuje progesteron a estrogény, ovlivňující přechod endometria z fáze proliferační do sekreční. Nedojde-li k oplození, corpus luteum začne degenerovat a přeměňuje se na corpus albicans (bílé tělísko). Ke konci sekreční fáze se tak podstatně snižuje produkce progesteronu, v ischemické fázi převládne hladina estrogenu nad progesteronem, a to vede ke kontrakci cév, ischemii a následně ke krvácení. Dojde-li k oplození vajíčka a jeho uhnízdění do endometria, dochází k produkci lidského choriového gonadotropinu (hCG), který ovlivňuje růst žlutého tělíska a jeho přeměnu na corpus luteum graviditatis. Toto žluté tělísko produkuje zvýšené množství progesteronu, vzniká těhotenská děložní sliznice, decidua. Corpus luteum graviditatis přetrvává až do druhé poloviny těhotenství, kdy jeho funkci přebírají hormony produkované placentou (Malínský a kol., 2004).

V průběhu cyklu reagují na pohlavní hormony také epitel pochvy a děložního hrdla. Epitel v horní třetině pochvy je velmi citlivý na stimulaci pohlavními steroidy a mění svou výšku a hustotu v průběhu cyklu. Změny se shodují s ovariálním cyklem. Změny na děložním hrdle jsou součástí přípravy k oplození. Cervikální hlen se skládá ze dvou složek, ze semisolidního mukoidního gelu, který je tvořen glykoproteiny, a z cervikální plazmy, která

obsahuje elektrolyty, sacharidy, lipidy a aminokyseliny. V průběhu cyklu se mění biofyzikální a biochemické vlastnosti cervikálního hlenu. Množství hlenu dosahuje maxima při ovulaci, v této době je jeho viskozita nejnižší. S tím souvisí jeho vysoká tažnost (Citterbart a kol., 2001).

4.2.8. Ovulace

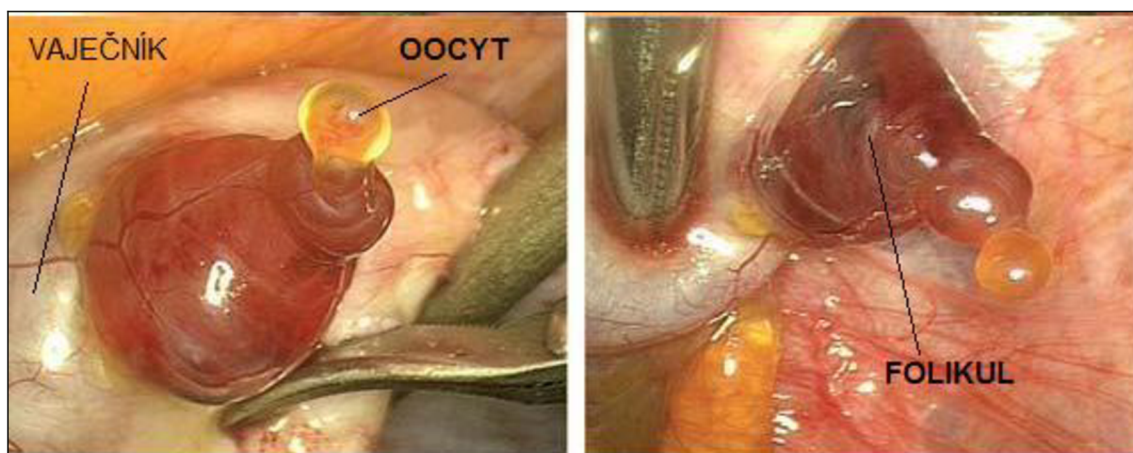
Ovulace je unikátní biologický proces, při kterém je zralý oocyt uvolněn z povrchu vaječníku a následně putuje vejcovodem, kde dojde k setkání se spermii.

Ovulační proces je rozdělen do tří fází: zánětlivá fáze, proces prasknutí folikulu (obr. č. 5) a fáze opravy. Zánětlivá fáze s účastí leukocytů a propustností cév nastává u lidí během 12 hodin. Ruptura trvající 1 hodinu pak nastává na vrcholu folikulu degradací bazální membrány a kontrakcí thekálních buněk typu hladké svaloviny, aby byl oocyt vypuzen z folikulu do vejcovodu. Ruptura folikulu je závislá na aktivaci metaloproteináz a prostaglandinu E. Opravná fáze trvá u lidí 3 dny a zahrnuje vrůstání pojivové tkáně a kapilárek z vaskulární vrstvy thekálních buněk do bezcévnaté vrstvy thekálních buněk. Obě vrstvy buněk podstoupí luteinizaci. Na periferii raného žlutého tělíska se objeví malé luteinní buňky, velké luteinní buňky v bývalé vrstvě granulózových buněk a antru folikulu (Spanel-Borowski, 2011).

Thekální buňky folikulu před ovulací exprimují LH-receptory, granulózové buňky především FSH-receptory, ale v tomto období také určité množství LH-receptorů. Tyto steroidogenní buňky mění genovou expresi v reakci na vrchol hladin gonadotropinů, takže různé mediátory jsou sekretovány ve větším množství. Tyto mediátory mohou buď přímo podpořit ovulaci nebo nepřímo přes nesteroidogenní buňky v nebo okolo folikulu, které změní své chování a podpoří ovulaci. Důležité mediátory v této parakrinní regulaci jsou cytokiny. Mohou také ovlivnit expresi chemokinů, které pak přitahují a aktivují leukocyty z krve. Ovulace je považována za lokální fyziologickou zánětlivou reakci, protože bylo zjištěno, že ve folikulu jsou přítomny prostaglandiny, kininy, histamin a další cytokiny a chemokiny a reaktivní formy kyslíku (Brännström, Enskog, 2002).

Jsou dvě hlavní složky folikulu ovlivňované ovulačními mediátory. Jedna z nich je extracelulární matrix stěny folikulu, které obsahuje husté svazky kolagenních vláken. Ty jsou rozkládány specifickými proteázami. Druhou složkou, která je ovlivňována, je cévní síť. Vlivem nárůstu hladin LH dochází ke zvýšenému průtoku krve v cévní síti v thekální vrstvě folikulu a mění se propustnost cév (Brännström, Enskog, 2002).

Významnými leukocyty zapojenými do procesu ovulace jsou žírné buňky, neutrofilů a makrofágy. Počet žírných buněk ve vaječniku v průběhu cyklu se zdá být konstantní, ale předpokládá se, že hraje hlavní roli při ruptuře folikulu. Tyto buňky vykazují zvýšenou aktivitu právě v období ovulace. Produkují histamin a serotonin. Na pokusech s potkany bylo prokázáno, že serotonin stimuluje produkci progesteronu předovulačním folikulem *in vitro* a na perfúzním modelu vyvolal ovulaci. Stejný účinek byl prokázán u histaminu. Účinek histaminu může být způsoben jeho vlivem na kontraktilitu buňky hladkého svalstva vaječniku. Podpora ovulace histaminem přes jeho stimulační efekt na produkci progesteronu a jeho vazodilatační efekt na ovariální cévy je také možný (Brännström, Enskog, 2002).



Obr. č. 5: **Ovulace:** oocyt je uvolněn ze zralého folikulu

Převzato a upraveno podle URL 5

Dominantními imunitními buňkami v časně fázi akutního zánětu a v průběhu ovulace jsou neutrofilů. Jsou specializovány k fagocytóze a destrukci tkání. Tyto dvě funkce jsou realizovány prostřednictvím enzymů uvolněných z azurofilních a specifických granul. Zdá se, že neutrofilů se koncentrují ve vnitřní části theca interna, velké množství je v oblasti vrcholu ovulujícího folikulu (Brännström, Enskog, 2002). Dále do tkání vaječniku vstupují monocyty a diferencují se v makrofágy, které zde mohou přežít až několik dní. Jejich funkce je ovlivňována signály z mikroprostředí. Bylo prokázáno, že krátce před prasknutím folikulu vzrůstá počet makrofágů v tunica albuginea a vrstvě thekálních buněk (Brännström, Enskog, 2002).

Neutrofilů, žírné buňky a makrofágy jsou podtypy leukocytů a produkují různé mediátory, cytokiny, zapojené do procesu ovulace. Interleukin-1 (IL-1) je prozánětlivý cytokin produkovaný především makrofágy, ale v menší míře také neutrofilů a žírnými buňkami. Na perfúzních potkaních vaječnicích bylo prokázáno, že IL-1 vyvolává ovulaci a

zesiluje odpověď vaječníku na LH, zatímco antagonist receptoru IL-1 tlumí *in vitro* LH podpořenou ovulaci. IL-1 také podporuje produkci dalších zánětlivých mediátorů, které se uplatňují v procesu ovulace (Brännström, Enskog, 2002).

Ve vaječníku je také produkován oxid dusnatý a inhibitory syntázy oxidu dusnatého snižují počet ovulací. Jeho účinek může být spojen s regulací cévního tlaku (Brännström, Enskog, 2002).

5. Spermie v ženském pohlavním traktu

Základ nového života je položen při setkání spermie s vajíčkem. Po pohlavním styku je do pohlavního traktu ženy vloženo velké množství spermií, ale pouze jedna spermie úspěšně oplodní vajíčko. K tomu je zapotřebí, aby k vajíčku doputovaly zralé funkční spermie. Jedná se o zlomek spermií, které byly inseminovány do ženského pohlavního traktu. Prošly dlouhou cestou, během které musely překonat anatomické překážky, a prodělaly fyziologické změny, které jsou nutné při interakci s oocyttem (Scott, 2000).

Distribuce spermií a jejich funkce je ovlivněna místem jejich depozice, vlastnostmi spermatu, anatomii a mikroprostředím ženského pohlavního traktu. Doba trvání transportu spermií závisí na intervalu mezi inseminací a ovulací a funkční životaschopnosti spermií. U většiny domácích druhů zvířat a také u člověka je načasování inseminace spojeno s ovulací. V této době je samička vnímavější na pohlavní styk. Místo depozice spermií definuje anatomické překážky, které spermie musí překonat, než doputují do vejcovodu. Tyto překážky omezují průchod spermií, určují gradient spermií v pohlavním traktu a mohou také sloužit jako rezervoár spermií. U druhů, u kterých dochází k inseminaci do dělohy, např. pes, kuň, prase, je první fyzickou bariérou pro spermie spojení vejcovodů s dělohou. U druhů s vaginální inseminací, např. primáti, přežvýkavci, je před touto bariérou ještě jedna překážka, a to děložní krček. Zde dochází k produkci hlenu děložního hrdla, jehož biofyzikální vlastnosti výrazně ovlivňují prostupnost spermií. Tvorba a vlastnosti hlenu jsou ovlivněny endokrinním stavem ženy (Scott, 2000).

Distribuce spermií v pohlavním traktu ženy je klasicky popisována jako nastávající ve fázích, které jsou definovány časovou závislostí na okamžiku inseminace a relativnímu podílu pasivního pohybu způsobeného viscerální kontrakcí pohlavního ústrojí ženy proti aktivní migraci spermií. Fáze rychlého transportu je perikoitální událost charakterizovaná přítomností spermií ve vejcovodech během několika minut po styku nebo inseminaci. Taková rychlost transportu je vyšší než samotný pohyb spermií. To je připisováno svalové kontraktilitě ženského traktu a s tím související změně intraluminálního tlaku (Scott, 2000).

Po této fázi rychlého transportu následuje prodloužená fáze migrace spermií, během které probíhá další distribuce spermií, a jsou ustanoveny rezervoáry spermií. Rezervoáry spermií jsou velmi důležité, když pohlavní styk (inseminace) proběhne několik hodin nebo dní před ovulací. Jedná se o oblasti pohlavního traktu, ve kterých se nahromadí a udrží populace životaschopných spermií po delší dobu (Scott, 2000).

Po pohlavním styku nebo inseminaci se do ženského traktu dostávají milióny spermií, ale jen jejich zlomek se dostane k vejcovodům. Většina spermií z nižších etází je odstraněna zpětným odtokem spermií děložním krčkem a pochvou. Nadbytečné spermie ve vejcovodech mohou být odstraněny průchodem do dutiny břišní. Jako odpověď na přítomnost spermií v pohlavním traktu ženy jsou zahájeny fyziologické zánětlivé reakce a fagocytóza spermií (Scott, 2000).

Kontakt složek spermatu s děložními a cervikálními tkáněmi vyvolává řadu imunitních reakcí a mechanismů. Vzhledem k tomu, že sperma je v mnoha aspektech cizorodý materiál, se zdá logické mnoho imunologických reakcí vysvětlovat jako zajišťující odstranění cizího materiálu. Nicméně imunitní reakce ovlivňují také proces ovulace, události zapojené do výběru spermie, vyvolávají a udržují imunologickou toleranci k antigenům otcovského původu, ovlivňují restrukturalizaci endometriální tkáně pro implantaci a placentaci embrya a aktivují imunologickou podporu fetálních tkání během těhotenství. Inseminace je tak považována za počátek komunikace s ženským organismem, která zajišťuje úspěšné těhotenství (Schuberth a kol., 2008).

V chirurgických zvířecích modelech, kde sperma měla přístup pouze k jednomu rohu dělohy, byla pozorována zrychlená ovulace ve vaječniku na příslušné straně. Vzhledem k tomu, že ovulace je přirovnávána k zánětlivé reakci, která zahrnuje pronikání populací různých leukocytů přes stěnu Graafova folikulu, je spekulováno, že seminální plazma by mohla vyvolat transport leukocytů z děložních tkání do vaječniku a že tyto migrující leukocyty mohou působit jako vektory mezi různými částmi reprodukčního systému. To však zatím nebylo prokázáno. Mechanismus a způsob přenosu signálu z dělohy na vaječník je v podstatě neznámý. Signální dráhy by mohly zahrnovat lokálně produkované cytokiny, např. granulocyto-makrofágový kolonie stimulující faktor (GM-CSF) a tumor nekrotizující faktor α (TNF), buď epitelálními buňkami, nebo jinými buňkami dělohy. Tyto mediátory mohou dosáhnout stroma vaječniku a předovulačního folikulu a vázat se na receptory exprimované na povrchu buněk vaječniku. Je známo, že GM-CSF je produkován epitelálními buňkami po stimulaci seminální plazmou (Schuberth a kol., 2008).

Po inseminaci dochází ke změně celulární dynamiky. Nejvýznamnější je příliv neutrofilů do dělohy, který vrcholí mezi 1 a 12 hodinami po inseminaci nebo pohlavním

styku. Neutrofilly jsou fagocytární buňky a proto je někdy jejich role snižována na tuto funkci, kdy zajišťují vyčištění prostředí dělohy po inseminaci. To se týká mikroorganismů a zbylých spermií. Aniž by to bylo prokázáno, předpokládá se, že staré, mrtvé nebo kapacitované spermie jsou přednostně atakovány neutrofilními granulocyty. To by souhlasilo s předpokladem, že neutrofilly se účastní při výběru spermií, odstraňování nadbytečných, nepohyblivých nebo poškozených spermií. Zůstává otázkou, zda fagocytóza spermií je náhodná nebo se jedná o selektivní proces. Fagocytóza není hlavní úlohou neutrofilů, alespoň v době, kdy se octnou v děloze. Navíc složky seminální plazmy tomu brání (Schuberth a kol., 2008). Neutrofilly produkují chemotaktické látky, které lákají monocyty a dendritické buňky a ovlivňují, zda se makrofágy budou diferencovat v pro- nebo proti-zánětlivý stav. Neutrofilly produkují na buňku méně cytokinů než makrofágy nebo lymfocyty, ale jejich počet převyšuje mononukleární leukocyty v zánětlivých místech a proto mohou být významným zdrojem cytokinů, např. TNF α (Schuberth a kol., 2008).

Během setrvání spermií v ženském reprodukčním traktu a jejich transportu do vejcovodu spermie nejen ovlivňují své okolí, ale samy jsou aktivovány a získávají fertilizační potenciál. Tento proces je označován jako **kapacitace spermií**. Kapacitace zahrnuje reorganizaci membránových proteinů, metabolismus membránových fosfolipidů a snížení hladiny membránového cholesterolu. Dochází také ke změně pohyblivosti spermií (hyperaktivace), která má pravděpodobně pomoci spermiím dosáhnout vejcovodu, udržet se dále od epitelu vejcovodu a proniknout skrze zona pellucida. Kapacitace a následně probíhající akrozomální reakce jsou důležité události při oplodnění, které zajistí spermii vazbu a průnik zona pellucida a spojení s plazmatickou membránou oocyty (Witte, Schäfer-Somi, 2007).

Aby ke kapacitaci mohlo dojít, musí být nejdříve odstraněny složky seminální plazmy, které obklopují hlavičku spermie v oblasti akrozomu. Významným krokem při kapacitaci je organizovaná destabilizace plazmatické membrány spermie. S tím souvisí změny v distribuci a složení lipidů, fosfolipidů a jiných molekul. Destabilizační proces vede ke zvýšení fluidity membrány a mění její architekturu. Klíčovou roli v tomto procesu hraje cholesterol. Jeho úbytek z membrány akrozomu je podstatným krokem při kapacitaci. V ženském pohlavním traktu je úbytek cholesterolu z plazmatické membrány spermií urychlován akceptory cholesterolu, jako je např. albumin. Albumin snižuje množství cholesterolu až o 40 %, ale tento účinek je závislý na přítomnosti bikarbonátu. Vyčerpání cholesterolu z membrány je kritickou událostí pro aktivaci tyrosin kinázy. Změny na membráně vedou ke zvýšenému přílivu vápenatých iontů do cytoplazmy spermie v průběhu akrozomální reakce, zvýšení

intracelulárního pH a expozici specifických manózových receptorů na povrchu spermie (Witte, Schäfer-Somi, 2007).

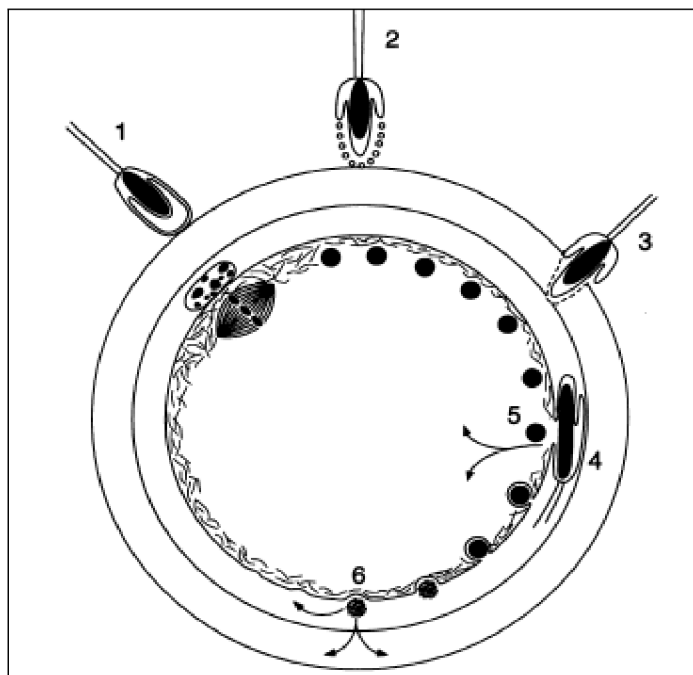
Dalšími kroky při kapacitaci je vedle zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů (Ca^{2+}) také nárůst koncentrace bikarbonátu (HCO_3) a peroxidu vodíku, kteří společně aktivují produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který aktivuje proteinkinázu A, aby fosforylovala určité proteiny.

Následující **akrozomální reakce** je nevratný exocytotický proces, během kterého dojde k uvolnění hydrolytických enzymů a umožní proniknout spermii skrze zona pellucida. *In vivo* je akrozomální reakce zahájena interakcí spermie se zona pellucida oocyty a navazuje a funkčně souvisí s kapacitací. Pouze kapacitované spermie mohou podstoupit také akrozomální reakci. Po proniknutí skrze cumulus oophorus se spermie váže prostřednictvím specifických receptorů ke glykoproteinům zona pellucida. U lidí jsou nejméně dva specifické receptory na membráně spermií. Jeden je G_i -spojený receptor (inhibiční receptor, který působí prostřednictvím G proteinu), který aktivuje fosfolipázu C a může regulovat činnost adenylátcyklázy, a tím ovlivnit produkci cAMP a aktivaci fosfolipázy A. Další je tyrosin kinázový receptor spojený s fosfolipázou C, která kaskádou ovlivňuje otevření napětím řízených vápenatých kanálů na vnější akrozomální membráně. To umožní uvolnění vápenatých iontů z akrozomu do cytosolu (Witte, Schäfer-Somi, 2007).

Vazba spermií k zona pellucida stimuluje G proteiny, následně se zvýší pH v cytosolu, je zahájena depolarizace plazmatické membrány, což vede k otevření napětím řízených vápenatých kanálů. Zvýšený obsah Ca^{2+} v cytosolu vede k fosforylaci proteinů a celkové akrozomální reakci (Witte, Schäfer-Somi, 2007). Jako odpověď na zvýšený obsah vápenatých iontů a změnu pH dochází ke změně cytoskeletu mezi plazmatickou membránou a vnější akrozomální membránou. Cytoskelet je bohatý na aktin, který je u kapacitovaných spermií ve vláknité formě (F-aktin). Tvoří fyzickou bariéru, která brání splynutí plazmatické membrány a vnější akrozomální membrány. Zvýšený obsah vápenatých iontů a pH vyvolává depolymerizaci F-aktinu a vzniká rozpustný monomerní aktin (G-aktin). To způsobí přiblížení membrán. Současně fosfolipáza A štěpí mastné kyseliny fosfolipidů a tím podpoří splynutí membrán (Tulsiani a kol., 1998).

Výsledkem akrozomální reakce je změna složení plazmatické membrány spermie. Vnitřní oblast akrozomální membrány je začleněna do plazmatické membrány s následným přeskupením některých membránových proteinů do dalších oblastí membrány. Po akrozomální reakci je přední část hlavičky spermie kryta membránou, která byla původně vnitřní akrozomální membránou. Jakmile je spermie inkorporována do cytoplazmy oocyty, membrány dvou gamet se sloučí za vzniku nové membrány okolo zygoty. Z tohoto spojení je

přední membrána hlavičky (vnitřní akrozomální membrána) vyloučena a tvoří samostatný oddělený hybridní váček v cytoplazmě (Primakoff, Myles, 2007).



Obr. č. 6: Schematické znázornění interakcí mezi samčí a samičí gametou vedoucí k oplození:

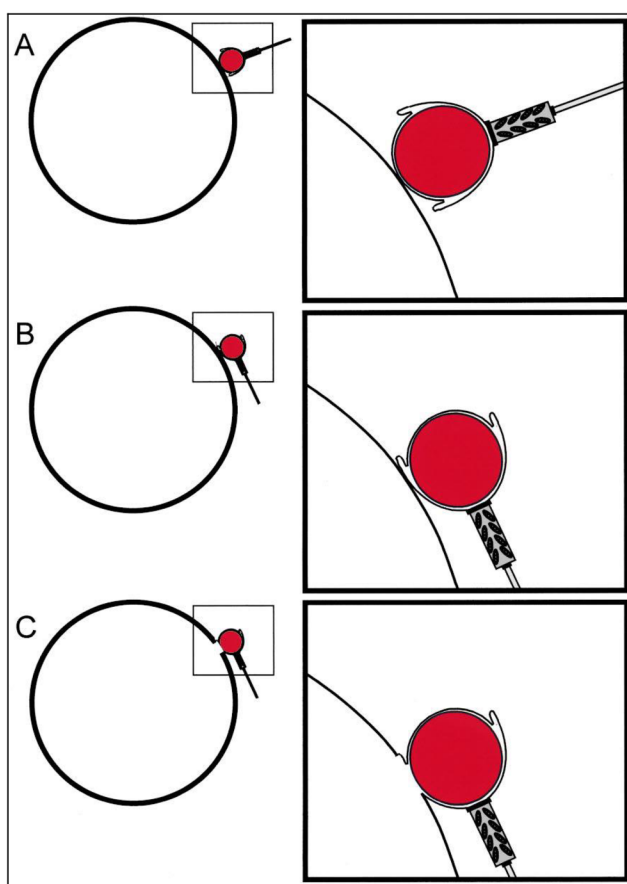
- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Spermie se váže na zona pellucida | 4. Vazba a fúze s oolemou |
| 2. Akrozomální reakce | 5. Aktivace oplozeného oocytu |
| 3. Penetrace skrz zona pellucida | 6. Kortikální reakce |

(Boerke a kol., 2008)

Po splynutí membrán dojde k uvolnění obsahu akrozomu. Významný je akrosin, což je akrozomální serinová proteáza, která umožní spermii proniknout skrze zona pellucida. Když spermie dosáhne perivitelinního prostoru, může se navázat a splynout s oolemou oocytu. Ke splynutí spermie s oolemou dochází v ekvatoriální oblasti hlavičky spermie, kde je stále kryt akrozom plazmatickou membránou. Před oplodněním byl pozorován v perivitelinním prostoru transport proteinových složek membrány oocytu na povrch spermie. To by mohlo znamenat, že i v rámci perivitelinního prostoru dochází ke konečným úpravám, které spermii připraví k oplodnění oocytu (Gadella, 2008).

Splynutí spermie s oolemou je vícestupňový proces, který byl nejvíce zkoumán u hlodavců. Zdá se, že je zahájen vazbou apikálního hrotu hlavičky spermie na oolemu oocytu.

U zlatých křečků tato předběžná vazba byla udržována po dobu přítomnosti inhibitorů proteázy. S největší pravděpodobností tato vazba zahrnuje komponenty druhově specifické vazby spermie a oocyty. Následně proteázy umožní spermii přejít do druhé fáze vazby. Prvotní vazba je zrušena a dojde k otočení spermie paralelně s oolemou (obr. č. 7). Spermie leží na povrchu oocyty, ekvatoriální oblast hlavičky spermie je připojena k oocyty, zatímco se bičík stále energicky pohybuje. Po určité době bičík ztuhne. Pouze ekvatoriální oblast plazmatické membrány hlavičky bičíku může splynout s oolemou. Vlastní splynutí s oolemou je popisováno dvěma modely. První tuto událost popisuje podobně jako splynutí membrány obalených virů s membránou hostitelské buňky, druhý model je analogický splynutí membrány transportních váčků v cytoplazmě a cílové membrány. Přesné pochopení molekulární podstaty fúze oocyty a spermie stále chybí (Flesch, Gadella, 2000).



Obr. č. 7: **Vazba spermie na oocyt:**

A – spermie se na oolemu váže nejdříve apikálním hrotem akrozomální membrány.

B – laterální vazba spermie na oocyt.

C – splynutí ekvatoriální plazmatické membrány spermie s oolemou. Převzato a upraveno podle (Flesch, Gadella, 2000).

Po splynutí membrán oocyty a spermie dojde k aktivaci oocyty a vytvoření diploidní zygoty, která podstoupí několik dělení a vytvoří se embryo. Jedna z prvních událostí, která je pozorována krátce po aktivaci oocyty, je nárůst intracelulární koncentrace vápenatých iontů následovaný jejich oscilací. Předpokládá se, že nárůst a oscilace koncentrace oocyty zajišťuje únik z meiotického „vězení“. Jednou z hypotéz aktivace oocyty je účast spermatického faktoru, který se dostane do oocyty po splynutí gamet (Tsaadon a kol., 2006).

Po splynutí gamet dochází také k exocytóze kortikálních granul, což vede ke změně glykoproteinů zona pellucida. Tím se zabrání polyspermii. Jedná se o evoluční mechanismus, který zamezí průniku dalších spermií a zajistí úspěšnou aktivaci oocyty a vývoj embrya. Pozdější událostí aktivace oocyty je uvolnění z metafáze druhého meiotického dělení, vytvoření prvojader a první mitotické dělení (Tsaadon a kol., 2006).

6. NEPLODNOST

Většina partnerských párů považuje plodnost za samozřejmost společného života. Plodnost neboli fertilita, je podle Světové zdravotnické organizace definována dosažením těhotenství v průběhu 2 let nechráněného pohlavního styku. Ve skutečnosti se s diagnózou neplodnosti setkává mnoho lidí. Podle statistiky neplodnost v ekonomicky vyspělých zemích vzrůstá a v současné době postihuje 10 – 15 % partnerských dvojic, tedy každý 7. až 10. pár (Citterbart a kol., 2001).

Neplodnost žen, které v anamnéze neudávají žádné těhotenství, se označuje jako primární sterilita. O sekundární sterilitě hovoříme, pokud žena uvádí těhotenství ukončené porodem, potratem nebo mimoděložní těhotenství.

Pojem infertilita označuje stav, kdy žena bez problému otěhotní, ale není schopna těhotenství donosit a porodit životaschopný plod. V anglosaské terminologii se neplodnost označuje termínem ‚infertility‘. I v současném českém názvosloví se výraz infertilita stále více používá pro poruchy plodnosti v obecném slova smyslu (Citterbart a kol., 2001).

Neplodnost je tedy definována jako stav, kdy nedojde k otěhotnění po jednom roce pravidelného pohlavního styku (Pope, Velkeniers, 2004). Na vzniku neplodnosti se podílí různé příčiny, ze strany ženy v 35 - 40 %, ze strany muže v 30 - 35 %, z obou stran v 25 % a konečně neznámé příčiny v 5 %. Neplodnost z neznámých příčin se označuje jako idiopatická neplodnost (Citterbart a kol., 2001).

6.1. NEPLODNOST MUŽŮ

Neplodnost mužů je vážným zdravotním problémem. Abnormality v mužské plodnosti samy o sobě nebo v kombinaci s poruchami ženské plodnosti jsou odpovědné až za 50 % všech případů neplodnosti (Wald, 2005).

Mužská neplodnost může být považována za syndrom, který je výsledkem mnoha vrozených nebo získaných faktorů. Hodně neplodných mužů jsou zdraví muži a nemají žádné příznaky (Iammarrone a kol., 2003). Mezi získané faktory mužské neplodnosti řadíme infekci a zánětlivá onemocnění, imunologické příčiny, úrazy a následky chirurgických zákroků a vystavení chemikáliím a jiným toxickým materiálům. K vrozeným faktorům mužské neplodnosti patří varikokéla, poruchy endokrinního systému a genetické příčiny (Wald, 2005).

6.1.1. Porucha pohlavní aktivity

Při některých vážných vývojových nepravidelnostech a některých neurologických či metabolických onemocněních se může muž setkat s neúspěšnými pokusy o pohlavní styk. Toto onemocnění se nazývá impotentia coeundi. V případě, že je porucha spojena s vytvářením spermií (spermatogenezí), je tento stav označován jako impotentia generandi. Tato onemocnění je nejlepší řešit s více specialisty v oboru sexuologie, neurologie, urologie, genetiky, psychologie, dermatovenerologie a gynekologie (Ulčová-Gallová, 2006).

6.1.2. Genetické příčiny mužské neplodnosti

Zhruba u 15% neplodných mužů mohou být zjištěny genetické abnormality (Ferlin a kol., 2006). Mezi nejznámější a nejfrekventovanější příčiny mužské neplodnosti patří chromozomální abnormality, *mutace v genu CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) a mikrolece na chromozomu Y. Hlavní předpoklady ke genetickému vyšetření jsou azoospermie a těžká oligospermie zjištěné analýzou spermatu (Kara, Simoni, 2010).

Výskyt chromozomálních aberací je u neplodných mužů desetkrát až patnáctkrát vyšší než u obecné populace. Ve většině případů neplodný pacient je jinak zdravý. Mezi neplodnými muži je běžný *Klinefelterův syndrom* (karyotyp 47, XXY, včetně mozaik). Může být rozpoznán podle následujících rysů: zmenšený objem varlat, azoospermie, výrazně zvýšené hladiny gonadotropinů a nízkých koncentrací sérového testosteronu (Kara, Simoni, 2010).

Až u 13 % azoospermických mužů mohou být zjištěny mikrolece na chromozomu Y. Byly zmapovány 3 odlišné oblasti na dlouhém raménku chromozomu Y – azoospermické faktory a, b a c (Wald, 2005). Úloha azoospermických faktorů ve spermatogenezi není příliš jasná a také nejsou známy genetické dráhy a mechanismy vlivu mikrolece na spermatogenezi (Ferlin a kol., 2006).

Pro normální vývoj pohlaví, vznik a sestup varlat a spermatogenezi je nutných několik set genů. Pouze několik z nich má klinický význam, např. gen CFTR. Gen CFTR se u člověka nachází na 7. chromozomu. Mutace v tomto genu je pozorována u 80 % pacientů s cystickou fibrózou. Nemusí se projevit všechny klinické příznaky cystické fibrózy. V souvislosti s neplodností je mutace v tomto genu spojena s vrozenou oboustrannou absencí chámovodu. U těchto mužů je spermatogeneze normální a není zvýšen výskyt aneuploidii (Ferlin a kol., 2006).

6.1.3. Varikokéla

Varikokéla je nejběžněji identifikovaná porucha spojená s neplodností mužů. Jedná se o rozšíření žil v žilních pleteních odvádějících krev z varlete a nadvarlete (Beddy a kol., 2005). Bývá zjištěna přibližně u 30 % neplodných mužů. Varikokéla vyvolává nežádoucí změny ve varleti, např. změny teploty, hemodynamiky a koncentrace antioxidantů, které ovlivňují spermatogenezi. Ale přesný mechanismus, jak varikokéla ovlivňuje plodnost, není znám. Chirurgická náprava varikokély, ať už jednostranné nebo oboustranné, zlepšuje parametry spermatu (Wald, 2005).



Obr. č. 8: **Selektivní venografie levé vena testicularis ukazuje dilataci plexus pampiniformis okolo levého varlete v souladu s varikokélou**

(Beddy a kol., 2005)

6.1.4. Poruchy endokrinního systému

Endokrinní poruchy hypotalamo-hypofýzární-gonádové osy jsou asociovány s mužskou neplodností. Tyto relativně vzácné abnormality jsou většinou způsobeny defekty v genech kódujících modulátory pohlavního vývoje a funkce – hormony, růstové faktory nebo jejich receptory (Wald, 2005).

K takovým poruchám patří například Kallmannův syndrom. Kallmannův syndrom je charakterizován kombinací hypogonadotropního hypogonadismu (porucha funkce pohlavních žláz) a anosmie (porucha funkce čichového smyslu). Většina pacientů s Kallmannovým syndromem má mikropenis a dvoustranně nesestoupnutá varlata při narození, odrážející těžkou vrozenou nedostatečnost gonadotropinů a gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRH) (Silveira a kol., 2010).

6.1.5. Infekce a zánětlivá onemocnění

Zánětlivá onemocnění urogenitálního traktu byla prokázána u 5 až 12 % neplodných mužů. Jejich následkem je nižší počet spermií ve spermatu a nižší kvalita spermií. Množství morfologicky normálních spermií je také pravděpodobně zasaženo. Kromě toho, infekce může být spojena s tvorbou autoprotilátek proti spermiím (Wald, 2005).

V neplodnost může vyústit genitální tuberkulóza. Infekce může postihnout všechny části pohlavního ústrojí, nejčastěji nadvarle. Neplodnost je většinou výsledkem zánětu a zjizvení, které následuje po infekci. Infekce vede k deformaci normální anatomie a způsobuje obstrukci (Kumar, 2008). Ucpání chámovodů se obvykle projevuje oligospermii nebo azospermii a malým objemem spermatu (Wald, 2005).

Dalším rizikovým faktorem pro vznik neplodnosti jsou příušnice. Příušnice jsou virové onemocnění, vyvolané *paramyxovirem* a způsobující zánět příušní žlázy, parotitidu. Nejčastější komplikací v postpubertálním věku mužů je zánět varlete, tzv. orchitida. Zánět varlete obvykle následuje jeden až dva týdny po parotitidě. Ve 30 až 50 % případů dochází k atrofování varlat. Byly také zjištěny nižší hladiny testosteronu a zvýšené hladiny luteinizačního hormonu. Vzácně vede orchitida ke sterilitě, ale může způsobit oligospermii, astenospermii nebo azospermii (Masarani a kol., 2006).

6.1.6. Úrazy a chirurgická poranění genitálií

Úrazy mohou způsobit přímé poškození tkáně varlat a tím snížit kapacitu produkce spermií. Mohou také narušit systém odtoku spermií. Ke zhoršení produkce a transportu spermií může dojít akutně po poranění semenných tubulů nebo systému kanálků, ale také se může projevit později jako následek chronického posttraumatického zjizvení a fibrózy.

Také náhodné poranění mužského pohlavního systému v průběhu chirurgického zákroku může způsobit neplodnost několika možnými mechanismy. Například operace prostaty a močového měchýře mohou mít za následek retrográdní ejakulaci. Chirurgické zákroky zahrnující mužské pohlavní orgány se mohou podílet na vzniku protilátek proti spermiím (Wald, 2005).

6.1.7. Vliv toxických látek

Mužská neplodnost může být výsledkem vystavení muže různým gonadotoxinům a jiným látkám, které mají inhibiční účinek na spermatogenezi. K takovým látkám se řadí chemikálie (např. pesticidy), různé léky (např. chemoterapeutika, sulfasalazin), rekreační drogy, alkohol a nikotin, radiace (Wald, 2005).

Vliv kouření na plodnost mužů je neustále zkoumán. Dostupná data přesvědčivě neprokazují, že kouření snižuje plodnost mužů. Avšak s přibývajícemi diskuzemi o vlivu kouření na parametry spermatu je kouření považováno za rizikový faktor neplodnosti. Většina dokumentů tvrdí, že kuřáci vykazují nižší objem spermatu, počet spermií, pohyblivost a životaschopnost spermií ve srovnání s nekuřáky. Bylo prokázáno, že kombinace kouření a varikokély úzce souvisí s výskytem oligospermie. U mužů kuřáků s varikokélou byl výskyt oligospermie desetkrát vyšší než u nekuřáků s varikokélou a pětkrát vyšší než u mužů, kteří kouří, ale byli bez varikokély (Mostafa, 2010).

Intenzivní výzkum v posledních deseti letech identifikoval rychlý nárůst kontaminantů životního prostředí, které mohou ovlivnit reprodukční procesy především napodobováním nebo působením proti účinkům steroidních hormonů, jako jsou estrogény a androgény (Massaad a kol., 2002).

Látky, které jsou jiné než fyziologické estrogény, ale jsou schopné vyvolat odpověď jako estrogény, se nazývají xenoestrogény. Způsob, jakým xenoestrogény ovlivňují vývoj a fyziologii živočichů, zůstával dlouhou dobu tajemstvím. Vysvětlení mechanismu účinku chybělo, protože tyto látky působí již ve velmi malých koncentracích a testovací mechanismy vykazovaly nízkou úspěšnost. Xenoestrogény jsou látky strukturálně rozlišné, ale všechny

obsahují lipofilní fenolické kruhy a jiné hydrofobní složky, které mají společně se steroidními hormony a souvisejí se sloučeninami aktivující jaderné receptory. Předpokládá se, že „promiskuita“ receptorů estrogenů v přijímání různých ligandů je výsledkem toho, že původně byly vyvinuty tak, aby reagovaly na různorodé soubory molekul v prostředí buňky. Proto mnoho sloučenin, které jsou vedlejšími produkty moderního průmyslového životního stylu (pesticidy, herbicidy, vedlejší produkty při výrobě plastů, složky kosmetických přípravků a léčiva) mohou sloužit jako estrogenní ligandy nevhodným způsobem. Známe jsou např. dichlor-difenyl-trichloretan a polychlorované bifenyly. (Watson a kol., 2007).

Například jeden z nejrozšířenějších endokrinních disruptorů, bisfenol A, byl prokázán v séru mužů a žen, plazmě matky a plodu a také mléku kojících žen. Zajímavé je, že koncentrace bisfenolu je pětikrát vyšší v plodové vodě než v plazmě matky. Některé studie se zabývaly také účinky vystavení těmto látkám v různá období života. Například muži vystavení polychlorovaným bifenyly před dosažením 20 let mají nižší šanci na potomky mužského pohlaví ve srovnání s muži, kteří jejich působení vystavení nebyli (Maffini a kol., 2006).

Některé epidemiologické studie poukázaly na změněnou funkci mužské reprodukční soustavy, dochází především ke snížení počtu spermií a jejich kvality, zvýšení frekvence malformací reprodukční soustavy a testikulární rakoviny. Předpokládá se, že xenohormony, dioxiny a glykolethery zastávají zásadní a škodlivou roli ve změně lidské reprodukce a zvýšeného výskytu rakoviny varlete a prsu. Ovlivňují plodnost různými mechanismy: mohou měnit sekreci FSH a LH a inhibovat produkci testosteronu, působí přes jaderné receptory hormonů, receptory estrogenní a receptory androgenní (Massaad a kol., 2002)

6.1.8. Imunologické příčiny mužské neplodnosti

Varle je z imunologického hlediska výsadním orgánem. Ve varletí nedochází za normálních podmínek k přímé imunologické reakci díky jeho uložení mimo přímý krevní kontakt a omezené mízní drenáži (Ulčová-Gallová, 2006). Kontrola antigen-specifických imunitních odpovědí existuje, aby se zabránilo reakci proti autoantigenům, především v průběhu spermatogeneze, protože se jedná o složitý proces buněčné diferenciaci, který probíhá velmi dlouho po ustanovení normálních mechanismů imunitní tolerance (Meinhardt, Hedger, 2011).

Existuje několik úrovní imunologické kontroly ve varletí. Převážná část testikulárních antigenů leží za bariérou krev – varle, která je tvořena vysoce specializovanými těsnými spoji mezi přilehlými Sertoliho buňkami. Ale tradiční pohled, že bariéra krev – varle je odpovědná

za imunitní privilegium varlete, má několik vážných nedostatků. Prvně v intersticiální tkáni mezi semenotvornými kanálky varlete se nachází účinné buňky imunitního systému, např. T lymfocyty, NK buňky, dendritické buňky a makrofágy. A za druhé, mnoho kritických autoantigenů zahrnutých v autoimunitních zánětech varlat se nachází i mimo bariéru krev – varle (Meinhardt, Hedger, 2011).

Celkově většina dat naznačuje, že imunologické privilegium je výsledkem selhání rozpoznání antigenů nebo aktivace imunitního systému, když se tyto antigeny vyskytnou v prostředí varlete a místních lymfatických uzlinách. V důsledku toho se pozornost zaměřila na expresi molekul na povrchu buněk varlete, zejména na MHC (hlavní histokompatibilní komplex) antigeny I. třídy a třídy II. Ale snížená exprese MHC antigenů sama o sobě nemůže být zodpovědná za imunitní privilegium varlete (Meinhardt, Hedger, 2011).

Existují důkazy, že aktivní imunosuprese (tj. dynamické odstraňování nebo inaktivace antigen specifických T lymfocytů) je hlavní příčinou imunitního privilegia varlete. Imunosupresivní činnost vykazují Sertoliho buňky. Produkují imunosupresivní cytokin TGF- β_1 a také exprimují inhibitory komplementu (Meinhardt, Hedger, 2011).

Nejen na buňkách varlete, ale i na povrchu spermií lze prokázat široké spektrum imunogenních diferenciačních znaků. Těmito znaky jsou různé glykoproteiny, lipoproteiny, bílkoviny a enzymy. Za určitých okolností může dojít k porušení bariéry krev – varle (hematotestikulární bariéry). Nejčastějším mechanismem je poranění, zánět, operační výkon, nádor, zablokování vývodných pohlavních cest při některých vrozených vadách, ale i neznámá příčina. Antigeny jsou tak vystaveny imunitnímu systému, což vede k zánětlivé reakci a tvorbě protilátek. Protilátky se mohou nacházet nejen v seminální plazmě, ale někdy i v séru (Ulčová-Gallová, 2006).

Přesný mechanismus jak protilátky proti spermiím narušují plodnost, není znám. V reprodukčním traktu muže i ženy mohou mít nepříznivý vliv na funkci spermií nebo celkovou kvalitu spermatu. Oplodnění vyžaduje, aby dostatek spermií podstoupil kapacitaci a další proměny vedoucí k vývoje fertilizačního potenciálu. Kromě toho musí spermie udržovat určitý stupeň pohybu vpřed, aby dosáhly oocyty. Tam se musí navázat a proniknout skrz zona pellucida. Jádro spermie musí dekonenzovat a musí začít rýhování embrya.

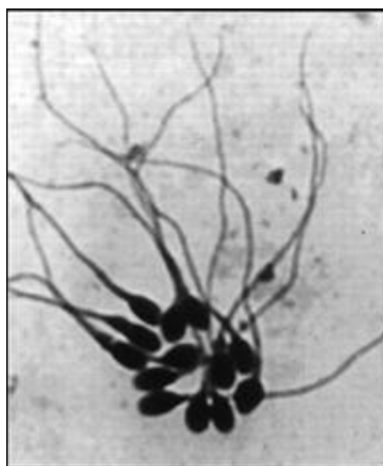
Protilátky proti spermiím mohou snížit jejich koncentraci, pohyblivost a změnit jejich normální morfologii. Protilátky proti spermiím se hodnotí v jednotlivých imunoglobulinových třídách: v seminální plazmě (ejakulátu) jsou nejčastěji protilátky proti spermiím v IgG, IgA a ojedinele v IgE, v krvi pak v IgG a IgM (Ulčová-Gallová, 2006). Protilátky proti spermiím izotypových tříd IgG, IgA a IgM jsou všechny schopné se vázat na spermie. Přítomnost protilátek tříd IgG a IgA byly zjištěny až u 21,1 % neplodných mužů. Různé izotypové třídy

mají odlišné účinky na oplozovací schopnost. Různé studie prokázaly, že snížené počty oplodnění a těhotenství korelují s přítomností IgG protilátek na spermiích nebo IgM v séru žen. Také byl popsán synergický negativní účinek protilátek tříd IgG a IgA (Chiu, Chamley, 2004).

Diskutuje se také vliv lokalizace protilátek vázaných na spermie. Některé studie popisují sníženou oplozovací schopnost u IgA protilátek přítomných na hlavičce spermií ve srovnání, kdy na hlavičce žádná protilátka není. Stejně tak pokles fertilizační schopnosti byl pozorován, když protilátky třídy IgM byly zaměřeny na hlavičku nebo špičku bičíku. Ale jiné výzkumy naopak souvislost lokalizace protilátek se sníženou oplozovací schopností spermií neprokázaly (Chiu, Chamley, 2004).

6.1.8.1. Protilátky shlukující spermie

Protilátky mohou být prokázány přímo navázané na spermiích, v tekuté složce ejakulátu nebo i v krevním séru. Cílem protilátek jsou různé antigenní znaky na každé spermii, popisuje se i několik desítek těchto znaků lokalizovaných na hlavičce, krčku a bičíku spermie. Z imunologického hlediska je plodnost muže snížena tím více, čím vyšší je koncentrace nežádoucích protilátek a čím větší množství spermií je jimi povlečeno.

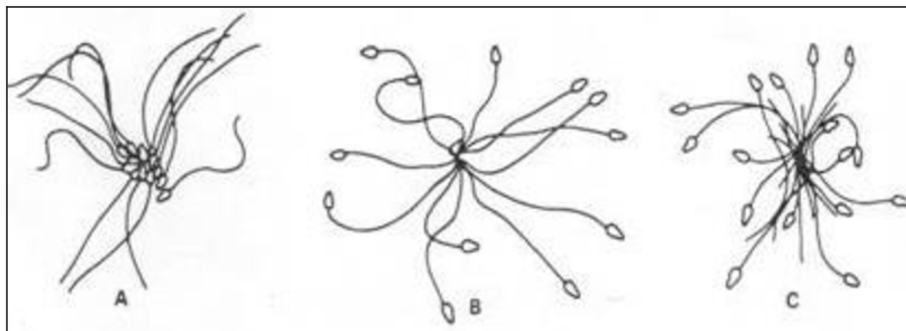


Obr. č. 9: **Mikrofotografie aglutinace spermií hlavičkami**

Dostupané a upraveno podle URL 6

Protilátky shlukují spermie buď hlavičkami, krčky nebo bičíky, nebo hlavičkami a bičíky současně (obr. č. 10). Shluky jsou schopné pouze kývavého pohybu. Proto nejsou

schopné prostoupit přes děložní hrdlo do dalších částí ženského pohlavního ústrojí (Ulčová-Gallová, 2006).



Obr. č. 10: **Aglutinace spermií**. Protilátky shlukují spermie hlavičkami (A), bičíky (B) nebo hlavičkami a bičíky současně (C).

(URL 7)

6.1.8.2. Protilátky znemožňující pohyb spermií

Tyto protilátky se označují také jako spermimobilizační a jejich nálezy převládají u mužů v Japonsku, Číně a Malajsii (Ulčová-Gallová, 2006). Spermie, které mají navázané protilátky na většině svého povrchu, nejsou schopné prostoupit do hlenu děložního hrdla. Zdá se, že muži, kteří mají vysokou úroveň autoimunity k vlastním spermiím, jak odráží podíl protilátkami potažených spermií v jejich ejakulátu, jsou funkčně oligospermičtí. Jejich spermie nemohou vstoupit do reprodukčního traktu ženy a šance, že dosáhnou vajíčko, je snížena (Bronson, 2000).

Studie zabývající se schopností spermií proniknout do cervikálního hlenu prokázala, že protilátky (především třídy IgA) namířené proti hlavičce spermií výrazně snižují schopnost proniknout do cervikálního hlenu. Oproti tomu u vazby IgG a IgA na špičku bičíku nebyl prokázán vliv na schopnost spermií pronikat do cervikálního hlenu (Chiu, Chamley, 2004).

Při působení těchto protilátek je zapojena další složka imunitního systému, a to komplement. Komplement je soubor proteinů, které se mohou vázat na komplex antigen-protilátka na povrchu buňky a způsobit lýzu buňky. IgG protilátky jsou účinné při stimulaci komplementu, zatímco IgA protilátky jsou relativně slabým aktivátorem komplementu (Chiu, Chamley, 2004).

Komplement se vyskytuje v reprodukčním traktu žen, kde je jeho zdrojem cervikální hlen nebo také folikulární tekutina. Když se protilátkami senzibilizované spermie dostanou k jedné z těchto tekutin po pohlavním styku, vystavení komplementu způsobí imobilizaci

spermií. V prvních částech pohlavního traktu ženy a bezprostředně po pohlavním styku jsou ale spermie chráněny seminální plazmou, která vykazuje inhibiční aktivitu proti komplementu. Inhibice komplementu seminální plazmou má zajistit, že události podporované komplementem (např. akrozomální reakce) nastanou ve správnou dobu po pohlavním styku a na správném místě pohlavního traktu ženy. Nedostatek inhibiční aktivity seminální plazmy pak má vážné následky pro plodnost (Harris a kol., 2006).

6.1.8.3. Protilátky poškozující spermie

Protilátky poškozující spermie jsou označovány také jako spermyctotoxické protilátky. Byly provedeny výzkumy, kdy byly spermie *in vitro* inkubovány se seminální plazmou mužů nebo s hlenem děložního hrdla žen, u kterých byly prokázány protilátky proti spermiím. Výsledkem byla výrazně snížená pohyblivost a přežití spermií (Mazumdar, Levine, 1998).

6.1.8.4. Buněčná imunita proti spermiím

U některých mužů neplodného páru může být prokázána přítomnost velkého množství leukocytů v ejakulátu. Jedná se o malé lymfocyty, makrofágy a jiné buňky. Tyto buňky jsou aktivované většinou náhlou infekcí nebo dlouhodobým zánětem. Mohou přímo ničit spermie nebo produkují cytokiny, které poškozují spermie. Buněčnou autoimunitu proti spermiím je tak možné určit z krve nebo ejakulátu, kde se prokazuje hladina cytokinů (Ulčová-Gallová, 2006).

6.1.9. Vyšetřovací metody

Mužská plodnost nejvíce závisí na kvalitě spermatu. U některých mužů může dojít ke snížení počtu spermií, snížení jejich pohyblivosti nebo správného tvaru. Takto poškozené spermie mohou ztratit schopnost proniknout děložním hrdlem, putovat pohlavním traktem ženy a oplodnit vajíčko.

6.1.9.1. Spermiogram

Analýza spermatu je prvotním vyšetřením při hodnocení mužské neplodnosti. Analýza spermatu zahrnuje vyšetření spermií a semenné tekutiny. Během první makroskopické prohlídky jsou zvažovány tyto vlastnosti: vzhled, zkapalnění, objem, viskozita, pH,

koncentrace spermií, pohyblivost spermií, morfologie spermií, buněčné elementy jiné než spermie (Iammarrone a kol., 2003).

Spermioqram je kvantitativní mikroskopický rozbor ejakulátu získaného většinou masturbací po krátké, 2 – 3 denní pohlavní abstinenci. Sperma muž odebírá do speciální nádoby – buď sterilní Petriho misky, nebo kelímku s víčkem. Nádobka nesmí obsahovat zbytky dezinfekčních činidel, která by mohla spermie poškodit. Muž může přinést sperma z domova, ale je třeba zajistit odběr do vhodné nádoby, např. většina prezervativů obsahuje spermicidní látky (Řežábek, 2008).

První hodnocení spermatu se provádí bezprostředně po odběru. Nejdříve se posuzuje *vzhled* spermatu, především jeho barva, která je u většiny druhů bílá. V ejakulátu by neměla být přítomna krev ani vločkovitý materiál, který by poukazoval na přítomnost infekce v pohlavním systému (Mocé, Graham, 2008).

Sperma se nechá 30 minut zkapalnit. Poté se měří jeho *objem* buď v odměrném válci, nebo natažením do sterilní injekční stříkačky, případně se váží na přesných digitálních automatických vahách (Řežábek, 2008).

Sperma se 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. Komůrka se skládá ze dvou sklíček, která jsou přesně zbrušena tak, že je mezi nimi stálá malá mezera o tloušťce 10 μm . Do krycího sklíčka 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 (Řežábek, 2008).



Obr. č. 11: Maklerova počítací komůrka

(URL 8)

Při počítání se spermie pohybují. Sice je možné spermie znehybnit, ale nejpodstatnějším údajem spermiogramu je *koncentrace* pohyblivých spermií a kvalita jejich pohybu. Počítání spermií pohybujících se v zorném poli mikroskopu relativně velkou rychlostí je tedy jen přibližné, ale pro praktické využití to nevadí. Existují i počítačem řízené analyzátory, které však mají vysokou pořizovací cenu (Řežábek, 2008).

Nepohyblivé spermie se většinou považují za mrtvé, ne vždy to tak musí být. Pro speciální způsoby použití lze barvením odlišit spermie skutečně mrtvé, které se obarví, od živých, ale nepohyblivých, u kterých k obarvení nedojde

Třetím parametrem je *morfologie* spermií, tedy jaké patologické tvary a v jakém počtu se v ejakulátu vyskytují. Odchylek od normálního tvaru je řada: dvojitá hlavička, dvojitě bičíky, deformace hlaviček, defekty krčku atd. Čtvrtým parametrem spermiogramu je přítomnost leukocytů, bakterií, prvoků, případně krystalů či cizorodých vláken (Řežábek, 2008). Hodnoty základních parametrů normálního spermiogramu jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Objem spermatu	1,5 ml
Koncentrace spermií	15 milionů/ml a více
Celkový počet spermií v ejakulátu	39 milionů a více
Celková pohyblivost	40 % a více pohyblivých spermií
Progresivní pohyb	32 % a více
Morfologie	více než 4 % s normální stavbou
Vitalita	58 % živých spermií
Leukocyty	Méně než 1 milion/ml

Tab. č. 1: Hodnoty základních parametrů normálního spermiogramu podle doporučení Světové zdravotnické organizace z roku 2010
(World Health Organization, 2010)

Nomenklatura parametrů ejakulátu:

- Normospermie – parametry ejakulátu jsou v mezích normy
- Oligozoospermie – koncentrace spermií je nižší než 15 milionů/ml
- Teratozoospermie – méně než 4 % spermií má normální stavbu (obr. č. 12)
- 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 (World Health Organization, 2010).



Obr. č. 12: Fotografie deformované spermie z elektronového mikroskopu
(URL 9)

6.1.9.2. Anamnéza a klinické vyšetření

Anamnézou lékař zjišťuje prodělané operace na genitáliích, virová onemocnění, pohlavní choroby, cévní a mozková onemocnění (Citterbart a kol., 2001). Může také zjistit některé reverzibilní faktory jako kouření, alkohol nebo užívání drog. Klinické vyšetření může odhalit abnormality pohlavních orgánů, např. varikokélu nebo atrofie varlat (Iammarrone a kol., 2003).

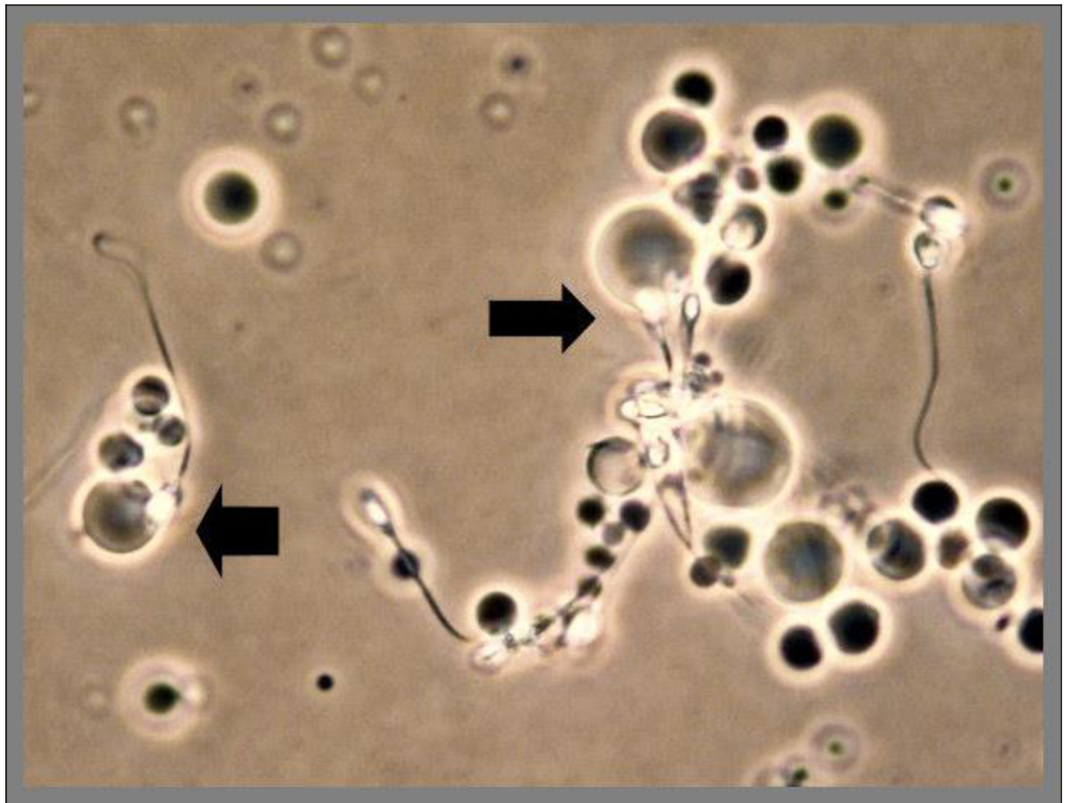
6.1.9.3. Hormonální vyšetření

Hormonálním vyšetřením se stanovují sérové hladiny gonadotropinů, folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) a plazmatického testosteronu. Se stoupající hodnotou FSH spermatogeneze obvykle klesá. Testosteron bývá často u poruch plodnosti testikulárního původu snížený (Citterbart a kol., 2001).

6.1.9.4. Vyšetření protilátek proti spermii

Vyšetření se provádí ze séra nebo seminální plazmy. Nejužívanější jsou smíšené aglutinační reakce (MAR test) a immunobead test. *MAR test* využívá latexové částice označené lidskými IgA, IgM nebo IgG. Sérum proti lidským Ig způsobí aglutinaci mezi spermii a částicemi (McLachlan, 2002).

Immunobead test (IBT) využívá polyakrylamidové korálky potažené protilátkami proti lidským IgG, IgM a IgA, které jsou inkubovány s čerstvými pohyblivými spermii pacienta (přímý test) nebo s normálními spermii dárce, které byly předtím inkubovány s tekutinami pacienta, např. seminální plazmou (nepřímý test). Předností IBT je, že lze kvantifikovat typ protilátek, procento spermii s navázanými korálky a jejich lokalizaci. Nevýhodou této metody jsou náklady na činidla, časová náročnost a nespecifické vazby. Ty mohou vzniknout při použití vysoké sérové koncentrace při nepřímém testu (McLachlan, 2002).



Obr. č. 13: **Immunobead test**: metoda umožňující zjistit protilátky navázané na povrchu spermií. Lze tak identifikovat typ a lokalizaci protilátek, např. na hlavičce spermií
(URL 10)

6.2. ŽENSKÁ NEPLODOST

Aby došlo k početí, musí nastat několik klíčových událostí. Zralé vajíčko musí být uvolněno z vaječníku, zachyceno vejcovodem a zde oplodněno spermií. Embryo pak musí být transportováno do dělohy, kde se implantuje do sliznice dělohy a vyvíjí se. Výsledkem vzniku problému v jednom nebo více krocích tohoto procesu je neplodnost (Adamson, Baker, 2003). Různé příčiny neplodnosti u žen jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Ovariální faktor	25 – 40 %
Tuboperitoneální faktor	25 – 40 %
Endometrióza	15 – 25 %
Děložní faktor	5 – 7 %
Cervikální faktor	3 – 4 %
Poševní faktor	3 – 4 %
Imunologický faktor	2 – 3 %
Psychogenní vlivy	1 – 2 %

Tab. č. 2: **Příčiny neplodnosti u žen** (Citterbart a kol., 2001)

6.2.1. Ovariální faktor

Jako ovariální faktor se označuje porucha činnosti vaječníků. Pravidelný menstruační cyklus výrazně naznačuje, že žena ovuluje. Cykly délky zhruba 22 až 35 dní jsou většinou ovulační, obzvláště pokud jsou doprovázeny premenstruačními symptomy, jako je např. plynatost a citlivost prsou. Pokud má žena menses méně nebo více často, pravděpodobně neovuluje nebo ovuluje nepravidelně. Chybění ovulace se označuje jako anovulace, nepravidelná ovulace pak oligoovulace.

Nejčastější příčinou anovulace nebo oligoovulace je *syndrom polycystických ovarií*. Dalšími častými příčinami jsou hypotalamická dysfunkce, hyperprolaktinémie, poruchy ovulace spojené s věkem a předčasné ovariální selhání. Také váhové extrémy mohou vést k anovulaci vyvoláním hypotalamické dysfunkce (Adamson, Baker, 2003).

Také *poruchy funkce štítné žlázy* mohou způsobit narušení ovulace. Dysfunkce štítné žlázy je onemocnění, u kterého je známé, že snižuje pravděpodobnost otěhotnění. Hormony štítné žlázy interagují s ženským pohlavním systémem. Např. hypotyreóza u dospělých žen způsobuje změny v délce cyklu a v krevním toku. Těžká hypotyreóza je často spojena

s poruchou ovulace. Reprodukci narušuje také hypertyreóza a autoimunní thyreoiditida (Poppe, Velkeniers, 2004).

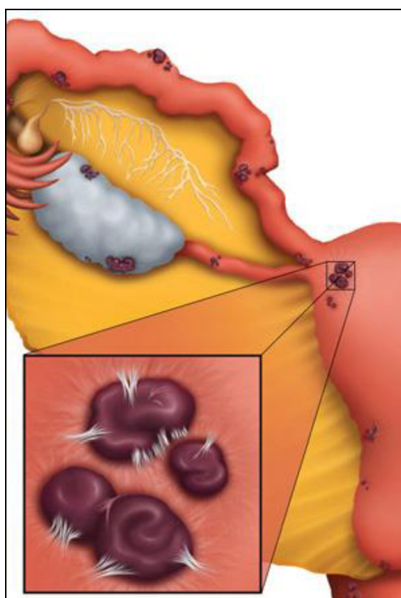
6.2.2. Tuboperitoneální faktor

Častou příčinou ženské neplodnosti je chybění nebo poškození vejcovodů. Nejčastěji dochází k poškození vejcovodu zánětem. Z příčin zánětu jednoznačně převažují sexuálně přenosné nemoci, které mohou proběhnout i bez klinických příznaků a jsou až v 80 % příčinou vzniku hlubokého pánevního zánětu. Vejcovod může být také postižen endometriózou. Příčinou tuboperitoneálního faktoru bývá i tubární těhotenství. Endokrinní poruchy způsobují porušení peristaltiky až spasmus vejcovodů (Citterbart a kol., 2001).

6.2.3. Endometrióza

Endometrióza je závažné onemocnění, které je často spojováno s neplodností u žen. Toto onemocnění je často odhaleno buď při chirurgickém otevření (laparotomii), nebo při optickém vyšetření (laparoskopii) dutiny břišní z důvodu zpřesnění diagnózy při neplodnosti především mezi 28 – 40letými pacientkami, které ve většině případů nemají sebemenší potíže. Ale některé pacientky mohou mít bolestivé příznaky vázající se k menstruaci (Ulčová-Gallová, 2006).

Není přesně známo, jak endometrióza vzniká. Nejvíce akceptovanou teorií je Sampsonova implantační teorie, podle které je endometrióza výsledkem zpětné (retrográdní) menstruace životaschopných endometriálních buněk skrze vejcovody. Klasický endometriální implantát je tmavé, modro-černé ložisko, které typicky leží pod povrchem pobřišnice (obr. č. 14) (Lessey, 2000).



Obr. č. 14: **Endometrióza**

(URL 11)

Avšak zdá se, že retrográdní menstruace nastává u všech žen a existují důkazy, že u zdravých žen namísto implantace buněk děložní sliznice dochází k jejich odstranění z mimoděložních ložisek. Předpokládá se, že imunitní systém u zdravých žen odstraňuje mimoděložní buňky děložní sliznice, brání jejich implantaci a vývoji v endometriotické cysty. Tento proces může být usnadněn změnami apoptózy mimoděložních buněk. Jejich apoptóza se normálně zvyšuje na konci menstruačního cyklu, ale je výrazně snížena u žen s endometriózou. Nedostatečná buněčná imunita a snížená apoptóza může tedy vést k přežití a implantaci buněk děložní sliznice (Dmowski, Braun, 2004).

Těžká endometrióza může ovlivnit plodnost několika mechanismy. Způsobuje bolest, která typicky začíná před menstruací, protože endometriální tkáně jsou pod stejnou hormonální stimulací jako endometrium. Tlak, změny ve srůstech a zánět jsou považovány za příčinu bolesti. Bolest v pánvi může snížit frekvenci pohlavního styku. Srůsty mohou narušit anatomii vejcovodů a vaječnicků, proto je omezeno zachycení oocyty vejcovodem. Ovariální endometrióza se může natolik rozšířit, že zničí normální tkáň vaječnicku a způsobí tak anovulaci (Ola, Ledger, 2005a).

6.2.4. Děložní faktor

Abnormality přítomné v děložní dutině, mohou být v rozporu s implantací embrya nebo zvýšeného výskytu potratů. K takovým abnormalitám patří nitroděložní srůsty, polypy, myomy nebo abnormálně tvarované děložní dutiny (Adamson, Baker, 2003).

Velmi vzácnou příčinou neplodnosti může být nevyvinutí dělohy. Častější bývá vrozené nedokonalé a nedostatečné vyvinutí různého stupně, které se může kombinovat s dalšími poruchami. Děloha je předozadně zploštělá, ohnutá dopředu. Někdy je však ohnutá dozadu a v některých případech se tak může stát příčinou snížené plodnosti. Nejčastější příčinou neplodnosti bývá funkční porucha výstavby děložní sliznice související s poruchami cyklu vaječníku. Výsledkem jsou nedostatečné podmínky pro uložení oplodněného vajíčka do hormonálně připravené děložní sliznice (Ulčová-Gallová, 2006).

Poškození děložní dutiny a srůsty mají často příčinu v nitroděložních operačních výkonech, mezi které se řadí např. kyretáže po potratech nebo po porodu. Srůsty výrazně snižují pravděpodobnost implantace oocytů (Citterbart a kol., 2001).

6.2.5. Cervikální faktor

Děložní hrdlo je první bariérou pro sperma v ženském reprodukčním ústrojí. Těsně před ovulací dochází ke změnám děložního hrdla, zvětší se jeho průsvit. Cervikální hlen prochází cyklickými změnami a v období kolem ovulace je vlivem pozitivní chemotaxe umožněn vzestup spermií. Rovněž slouží jako rezervoár spermií a je zde zahajována jejich kapacitace. Při anatomických poruchách, při zánětech a změnách složení hlenu jsou tyto funkce narušeny. Poruchy ovariální činnosti způsobují nedostatečnou tvorbu a složení cervikálního hlenu. V cervikálním hlenu mohou být přítomny protilátky proti spermiím. Mezi další příčiny cervikálního faktoru neplodnosti patří chronická endocervicitida (zánět sliznice kanálu děložního hrdla). Její nejčastější příčinou je chlamydiová infekce. Byl také prokázán vliv spermicidních účinků některých bakterií (*Streptococcus*, *Staphylococcus*) a častá je fagocytóza spermií přítomnými leukocyty (Citterbart a kol., 2001).

6.2.6. Poševní faktor

Příčinou poševního faktoru neplodnosti jsou vývojové anomálie pochvy, které jsou spojeny s ostatními anomáliemi genitálu. Záněty pochvy negativně ovlivňují plodnost stejnými mechanismy jako v děložním hrdle. Nejčastěji a stále přibývajícím příčinou výtoku je kvasinková a bakteriální infekce (Citterbart a kol., 2001).

6.2.7. Věk

Pokles plodnosti žen související s věkem začíná mnoho let před nástupem menopauzy. Pokles plodnosti je spojen s vyčerpáním oocytů a s klesající průměrnou kvalitou oocytů. Jakmile starší žena otěhotní, má výrazně zvýšené riziko spontánního potratu a chromozomálních abnormalit.

S postupujícím věkem se zvyšuje množství patologických jevů v děloze, jako jsou myomy a polypy. Zdá se, že věk nemá žádný vliv na morfológickou a histologickou odpověď na stimulaci steroidy (Adamson, Baker, 2003).

Kromě toho ženy stále častěji odkládají snahu o první dítě na pozdější věk. Vzhledem k tomu, že plodnost začíná klesat již od 25 let a rapidně pak po 35. roce života, jsou šance na těhotenství nižší. A v dnešní době je věk 35 let stále častějším obdobím, kdy je zakládána rodina.

6.2.8. Psychogenní faktor

Vliv psychogenních příčin na neplodnost ženy může být významnější, než se všeobecně předpokládá. Uváděné údaje se výrazně liší a zahrnují rozmanité vlivy, od nesplněné touhy po dítěti po extrémní a konfliktní situace v rodině a zaměstnání (Citterbart a kol., 2001).

6.2.9. Imunologický faktor

Spermie jsou pro ženu antigenně i geneticky zcela cizí. Při normálním fyziologickém pohlavním styku je uloženo v blízkosti hrdla děložního asi 200 – 500 milionů spermií (Ulčová-Gallová, 2006). Přestože jsou ženy pravidelně očkovány intravaginálně spermiemi během pohlavního styku, není tato činnost obvykle spojována s vývojem imunologické reakce proti spermiím. Přesto ale ženský reprodukční trakt není imunologicky privilegovaným

místem. Imuno-inhibiční látky byly zjištěny v seminální plazmě. Chrání spermie před imunologickým poškozením a brání rozvoji citlivosti žen k antigenům spermií po pohlavním styku (Bronson, 2000).

„Přecitlivělý“ reprodukční trakt pacientky je však schopný už při prvním setkání se spermii vytvořit protilátky, které zpočátku bývají zjistitelné v hleny 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 – dutině děložní, vejcovodech, dutině břišní, 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.

Hrdlo děložní odpovídá imunologicky rychleji než např. pochva. V hrdle děložním se nachází jak velké množství plazmatických buněk, které produkují protilátky proti spermii, tak i T-lymfocyty, které se stěhují do vyšších etáží reprodukčního traktu. Mohou také být fixované na slizničním povrchu hrdla děložního. T-lymfocyty se účastní buňkami zprostředkované reakce namířené jak proti mikroorganismům, tak proti pohyblivým spermii. Reakce bývá cytotoxická (Ulčová-Gallová, 2006).

Děložní hrdlo je některými vědci považováno za „imunitní orgán“. Za 8 vteřin po ejakulaci se mění pH pochvy z kyselého prostředí na zásadité. Lidská seminální plazma obsahuje celou řadu významných enzymů, které štěpí hlen v hrdle děložním, čímž usnadňují a urychlují pronikání lidských spermií změněným sekretem do vyšších oddílů reprodukčního traktu. Průnik spermií se zvětšuje v období ovulace, dva dny po uvolnění vajíčka se obvykle snižuje. Po nechráněném pohlavním styku zůstávají živé spermie v pochvě až 12 hodin, v hrdle a jeho záhybech dokonce až 8 dnů (Ulčová-Gallová, 2006).

Některé spermie se za zcela normálních podmínek dostanou až k vajíčku, jiné jsou fagocytovány makrofágy nebo polymorfonukleárními leukocyty už v děložním hrdle. To, že pochva a děložní hrdlo hrají dvě role najednou (jednak proti infekci a jednak proti spermii), je nejspíš i dílem hormonálního působení. Za normálních fyziologických podmínek nebudou všechna místa na spermii, proti nimž se vytvoří imunologická odpověď, přístupná imunologické odezvě. Plné rozvinutí imunitní reakce nebude záviset jen na povrchu spermií a látkách obsažených v seminální plazmě, ale především na proměnlivé vnímavosti rozpoznávacích imunitních mechanismů, kterých je celá řada, a jsou geneticky podmíněné. V 90. letech 20. století byla tato genetická pohotovost tvorby protilátek proti spermii nalezena u pacientek s HLA fenotypy A3B7 a A1B8, které bývají spojovány s imunologickou hyperreaktivitou, a znakem A2B12, který je velmi často nalézán u jedinců s ekzémami, u nich jsou výrazná porucha buněčné a protilátkové imunity (Ulčová-Gallová, 2006).

Protilátková aktivita je u normální zdravé ženy v období ovulace v hlenu nejnižší. Právě v této době se vytvářejí nejlepší podmínky k přijetí spermií a pro další transport. Cyklické změny jednotlivých imunoglobulinů a specifických protilátek v hlenu hrdla děložního byly studovány na velkých skupinách opic rodu *Rhesus* a dobrovolných zdravých žen. Uprostřed cyklu (v období ovulace) jsou hladiny imunoglobulinů IgG a IgA až 20x nižší než po skončení nebo před začátkem menstruace (Ulčová-Gallová, 2006).

Účinky protilátek proti spermiím tvořeným v ženském pohlavním traktu jsou v podstatě shodné s účinky protilátek tvořených u mužů, tj. sperma imobilizační, cytotoxické, ovlivňující kapacitaci spermií a akrozomální reakci.

Přítomnost protilátek proti spermiím může být tedy také spojena se změnou pohybu spermií v hlenu děložního hrdla. V tomto případě jsou spermie původně schopné vstoupit do hlenu děložního hrdla, ale následně jsou znehybněny. Buď se „mrskají“ na místě a nevykazují pohyb vpřed nebo jsou zcela nehybné. Chování spermií v hlenu děložního hrdla bude záviset na typu protilátek v hlenu a jejich specifčnosti k povrchu spermií. Přítomnost komplement- nevázájících protilátek v hlenu může způsobit zachycení spermií a třes na místě, zatímco komplement-vázající protilátky mohou vést k jejich celkovému znehybnění (Bronson, 2000).

Přítomnost některých složek komplementu a komplement dependentních protilátek proti spermiím mohou působením na spermie zkrátit jejich dobu přežívání v děložním hrdle. Účinky těchto protilátek mohou měnit čepičku spermií a tím snížit možnost oplození. Dojde k zablokování účinků enzymů hlavičkové části spermie určené k rozpuštění povrchu vajíčka a vlastního vstupu do vajíčka, oplození (Ulčová-Gallová, 2006).

Reakce imunitního systému ženy však nemusí být namířena pouze proti cizorodým mužským spermiím. U mužů se setkáváme s autoimunitní reakcí vůči vlastním spermiím, podobná situace může nastat u žen, kdy dochází k tvorbě protilátek namířených proti částem vaječnicků, cytoplazmě oocyty, žlutému tělísku nebo proti zona pellucida. Mezi nejčastější důsledky imunitní poruchy vaječnicků patří předčasné ovariální selhání. Antiovariální protilátky byly však zjištěny i u žen bez zjevných známek předčasného ovariálního selhání. Proto jsou neustále předmětem zkoumání, např. pro svou předpovědní hodnotu, zda dojde k selhání vaječnicků v budoucnosti (Monnier-Barbarino a kol., 2005).

Protilátky proti zona pellucida (*antizonální protilátky*) mohou teoreticky reprodukci ovlivnit několika způsoby, vzhledem k různým úlohám zona pellucida v průběhu folikulogeneze, oplození a raného vývoje embrya. Že protilátky proti třem hlavním proteinům zona pellucida, ZP1, ZP2 a ZP3, mohou ovlivnit plodnost, bylo prokázáno na zvířecích modelech. Očkování ZP2 a ZP3 vyvolává produkci protilátek inhibující oplození, zatímco na jiných modelech imunizace ZP1 vyvolala produkci protilátek inhibující vazbu spermií k zona

pellucida. U lidí byl zjištěn vyšší výskyt antizonálních protilátek u pacientů s neznámou příčinou neplodnosti než u pacientů se známou příčinou neplodnosti (Monnier-Barbarino a kol., 2005).

6.2.10. Vyšetřovací metody

Vyšetření ženy zahrnuje posouzení stavu ovulace, průchodnosti vejcovodů, tuboperitoneálního, cervikálního a děložního faktoru.

6.2.10.1. Anamnéza

Pro lékaře jsou důležité informace o nástupu menstruace, pravidelnosti a délce menstruačního cyklu, síle menstruačního krvácení, četnosti pohlavního styku. Samozřejmě při odebrání anamnézy zjišťuje prodělané operace, onemocnění, užívané léky a také onemocnění u rodinných příslušníků.

6.2.10.2. Měření bazální teploty

Při pravidelném menstruačním cyklu se může měření bazálních teplot využít k nepřímému průkazu ovulace i k diagnóze těhotenství. Tato metoda je založena na termogenním působení progesteronu, který se po ovulaci uvolňuje ze žlutého tělíska. Jde však o metodu orientační a doplňkovou.

Žena si každý den ráno, dříve než vstane z lůžka, měří teplotu v pochvě nebo konečniku. Teplota se měří vždy ve stejnou dobu nejméně 5 minut. Diagnostické závěry se stanovují až po měření v průběhu nejméně 3 cyklů. Teplotu si žena zapisuje do menstruačního kalendáře. Spojením naměřených hodnot vznikne křivka charakterizující cyklus.

U ovulačního cyklu je křivka bifázická, tj. po ovulaci se teploty zvyšují nad 37 °C. Den před ovulací lze pozorovat pokles teploty odpovídající předovulačnímu vyplavení estrogenů. Před menstruací klesá teplota na hodnoty obvyklé ve folikulární fázi. Teplota zvýšená nad 37 °C trvající déle než 18 dní upozorňuje na možnost počínajícího těhotenství (Citterbart a kol., 2001).

6.2.10.3. Zobrazovací metody

Metody zobrazující orgány a tkáně reprodukčního systému ženy jsou jednou z nejdůležitějších součástí moderní gynekologické diagnostiky. Jako první se v diagnostice uplatnily rentgenové metody. Vzhledem k nepříznivým účinkům radiace na gonády ženy je však nutno tato vyšetření omezovat pouze na jednoznačně indikované situace. U žen ve fertilním věku se plánovaná rtg vyšetření provádějí v první polovině menstruačního cyklu, aby se tak vyloučila časná gravidita a nedošlo k poškození plodu.

Nejvíce se v gynekologii využívá ultrazvukové vyšetření. Vyšetření se provádí přes dutinu břišní nebo přes vaginu. Pomocí ultrazvukového vyšetření se zjišťuje přítomnost gynekologických tumorů, může se posoudit kvalita a tloušťka endometria. A také se využívá k folikulometrii, tj. vyšetření zjišťující počet a velikost folikulů. Zjistí se tak aktivita vaječnicků a kdy asi dojde k ovulaci (Citterbart a kol., 2001).

6.2.10.4. Hormonální vyšetření

Hormonální vyšetření se provádí při neplodnosti a při větších nepravidelnostech cyklu. Stanovují se především hodnoty LH, FSH, prolaktinu, estradiolu a progesteronu. Například ovulaci lze zjistit pomocí jednostupňového testu, který svou pozitivitou prokazuje vzestup LH jeden až dva dny před ovulací (Citterbart a kol., 2001). Tento test, známý jako ovulační test, je možné zakoupit v lékárně.

6.2.10.5. Imunologická vyšetření

Hlavní imunologické příčiny neplodnosti žen jsou antispermatozoidní a antiovariální protilátky. Ke zjištění protilátek se provádí vyšetření cervikálního hlenu žen:

Test podle Kremera – jedná se o test pronikání spermií kapilárou s ovulačním hlenem. Úkolem je posoudit vzdálenost, kterou urazí spermie v ovulačním hlenu za jednotku času. Navíc je zapotřebí všimnout si počtu pohyblivých spermií, posoudit charakter pohybu spermií a případné změny na hlavičkách spermií. Test odráží základní penetrační schopnosti spermií v ovulačním hlenu za jednotku času, modeluje tak situaci *in vivo*. Screeningovým Kremerovým testem je možné zachytit i aglutinaci spermií.

Mikroaglutinační test – test zjišťuje přítomnost protilátek proti spermiím v hlenu. V případě, že ovulační hlen neobsahuje protilátky proti spermiím, spermie zcela volně proplouvají svým charakteristickým pohybem, v opačném případě jsou nahloučené k sobě.

Postkoitální test – test se provádí do 2 hodin po nechráněném styku v období ovulace. Odeber se hlen z děložního hrdla a vyšetřuje se pod mikroskopem. Sleduje se počet spermií, jejich pohyblivost a charakter pohybu (Ulčová-Gallová, 2006).

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – metoda využívá sekundární protilátky ke specifickým isotypům imunoglobulinů, které jsou kovalentně navázány na enzym a přidány ke vzorku (sérum, hlen děložního hrdla, spermie). Je-li ve vzorku přítomen daný imunoglobulin (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 specificita. Hlavní nevýhodou této metody je, že vzorky jsou fixovány a to může způsobit narušení plazmatické membrány. Pak může dojít k odhalení vnitřních antigenů. Použité protilátky se mohou také vázat nespecificky a metoda pak poskytuje falešně pozitivní výsledky. Touto metodou není možné zjistit lokalizaci protilátek (Mazumdar, Levine, 1998).

6.3. LÉČBA 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 (Citterbart a kol., 2001).

V 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 inseminace (IUI), *in vitro* fertilizace (IVF) a intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI).

Etiologická léčba by měla být obecně využita jako první, ale často není úspěšná. Při plánování léčby musí být zváženy kromě diagnózy i další okolnosti, např. věk ženy, délka trvání neplodnosti, porovnání ceny a účinnosti a preference pacienta (De Sutter, 2006).

6.3.1. Kondomová terapie

Tento typ léčby je doporučován pacientkám s vysokými hladinami protilátek proti spermiím v děložním hrdle. Většinou se jedná o ženy mladší 30 let, u nichž nebyly zjištěny jiné příčiny neplodnosti. Léčba je ordinována na 3 – 6 měsíců, někdy i 12 měsíců. Cílem chráněného pohlavního styku pomocí prezervativu je zabránit kontraktu rozpustných antigenů spermií s buňkami reprodukčního traktu, které jsou schopné vytvářet protilátky proti spermiím. Protilátky během léčby klesají na minimální hladiny. Výsledky této léčby se však liší případ od případu. V některých studiích bylo zjištěno otěhotnění v následujících ovulačních cyklech u 1 – 2% žen, v jiné studii až u 41% předtím neplodných pacientek. Příčinou je přítomnost paměťových buněk i v děložním hrdle, kde ihned po opětovném setkání se spermiemi začnou vytvářet protilátky. Proto je většinou tento způsob léčby kombinován s jinými terapiemi (Ulčová-Gallová, 2006).

6.3.2. Imunoterapie

Imunoterapie je v reprodukční imunologii definována jako přímé ztvárnění přirozené obranyschopnosti organismu vedoucí k vyloučení tvorby protilátek proti spermiím, vajíčku nebo k úplnému omezení jejich produkce.

Celková nespecifická terapie: při této léčbě jsou využívány kortikosteroidy. Vzhledem k celé řadě nežádoucích vedlejších účinků musí být pacientka nebo pacient před touto léčbou řádně vyšetřen a během ní pečlivě sledován. Celková imunosuprese bývá úspěšná u izolované neplodnosti z imunologických příčin. Často je používána při léčbě jiné příčiny neplodnosti, kdy se přistupuje k *in vitro* fertilizaci.

Lokální specifická terapie: lokální využití kortikoidů je určeno neplodným ženám, u kterých jsou jedinou příčinou neplodnosti protilátky proti spermiím v děložním hrdle. Dalšími podmínkami tohoto způsobu léčby jsou normální spermioqram partnera, hladiny hormonů, průchodné vejcovody a vyloučení protilátek proti spermiím v séru.

Plazmaferéza: plazmaferéza je drahá, bezpečná, většinou dobře tolerovaná léčebná metoda, při které dochází k oddělení plazmy od krevních buněk. U pacientek s vysokými protilátkami 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 (Ulčová-Gallová, 2006).

6.3.3. Inseminace

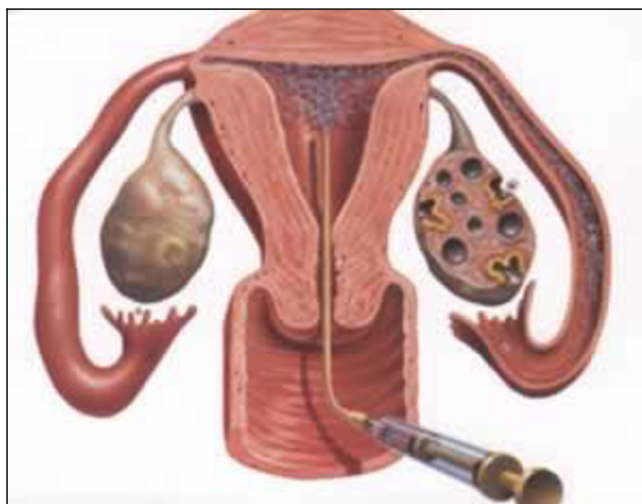
Intrauterinní inseminace (IUI) je často využívána v léčbě neplodných párů. Indikací pro IUI jsou ženské faktory, např. abnormality hlenu děložního hrdla, a také idiopatická neplodnost. Mnoho urologů doporučuje IUI jako výchozí metodu asistované reprodukce u párů s mužským faktorem neplodnosti, kdy selže léčba specifické příčiny neplodnosti. IUI je obvykle vyzkoušena před provedením dražších a invazivnějších metod asistované reprodukce, jako jsou *in vitro* fertilizace a intracytoplazmatická injekce spermií (Miller a kol., 2002).

Pokročilý věk matky by neměl být důvodem přeskočení IUI jako metody léčby. Pokud jsou oba vejcovody průchodné a kvalita spermií rozumná, pak tři cykly IUI mohou vést ke stejným kumulativním četnostem těhotenství jako jeden cyklus IVF (De Sutter, 2006).

Důvodem k IUI je také potřeba umístit do děložní dutiny velké množství žijících spermií kvůli přítomnosti protilátek proti spermiím buď na povrchu spermií, nebo v hlenu děložního hrdla. Teoreticky se zvýší pravděpodobnost, že spermie vstoupí do vejcovodu a dostanou se k vajíčku. Pomocí sonografického a hormonálního sledování zrání folikulů může být inseminace načasována do rozmezí několika hodin od očekávané ovulace. Přesnost načasování je velmi důležitá, protože spermie s navázanými protilátkami přežívají v ženském reprodukčním traktu kratší dobu. Vazba složek komplementu může vést k jejich fagocytóze nebo imobilizaci (Bronson, 2000).

U mužů tvořících protilátky proti spermiím je IUI také prospěšná. Promytí spermií může přinést určité výhody odstraněním nízkoafinitních protilátek proti spermiím v seminální plazmě, které se mohou vázat na spermie během jejich pobytu v pochvě po pohlavním styku. Afinita protilátek k antigenům na povrchu spermií je však vysoká, a jakmile dojde k navázání protilátek na spermie, není jednoduché protilátky ze spermií odstranit. Techniky vedoucí k disociaci komplexů jsou spojeny s nezvratnou ztrátou pohyblivosti spermií.

Ejakulace přímo do promývacího pufru je také výhodná z hlediska minimalizace množství protilátek potahující spermií. Proces potažení spermií protilátkami ve spermatu je ale složitý. U králíků bylo prokázáno, že protilátky vstupují do samčího pohlavního traktu přes nadvarle. Pokud je tomu tak i u lidí, k potažení spermií protilátkami může dojít před ejakulací i po ní. Oproti tomu protilátky jsou přítomné i v sekretu prostaty a spermie jsou jim vystaveny po zkapalnění spermatu. Rychlé zkapalnění ejakulátu a míchání spermatu by tak mohlo být prospěšné. Odběr spermatu doma a jeho přeprava do laboratoře by poskytla čas k potažení spermií protilátkami a jejich aglutinaci, čemuž by se dalo vyhnout zpracováním spermatu ihned po ejakulaci (Bronson, 2000).



Obr. č. 15: **Intrauterinní inseminace**: Zavedení spermií pomocí katetru do dělohy (URL 12)

Provedení IUI: u ženy je na začátku menstruačního cyklu zahájena hormonální stimulace růstu 2 nebo 3 vajíček. Ke stimulaci se obvykle používají tabletky klomifencitrátu nebo injekce gonadotropinu. Růst folikulů je sledován pomocí ultrazvukového vyšetření, podle reakce na stimulaci je upraveno dávkování hormonálních přípravků. Dosáhnou-li dva nebo tři folikuly požadované velikosti, dostane pacientka injekci hCG a tím je nastartována ovulace. V den ovulace partner poskytne sperma, které se připraví k inseminaci. Čerstvé sperma se po odběru a zkapalnění propere a zkoncentruje. Lékař pak pomocí jemného katetru zavede připravené sperma přes hrdlo až do dělohy. Celý proces je bezbolestný, provádí se ambulantně (URL 13).

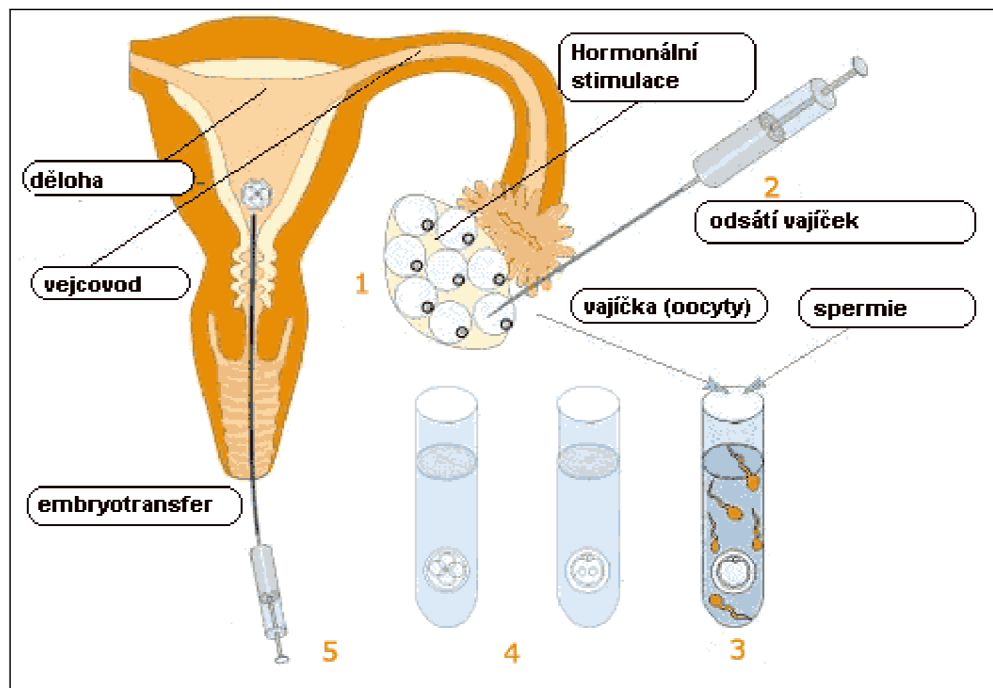
Za normálních okolností je k inseminaci využito sperma partnera. Další metodou je inseminace spermatem dárce (asistovaná inseminace). Na základě zákonů a právních předpisů České republiky je použití čerstvého spermatu dárce k inseminaci zakázáno. Vzorky musí být zmrazeny a uchovány po dobu 6 měsíců. Dárce musí být opětovně testován na přítomnost infekčních chorob. Výsledky tohoto vyšetření musí být jak při odběru, tak při kontrolním vyšetření po 6 měsících negativní. Komplikace u této metody jsou vzácné, nicméně se může vyskytnout infekce nebo přenos pohlavních chorob.

Úspěšnost této metody je od 5 do 15% na jeden cyklus v závislosti na věku ženy a v případě, že koncentrace spermatu je v limitu normy a vejcovody ženy jsou volně průchodné. Výhodou metody IUI oproti IVF je, že nevyžaduje odběr vajíček a anestezii. V případě, že je metoda IUI neúspěšná po 3 cykly, je páru doporučena metoda IVF (URL 13).

6.3.4. *In vitro* fertilizace

In vitro fertilizace (IVF) je metoda asistované reprodukce, kdy dochází k mimotělnímu oplodnění vajíčka. Indikací k IVF jsou vážné příčiny mužské neplodnosti, neprůchodnost vejcovodů ženy nebo je tato léčba doporučena párům, u kterých selhala konvenční terapie (např. po několika cyklech IUI) (De Sutter, 2006).

V současné době představuje metoda IVF vynikající příležitost k početí u párů, u kterých byla prokázána imunitní reakce proti spermiím. Protilátky proti spermiím ve folikulární tekutině u žen mohou být odstraněny promytím komplexu cumulus – oocyt. Také pro muže s autoimunitou ke spermiím je tato metoda výhodná. Jak již bylo uvedeno dříve, spermie s navázanými protilátkami nemohou prostoupit do hlenu děložního hrdla a snižuje se tak pravděpodobnost, že se gamety setkají. IVF tento problém transportu spermií obchází a zajišťuje setkání vajíčka se spermií. Zatímco u žen mohou být ale protilátky od vajíčka odstraněny promytím, u mužů zůstávají protilátky vázané k povrchu spermií. Protilátky vázané na bičík spermie nijak výrazně nebrání oplodnění *in vitro*. Protilátky vázané na hlavičku spermie však již ovlivňují schopnost proniknout do vajíčka. Naštěstí tyto účinky jsou znatelné, až když více než 70 % spermií použitých k IVF je potaženo protilátkami. Teoreticky tedy závisí, proti kterým antigenům jsou protilátky namířeny. Jsou-li namířeny proti antigenům nehrající významnou roli při oplodnění, schopnost pronikání spermie do vajíčka by neměla být narušena. Je-li u neplodného páru zjištěna přítomnost protilátek namířených proti hlavičce spermií, měla by být páru doporučena metoda ICSI, která zvýší šance oplození (Bronson, 2000).



Obr. č. 16: Procedura IVF

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| 1. Hormonální stimulace | 4. Kultivace |
| 2. Odběr vajíček | 5. Embryotransfer |
| 3. Oplodnění (fertilizace) | |

(URL 14)

Počátek IVF u lidí spadá do roku 1978, kdy se narodila Louisa Brownová, první ‚dítě ze zkumavky‘. Zakladateli této metody jsou embryolog Robert Edwards a gynekolog Patrick Steptoe. Většina kroků této metody byla však vyvinuta již dříve pro veterinární účely. Princip IVF (obr. č. 16) je jednoduchý: shromáždit zralé oocyty, oplodnit je v laboratoři v buněčné kultuře a umístit je do děložní dutiny ve vhodné fázi cyklu, aby bylo přijato. Desítky let experimentů vedle k vylepšování jednotlivých kroků (Ola, Ledger, 2005b).

Jedním z největších problémů u Edwardse a Steptoea byl nedostatek oocytů. Získali v přirozených cyklech pouze jeden nebo dva oocyty a často byly ztraceny v pánvi pro nevhodné načasování odběru. Úspěšnost tak byla nízká. Aby se zvýšila šance na přenos embryí, embryolog potřebuje větší množství oocytů a potřebuje jistotu, že nenastane předčasná ovulace (Ola, Ledger, 2005b). Proto nejdříve pacientka podstoupí stimulaci ovariální činnosti. Ke stimulaci ovariální činnosti se používají preparáty klomifencitrát, lidský menopauzální gonadotropin a choriový gonadotropin. Samotný klomifencitrát se v dnešní době příliš nepoužívá. Osvědčily se analogy GnRH, které blokují hypofyzární receptory

GnRH a tím zastavují tvorbu gonadotropinů spolu se zablokováním steroidogeneze a ovulace. Výhodou stimulovaného cyklu je tedy větší počet folikulů, dozrávání oocytů v obou vaječnicích, zajištění přiměřené produkce steroidů žlutým tělískem. Stimulace má i své nevýhody. Drahé léky zvyšují náklady na léčby. Hrozí riziko hyperstimulace (Citterbart a kol., 2001).

V přirozeném cyklu zahajuje zrání folikulů a ovulaci luteinizační hormon. Zrání folikulů může být spuštěno také vnějším podáním hCG. Aby se zabránilo hyperstimulaci, musí být vývoj folikulů monitorován, např. ultrazvukem. Monitoringem lze také u starších žen zjistit, zda dochází ke zrání folikulů. Pokud folikuly nedozrávají, je pacientkám doporučeno přerušit cyklus nebo jsou poučeny, že pokud se rozhodnout pokračovat, je těhotenství málo pravděpodobné (Ola, Ledger, 2005b).

Odběr folikulární tekutiny se provádí transvaginální punkcí pod kontrolou ultrazvukem, většinou v krátké celkové narkóze. Termín odběru je 35 – 37 hodin po aplikaci indukční dávky hCG. Vzhledem k provozu laboratoře většinou aplikují pacientky hCG večer ve 21 hodin a odběr folikulární tekutiny se provádí v 8 – 10 hodin dopoledne 1,5 dne poté. Odběr se provádí na operačním sále (Řežábek, 2008). Ve stejný den, kdy probíhá odběr oocytů, poskytne také partner vzorek spermatu. Od spermií je oddělena seminální plazma, čímž se sníží také bakteriální kontaminace, která může ovlivnit složení kultivačního média pro spermie a nepřímo tak ovlivnit pohyblivost spermií. V kultivačním médiu proběhne kapacitace spermií. Doba potřebná pro kapacitaci je obvykle 6 hodin nebo více (Citterbart a kol., 2001).

Laboratorní část mimotělního oplodnění začíná předáním folikulární tekutiny s oocyty z operačního sálu a končí přenosem embryí do dělohy pacientky. Veškeré procesy s tím spojené se odehrávají v embryologické laboratoři. Po převzetí punktátu z operačního sálu do embryologické laboratoře jsou postupně vyhledávána všechna vajíčka, která byla získána punkcí. Vajíčka jsou pomocí drobných jehel očištěna a přenesena do živného roztoku v kultivační misce pečlivě označené jménem pacientky.

Miska je pak uložena do kultivačních boxů, kde jsou udržovány optimální podmínky pro oplození vajíček a vývoj embryí. V rozmezí 2 - 6 hodin po zisku vajíček jsou k vajíčkům přimíchány spermie partnera pacientky. Tím je umožněn kontakt vajíčka a spermie a může dojít k oplození (URL 15).

Zda vajíčka opravdu byla oplozena a zda oplození proběhlo v pořádku, je zkontrolováno 24 hodin po odběru vajíček. Výsledek je zaprotokolován, živný roztok je vyměněn za čerstvý a kultivace pokračuje dál.



Obr. č. 17: **Oplozené vajíčko se dvěma prvojádry a dvěma pólovými tělísky**

Převzato a upraveno podle URL 15

Dva dny po odběru vajíček jsou transferována první embrya. Při tzv. prodloužené kultivaci jsou embrya kultivována ve speciálních živných roztocích umožňujících jejich růst do vyšších embryonálních stadií. Během této kultivace jsou embryím dodávány živiny charakteristické a potřebné pro jednotlivá vývojová stadia. Díky této dlouhodobé kultivaci jsou vyloučena embrya, která se přestanou vyvíjet a nejsou tedy schopná dát vznik těhotenství. Je možné lépe určit nejkvalitnější embrya a optimalizovat den transferu a tím zvýšit šanci na úspěch celé léčby. V některých případech (zejména při opakovaném neúspěchu v předchozích cyklech IVF a u starších pacientek) je kultivace embryí směřována k transferu blastocyst. Blastocysta je nejvyšší embryonální stádium, které lze získat v podmínkách mimo tělo pacientky (URL 15).

Embrya ve stádiu blastocysty by měla být maximálně připravena na implantaci ve sliznici děložní. Ne všechna embrya jsou však schopna dosáhnout tohoto stadia a proto při použití této metodiky nemusí být i přes vyšší počet získaných embryí žádná embrya zamražena a dokonce nemusí být proveden ani vlastní transfer. To v tom případě, že žádné z embryí nedosáhne tohoto stadia (URL 15).

Embryotransfer se provádí v den, který laboratoř určí jako optimální. Nejdříve lze embrya transferovat druhý den po odběru, nejpozději šestý den. Prodloužená kultivace v laboratoři má za cíl vybrat podle vývoje embryí ta z nich, která mají nejlepší předpoklady k implantaci. Prodloužená kultivace je nicméně pro embrya určitou fyziologickou zátěží, přestože se kultivační tekutiny stále zdokonalují. Při transferu jsou v laboratoři embrya natažena do katétru, který lékař následně zavede děložním hrdlem do dělohy a obsah tam aplikuje. Důležité je zavést katétr bez poranění, protože krvácení s velkou pravděpodobností obalí embryo koagulem a zabrání nidaci. Některá pracoviště doporučují po embryotransferu

klid, na jiných pracovištích pacientky po zákroku odchází hned domů nebo do práce. Po embryotransferu se podává progesteron, aby podpořil luteální fázi. Doba podávání je obvykle dva týdny, nejméně však jeden týden (Řežábek, 2008).

V případech, že má pacientka více embryí dobré kvality, přebytečná embrya je možné zamrazit. Pro zamrazení (kryokonzervaci) jsou určena ta embrya, která jsou dobré kvality a jejich vývoj není zastaven. Jen taková embrya mají dispozici dát vznik těhotenství po jejich rozmrazení a transferu do dělohy. Před zamrazením jsou embrya vystavena účinkům látek, které zabrání jejich poškození v průběhu kryokonzervace. Embrya jsou po skupinkách (obvykle 2-4 embrya) uložena do speciálních slámek. Teplota je díky programovatelnému zařízení pomalu snížena až na $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ a embrya jsou uchovávána v kontejnerech naplněných tekutým dusíkem. Při rozmrazení je slámka s embryi zahřáta na pokojovou teplotu. Kryokonzervační látky jsou odstraněny a embrya uložena do kultivačních boxů, aby byla ověřena jejich schopnost dalšího vývoje ještě před vlastním transferem. Kromě embryí lze snadno zamrazovat i mužské pohlavní buňky (spermie) a v poslední době i neoplozená vajíčka (URL 15).

Kryokonzervovaná embrya se rozmrazí, když se žena rozhodne pro jejich embryotransfer, tedy po porodu plodu z minulého cyklu IVF nebo poté, co neotěhotněla v minulém cyklu IVF. Podmínkou nidace je synchronizace vývoje endometria s vývojem embrya. U ženy samovolně ovulující lze monitorováním cyklu stanovit den ovulace a poté provést embryotransfer v odpovídající den, závislý samozřejmě na stáří embryí (počítáno od fertilizace). Absolutní stáří embryí, tedy doba jejich uchování v kryokonzervovaném stavu, je nepodstatné (Řežábek, 2008).

Není-li jistota o dokonalém průběhu cyklu, je použit plně substituovaný cyklus. Princip spočívá v podávání estrogenů a následně estrogenů společně s gestageny. Stejná příprava je využita i pro přijetí embryí z darovaných ovocytů. V plně substituovaných cyklech nepřichází menstruace. Přibližně 2,5 až 3 týdny po od začátku podávání gestagenů se stanovuje hladina hCG. Je-li test pozitivní, pokračuje se v podávání substituce. Placenta začíná přebírat funkci (zde neexistujícího) žlutého tělíska až od 6. týdne těhotenství a teprve v 10. - 12. týdnu je těhotenství na žlutém tělísku nezávislé. Předčasné vysazení substituce by vedlo k potratu.

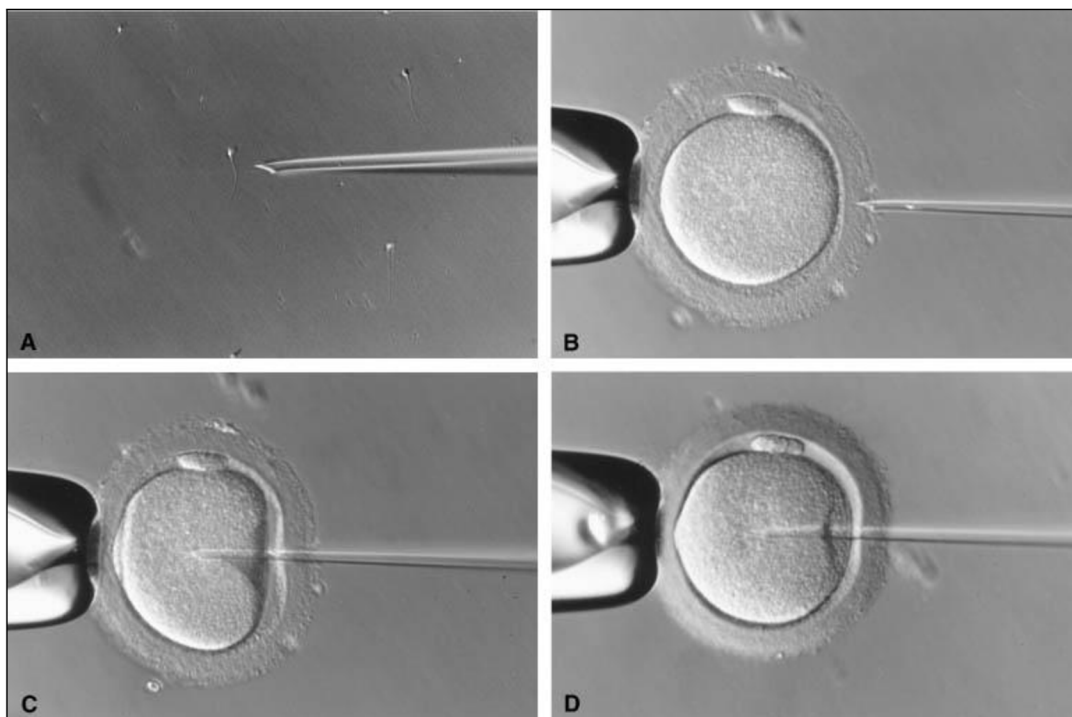
Je-li test negativní, pokračuje se v substituci a provede se další test, většinou z krve. Při dvou negativních testech je substituce ukončena, za 2 – 3 dny po vysazení přijde menstruace. Ihned v následujícím cyklu se žena může připravovat na další cyklus přenosu kryokonzervovaných nebo darovaných embryí. (Řežábek, 2008).

6.3.5. Intracytoplazmatická injekce spermie

Pokud je vážně ovlivněna kvalita spermatu nebo po předchozím IVF nedojde k oplodnění, je doporučena metoda intracytoplazmatické injekce spermie do cytoplazmy vajíčka (ICSI) (De Sutter, 2006). První těhotenství využívající embrya vytvořená pomocí ICSI byla popsána roku 1992 a postup byl stále více aplikován z 11 % IVF cyklů v roce 1995 na 55,6 % IVF cyklů v roce 2003. Konvenční IVF je mnohem méně úspěšná, když jsou parametry spermatu pod referenční hodnoty: oligozoospermie, astenozoospermie, teratozoospermie. Jsou tak výrazně sníženy počty oplození a je méně embryí k transferu. Muži s azoospermii (v ejakulátu nejsou spermie) byli zcela bez možnosti léčby (Wang, Sauer, 2006).

U mužů s obstrukční azoospermii byla pozornost zaměřena na spermie získané z nadvarlete. Spermie se z nadvarlete získávají mikrochirurgickou nebo perkutánní metodou. Mikrochirurgická aspirace epididymálních spermii se provádí v celkové anestezii a je také významnou diagnostickou metodou, protože umožňuje vyšetření šourku. Perkutánní aspirace epididymálních spermii je méně invazivní, poskytuje méně diagnostických informací a výnos spermii může být nižší. U mužů, u nichž není azoospermie způsobena obstrukcí, se spermie získávají přímo z varlat. U mužů s normální spermiogenezí vede k úspěšnému dosažení těhotenství. Provádí se perkutánním odsátím v lokální anestezii nebo extrakcí, která je ekvivalentní diagnostické biopsii (Navarro a kol., 2008).

ICSI je mikromanipulační metoda (obr. č. 18), při které embryolog pomocí mikropipety vpraví spermii přímo do vajíčka. Celý proces se provádí v mikromanipulátoru pod mikroskopickou kontrolou. Mikromanipulátor je přístroj, který převádí poměrně hrubé pohyby ruky na jemné miniaturní pohyby. Vzhledem k velikosti vajíčka by i velmi jemný pohyb ruky byl nešetrný. Do tohoto přístroje se upevní držící pipeta, kterou se přidržuje vajíčko. Menší manipulační pipetou se nasaje jedna spermie a vpraví se do ženské pohlavní buňky.



Obr. č. 18: ICSI

A – výběr a nasátí spermie

B – průnik pipety skrze zona pellucida

C – průnik pipety do oocytu

D – injekce spermie do cytoplazmy oocytu

Převzato a upraveno podle URL 16

Příprava ejakulovaných spermií pro ICSI zahrnuje následující kroky: oddělení seminální tekutiny promytím v médiu, centrifugace a odstranění supernatantu, průchod přes dvě nebo tři vrstvy gradientu Percollu a poslední koncentrační krok bezprostředně před samotnou procedurou (van Steirteghem, 1997).

Vajíčka jsou pro ICSI také upravována. Po jejich odběru je nutné odstranit corona radiata a cumulus oophorus a to pomocí enzymu hyaluronidázy a mechanického procesu. Oocyty jsou pak opakovaně nasávány do pipety. Pod mikroskopem proběhne kontrola oocytu, to znamená, že se kontroluje zona pellucida, samotný oocyt a přítomnost nebo absence polárního tělíska. Oocyty, které jsou ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení, jsou následně inkubovány v médiu potažené minerálním olejem. Pak je provedeno ICSI (van Steirteghem, 1997).

Příprava mikromanipulátoru a vlastní proces mikroinjekce jsou tím nejdůležitějším při ICSI. Držící a injekční pipeta jsou vyrobeny z borokřemičitého skla a před procedurou jsou omyty. Obě pipety jsou nakloněny pod úhlem 40°. Na injekční misce je ve středu části kapka

upravených spermii obklopena kapkami média. Jedna znehybněná spermie je nasáta bičíkem napřed do injekční pipety. Oocyt je fixován pomocí držící pipety tak, že polární tělísko je na pozici 6 hodin. Injekční pipeta pronikne zona pellucida do oocytu v pozici 3 hodin a spermie je vstříknuta do cytoplazmy s co nejmenším množstvím média. Tento způsob orientace oocytu minimalizuje riziko, že injekce poškodí metafázní desku. Po injekci (oplození) se oplozený oocyt inkubuje. Po 16 až 18 hodinách se kontroluje intaktnost oocytu a také počet pólových tělísek a prvojader. Za oplodněné se považují oocyty, které vykazují přítomnost dvou individuálních pólových tělísek a dvou jasně viditelných prvojader (van Steirteghem, 1997).

Úspěšnost léčby neplodnosti pomocí IVF a ICSI se liší z důvodů různých příčin neplodnosti a může se také lišit úspěšnost v jednotlivých centrech asistované reprodukce. Např. Centrum reprodukčního zdraví Arleta uvádí úspěšnost léčby IVF mezi 25 – 45 %. Šance na těhotenství po ICSI je vyšší a mohou pro to být dva důvody: ženy mužů, kteří mají poruchu plodnosti, mladší, než ženy podstupující IVF, a dále u ICSI je vyšší šance na oplození vajíčka. Pravděpodobnost, že dojde ke graviditě, roste také s počtem proběhnutých cyklů - v současné době centrum uvádí, že v rámci třech léčebných IVF cyklů pomohou asi 60 – 70 % párům k dítěti. To je takzvaná kumulativní úspěšnost léčby metodami IVF (URL 17).

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo formou literární rešerše shrnout nejnovější vědecké poznatky o procesech zahrnutých do lidské reprodukce. Většina lidí považuje za samozřejmost a právo mít vlastní děti, nicméně v dnešní době stále více párů vyhledává odbornou lékařskou pomoc při problémech s otěhotněním nebo opakovanými potraty. Příčiny těchto potíží jsou různého charakteru, některé lze snadno odstranit, u jiných může být léčba zdlouhavější. I přesto, že se jedná o podstatnou součást našeho života, informovanost v této oblasti není příliš vysoká a mnozí lidé svým životním stylem (obezita, kouření, neléčení infekcí, vystavování se působení chemických látek) značně ovlivňují své šance na potomka.

Při léčbě neplodnosti jsou dnes nejčastěji využívané metody asistované reprodukce, tedy *in vitro* fertilizace a intrauterinní inseminace, které umožňují těhotenství párům, které by dříve musely zůstat bezdětné. Přesto u některých párů příčina neplodnosti nemusí být zjištěna nebo současná léčba nevede k úspěšnému těhotenství. Proto je důležité v budoucnosti neustále vylepšovat metody asistované reprodukce a také se zabývat některými kroky při interakci pohlavních buněk, které nejsou dodnes dostatečně známy. Do té doby je pro tyto páry jedinou možností k úplné rodině adopce.

8. SEZNAM ZKRATEK

C - komplement

cAMP - cyklický adenosinmonofosfát

CD - povrchový znak na buňkách (cluster of differentiation)

CFTR - cystic fibrosis transmembrane conductance regulátor

CR - membránový regulátor

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

FSH - folikuly stimulující hormon

GM-CSF - granulocyto-makrofágový kolonie stimulující faktor

GnRh - gonadotropiny uvolňující hormon

hCG - lidský choriový gonadotropin

HLA - human leukocyte antigen

IBT - immunobead test

ICSI - intracytoplazmatická injekce spermie

IFN - interferon

Ig - imunoglobulin

IL - interleukin

IUI - nitroděložní (intrauterinní) inseminace

IVF - *in vitro* fertilizace

LH - luteinizační hormon

MAR - smíšená aglutinační reakce

MCP - membránový kofaktorový protein

MHC - hlavní histokompatibilní komplex

NK - natural killer

PGE2 - prostaglandin E2

T_H - T helper

TNF - tumor nekrotizující faktor

ZP - zona pellucida

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamson, G.D., Baker, V.L. 2003. **Subfertility: causes, treatment and outcome.** Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 17: 169-185.
- Beddy, P., Geoghegan, T., Browne, R.F, Torreggiani, W.C. 2005. **Testicular varicoceles.** Clinical Radiology. 60: 1248-1255.
- Boerke, A., Tsai, P.S., Garcia-Gil, N., Brewis, I.A., Gadella, B.M. 2008. **Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction.** Theriogenology. 70: 1188-1196.
- Brännström, M., Enskog, A. 2002. **Leukocyte network and ovulation.** Journal of Reproductive Immunology. 57: 47-60.
- Bronson, R.A. 2000. **Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines.** Journal of Reproductive Immunology. 45: 159-183.
- Chiu, W.W.C., Chamley, L.W. 2004. **Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies.** Fertility and Sterility. 82: 529-535.
- 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. 2001. **Gynekologie.** Galén. ISBN 80-7262-094-0.
- De Sutter, P. 2006. **Rational diagnosis and treatment in infertility.** Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 20: 647-664.
- Dmowski, W.P, Braun, D.P. 2004. **Immunology of endometritis.** Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 18: 245-263.
- Ferlin, A., Arredi, B., Foresta, C. 2006. **Genetic causes of male infertility.** Reproductive Toxicology. 22: 133-141.

- Flesch, F.M., Gadella, B.M. 2000. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1469: 197-235.
- Gadella, B.M. 2008. **Sperm membrane physiology and relevance for fertilization.** *Animal Reproduction Science.* 107: 229-236.
- Gupta, S.K., Srivastava, N., Choudhury, S., Rath, A., Sivapurapu, N., Gahlay, G.K., Batra, D. 2004. **Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine.** *Journal of Reproductive Immunology.* 62: 79-89.
- Harris, C.L., Mizuno, M., Morgan, B.P. 2006. **Complement and complement regulators in the male reproductive system.** *Molecular Immunology.* 43: 57-67.
- Hickey, D.K., Patel, M.V., Fahey, J.V., Wira, C.R. 2011. **Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections.** *Journal of Reproductive Immunology.* 88: 185-194.
- Hunt, P.A., Hassold, T.J. 2008. **Human female meiosis: what makes a good egg go bad?** *Trends in Genetics.* 24: 86-93.
- Iammarrone, E., Balet, R., Lower, A.M., Gillot, C., Grudzinskas, J.G. 2003. **Male infertility.** *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 17: 211-229.
- Kara, E., Simoni, M. 2010. **Genetic screening for infertility: When should it be done?** *Middle East Fertility Society Journal.* 15: 139-145.
- Kumar, R. 2008. **Reproductive tract tuberculosis and male infertility.** *Indian Journal of Urology.* 24: 392-395.
- Lessey, B.A. 2000. **Medical management of endometritis and infertility.** *Fertility and sterility.* 73: 1089-1096.

- Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. 2006. **Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A.** *Molecular and Cellular Endocrinology.* 254-255: 179-186.

- Malínský, J., Lichnovský, V., Michalíková, Z. 2004. **Přehled histologie člověka v obrazech – II. díl.** Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 80-244-0850-3.

- Masarani, M., Wazait, H., Dineen, M. 2006. **Mumps orchitis.** *Journal of The Royal Society of Medicine.* 99: 573-575.

- Massaad, Ch., Entezami, F., Massade, L., Benahmed, M., Olivennes, F., Barouki, R., Hamamah, S. 2002. **How can chemical compounds alter human fertility?** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 100: 127-137.

- Mastellos, D., Lambris, J.D. 2002. **Complement: More than a 'guard' against invading pathogens?** *Trends in Immunology.* 23: 485-491.

- Mazumdar, S., Levine, A.S. 1998. **Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment.** *Fertility and Sterility.* 70: 799-810.

- McLachlan, M.I. 2002. **Basis, diagnosis and treatment of immunological infertility in men.** *Journal of Reproductive Immunology.* 57: 35-45.

- Meinhardt, A., Hedger, M.P. 2011. **Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege.** *Molecular and Cellular Endocrinology.* 335: 60-68.

- Merkunová, A., Orel, M. 2008. **Antanomie a fyziologie člověka. Pro humanitní obory.** Grada. ISBN: 978-80-247-1521-6.

- 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.

- Mocé, E., Graham, J.K. 2008. ***In vitro* evaluation of sperm quality**. Animal Reproduction Science. 105: 104-118.
- Monnier-Barbarino, P., Forges, T., Fauer, G.C., Béné, M.C. 2005. **Gonadal antibodies interfering with female reproduction**. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 19: 135-148.
- Mostafa, T. 2010. **Cigarette smoking and male infertility**. Journal of Advanced Research. 1: 179-186.
- Navarro, J., Risco, R., Toschi, M., Schattman, G. 2008. **Gene Therapy and Intracytoplasmic Injection (ICSI) – A Review**. Placenta. 29: 193-199.
- Ola B., Ledger, W.L. 2005a. **Endometriosis and infertility**. Women's Health Medicine. 2: 15-17.
- Ola, B., Ledger, W.L. 2005b. ***In vitro* fertilisation**. Current Obstetrics & Gynaecology. 15: 314-323.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. **The molecular basis of oocyte growth and development**. Molecular and Cellular Endocrinology. 145: 27-37.
- Poppe, K., Velkeniers, B. 2004. **Female infertility and the thyroid**. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 18: 153-165.
- Primakoff, P., Myles, D.G. 2007. **Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization**. FEBS Letters. 581: 2174-2180.
- Quayle, A.J. 2002. **The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells**. Journal of Reproductive Immunology. 57: 61-79.
- Revelli, A., Piane, L.D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P. 2009. **Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics**. Reproductive Biology and Endocrinology. 7:40.

- Řežábek, K. 2008. **Asistovaná reprodukce**. Maxdorf. ISBN 978-80-7345-154-7.

- Scott, M.A. 2000. **A glimpse at sperm function *in vivo*: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract**. Animal Reproduction Science. 337-348.

- Schubert, H.J., Taylor, U., Zerbe, H., Waberski, D., Hunter, R., Rath, D. 2008. **Immunological responses to semen in the female genital tract**. Theriogenology. 70: 1174-1181.

- Silveira, L.F.G., Trarbach, E.B., Latronico, A.C. 2010. **Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans**. Molecular and Cellular Endocrinology. 324: 30-38.

- Spaniel-Borowski, K. 2011. **Ovulation as danger signaling event of innate immunity**. Molecular and Cellular Endocrinology. 333: 1-7.

- Song, J.L., Wessel, G.M., 2005. **How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes**. Differentiation. 73: 1-17.

- Tsaadon, A., Eliyahu, E., Shtraizent, N, Shalgi, R. 2006. **When sperm meets an egg. Block to polyspermy**. Molecular and Cellular Endocrinology. 252: 107-114.

- Tulsiani, D.R.P., Abou-Haila, A., Loeser, C.R., Pereira, B.M.J. 1998. **The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization**. Experimental Cell Research. 240: 151-164.

- Ulčová-Gallová, Z. 2006. **Neplodnost. Útok imunity**. Grada Publishing. ISBN 80-247-1493-0.

- Van Steirteghem, A. 1997. **Intracytoplasmic sperm injection**. Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology. 11: 725-738.

- Von Wolff, M., Nowak, O., Pinheiro, R.M., Strowitzki, T. 2007. **Seminal plasma – Immunomodulatory potential in men with normal and abnormal sperm count.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 134: 73-78.
- Wald, M. 2005. **Male infertility: Causes and cures.** Sexuality, Reproduction and Menopause. 3: 83-87.
- Wang, J., Sauer, M. 2006. **In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement.** Therapeutics and Clinical Risk Management. 2: 355-364.
- Watson, Ch.S., Bulayeva, N.N., Wozniak, A.L., Alyea, R.A. 2007. **Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses.** Steroids. 72: 124-134.
- Witte, T.S., Schäfer-Somi, S. 2007. **Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa.** Animal Reproduction Science. 102: 181-193.
- World Health Organization. 2010. **WHO laboratory manual for the Examination and Processing of human semen.** World Health Organization. ISBN: 978-92-4-154778-9.
- Xia, W., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, Y. 2005. **Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis – a lesson to learn from the testis.** Cytokine & Growth Factor Reviews. 16: 469–493.

10. SEZNAM INTERNETOVÝCH ODKAZŮ

URL 1: Prostate Cancer Canada. © 2011 [cit. 2011-04-06]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.prostatecancer.ca/Prostate-Cancer/About-the-Prostate>>.

URL 2: Halucinace.Webnode © 2008 [cit. 2011-04-06]. Dostupné na World Wide Web: <<http://halucinace.webnode.cz/products/spermie/>>.

URL 3: Cancer Council Victoria. © 2011 [cit. 2011-04-07]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.cancervic.org.au/about-cancer/living-with-cancer/sexuality_and_cancer/how_your_body_responds_sexuall.html>.

URL 4: Gunin A. Histology Images. © 2000 - 2009 [cit. 2011-04-06]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.histol.chuvashia.com/atlas-en/female-01-en.htm>>.

URL 5: Natural Fertility. Want to See Ovulation? © 2009 [cit. 2011-04-07]. Dostupné na World Wide Web: <<http://fertility.amuchbetterway.com/human-ovulation-picture/>>

URL 6: Biology of Reproduction. © 2011 [cit. 2011-04-21]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.bioreprod.org/content/63/1/172.full>>.

URL 7: Biogenetics. Male Infertility Department. © 2006 [cit. 2010-12-18]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.biogenetics.gr/en/male-infertility.htm>>.

URL 8: Sepal Reproductive Devices. © 2003 - 2011 [cit. 2011-04-05]. Dostupné na World Wide Web: <http://sepalreproductivedevices.com/template_products.cfm?classID=50>

URL 9: Lian Chinaherb AG. Fertilitätsstörungen Probleme des Mannes werden ignoriert. © 2011 [cit. 2011-04-05]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.lian.ch/index.cfm?fuseaction=resources.13086&lan=de>>.

URL 10: Loma Linda University Medical Center. © 2011 [cit. 2011-04-08]. Dostupné na World Wide Web: <<http://lomalindahealth.org/health-care/our-services/fertility/conditions-and-treatments/andrology-tour.page>>.

URL 11: Miracle Moms. Endometriosis Pain. © 2011 [cit. 2011-05-3]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.miracle-moms.com/adhesions/miracle-moms-e-book-chapter-17-endometriosis-pain>>.

URL 12: Newcastle Fertility Specialists: Dr Myvanwy McIlven & Dr Robert Woolcott. Treatments – Intrauterine Insemination. © 2007 [cit. 2011-04-07]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.drwoolcott.com.au/treatIui.htm>>.

URL 13: Reprofit International. IUI. © 2011 [cit. 2011-04-01]. Dostupné World Wide Web: <<http://www.reprofit.cz/page.php?id=20&rodic=7&lang=cz>>.

URL 14: IVF FNM. Mímotělní oplodnění – *in vitro* fertilizace (IVF). © 2006 -2011 [cit. 2011-03-20]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.ivf-motol.cz/ivf.aspx>>.

URL 15: Pronatal. [cit. 2011-04-25]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.pronatal.cz/pages/pece-embryologie-mimotelni-oplodneni.php>>.

URL 16: Sanatorium Helios. Oplození. © 2006 – 2011 [cit. 2011-03-20]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.sanatoriumhelios.cz/oplozeni>>.

URL 17: Arleta. Centrum reprodukčního zdraví. © 2011 [cit. 2011-04-20]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.arleta.cz/cs/sance-rizika>>.