

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Soňa Pastyříková

Hodnocení antispermiových protilátek (ASA) v diagnostice  
idiopatické neplodnosti

Evaluation of antisperm antibodies (ASA) in diagnostics of idiopathic infertility

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Veronika Páleníková

Praha, 2022

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce, RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D., za její vřelý a odborný přístup při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Veronice Páleníkové za její čas a ochotu si pročitat a opravovat moji bakalářskou práci a její odborné rady v jejím zpracování. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým přátelům a rodině, kteří mě při psaní bakalářské práce a mém studiu na fakultě podporovali.

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V ..... dne .....

Podpis autora

# Abstrakt

Neplodnost je problémem postihujícím téměř 15 % partnerských párů. Může být způsobena problémy genetickými, hormonálními, anatomickými či infekčními, a také může být zapříčiněna imunologickým faktorem. Jednou z imunologických příčin neplodnosti je přítomnost protilátek proti spermiím (ASA), které se váží na spermie a negativně ovlivňují jejich funkci. Výskyt ASA se projevuje například sníženou motilitou spermií, může docházet k jejich aglutinaci a narušení schopnosti kapacitace spermií. Případně ASA snižují schopnost pohybu spermií urogenitálním traktem ženy, negativně ovlivňují interakci spermií s oocytom a následně také vývoj embrya.

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání existujících metod pro vyšetření ASA. Hlavními parametry byla náročnost dané metody a zhodnocení výsledků dle klinických studií zaměřených na detekci a hodnocení ASA. Exaktní porovnání metod detekce ASA na základě provedených studií se ukázalo jako komplikované, zejména z důvodu vývoje jednotlivých metod v čase, rozdílných přístupů k vyhodnocení výsledků a malé standardizaci metod jako takových. Nicméně nejběžněji doporučovanými metodami jsou MAR, ELISA a IBT testy, které jsou standardizované, a díky komerčně dostupným kitům jsou považovány za nenáročné na provedení a vyhodnocení vzorků. Ve prospěch využití metod MAR a IBT navíc mluví doporučení v manuálu Světové zdravotnické organizace (WHO).

Klíčová slova: Spermie, MAR test, IBT test, ELISA, detekce, neplodnost

# Abstract

Infertility is a problem affecting almost 15% of couples. It can be caused by genetic, hormonal, anatomical or infectious problems, and it can also be caused by an immunological factor. One of the immunological causes of infertility is the presence of anti-sperm antibodies (ASA), which bind to sperm and adversely affect their function. The occurrence of ASA is manifested, for example, by reduced sperm motility, agglutination, and impaired sperm capacitation. Alternatively, ASA reduces the sperm ability to pass through the female urogenital tract, negatively affecting the sperm-oocyte interaction and the development of the embryo.

The aim of this bachelor thesis was to compare existing methods for ASA determination. The main parameters were the complexity of the method and the assessment of results according to clinical studies focused on the detection and evaluation of ASA. The exact comparison of ASA detection methods based on the performed studies proved to be complicated, mainly due to the development of individual methods over time, different approaches to the evaluation of results, and low standardization of the methods. However, the most commonly recommended methods are MAR, ELISA and IBT tests, which are standardized and, due to commercially available kits, are considered to be easy to perform and evaluate. In addition, the recommendations in the World Health Organization (WHO) manual speak in favour of the use of MAR and IBT methods.

Keywords: Sperm, MAR test, IBT test, ELISA, detection, infertility

## Seznam zkratek

- ANA** antinukleární protilátky (Antinuclear antibodies)
- AOA** antiovariální protilátky (Antiovarian antibodies)
- APL** antifosfolipidové protilátky (Antiphospholipid antibodies)
- ASA** protilátky proti spermiím (Antisperm antibodies)
- ATA** antityreoidální protilátky (Antithyroid antibodies)
- AZPA** protilátky proti zona pellucida (Anti-zona pellucida antibodies)
- CASA** Computer Aided Sperm Analysis
- DNA** deoxyribonukleová kyselina (Desoxyribonucleic acid)
- ELISA** enzymová imunosorbentní analýza (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- FC** průtoková cytometrie (Flow Cytometry)
- GAT** Gelatin Agglutination Test
- IBT** Immunobead Test
- IF** imunofluorescence (Immunofluorescence test)
- IgA** imunoglobulin A
- IgD** imunoglobulin D
- IgE** imunoglobulin E
- IgG** imunoglobulin G
- IgM** imunoglobulin M
- IU** mezinárodní jednotka (International Unit)
- MAR** test smíšené aglutinace (Positive Mixed Agtoglobulin Test)
- NK** přirození zabíječi (Natural Killer)
- PCOS** syndrom polycystických ovarií (Polycytic Ovary Syndrom)
- PCT** postkoitální test (Post-Coital Test)
- RNA** ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
- SIT** Sperm Immobilization Test
- TAT** Tray Agglutination Test
- WHO** Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2 Neplodnost</b>	<b>2</b>
2.1 Neplodnost u mužů . . . . .	2
2.2 Neplodnost u žen . . . . .	4
<b>3 Imunitní reakce a její mechanismy</b>	<b>5</b>
3.1 Imunologická příčina neplodnosti . . . . .	6
3.2 Antispermiové protilátky . . . . .	8
3.2.1 ASA u mužů . . . . .	9
3.2.2 ASA u žen . . . . .	10
<b>4 Možnosti diagnostiky ASA</b>	<b>12</b>
4.1 Stanovení metody pomocí MAR testu (Positive mixed antiglobulin test) . . . . .	13
4.2 Stanovení ASA pomocí IBT . . . . .	14
4.3 Stanovení ASA pomocí ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) . . . . .	15
4.4 Stanovení ASA imunofluorescenčním značením . . . . .	16
4.5 Stanovení ASA penetračním testem (Sperm Penetration Assay) .	17
<b>5 Zhodnocení metod využívaných pro detekci ASA</b>	<b>18</b>
5.1 Zhodnocení metod MAR a IBT . . . . .	18
5.2 Zhodnocení metody ELISA . . . . .	20
5.3 Zhodnocení metody imunofluorescence a průtokové cytometrie . .	22
5.4 Zhodnocení metody penetračního testu . . . . .	23
<b>6 Závěr</b>	<b>25</b>
Seznam obrázků	35
Seznam tabulek	36

# 1. Úvod

ASA, neboli protilátky proti spermiím, tvoří skupinu protilátek, které reagují se spermiovými antigeny a zabraňují správné funkci spermií. Mohou tak být jedním z důvodů imunologické neplodnosti. Výzkum zaměřující se na přesný popis vlivu ASA na plodnost, popřípadě metody detekce ASA u pacientů, probíhal od sedmdesátých let minulého století. Postupně byla vyvinuta řada metod pro jejich detekci. Často se liší nejen časem potřebným k vyšetření, ale i opakovatelností, přesností a dalšími parametry. Důležitá je i standardizace procesu vyšetření, kterou je možné snížit rozdíly ve výsledcích mezi laboratořemi. Tato práce si klade za cíl vytvořit ucelenou rešerši existujících studií a na jejich základě jednotlivé metody vzájemně porovnat. Výsledkem porovnání je doporučení nejvhodnějších metod pro použití v klinické praxi.



## 2. Neplodnost

Definicí neplodnosti je dle Světové zdravotnické organizace (WHO) stav, kdy nedochází k těhotenství u párů, kteří jsou pravidelně sexuálně aktivní po dobu jednoho roku bez antikoncepčních metod (WHO, 2010). Problémem s neplodností se potýká 10–15 % párů. (\*Kumar a Singh, 2015).

Neplodnost rozdělujeme na primární, sekundární a idiopatickou. Primární neplodností se nazývá stav, kdy žena těhotná nikdy nebyla a páru se i přes opakovaný pohlavní styk po dobu alespoň jednoho roku nezdaří početí. Sekundární neplodnost je stav, kdy žena již těhotná byla, ale párů se nezdařilo otěhotnět znovu v období jednoho roku při pravidelném sexuálním styku a bez použití antikoncepčních metod. Při idiopatické neplodnosti nelze zjistit příčinu neplodnosti a je takto označena až po negativních výsledcích všech ostatních vyšetření u obou partnerů. Tyto problémy jsou u 15–20 % pacientů (\*Shibahara a kol., 2021).

### 2.1. Neplodnost u mužů

Mezi příčiny mužské neplodnosti patří získané či vrozené urogenitální abnormality, infekce urogenitálního traktu, imunologické faktory a genetické faktory (Seshagiri, 2001).

Nicméně až u 25 % případů příčina neplodnosti u mužů zůstává neznáma (\*Jung a Seo, 2014). V takovýchto případech je provedena analýza spermatu, kdy nejběžnějšími abnormalitami jsou například azoospermie, což je nepřítomnost spermií, oligozoospermie, neboli nízký počet spermií, abnormální morfologie (tvar) či motilita (pohyblivost) spermií (Dohle a kol., 2005). Další abnormality a referenční hodnoty normozoospermii, se kterými se parametry ejakulátu srovnávají jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2.

Tyto abnormality spermií mohou být způsobeny epigenetickými poruchami (Houshdaran a kol., 2007), narušením endokrinního systému (Luboshitzky a kol., 2002), působením reaktivních forem kyslíku (Aitken, 2016) či znečištěním životního prostředí (Anderson a kol., 2014).

Pro správné vyhodnocení spermioqramu se hodnotí objem ejakulátu, jeho pH, celkový počet spermií, jejich motilita a koncentrace.

Tabulka 1: Referenční hodnoty pro Normozoospermie dle WHO 2010, převzato a přeloženo z WHO (2010).

<b>Parametry - Normozoospermie</b>	<b>Referenční hodnoty spermioqramu</b>
Objem	1.5 ml a více
pH	7.2 a vyšší
Koncentrace	Alespoň 15 mil./ml ejakulátu
Pohyblivost	Nejméně 40 % pohyblivých a 32 % progresivně pohyblivých (vpřed pohybujících se)
Morfologie	Alespoň 4 % normální stavby spermie
Podíl živých spermií	Nejméně 58 %

Tabulka 2: Vyhodnocení spermioqramu dle WHO, převzato a přeloženo z WHO (2010).

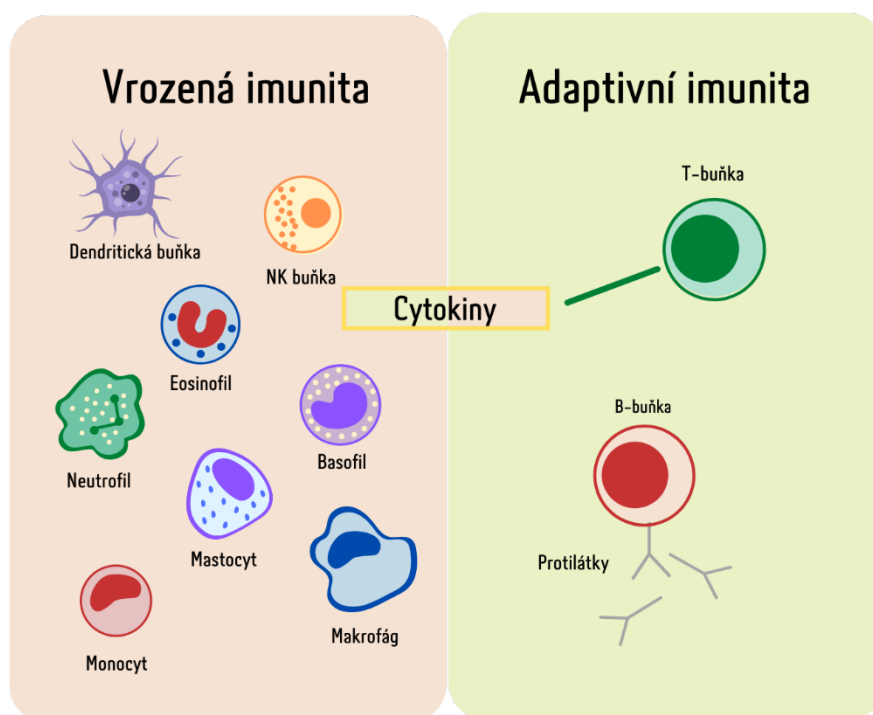
<b>Název výsledku</b>	<b>Kritéria pro hodnocení</b>
Normozoospermie	Parametry ejakulátu jsou normální (počet, motilita a morfologie spermií odpovídají referenčním hodnotám, viz tabulka 1)
Oligozoospermie	Snížená koncentrace spermií (méně než 15 miliónů / ml)
Astenozoospermie	Snížená motilita spermií definovaná jako méně než 32 % spermií s normální pohyblivostí
Teratozoospermie	Detekce tvarově chybných spermií v ejakulátu – nízký počet spermií se standardním tvarem (méně než 4 %)
Oligoastenoteratozoospermie	Snížená koncentrace, motilita a morfologie
Kryptozoospermie	Nález velmi malého množství spermií v ejakulátu, je nutné provedení centrifugace ejakulátu a následná detekce (méně než 1 milion spermií / ml)
Azoospermie	V ejakulátu se nenachází žádné spermie
Nekrozoospermie	V ejakulátu se nenachází žádné pohyblivé spermie

## 2.2. Neplodnost u žen

Jednou z příčin ženské neplodnosti může být syndrom polycystických ovarií (PCOS), což je onemocnění metabolické a endokrinní povahy. Pacientky diagnostikované s PCOS často neovulují, a to může negativně ovlivnit plodnost ženy. S tímto onemocněním dle odhadu bojuje až 7 % dospělých žen (\*Esfandyari a kol., 2020). Dalším důvodem neplodnosti u ženy může být její věk (Sabarre a kol., 2013). Je mnoho faktorů, které jsou odpovědné za snížení plodnosti v pozdním reprodukčním věku. Tyto faktory řadíme do dvou skupin. Skupina první je spojena s kvalitou oocytů, která klesá s rostoucím věkem, a skupina druhá souvisí se stavem reprodukčních orgánů a celkovým zdravím pacientky (\*Meczekalski a kol., 2016). Dále jsou v případě neplodnosti zvažovány například faktory životního stylu, jako kouření nebo sport (Gudmundsdottir a kol., 2009; Olive, 2010), poruchy menstruace a ovulace či abnormality na vaječnicích (Masoumi a kol., 2015). Dalším z důležitých faktorů je endometrióza (Abrao a kol., 2013), což je onemocnění, kdy se tkáň endometria (sliznice dutiny děložní) nachází mimo dělohu a reaguje na hladiny pohlavních hormonů. V těchto částech těla pak dochází ke krvácení a rozvoji chronických zánětů (\*Esfandyari a kol., 2020).

### 3. Imunitní reakce a její mechanismy

Imunitní mechanismy můžeme rozdělit do dvou skupin, a to vrozené (přirozené) či adaptivní. Jejich hlavní složky můžeme vidět na obrázku 1.



Obrázek 1: Obrázek popisující základní rozdělení imunitního systému – převzato a upraveno z (\*Oliveira a kol., 2015)

Mezi přirozenou imunitu patří fyzické bariéry organismu, jako kůže či sliznice, a některé buněčné komponenty zahrnující neutrofile, NK („natural killer“ – přirození zabíječi) a dendritické buňky, případně rozpustné proteiny jako jsou některé proteiny komplementu. Buňky vrozené (nespecifické) imunity nevytváří imunologickou paměť a jsou vytvořeny k rozeznávání cizích látek a organismů (\*Turvey a Broide, 2010).

Adaptivní imunita působí cíleně, vytváří imunitní paměť a k aktivaci je

nutných i několik dní. Tuto imunitu můžeme rozdělit na dvě části, a to humorální a buněčnou. Buněčná imunita zahrnuje T-lymfocyty, které jsou schopny uvolňovat cytokiny nebo cíleně zabíjet infikované buňky. Humorální imunitou se rozumí sekrece protilátek B-buňkami (\*Turvey a Broide, 2010).

Protilátky (imunoglobuliny) lze rozdělit do pěti tříd, a to IgM a IgD, které se produkují v brzké části imunitní reakce, a dále pak IgA, IgG a IgE, k jejichž produkci dochází v pozdější části imunitní odpovědi (Schroeder a Cavacini, 2010). Všeobecné účinky imunoglobulinů jsou opsonizace, aktivace komplementu a neutralizace toxinů vytvořením imunokomplexů, což vede ke zničení cílové buňky (\*Turvey a Broide, 2010).

Imunoglobuliny třídy IgM se vyskytují převážně v séru. IgG jsou přítomny v krvi i v tkáňovém moku (Gonzalez-Quintela a kol., 2008). Imunoglobuliny třídy IgA se nachází na povrchu sliznic a v sekretech (Schroeder a Cavacini, 2010).

### 3.1. Imunologická příčina neplodnosti

Imunologická neplodnost je jedním z hlavních problémů fertility. Je vyvolána aktivací imunitního systému, což může vyvolat produkci specifických protilátek (Carp a kol., 2012), mezi které patří antifosfolipidové protilátky, antiovariální protilátky, antityroidální protilátky, antinukleární protilátky a také antispermiové protilátky označované jako ASA (protilátky proti spermiím), kterým bude věnována zvláštní kapitola. Souhrn dopadů jednotlivých typů autoprottilátek na neplodnost je ukázán na obrázku 2.

**Antifosfolipidové protilátky** (APL) jsou heterogenní skupinou protilátek, které se váží na negativně nabitě fosfolipidy, fosfolipidy vázající proteiny či komplexy fosfolipidů s proteiny (Pierangeli a kol., 2008). Antifosfolipidové protilátky mohou poukazovat na autoimunitní onemocnění zvané antifosfolipidový syndrom. Mezi hlavní klinické projevy patří trombóza a komplikace s těhotenstvím (Kaul a kol., 2007). Těmito komplikacemi mohou být například jedno nebo více nevysvětlitelných úmrtí morfologicky zdravého plodu ve více než 10. týdnu těhotenství. Dále jedno nebo více předčasných porodů morfologicky zdravého plodu v méně než 34. týdnu těhotenství z důvodu

preeklampsie (těhotenská toxikóza), eklampsie (navazuje na preeklampsii a projevuje se jako záchvat tonicko-klonických křečí) nebo placentární insuficience (funkční nedostatečnost placenty) (Tektonidou a kol., 2019).

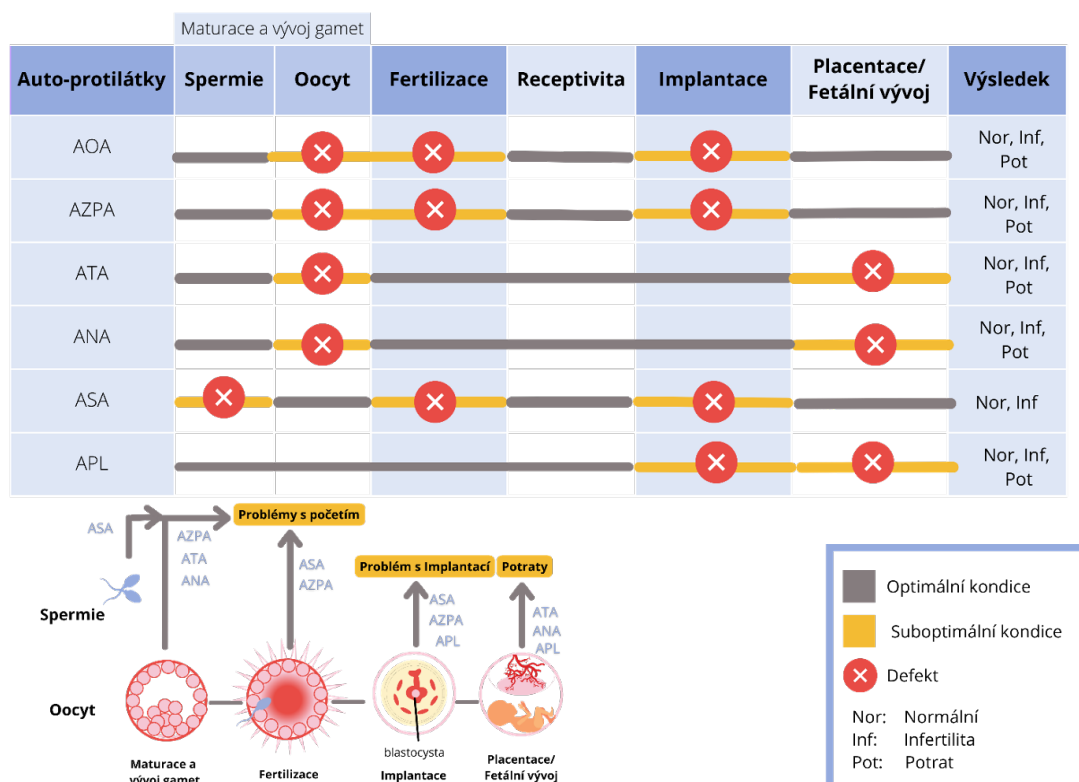
**Antiovariální protilátky (AOA)**, zahrnují protilátky proti glykoproteinovému obalu vajíčka *zona pellucida*, membránám granulózy a antrálním folikulům (Pires, 2010). U těchto protilátek není prozatím známo, jestli jejich vznik je zapříčiněn poškozením ovaria nebo se jedná o patologický stav. Často se tyto protilátky vyskytují s dalšími autoprotilátkami, například s antityreoidálními protilátkami (\*Shen a kol., 2021). Dále jsou AOA detekovány u pacientek se syndromem předčasného ovariálního selhání (Shatavi a kol., 2006). Tyto protilátky mohou ovlivnit další vývoj oocyty, například zabráňují uchycení oplozeného oocyty ve vejcovodu. AOA můžeme najít u žen s PCOS, s poruchami štítné žlázy nebo po laparoskopické operaci břicha (\*Shen a kol., 2021).

**Protilátky proti *zona pellucida* (AZPA)** jsou namířené proti glykoproteinovému obalu vajíčka, kde maskují receptory pro vazbu spermií. Nachází se v krevní plazmě, peritoneální tekutině a folikulární tekutině. Obecně lze říci, že výskyt AZPA má negativní vliv na vývoj folikulů a oocytů, jelikož narušují komunikační spoje, tzv. „gap junctions“, mezi buňkami oocytů a granulózními buňkami. Mohou být také příčinou předčasného ovariálního selhání, kdy dochází ke ztrátě folikulů před čtyřicátým rokem života ženy (\*Shen a kol., 2021).

**Antityreoidální protilátky (ATA)** jsou ukazatelem na autoimunitního onemocnění štítné žlázy. Jsou často zjištěny u žen v plodném věku s prevalencí 5–15 %. Lze je detekovat i u mužů a často se vyskytují i bez poruchy štítné žlázy, což znesnadňuje jejich diagnostiku (\*Khizroeva a kol., 2019). Tyto protilátky jsou spojovány s infertilitou a častými potraty, a proto se doporučuje je sledovat jako možné markery při problémech se spontánním těhotenstvím. Těmito markery mohou být například antityreoglobuliny a antityreoperoxidázy (Matalon a kol., 2001).

**Antinukleární protilátky** neboli ANA jsou autoprotilátky proti antigenům buněčného jádra (DNA, RNA, histony, nukleoproteiny) a cytoplazmy

(mitochondrie, mikrozomy, lysozomy, peroxizomy, Golgiho aparát). Stále se neví, zda existence ANA může napomáhat zapříčinění potratů a souviset s problémy s početím, jelikož větší koncentrace ANA byla detekována u starších žen. Společně s věkem klesá i pravděpodobnost početí, je tedy možné, že tyto dva jevy vedle sebe pouze koexistují (Ticconi a kol., 2010). Jiné studie ale potvrzují přímou korelaci mezi koncentrací ANA a problémy s početím (Ying a kol., 2012).



Obrázek 2: Obrázek popisující vliv autoprotílátek na početí a fáze kde protílátky tento problém způsobují – převzato, přeloženo a upraveno z (\*Shen a kol., 2021)

### 3.2. Antispermiové protílátky

Antispermiové protílátky (ASA) jsou imunoglobuliny tříd IgG, IgA a IgM namířené proti antigenům/proteinům spermií. Tyto imunoglobuliny mohou být lokalizovány na hlavičce spermie, krčku, bičku, anebo na kombinaci těchto částí spermie. Tyto protílátky se mohou vyskytovat u žen i mužů (\*Lu a kol., 2008). Výskyt ASA byl zjištěn téměř u 9–12 % pacientů, kteří se potýkali s neplodností (Bozhedomov a kol., 2015). Více budou ASA popsány v následujících kapitolách.

### 3.2.1. ASA u mužů

Imunitní systém musí udržovat rovnováhu mezi reakcí na cizorodé proteiny a tolerancí vlastních proteinů, se kterými se ještě nesetkal. Těmto vlastním, avšak neznámým proteinům, říkáme neoantigeny. Jedním z míst, kde na tyto antigeny můžeme narazit, jsou varlata. Ty společně s jinými orgány patří do tzv. imunologicky privilegovaných míst (Qu a kol., 2020). Imunitní systém v těchto místech koncentruje řadu mechanismů, kterými je schopen regulovat reakci imunitního systému tak, aby nedocházelo k nadměrným zánětlivým reakcím, ale aby stále, je-li to nutné, byl schopen zneškodnit patogeny, které se v těchto orgánech objeví (Dai a kol., 2005). Jakýkoliv zásah, který poruší fyzickou bariéru varlat, může vést k prozánětlivé imunitní odpovědi a k tvorbě ASA (\*Lu a kol., 2008). Například zvýšené množství ASA můžeme pozorovat u mužů, kteří podstoupili vasektomii (Kay a kol., 1993).

Dalším předpokladem pro vznik ASA jsou infekce. Jedná-li se o infekci mimo urogenitální systém, mohou za vznik ASA tzv. molekulární mimikry. To znamená, že některé patogeny obsahují proteiny, které jsou podobné proteinům přítomným na spermiích. Tato podobnost způsobí, že při infekci dojde k tvorbě protilátek, které se mohou vázat jak na proteiny patogenu, tak na proteiny spermií (Prabha a kol., 2011). Příkladem mohou být opět muži, kteří si vyvinuli ASA po prodělání bakteriální nemoci způsobené rodem *Shigella* (bacilární úplavice) anebo po prodělání salmonelózy (Kalaydjiev a kol., 2007). Infekce urogenitálního systému může vést k nadměrné produkci prozánětlivých cytokinů či reaktivních kyslíkových radikálů, což vede k vyššímu prozánětlivému potenciálu (v případě cytokinů) a k různým druhům poškození, což může nakonec vyústit ve vznik ASA (Whittington a kol., 1999; Shiraishi a kol., 2009).

ASA u mužů můžeme detekovat v krevním séru a seminální plazmě (\*Lu a kol., 2008). Imunoglobuliny obou skupin mohou být buď navázány přímo na povrchu spermií nebo volně v seminální plazmě či krevním séru (Bohring a Krause, 2003). ASA může značně snížit motilitu (hybnost) spermií, může dojít k aglutinaci spermií (jejich shlukování), narušují jejich schopnost dostat se přes cervikální hlen, případně mohou způsobit problémy u spermií s jejich kapacitací nebo akrozomální reakcí, případně mohou negativně ovlivnit interakci spermie



s vajíčkem či narušit počáteční vývoj embrya. Dále mohou ASA zapříčinit snížení počtu spermií, narušit jejich morfologii či životaschopnost (Sinisi a kol., 1993; \*Mazumdar a Levine, 1998; Zini a kol., 2010). Diagnostika ASA se doporučuje pacientům s poruchou hybnosti spermií, neboli astenozoospermií (WHO, 2010), nebo narušenou bariérou mezi krevním oběhem a varlaty, u kterých byla pozorována aglutinace spermií (Koksal a kol., 2007).

### **3.2.2. ASA u žen**

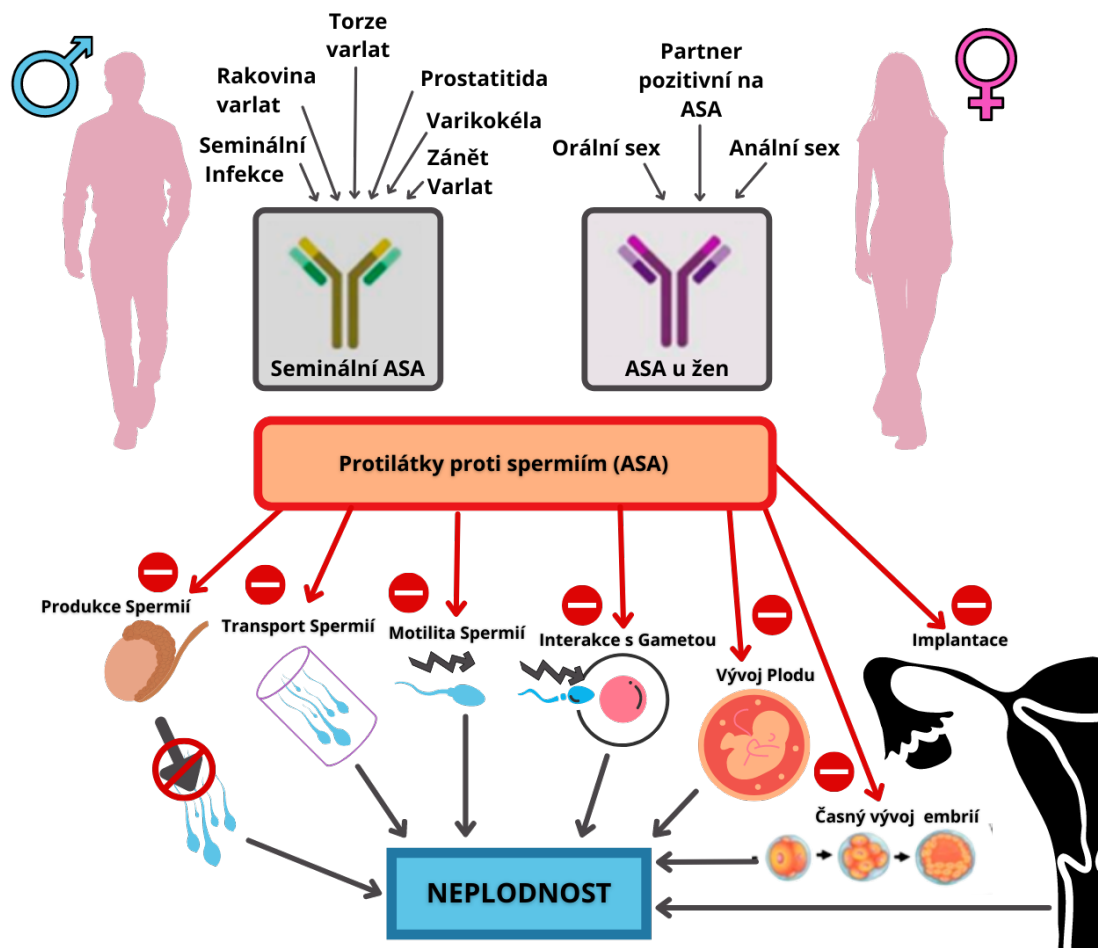
U žen se nenachází žádná imunologická bariéra, která by oddělovala urogenitální systém od systému imunitního (Alexander a kol., 1977). Nicméně v urogenitálním traktu se nachází mukózní povrchy, kde dochází ke značné interakci s bakteriemi či ejakulátem. To znamená, že imunitní systém v urogenitálním traktu zajišťuje ochranu proti bakteriím a molekulám způsobujícím infekci, ale zároveň je nutná tolerance vůči spermiím. Stejně jako u jiných mukózních povrchů je základní obranou mukus s antimikrobiálními peptidy. Vaginální mukus má oproti většině slizničních povrchů nižší pH. Dále zde můžeme nalézt klasické imunitní buňky jako například makrofágy, dendritické buňky, neutrofilů, NK, B a T buňky. Mezi imunoglobuliny můžeme najít IgG a IgA, kde v tomto případě převažují převážně IgG, na rozdíl od běžných slizničních povrchů. Celý ženský imunitní systém je silně závislý na hormonálním cyklu (\*Lee a kol., 2015).

Při pohlavním styku se do ženského reprodukčního traktu dostávají miliony spermií. Ty ač jsou pro ženský reprodukční trakt cizím tělesem, nespouštějí humorální imunitní odpověď (Alexander a Anderson, 1987). Společně se spermiemi se do ženského reprodukčního traktu dostane i seminální plazma, která chrání spermie tím, že obsahuje imunosupresivní látky, cytokiny, regulátory komplementu, rozpustné Fc receptory (receptory detekující těžké řetězce imunoglobulinů) atd. (Chiu a Chamley, 2002; Politch a kol., 2007).

Stejně jako u mužů, tak i u žen se předpokládá, že urogenitální infekce, úrazy genitálu či jiné porušení homeostázy reprodukčních orgánů mohou vést ke tvorbě ASA (\*Lu a kol., 2008). U žen se ASA vyskytují především v oblasti děložního krčku, v oblasti dutiny děložní, v peritoneální tekutině či v séru (Shibara a kol.,

1995). Vznik protilátek je ovlivněn především imunogenními látkami obsaženými v seminální plazmě a na povrchu spermií (Bohring a Krause, 2003). Výskyt ASA může být dále vyvolán podrážděním vaginální sliznice, análním nebo orálním sexem vedoucím k hromadění spermií uvnitř zažívacího traktu (\*Vickram a kol., 2019).

ASA v séru žen, které mají problémy s početím, mohou snižovat migraci spermií v ženském urogenitálním traktu. Navíc mohou také negativně ovlivnit interakci spermie s vajíčkem a také vývoj embrya při *in vitro* technikách asistované reprodukce v souvislosti s inhibičními účinky ASA na interakci gamet (\*Shibahara a kol., 2021). Další možnosti vzniku ASA a jejich dopad na fertilizaci jsou popsány na obrázku 3.



Obrázek 3: Obrázek shrnující možný vznik a důsledek ASA u obou pohlaví, převzato z \*Vickram a kol. (2019).

## 4. Možnosti diagnostiky ASA

ASA mohou být detekovány v ejakulátu, séru, folikulární tekutině, krvi či cerviko-vaginálním sekretu (\*Lu a kol., 2008). U mužů předpokládáme možnost přítomnosti ASA, pokud při analýze ejakulátu narazíme na shlukování (aglutinaci) spermií způsobeném přítomností protilátek (Gatimel a kol., 2018). Bohužel k aglutinaci spermií může docházet, i když ve spermatu ASA přítomny nejsou, tudíž ne vždy tato skutečnost musí být jasným ukazatelem (Vivas-A a kol., 2007). Je doporučováno provádět testy u mužů na přítomnost ASA, když v minulosti došlo ke zranění v oblasti třísel (Gatimel a kol., 2018). U žen je přítomnost ASA testována, až když jsou vyvráceny jiné možnosti vzniku neplodnosti (\*Restrepo a Cardona-Maya, 2013). Mezi testy doporučované k detekci protilátek patří testy Positive Mixed Agtiglobulin Test (MAR) a Immunobead Test (IBT) (WHO, 2010). Těmto testům je věnována kapitola 4.1 a 4.2, jejich zhodnocení je popsáno v kapitole 5.1. Testy MAR a IBT mohou přímo detekovat třídu imunoglobulinů, ale nedá se jimi určit přesný antigen. Lokalizaci specifického antigenu můžeme určit například za pomoci imunofluorescenční mikroskopie.

Testy k detekci ASA dělíme na přímé a nepřímé. Metody přímé využívají k detekci ejakulát, metody nepřímé využívají tekutiny, které neobsahují spermie (seminální plazma, sérum, folikulární tekutina, krev, cerviko-vaginální sekret) (WHO, 2021).

K vyšetření ASA je možné použít i další metody – Sperm Immobilization Test (SIT), Gelatin Agglutination Test (GAT), Computer-Aided Sperm Analysis (CASA), Post-Coital Test (PCT) a Tray Agglutination Test (TAT). Tyto metody byly často v průběhu studie ASA nahrazeny jednoduššími, rychlejšími, levnějšími nebo přesnějšími metodami. S ohledem na zachování rozsahu bakalářské práce byly tedy výše zmíněné metody vynechány. Zmíněny budou pouze v případě, kdy

je třeba porovnat je s metodami, které budou v této práci popsány do detailu. Pozornost bude věnována především metodám, které se k vyšetření ASA nyní reálně využívají.

V poslední době se pro detekci ASA začaly využívat tzv. biočipy. Studie věnující se této metodě jsou poměrně nové a není jich velké množství. I tak se zdá, že by biočipy mohly tvořit základ budoucí metody k detekování ASA. Mezi jejich výhody patří primárně vysoká citlivost, která dle Xu a kol. (2020) dokonce předčí MAR test. Naopak dle některých studií velmi dobře korelují výsledky z biočipů s ELISA testem (Wang a kol., 2017; Xu a kol., 2020). Biočipy je možné vyrábět průmyslově a díky tomu jsou výsledky se stejným vzorkem lépe porovnatelné mezi vícero laboratořemi (Wang a kol., 2017). K vyšetření postačí pouze malé množství ejakulátu a výsledky jsou konzistentní a specifické (Wu a kol., 2020; Xu a kol., 2020).

## **4.1. Stanovení metody pomocí MAR testu (Positive mixed antiglobulin test)**

MAR test byl vyvinut k detekci ASA navázaných na povrchu spermie. Metoda je založena na upraveném Coombsově testu, které diagnostikuje přítomnost protilátek proti červeným krvinkám. Opět jsou využívány dvě varianty, přímý a nepřímý test (\*Said a Agarwal, 2016). Přímou metodu MAR testu doporučuje pro vyšetření ASA manuál WHO (WHO, 2010).

**Přímá metoda MAR testu** využívá čerstvý ejakulát. Ten je použit z důvodu minimalizace šance vymytí ASA ze seminální plazmy či zamezení reakce antiséra s protilátkou vlivem promývacích médií (Rajah a kol., 1992). K vyšetření protilátek vázaných na spermie se využívají latexové kuličky s imobilizovanými lidskými protilátkami (IgA, IgG) a monospecifické antisérum zaměřené proti vyšetřované protilátce (\*Said a Agarwal, 2016). Po krátké inkubaci (2-3 minuty) je aglutinace mezi latexovými kuličkami, antisérem a spermii pozorovatelná pomocí světelného mikroskopu. Výsledkem vyšetření je poměr motilních spermií vázaných ve shlucích vůči volně se pohybujícím spermii. Jako pozitivní je výsledek nejčastěji považován při aglutinaci alespoň

poloviny motilních spermií (WHO, 2010). V novější edici (WHO, 2021) se však doporučuje, aby si každá laboratoř určila hranici sama dle co největšího množství testovaných fertálních mužů.

**Nepřímá metoda MAR testu** se využívá k vyšetření přítomnosti ASA v ostatních biologických materiálech – cervikálním hlenu, séru či seminální plazmě (WHO, 2021). Dárcovské sperma, které je diagnostikované jako ASA negativní, je promyto a následně inkubováno společně s vyšetřovaným vzorkem. Za pomoci selekce „swim-up“ jsou získány 100% motilní spermie a zároveň jsou odstraněny volné imunoglobuliny, které by v dalších stádiích testu mohly způsobovat problémy (Meinertz 1987). Dále se již postupuje jako v případě přímé metody – k dárcovskému spermatu s navázaným ASA se přidají latexové kuličky s anti-IgG/IgA a celý takto připravený vzorek se ponechá inkubovat. Poté je procentuálně vyjádřen poměr mezi aglutinujícími a volně se pohybujícími spermii (WHO, 2021).

## 4.2. Stanovení ASA pomocí IBT

Metoda IBT využívá tzv. „immunobeads“, tedy malých plastových částic, které jsou nejčastěji z latexu či polyakrylamidu. Na jejich povrchu jsou vázány králičí protilátky cílené na imunoglobuliny IgG, IgA či IgM v lidském spermatu nebo tělních tekutinách (Clarke a kol., 1985). V současné době na trhu neexistuje komerční IBT test, je nutné jej vyrobit pomocí gelových kuliček aktivovaných bromkyanem (CNBr-Sepharose), kdy jsou gelové kuličky kovalentně vázány s protilátkami proti lidským imunoglobulinům (Hellstrom a kol., 1989). Rozdílem mezi IBT a MAR testem je převážně v promytí vzorku ejakulátu. IBT se testuje na kapce promytého ejakulátu, u MAR testu se využívá ejakulát neošetřený.

**Přímá metoda IBT** vyšetřuje výskyt imunoglobulinů IgA, IgM a IgG přímo na spermii. Částice jsou přidány k předem připravenému a promytému vzorku ejakulátu. Promytí je nutné z důvodu možnosti odstranění volných imunoglobulinů, které mohou být v seminální plazmě a jejich přítomnost by mohla změnit výsledky testů. Takto připravený preparát je přibližně po deseti

minutách možné začít vyhodnocovat pod mikroskopem (Rajah a kol., 1992). Pro diagnostiku výsledku IBT testu je třeba zkontrolovat alespoň 200 motilních spermií, u kterých se vyhodnocuje, jestli se částice navázaly, a na jaké místo na spermii (WHO, 2021). Některé studie naznačují možnou korelaci mezi místem, kam se váže ASA na spermiích, a funkcí spermií (Petit a kol., 2013; Kuntareddi a kol., 2020).

Jako pozitivní můžeme označit vzorek, ve kterém se na více než polovině spermií ve vzorku navázaly částice s imunoglobuliny. Tato hodnota je doporučena WHO (WHO, 2021). Nicméně ve starších studiích je možné najít hodnoty pohybující se v rozsahu od 15 do 80 %. Jedním z důvodů bylo testování pacientů, u kterých bylo podezření na imunologickou příčinu neplodnosti, a tudíž i slabě pozitivnímu výsledku byla přikládána větší důležitost (Sukcharoen a Keith, 1995; Culligan a kol., 1998).

**Nepřímá varianta IBT** se používá k vyšetření přítomnosti ASA mimo spermie – tedy v seminální plazmě, séru, cervikálním hlenu nebo folikulární tekutině (Gwatkin, 1991). V tomto případě je vyšetřována suspenze dárcovských spermií s neprokázanými ASA a vyšetřované, výše zmíněné, tělní tekutiny od pacienta s podezřením na přítomnost ASA. Po ustálení se vzorek vyhodnotí stejným způsobem jako při přímé IBT metodě (Hellstrom a kol., 1989; Gwatkin, 1991).

### 4.3. Stanovení ASA pomocí ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Tato metoda je určena pro stanovení antigenů nebo protilátek ve vzorku. Vzorkem může být například krevní sérum, seminální plazma či cervikální hlen. Je založena na specifické interakci mezi antigenem a jeho protilátkou, která je označena enzymem, například křenovou peroxidázou. Chromogenní substrát pro daný enzym pak poskytne viditelnou změnu barvy, která odpovídá koncentraci vazby protilátky a antigenu (Ali, 2010). Obecně vzato se i ELISA dělí na dvě hlavní metody – metody přímou a nepřímou.

**Nepřímá metoda ELISA** se používá pro vyšetření z krevního séra

či seminální plazmy. Díky tomu je možné vyšetřit i pacienty, kteří nemají dostatek zdravých spermií (\*Vazquez-Levin a kol., 2014). K testování využívá dárcovského spermatu s předem neprokázanými ASA. Sperma je fixováno v jamce mikrotitrační destičky. Vzorek je poté inkubován s vyšetřovaným vzorkem tělní tekutiny a následně protilátkou konjugovanou s enzymem (Ackerman a kol., 1981). Po aplikaci substrátu je porovnáno výsledné zbarvení vůči jamkám se známými koncentracemi hledaných protilátek. Díky tomu je možné stanovit koncentraci ASA v jednotlivých vzorcích (Lynch a kol., 1986).

**Přímá metoda ELISA** probíhá obdobně, jen místo dárcovského spermatu je použito sperma přímo od pacienta (Lynch a Howe, 1987).

#### 4.4. Stanovení ASA imunofluorescenčním značením

**Imunofluorescenční mikroskopie** (IF) umožňuje detekovat přítomnost ASA na spermiích (přímá metoda) v séru či seminální plazmě (nepřímá metoda) vizualizací vazby vzorku na protilátku. Sekundární protilátka proti lidským imunoglobulinům označená fluorescenčním barvivem se váže na imunoglobuliny navázané na spermiích či v séru nebo plazmě. Vyhodnocení probíhá v závislosti na intenzitě zbarvení (Bohring a kol., 2004; Rajčáni a kol., 2015). Některé studie naznačují možnou korelaci mezi místem, kde se ASA na spermii váže a funkcí spermií (Petit a kol., 2013; Kuntareddi a kol., 2020).

**Průtoková cytometrie** (FC – Flow Cytometry) je biofyzikální metoda, díky které lze měřit optické a fluorescenční charakteristiky každé jedné buňky (spermie) nebo jiných částic (Rasanen a kol., 1992). Přímý a pravoúhlý paprsek FC umožňuje v ejakulátu ignorovat nespermatické buňky, například lymfocyty, červené krvinky nebo epiteliální buňky (Haas a Cunningham, 1984). Výsledné úrovně fluorescence se zobrazují jako histogramy, kde na ose  $y$  je zobrazen počet spermií a na ose  $x$  intenzita fluorescence. FC umožňuje detekovat typy imunoglobulinů a lze vypočítat i množství imunoglobulinů navázaných na spermii (Nicholson a kol., 1997).

## 4.5. Stanovení ASA penetračním testem (Sperm Penetration Assay)

Pouhá přítomnost ASA nemusí zamezit správné funkci spermií. Je nutné prokázat, že přítomnost protilátek ovlivňuje funkci spermií. Jak je výše zmíněno, ASA ovlivňuje mimo jiné i průchod spermií cervikálním hlenem, což bývá hodnoceno penetračním testem (WHO, 2021).

Penetrační test je metoda, která využívá schopnost spermatu procházet sloupcem cervikálního hlenu. Pro vyhodnocení testu se využívá několik parametrů – vzdálenost mezi první spermií a spodním okrajem kapiláry v rezervoáru spermatu, počet spermií v určité výšce sloupce nebo snížení koncentrace spermií se zvyšující se výškou sloupce cervikálního hlenu (Ivic a kol., 2002).

Jelikož se lidský cervikální hlen hůře získává ve větším množství, a navíc se liší ve své viskozitě (Eggert-Kruse a kol., 1989), jsou často používány i náhražky. Nejčastěji jde o hovězí cervikální hlen. Jednoduše se získává ve větším množství, má podobné vlastnosti jako lidský cervikální hlen (Gaddum-Rosse a kol., 1980) a pokud se zamrazí, nezničí se jeho vlastnosti (Lee a kol., 1981). Další alternativou je methylcelulóza (Ivic a kol., 2002) či kyselina hyaluronová (Bothner a Wik, 1987). Ta se chová podobně, jako lidský cervikální hlen a lze ji naředit na potřebnou viskozitu (Ishijima a kol., 1986; Bothner a Wik, 1987).



# 5. Zhodnocení metod využívaných pro detekci ASA

V této kapitole jsou porovnány jednotlivé metody mezi sebou z hlediska vzájemné korelace, využití v klinické praxi či výzkumu a dalších aspektech.

## 5.1. Zhodnocení metod MAR a IBT

Při rešerši studií využívajících MAR test (ať přímou či nepřímou metodu, popř. kity – např. SpermMAR) se ukázalo, že jednotlivé studie se výrazně liší v několika ohledech. Jednotlivé studie se lišily v počtu vzorků od malých jednotek (Meinertz a Bronson, 1988; Kay a Boettcher, 1992; Dondero a kol., 1997), po stovky (Hellstrom a kol., 1989; Lotti a kol., 2018) až tisíce (Barbonetti a kol., 2019). Dále se citované studie liší ve výběru pacientů, od kterých byly vzorky získány. V některých případech se testovali pouze neplodní muži (Bohring a Krause, 2003), v jiných šlo o kombinaci mužů plodných a neplodných (Lotti a kol., 2018), či byly do testu zahrnuti muži s podezřením na případné problémy s neplodností (Barbonetti a kol., 2019). Tyto rozdíly znesnadňují přímé porovnání výsledků a určení parametrů, jako jsou například specificita či senzitivita. Lze provést pouze dílčí srovnání závěrů a doporučení jednotlivých studií.

Dle (Lotti a kol., 2018) nejsou výsledky ASA testu ve vztahu se socio-demografickou charakteristikou (věk, životní styl, kouření, historie imunitních a zánětlivých onemocnění genitálního traktu, třísel atd.), provedenými operacemi či objemem varlat. Zároveň však byla prokázána korelace s epidimitidou, zánětem nadvarlete. V práci Barbonetti a kol. (2019) byla pozorována korelace mezi výsledkem MAR testu a místem výskytu

antigenů na spermii. Vazby na hlavičku spermie převažovaly u mužů s vysokou počáteční hodnotou MAR (100 %). Naproti tomu vazba na bičík byla pozorována u vzorků s nízkou počáteční pozitivitou MAR (10–49 %). Ukázala se souvislost mezi množstvím IgG protilátek a nižší motilitou spermií. Vliv na snížení počtu spermií měly jak IgG, tak IgA protilátky. Zajímavý je i fakt, že více než polovina kontrolních testů pořízených s odtupem alespoň 12 měsíců, vyšla negativní, a to i přesto, že tito pacienti byli původně vyhodnoceni jako pozitivní (Barbonetti a kol., 2019). Dále tato studie srovnávala výsledky MAR testu s postkoitálním testem (PCT). Všech 78 % vyšetřených párů, kterým vyšel MAR test pozitivní ze 100 %, mělo negativní výsledek PCT. U výsledků MAR testu v rozmezí 50–99 % byly výsledky PCT negativní jen ze 30 %. Pro nižší hodnoty MAR testu se neprojevila souvislost s negativním PCT (Barbonetti a kol., 2019).

Porovnáním s ostatními metodami, které se pro vyšetření ASA používají, se MAR test jeví jako vhodný pro úvodní screening (Windt a kol., 1989). Umožňuje rychlou detekci IgG protilátek (Kay a Boettcher, 1992) a dostupné kity, jako SpermMAR (výrobce FertiPro), zpracování vzorků dále zrychlují a zjednodušují (Dondero a kol., 1997). Nevýhodou MAR je nutnost čerstvého vzorku spermatu (Dondero a kol., 1997) a motilních spermií, což znemožňuje vyšetření při oligozoospermii a astenozoospermii.

Metoda IBT a výše popsaná metoda MAR jsou si vzájemně velice podobné. I proto se následující text zaměřuje především na porovnání s touto metodou. Technicky se IBT a MAR liší ve dvou hlavních ohledech. Jedním z nich jsou částice, které se vážou na spermie. Původně MAR test využíval lidských červených krvinek (Rajah a kol., 1992). Ty se postupně nahradily za latexové kuličky. Oproti polyakrylamidovým kuličkám IBT (3–10  $\mu\text{m}$ ) mají ty latexové u MAR všechny stejnou velikost a jsou obecně menší (2  $\mu\text{m}$ ). Díky tomu se pomocí MAR lépe vyhodnocuje místo jejich vazby na spermii (Kay a Boettcher, 1992; Mahmoud a Comhaire, 2000). Kuličky se dále liší v navázaných protilátkách. MAR test využívá lidský imunoglobulin (Rajah a kol., 1992), kdežto IBT využívá králičí protilátky proti lidským imunoglobulinům (MacMillan a Baker, 1987). Dalším rozdílem je, že při využití metody IBT je nutné, aby bylo sperma před vyšetřením

nejprve promyto. Tím se vzorek zbaví volných imunoglobulinů, které by mohly způsobovat nesprávné výsledky (Rajah a kol., 1992).

Studie porovnávající IBT s metodou MAR nyní již zcela neodpovídají dnešní skutečnosti. U starších studií se často setkáme s tvrzením, že IBT na rozdíl od MAR testu umí vyšetřovat přítomnost IgA i IgM (Kay a Boettcher, 1992). Tato skutečnost se časem změnila, jelikož kit SpermMAR například všechny tyto skupiny protilátek vyšetřovat již umí (Mahmoud a Comhaire, 2000). Mezi další výhodu IBT historicky patřila možnost nepřímého testu ze seminální plazmy či séra (Windt a kol., 1989; Nicholson a kol., 1997). Díky rozvoji kitu SpermMAR byla i tato výhoda později dorovnána (Andreou a kol., 1995).

V porovnání s MAR je IBT technicky obtížnější a celkově dražší (Marconi a kol., 2008). S ostatními metodami většinou dobře koreluje (Meinertz a Bronson, 1988; Haas a kol., 1991; Kay a Boettcher, 1992; Nicholson a kol., 1997). Na druhou stranu je MAR, respektive SpermMAR, rychlejší a často i citlivější (Kay a Boettcher, 1992; Andreou a kol., 1995). Navíc se sperma nemusí promývat, je ho zapotřebí v menším objemu a také s nižším počtem motilních spermií (Mahmoud a Comhaire, 2000).

Při porovnání výsledků IBT s TAT, GAT či SIT testy je často pozorována silná korelace (Meinertz a Bronson, 1988; Haas a kol., 1991; Kay a Boettcher, 1992). Porovnání těchto metod s FC je sporné. Některé studie uvádějí, že IBT je pro menší hodnoty výskytu protilátek více citlivý (Haas a kol., 1991), jiné ukazují na vysokou korelaci mezi oběma metodami (Nicholson a kol., 1997).

## 5.2. Zhodnocení metody ELISA

Nepřímá ELISA umožňuje vyšetřit vzorky spermií se špatnou motilitou, oligozoospermií, nebo stanovení nenavázaných protilátek přítomných v seminální plazmě (Lynch a Howe, 1987; Windt a kol., 1989; Fichorova a Nakov, 1993).

Výsledky přímé metody jsou silně ovlivněny několika faktory, především pak kvalitou kontrolních vzorků a způsobem uchycení spermií na destičku (Wallach a kol., 1984; Wolff a Schill, 1985). Některá fixační činidla totiž poškozují

plazmatickou membránu spermií a test poté detekuje i interní protilátky, které jinak nemusí mít na plodnost vliv. Test tedy může ukazovat falešně pozitivní výsledek (Bronson a kol., 1984; \*Mazumdar a Levine, 1998). Vzájemně přímá i nepřímá metoda silně koreluje (Lynch a Howe, 1987), což je ale v přímém rozporu s výsledky od Howe a Lynch (1986), a také Eggert-Kruse a kol. (1993). Ve výzkumu Eggert-Kruse a kol. (1993) vyšlo, že přímá MAR metoda a nepřímá ELISA vzájemně nekoreluje. Navíc při vyšetření séra nebyly pozorovány rozdíly mezi ženami, které ještě neměly pohlavní styk, ženami, u kterých byly detekovány ASA, a ve vzorcích od plodných žen (Eggert-Kruse a kol., 1993). Dle výzkumu, který vedli Howe a Lynch, není přímá vazba mezi negativním vyšetřením séra a negativním vyšetřením spermatu (Howe a Lynch, 1986). Podle výzkumu, který uveřejnili Lynch a Howe (1987) o rok později, nepřímá metoda může vykazovat falešně negativní výsledky v případě, že ASA má specificitu na antigen, který není přítomen na spermii. Stejný problém může nastat, pokud mají protilátky vysokou afinitu *in vivo* a ve vyšetřované biologické tekutině jich nezůstane dostatek volných k navázání na dárcovské spermie (Lynch a Howe, 1987). To by mohlo vysvětlit výše popsané problémy.

Problém opakovatelnosti a srovnatelnosti výsledků mezi laboratoři se snažili řešit ve studii Carlsson a kol. (2004), kteří navrhli testovat navázání prostasomů na spermie. Prostasomy jsou exosomy pocházející z tkáně prostaty, vyskytují se v seminální tekutině a zvyšují pohyblivost spermií, popř. oddalují akrosomální reakci spermií (Kravets a kol., 2000). Váží se na spermie a fungují jako antigeny pro ASA. Dle studie Carlsson a kol. (2004) 97 % neplodných pacientů mělo v séru přítomno protilátky proti prostasomům. Podle autorů článku se protilátky proti prostasomům vyšetřují snáze než ASA (Carlsson a kol., 2004).

Výhodou ELISA je, že nepotřebuje čerstvý ejakulát. Spermie mohou být před vyšetřením zmrazeny, což bylo úspěšně vyzkoušeno již před více než 35 lety (Wolff a Schill, 1985). V počátcích detekce ASA, ELISA byla považována za opakovatelnou, rychlou a jednoduchou metodu s vysokou senzitivitou a specificitou (Wolff a Schill, 1985; Lynch a kol., 1986; Fichorova a Nakov, 1993). I přesto (Bronson a kol., 1984) uvádí velký rozdíl mezi výsledky ELISA

a IBT, což znesnadňuje porovnání výsledků studií mezi sebou. Novější publikace však ukazuje, že ELISA silně koreluje s výsledky získanými pomocí biočipu pro detekci ASA a může být citlivější než použití MAR testu z hlediska zachytu ASA pozitivních pacientů (Xu a kol., 2020). Nevýhodou je nemožnost detekovat místo navázání ASA na spermii (Lynch a kol., 1986; \*Mazumdar a Levine, 1998). I přes tuto nevýhodu patří ELISA mezi metody standardně využívané pro detekci ASA v rámci klinických studií (Dimitrova-Dikanarova a kol., 2017; El-Sherbiny a kol., 2021).

### **5.3. Zhodnocení metody imunofluorescence a průtokové cytometrie**

Historicky se samotná IF používala jak k detekci ASA v séru či seminální plazmě pomocí nepřímé metody (Francavilla a kol., 1988; Cross a Moore, 1990), tak přímo v ejakulátu za pomoci metody přímé (Francavilla a kol., 1988; Bohring a kol., 2004). Dnes se IF častěji využívá v kombinaci s metodou FC.

Na rozdíl od IBT, která pracuje na podobném principu barevného zvýraznění míst s navázanou ASA, je IF přesnější. IBT používá relativně velké částice, které neumožňují přesnou lokalizaci ASA na spermii (Cross a Moore, 1990; Bohring a kol., 2004). Díky tomuto zpřesnění bylo možné pozorovat různé typy protilátek, které se vážou na různé části spermie (Hjort a Hansen, 1971; Bohring a kol., 2004). Příprava vzorku před vyšetřením je složitější než u MAR či IBT (Bohring a kol., 2004). Nad rámec promytí ejakulátu je nutné spermie inkubovat se sekundární protilátkou značenou fluoroforem (Johnson a Menge, 1975). Často se využívá dalšího barviva (například Hoechst 33258) pro označení spermií, u kterých došlo k rozpadu plazmatické membrány v důsledku sušení či fixace preparátu (Cross a Moore, 1990). Tyto spermie jsou poté při vyhodnocení vynechány. Porovnání výsledků IF a MAR na stejných vzorcích autoři studie Francavilla a kol. (1988) ukázali, že obě metody vzájemně korelují.

FC oproti ostatním metodám, které jsou většinou vyhodnocovány na vybrané části vzorku pomocí mikroskopu (Cooper a kol., 1999), nabízí kvantitativní vyšetření na vzorku celém, a to včetně možnosti odlišit živé

a mrtvé spermie na základě barvení spermií s rozpadlou plazmatickou membránou (Nikolaeva a kol., 1993; Nicholson a kol., 1997).

Výsledky přímé FC nekorelují s nepřímou FC, ale ani nepřímým MAR testem a nepřímým IBT (Menkveld a kol., 1991; Rasanen a kol., 1996). Přítomnost nenavázaných protilátek v seminální plazmě je obecně přisuzována jejich nadbytku (Bronson a kol., 1987). Oddělit protilátky nenavázané z důsledku rozdílné reaktivity vůči protilátkám nalezených na spermiích není při nepřímých testech možné. Z toho důvodu se mohou jevit výše popsané nepřímé metody v porovnání s přímou metodou FC jako nespolehlivé (Rasanen a kol., 1996).

Přímá metoda FC ve srovnání s přímou MAR vykazuje vysokou specificitu i senzitivitu. Předpokladem bylo, že MAR výsledek vyšší než 10 % byl považován za pozitivní. Nicméně metoda FC vyžaduje promytí ejakulátu, a proto může u slabé vazby protilátek na povrch spermie vytvářet falešně negativní výsledek (Nikolaeva a kol., 1993; Räsänen a kol., 1994). Při použití nepromyteného spermatu je korelace mezi MAR a FC jen velmi slabá, protože dochází k navázání anti-IgG na volné imunoglobuliny v ejakulátu, a nikoliv na spermie jako takové (Kremer a Jager, 1992; Rasanen a kol., 1992). Při porovnání nepřímé FC a MAR metody vychází MAR jako citlivější a specifitější (Rasanen a kol., 1996). FC je objektivní a kvantitativní metoda (Nikolaeva a kol., 1993; Nicholson a kol., 1997), která ale i přes svou technologickou složitost a vyšší cenu nedosahuje vždy specificity a citlivosti MAR testu (Kremer a Jager, 1992; Rasanen a kol., 1992, 1996)

## 5.4. Zhodnocení metody penetračního testu

Penetrační test sám o sobě není přímo vytvořený pro detekci ASA. Využívá ale poznatku, že průchod spermií cervikálním hlenem je negativně ovlivněn přítomností protilátek (Busacca a kol., 1989; Menge a Beitner, 1989). Tento efekt byl otestován porovnáním průchodu spermií stejného dárce s přítomností ASA a spermií, kde ASA diagnostikováno nebylo (Haas, 1986; Aitken a kol., 1988). Na druhou stranu je ale nutné poznamenat, že přítomnost ASA ještě nutně neznamená negativní penetrační test (Heidenreich a kol., 1994)

a není shoda ve výpovědní hodnotě výsledku penetračního testu na šanci otěhotnět (\*Bolarende a kol., 2003).

## 6. Závěr

V této bakalářské práci jsem se zaměřila na porovnání metod určených k detekci protilátek proti spermiím (ASA). První výzkumy na toto téma vznikaly již v 50. letech 20. století, nicméně největšího vědeckého zájmu se hodnocení ASA dostalo v 70. až 80. letech. Od té doby zájem o tento výzkum spíše upadá. Na vině může být rozvoj technik asistované reprodukce umožňující početí dítěte i přes přítomnost ASA, nekonzistence v experimentálním designu či použité technologie a časté protichůdné výsledky.

Rešerší publikovaných prací zabývajících se detekcí ASA se ukázalo, že vzájemně metody porovnat je velmi obtížné. Výsledky metod se liší v jednotkách, kterými se hodnotí – MAR a IBT používají procenta, ELISA mezinárodní jednotku IU a biočipy fluorescenční optickou hustotu. Zároveň se často liší postup, jakým jsou vzorky získány, zpracovány a následně vyhodnoceny. To výrazně znesnadňuje i porovnání jedné a té samé metody v rámci více studií.

Ke standardizaci metod přispěla WHO vydáním doporučené metodologie. Standardizovaného postupu se však nedostalo všem metodám. Navíc nebylo ojedinělé, že i přes tato doporučení nebyly z nějakého důvodu v pracích postupy dodrženy.

WHO ve svém manuálu doporučuje primárně dvě metody – IBT a MAR. Hojně se využívaná i metoda ELISA. Ta se na rozdíl od dříve zmíněných metod dá aplikovat i v případě nedostatku motilních spermií. Navíc nepotřebuje čerstvý ejakulát. Velkou výhodou metody ELISA je především možnost detekovat i jiné protilátky než ASA, což ji činí multifunkční. Všechny zmíněné testy jsou poměrně jednoduché na vyhodnocení, jsou přesné a poměrně levné.

Dle zdrojů, které byly zpracovány pro potřeby této práce, je pro detekci ASA ve spermatu nejvhodnější metoda MAR. Dokáže lokalizovat umístění ASA



na spermiu, ejakulát není nutné promývat. Zároveň se díky dostupným kitům, jako například SpermMAR, vyšetření zrychluje a zjednodušuje. Svou citlivostí předčí metodu IBT a není nutné takové množství ejakulátu.

Přestože je možné nespermatické tekutiny vyšetřovat i u žen, valná většina studií porovnávajících jednotlivé metody byla provedena na mužích, popřípadě na párech. Studie nicméně nejčastěji využívaly krevního séra, a tudíž by výsledky měly být aplikovatelné i na ženy.

V poslední době se začaly k vyšetření přítomnosti ASA využívat i takzvané biočipy. Je možné je produkovat průmyslově. Z několika málo zatím dostupných studií vyplývá, že by biočipy měly být velice citlivé a specifické. Výsledky jsou konzistentní s ELISA testy a citlivost přesahuje i doporučené MAR. Bohužel využití biočipů nebylo ještě standardizováno. I přesto se zdá, že jde o velmi slibnou technologii, kterou by bylo v budoucnu možné k detekci ASA využít.

S ohledem na výsledky provedené rešerše bych k analýze ejakulátu na přítomnost ASA upřednostnila metody doporučené WHO. Byla jim v minulosti vědeckou obcí věnována velká pozornost, jsou rozšířené a vyrábějí se pro ně standardizované kity.

## Seznam použité literatury

- ABRAO, M. S., MUZII, L. a MARANA, R. (2013). Anatomical causes of female infertility and their management. volume 123. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.008.
- ACKERMAN, S. B., WORTHAM, J. W. a SWANSON, R. J. (1981). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for the detection and quantitation of antisperm antibodies. *American Journal of Reproductive Immunology*, **1**. ISSN 0271-7352. doi: 10.1111/j.1600-0897.1981.tb00037.x.
- AITKEN, R. J. (2016). Oxidative stress and the etiology of male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **33**. ISSN 15737330. doi: 10.1007/s10815-016-0791-4.
- AITKEN, R. J., PARSLow, J. M., HARGREAVE, T. B. a HENDRY, W. F. (1988). Influence of antisperm antibodies on human sperm function. *British Journal of Urology*, **62**. ISSN 1464410X. doi: 10.1111/j.1464-410X.1988.tb04367.x.
- ALEXANDER, N., ANDERSEN, P. a BAUMINGER, S. (1977). Auto- and iso-antibodies to antigens of the human reproductive system. i. results of an international comparative study. *Clinical and Experimental Immunology*, **30**. ISSN 0009-9104.
- ALEXANDER, N. a ANDERSON, D. (1987). Immunology of semen. *Journal of Urology*, **138**. ISSN 0022-5347. doi: 10.1016/s0022-5347(17)43334-9.
- ALI, N. H. (2010). Detection of antisperm antibodies by elisa system in the cervical mucus of women with unexplained infertility. *Zanco*, **14**.
- ANDERSON, D., SCHMID, T. E. a BAUMGARTNER, A. (2014). Male-mediated developmental toxicity. *Asian Journal of Andrology*, **16**. ISSN 17457262. doi: 10.4103/1008-682X.122342.
- ANDREOU, E., MAHMOUD, A., VERMEULEN, L., SCHOONJANS, F. a COMHAIRE, F. (1995). Comparison of different methods for the investigation of antisperm antibodies on spermatozoa, in seminal plasma and in serum. *Human Reproduction*, **10**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/humrep/10.1.125.
- BARBONETTI, A., CASTELLINI, C., D'ANDREA, S., CORDESCHI, G., SANTUCCI, R., FRANCAVILLA, S. a FRANCAVILLA, F. (2019). Prevalence of anti-sperm antibodies and relationship of degree of sperm auto-immunization to semen parameters and post-coital test outcome: a retrospective analysis of over 10 000 men. *Human reproduction (Oxford, England)*, **34**. ISSN 14602350. doi: 10.1093/humrep/dez030.
- BOHRING, C. a KRAUSE, W. (2003). Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, **50**. ISSN 87558920. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.00103.x.
- BOHRING, C., KLEPPER, L. a KRAUSE, W. (2004). Localization of binding sites of naturally occurring antisperm antibodies on human spermatozoa by immunofluorescence. *Andrologia*, **36**. ISSN 03034569. doi: 10.1111/j.1439-0272.2004.00621.x.
- \*BOLARENDE, O., AFNAN, M., PAPAIOANNOU, S., SHARIF, K., BJÖRNDAHL, L. a COOMARASAMY, A. (2003). Accuracy of sperm - cervical mucus penetration tests in evaluating sperm motility in semen: A systematic quantitative review. *Human Reproduction*, **18**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/humrep/deg209. review.
- BOTHNER, H. a WIK, O. (1987). Rheology of hyaluronate. *Acta Oto-Laryngologica*, **104**. ISSN 00016489. doi: 10.3109/00016488709102834.
- BOZHEDOMOV, V. A., NIKOLAEVA, M. A., USHAKOVA, I. V., LIPATOVA, N. A., BOZHEDOMOVA, G. E. a SUKHIKH, G. T. (2015). Functional deficit of sperm and fertility impairment in men with antisperm antibodies. *Journal of Reproductive Immunology*, **112**. ISSN 18727603. doi: 10.1016/j.jri.2015.08.002.
- BRONSON, R. A., COOPER, G. W. a ROSENFELD, D. L. (1987). Seminal fluid antisperm antibodies do not reflect those present on the sperm surface. *Fertility and Sterility*, **48**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)59430-8.
- BRONSON, R., COOPER, G., ROSENFELD, D. a WITKIN, S. S. (1984). Detection of spontaneously occurring sperm-directed antibodies in infertile couples by immunobead binding and enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **438**. ISSN 17496632. doi: 10.1111/j.1749-6632.1984.tb38318.x.
- BUSACCA, M., FUSI, F., BRIGANTE, C., DOLDI, N., SMID, M. a VIGANO, P. (1989). Evaluation of antisperm antibodies in infertile couples with immunobead test: Prevalence and prognostic value. *Acta Europaea Fertilitatis*, **20**. ISSN 05872421.
- CARLSSON, L., NILSSON, B. O., RONQUIST, G., LUNDQUIST, M. a LARSSON, A. (2004). A

- new test for immunological infertility: An elisa based on prostasomes. *International Journal of Andrology*, **27**. ISSN 01056263. doi: 10.1111/j.1365-2605.2004.00458.x.
- CARP, H. J., SELMI, C. a SHOENFELD, Y. (2012). The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *Journal of Autoimmunity*, **38**. ISSN 08968411. doi: 10.1016/j.jaut.2011.11.016.
- CHIU, W. W. a CHAMLEY, L. W. (2002). Antibody-binding proteins in human seminal plasma. *American Journal of Reproductive Immunology*, **48**. ISSN 87558920. doi: 10.1034/j.1600-0897.2002.01122.x.
- CLARKE, G. N., ELLIOT, P. J. a SMAILA, C. (1985). Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: A survey of 813 consecutive patients. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, **7**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/j.1600-0897.1985.tb00269.x.
- COOPER, T. G., ATKINSON, A. D. a NIESCHLAG, E. (1999). Experience with external quality control in spermatology. *Human Reproduction*, **14**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/humrep/14.3.765.
- CROSS, N. L. a MOORE, S. (1990). Regional binding of human anti-sperm antibodies assessed by indirect immunofluorescence. *Human Reproduction*, **5**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137039.
- CULLIGAN, P. J., CRANE, M. M., BOONE, W. R., ALLEN, T. C., PRICE, T. M. a BLAUER, K. L. (1998). Validity and cost-effectiveness of antisperm antibody testing before in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, **69**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(98)00034-X.
- DAI, Z., NASR, I. W., REEL, M., DENG, S., DIGGS, L., LARSEN, C. P., ROTHSTEIN, D. M. a LAKKIS, F. G. (2005). Impaired recall of cd8 memory t cells in immunologically privileged tissue. *The Journal of Immunology*, **174**. ISSN 0022-1767. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1165.
- DIMITROVA-DIKANAROVA, D. K., LAZAROV, V. V., TAFRADJISKA-HADJIOLOVA, R., DIMOVA, I. I., PETKOVA, N. U. a KRASSTEV, Z. A. (2017). Association between helicobacter pylori infection and the presence of anti-sperm antibodies. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **31**. ISSN 13102818. doi: 10.1080/13102818.2016.1258330.
- DOHLE, G. R., COLPI, G. M., HARGREAVE, T. B., PAPP, G. K., JUNGWIRTH, A. a WEIDNER, W. (2005). Eau guidelines on male infertility. *European Urology*, **48**. ISSN 03022838. doi: 10.1016/j.eururo.2005.06.002.
- DONDERO, F., GANDINI, L., LOMBARDO, F., SALACONE, P., CAPONECCHIA, L. a LENZI, A. (1997). Antisperm antibody detection: 1. methods and standard protocol. *American Journal of Reproductive Immunology*, **38**. ISSN 87558920. doi: 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00302.x.
- EGGERT-KRUSE, W., GERHARD, I., TILGEN, W. a RUNNEBAUM, B. (1989). Clinical significance of crossed in vitro sperm-cervical mucus penetration test in infertility investigation. *Fertility and Sterility*, **52**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(16)53171-9.
- EGGERT-KRUSE, W., HUBER, K., ROHR, G. a RUNNEBAUM, B. (1993). Immunology: Determination of antisperm antibodies in serum samples by means of enzyme-linked immunosorbent assay-a procedure to be recommended during infertility investigation? *Human Reproduction*, **8**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138269.
- EL-SHERBINY, A. F., ALI, T. A., HASSAN, E. A., MEHANEY, A. B. a ELSHEMY, H. A. (2021). The prognostic value of seminal anti-sperm antibodies screening in men prepared for icsi: a call to change the current antibody-directed viewpoint of sperm autoimmunity testing. *Therapeutic Advances in Urology*, **13**. ISSN 17562880. doi: 10.1177/1756287220981488.
- \*ESFANDYARI, S., CHUGH, R. M., PARK, H. S., HOBEIKA, E., ULIN, M. a AL-HENDY, A. (2020). Mesenchymal stem cells as a bio organ for treatment of female infertility. *Cells*, **9**. ISSN 20734409. doi: 10.3390/cells9102253.
- FICHOVA, R. N. a NAKOV, L. S. (1993). The use of elisa to evaluate human antibody binding to epididymal sperm from different species. *American Journal of Reproductive Immunology*, **29**. ISSN 87558920. doi: 10.1111/j.1600-0897.1993.tb00574.x.
- FRANCAVILLA, F., SANTUCCI, R., ROMANO, R., FRANCAVILLA, S., CASASANTA, L. a PROPERZI, G. (1988). A direct immunofluorescence test for the detection of sperm surface bound antibodies. comparison with sperm agglutination test, indirect if test and mar test/direkter immunfluoreszenztest für die bestimmung von spermatozoen-oberflächen-antikörpern. vergleich mit dem spermagglutinationstest, dem indirekten if-test und dem mar-test. *Andrologia*, **20**. ISSN 14390272. doi: 10.1111/j.1439-0272.1988.tb03129.x.

- GADDUM-ROSSE, P., BLANDAU, R. J. a LEE, W. I. (1980). Sperm penetration into cervical mucus in vitro. ii. human spermatozoa in bovine mucus. *Fertility and Sterility*, **33**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)44779-5.
- GATIMEL, N., MOREAU, J., ISUS, F., MOINARD, N., PARINAUD, J. a LEANDRI, R. D. (2018). Anti-sperm antibodies detection by a modified mar test: Towards a better definition of its indications. *Reproductive BioMedicine Online*, **37**, 717–723. ISSN 14726491. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.09.011.
- GONZALEZ-QUINTELA, A., ALENDE, R., GUDE, F., CAMPOS, J., REY, J., MEIJIDE, L. M., FERNANDEZ-MERINO, C. a VIDAL, C. (2008). Serum levels of immunoglobulins (igg, iga, igm) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clinical and Experimental Immunology*, **151**. ISSN 00099104. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x.
- GUDMUNDSDOTTIR, S. L., FLANDERS, W. D. a AUGESTAD, L. B. (2009). Physical activity and fertility in women: The north-trøndelag health study. *Human Reproduction*, **24**. ISSN 14602350. doi: 10.1093/humrep/dep337.
- GWATKIN, R. B. L. (1991). Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility, ed. by brooks keel and bobby webster. boca raton, fl: Crc press, 1990, 431 pp, \$97.50. *Molecular Reproduction and Development*, **29**. ISSN 1040-452X. doi: 10.1002/mrd.1080290117.
- HAAS, G. G. (1986). The inhibitory effect of sperm-associated immunoglobulins on cervical mucus penetration. *Fertility and Sterility*, **46**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(16)49538-5.
- HAAS, G. G. a CUNNINGHAM, M. E. (1984). Identification of antibody-laden sperm by cytofluorometry. *Fertility and Sterility*, **42**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)48146-x.
- HAAS, G. G., D'CRUZ, O. J. a DEBAULT, L. E. (1991). Comparison of the indirect immunobead, radiolabeled, and immunofluorescence assays for immunoglobulin g serum antibodies to human sperm. *Fertility and Sterility*, **55**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(16)54133-8.
- HEIDENREICH, A., BONFIG, R., WILBERT, D. M., STROHMAIER, W. L. a ENGELMANN, U. H. (1994). Risk factors for antisperm antibodies in infertile men. *American Journal of Reproductive Immunology*, **31**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/j.1600-0897.1994.tb00849.x.
- HELLSTROM, W. J., SAMUELS, S. J., WAITS, A. B. a OVERSTREET, J. W. (1989). A comparison of the usefulness of spermmar and immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*, **52**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(16)53170-7.
- HJORT, T. a HANSEN, K. B. (1971). Immunofluorescent studies on human spermatozoa. i. the detection of different spermatozoal antibodies and their occurrence in normal and infertile women. *Clinical and Experimental Immunology*, **8**. ISSN 0009-9104.
- HOUSHDARAN, S., CORTESSIS, V. K., SIEGMUND, K., YANG, A., LAIRD, P. W. a SOKOL, R. Z. (2007). Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad dna methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS ONE*, **2**. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0001289.
- HOWE, S. E. a LYNCH, D. M. (1986). Quantitation of sperm bindable iga and igg in seminal fluid. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, **11**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/j.1600-0897.1986.tb00022.x.
- ISHIJIMA, S., OSHIO, S. a MOHRI, H. (1986). Flagellar movement of human spermatozoa. *Gamete Research*, **13**. ISSN 15543919. doi: 10.1002/mrd.1120130302.
- IVIC, A., ONYEAKA, H., GIRLING, A., BREWIS, I. A., OLA, B., HAMMADIEH, N., PAPAIOANNOU, S. a BARRATT, C. L. (2002). Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. *Human Reproduction*, **17**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/humrep/17.1.143.
- JOHNSON, W. L. a MENGE, A. C. (1975). Evaluation of human sera for antibodies against sperm by immunofluorescence. *Fertility and Sterility*, **26**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)41241-0.
- \*JUNG, J. H. a SEO, J. T. (2014). Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: Promise or panacea? *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, **41**. ISSN 22338241. doi: 10.5653/cerm.2014.41.3.108. review.

- KALAYDJIEV, S., DIMITROVA, D., MITOV, I., DIKOV, I. a NAKOV, L. (2007). Serum sperm antibodies after diarrhoeal diseases. *Andrologia*, **39**. ISSN 03034569. doi: 10.1111/j.1439-0272.2007.00772.x.
- KAUL, M., ERKAN, D., SAMMARITANO, L. a LOCKSHIN, M. D. (2007). Assessment of the 2006 revised antiphospholipid syndrome classification criteria. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **66**. ISSN 00034967. doi: 10.1136/ard.2006.067314.
- KAY, D. J. a BOETTCHER, B. (1992). Comparison of the sperm test with currently accepted procedures for detecting human sperm antibodies. *Reproduction, Fertility and Development*, **4**. ISSN 14485990. doi: 10.1071/RD9920175.
- KAY, D. J., CLIFTON, V., TAYLOR, J. S. a BOETTCHER, B. (1993). Anti-sperm antibodies and semen profiles in re-anastomosed men. *Reproduction, Fertility and Development*, **5**. ISSN 14485990. doi: 10.1071/RD9930135.
- \*KHIZROEVA, J., NALLI, C., BITSADZE, V., LOJACONO, A., ZATTI, S., ANDREOLI, L., TINCANI, A., SHOENFELD, Y. a MAKATSARIYA, A. (2019). Infertility in women with systemic autoimmune diseases. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, **33**. ISSN 15321908. doi: 10.1016/j.beem.2019.101369. review.
- KOKSAL, I. T., ISHAK, Y., USTA, M., DANISMAN, A., GUNTEKIN, E., BASSORGUN, I. C. a CIFTCIOGLU, A. (2007). Varicocele-induced testicular dysfunction may be associated with disruption of blood-testis barrier. *Archives of Andrology*, **53**. ISSN 01485016. doi: 10.1080/01485010600822606.
- KRAVETS, F. G., LEE, J., SINGH, B., TROCCHIA, A., PENTYALA, S. N. a KHAN, S. A. (2000). Prostatomes: Current concepts. *Prostate*, **43**. ISSN 02704137. doi: 10.1002/(SICI)1097-0045(20000515)43:3<169::AID-PROS2>3.0.CO;2-D.
- KREMER, J. a JAGER, S. (1992). Opinion: The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Human Reproduction*, **7**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137737.
- \*KUMAR, N. a SINGH, A. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, **8**. ISSN 19984766. doi: 10.4103/0974-1208.170370. review.
- KUNTAREDDI, C., KUMARESAN, A., SARAF, K. K., NAG, P., PAUL, N., KURATI, S. P., SELVARAJU, S., JEYAKUMAR, S., MANIMARAN, A., RAMESHA, K. P. a ARANGASAMY, A. (2020). Characterization of antisperm antibody binding patterns in relation to sperm phenotypic attributes and field fertility in dairy bulls. *Theriogenology*, **141**. ISSN 0093691X. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.022.
- \*LEE, S. K., KIM, C. J., KIM, D.-J. a HYUN KANG, J. (2015). Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Network*, **15**. ISSN 1598-2629. doi: 10.4110/in.2015.15.1.16. review.
- LEE, W., GADDUM-ROSSE, P. a BLANDAU, R. J. (1981). Sperm penetration into cervical mucus in vitro. iii. effect of freezing on estrous bovine cervical mucus. *Fertility and Sterility*, **36**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)45680-3.
- LOTTI, F., BALDI, E., CORONA, G., LOMBARDO, F., MASEROLI, E., DEGL'INNOCENTI, S., BARTOLI, L. a MAGGI, M. (2018). Epididymal more than testicular abnormalities are associated with the occurrence of antisperm antibodies as evaluated by the mar test. *Human Reproduction*, **33**. ISSN 14602350. doi: 10.1093/humrep/dey235.
- \*LU, J. C., HUANG, Y. F. a LU, N. Q. (2008). Antisperm immunity and infertility. *Expert Review of Clinical Immunology*, **4**. ISSN 1744666X. doi: 10.1586/1744666X.4.1.113. review.
- LUBOSHITZKY, R., KAPLAN-ZVERLING, M., SHEN-ORR, Z., NAVE, R. a HERER, P. (2002). Seminal plasma androgen/oestrogen balance in infertile men. *International Journal of Andrology*, **25**. ISSN 01056263. doi: 10.1046/j.1365-2605.2002.00376.x.
- LYNCH, D. M. a HOWE, S. E. (1987). Comparison of a direct and indirect elisa for quantitating antisperm antibody in semen. *Journal of Andrology*, **8**. ISSN 19394640. doi: 10.1002/j.1939-4640.1987.tb03306.x.
- LYNCH, D. M., LEALI, B. A. a HOWE, S. E. (1986). A comparison of sperm agglutination and immobilization assays with a quantitative elisa for anti-sperm antibody in serum\*\*supported by a grant from the rose foundation, denver, colorado. *Fertility and Sterility*, **46**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)49527-0.
- MACMILLAN, R. A. a BAKER, H. W. (1987). Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies. *Clinical Reproduction and Fertility*, **5**. ISSN 0725556X.

- MAHMOUD, A. a COMHAIRE, F. (2000). Antisperm antibodies: use of the mixed agglutination reaction (mar) test using latex beads. *Human reproduction (Oxford, England)*, **15**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/humrep/15.2.231.
- MARCONI, M., NOWOTNY, A., PANTKE, P., DIEMER, T. a WEIDNER, W. (2008). Antisperm antibodies detected by mixed agglutination reaction and immunobead test are not associated with chronic inflammation and infection of the seminal tract. *Andrologia*, **40**. ISSN 03034569. doi: 10.1111/j.1439-0272.2008.00848.x.
- MASOUMI, S. Z., PARSA, P., DARVISH, N., MOKHTARI, S., YAVANGI, M. a ROSHANAIEI, G. (2015). An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in fatemeh hospital in hamadan. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, **13**. ISSN 20082177.
- MATALON, S. T., BLANK, M., ORNOY, A. a SHOENFELD, Y. (2001). The association between anti-thyroid antibodies and pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, **45**. ISSN 87558920. doi: 10.1111/j.8755-8920.2001.450202.x.
- \*MAZUMDAR, S. a LEVINE, A. S. (1998). Antisperm antibodies: Etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertility and Sterility*. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(98)00302-1. review.
- \*MECZEKALSKI, B., CZYZYK, A., KUNICKI, M., PODFIGURNA-STOPA, A., PLOCIENNIK, L., JAKIEL, G., MACIEJEWSKA-JESKE, M. a LUKASZUK, K. (2016). Erratum to: Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-müllerian hormone (amh) levels in its assessment (j endocrinol invest, 10.1007/s40618-016-0497-6). *Journal of Endocrinological Investigation*, **39**. ISSN 17208386. doi: 10.1007/s40618-016-0513-x. review.
- MEINERTZ, H. a BRONSON, R. (1988). Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. comparison of the immunobead binding technique (ibt) and the mixed antiglobulin reaction (mar). *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, **18**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/j.1600-0897.1988.tb00247.x.
- MENGE, A. C. a BEITNER, O. (1989). Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertility and Sterility*, **51**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(16)60559-9.
- MENKVELD, R., KRUGER, T. F., KOTZE, T. J., WINDT, M. L. a PRETORIUS, E. (1991). Detection of sperm antibodies on unwashed spermatozoa with the immunobead test: A comparison of results with the routine method and seminal plasma tat titers and scmc test. *American Journal of Reproductive Immunology*, **25**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/j.1600-0897.1991.tb01069.x.
- NICHOLSON, S. C., ROBINSON, J. N., SARGENT, I. L. a BARLOW, D. H. (1997). Detection of antisperm antibodies in seminal plasma by flow cytometry: Comparison with the indirect immunobead binding test. *Fertility and Sterility*, **68**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(97)00374-9.
- NIKOLAEVA, M. A., KULAKOV, V. I., TER-AVANESOV, G. V., TEREKHINA, L. N., PSHENICHNIKOVA, T. J. a SUKHIKH, G. T. (1993). Detection of antisperm antibodies on the surface of living spermatozoa using flow cytometry: Preliminary study. *Fertility and Sterility*, **59**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(16)55812-9.
- OLIVE, D. L. (2010). Editorial: Exercise and fertility: An update. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **22**. ISSN 1040872X. doi: 10.1097/GCO.0b013e32833c7227.
- \*OLIVEIRA, C., SILVEIRA, I., VEIGA, F. a RIBEIRO, A. J. (2015). Recent advances in characterization of nonviral vectors for delivery of nucleic acids: Impact on their biological performance. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **12**. ISSN 17447593. doi: 10.1517/17425247.2014.945421. review.
- PETIT, F. M., SERRES, C., BOURGEON, F., PINEAU, C. a AUER, J. (2013). Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Human Reproduction*, **28**. ISSN 14602350. doi: 10.1093/humrep/des452.
- PIERANGELI, S. S., CHEN, P. P., RASCHI, E., SCURATI, S., GROSSI, C., BORGHI, M. O., PALOMO, I., HARRIS, E. N. a MERONI, P. L. (2008). Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: Pathogenic mechanisms. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **34**. ISSN 00946176. doi: 10.1055/s-0028-1082267.
- PIRES, E. S. (2010). Multiplicity of molecular and cellular targets in human ovarian autoimmunity: An update. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **27**. ISSN 10580468. doi: 10.1007/s10815-010-9440-5.

- POLITCH, J. A., TUCKER, L., BOWMAN, F. P. a ANDERSON, D. J. (2007). Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Human Reproduction*, **22**. ISSN 14602350. doi: 10.1093/humrep/dem281.
- PRABHA, V., CHAUDHARY, N. a KAUR, S. (2011). Molecular mimicry between spermatozoa and bacteria. *Journal of Urology*, **186**. ISSN 00225347. doi: 10.1016/j.juro.2011.07.084.
- QU, N., OGAWA, Y., KURAMASU, M., NAGAHORI, K., SAKABE, K. a ITOH, M. (2020). Immunological microenvironment in the testis. *Reproductive Medicine and Biology*, **19**. ISSN 14470578. doi: 10.1002/rmb2.12293.
- RAJAH, S. V., PARLOW, J. M., HOWELL, R. J. a HENDRY, W. F. (1992). Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males. *Fertility and Sterility*, **57**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)55091-2.
- RAJČÁNI, J., KORINKOVA, L. a BENCAT, M. (2015). Detection of autoantibodies by indirect immunofluorescence and related techniques: the pathologist's view. *Medical Research Archives*. ISSN 2375-1916. doi: 10.18103/mra.v0i4.330.
- RASANEN, M., AGRAWAL, Y. P. a SAARIKOSKI, S. (1996). Seminal fluid antisperm antibodies measured by direct flow cytometry do not correlate with those measured by indirect flow cytometry, the indirect immunobead test, and the indirect mixed antiglobulin reaction. *Fertility and Sterility*, **65**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/S0015-0282(16)58047-9.
- RASANEN, M. L., HOVATTA, Q. L., PENTILLA, I. M. a AGRAWAL, Y. P. (1992). Detection and quantitation of sperm-bound antibodies by flow cytometry of human semen. *Journal of Andrology*, **13**. ISSN 19394640. doi: 10.1002/j.1939-4640.1992.tb01628.x.
- \*RESTREPO, B. a CARDONA-MAYA, W. (2013). Antisperm antibodies and fertility association. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, **37**. ISSN 21735786. doi: 10.1016/j.acuroe.2012.11.016. review.
- RÄSÄNEN, M., SAARIKOSKI, S., PENTTILÄ, I. a AGRAWAL, Y. P. (1994). A flow cytometric study on the effect of low dose cyclic prednisolone treatment on sperm-bound antibody levels. *Human Reproduction*, **9**. ISSN 02681161. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138612.
- SABARRE, K. A., KHAN, Z., WHITTEN, A. N., REMES, O. a PHILLIPS, K. P. (2013). A qualitative study of ottawa university students' awareness, knowledge and perceptions of infertility, infertility risk factors and assisted reproductive technologies (art). *Reproductive Health*, **10**. ISSN 17424755. doi: 10.1186/1742-4755-10-41.
- \*SAID, T. M. a AGARWAL, A. (2016). *Tests for sperm antibodies*. doi: 10.1007/978-3-319-40788-3\_13. review.
- SCHROEDER, H. W. a CAVACINI, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**. ISSN 00916749. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- SESHAGIRI, P. B. (2001). Molecular insights into the causes of male infertility. *Journal of Biosciences*, **26**. ISSN 02505991. doi: 10.1007/BF02704745.
- SHATAVI, S. V., LLANES, B. a LUBORSKY, J. L. (2006). Association of unexplained infertility with gonadotropin and ovarian antibodies. *American Journal of Reproductive Immunology*, **56**. ISSN 10467408. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00428.x.
- \*SHEN, H. H., LAI, Z. Z., YANG, H. L., SHI, J. W. a LI, M. Q. (2021). Role of autoantibodies in infertility, miscarriage, and assisted reproductive technology outcomes. *Reproductive and Developmental Medicine*, **5**. ISSN 20962924. doi: 10.4103/2096-2924.322829. review.
- \*SHIBAHARA, H., WAKIMOTO, Y., FUKUI, A. a HASEGAWA, A. (2021). Anti-sperm antibodies and reproductive failures. *American Journal of Reproductive Immunology*, **85**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/aji.13337. review.
- SHIBARA, H., SHIGETA, M., TOJI, H. a KOYAMA, K. (1995). Sperm immobilizing antibodies interfere with sperm migration from the uterine cavity through the fallopian tubes. *American Journal of Reproductive Immunology*, **34**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/j.1600-0897.1995.tb00927.x.
- SHIRAIISHI, Y., SHIBAHARA, H., KORIYAMA, J., HIRANO, Y., OKAZAKI, H., MINOTA, S. a SUZUKI, M. (2009). Incidence of antisperm antibodies in males with systemic autoimmune diseases. *American Journal of Reproductive Immunology*, **61**. ISSN 10467408. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00676.x.
- SINISI, A. A., DI FINIZIO, B., PASWALI, D., SCURINI, C., D'APUZZO, A. a BELLASTELLA, A. (1993). Prevalence of antisperm antibodies by spermartest in subjects undergoing a

- routine sperm analysis for infertility. *International Journal of Andrology*, **16**. ISSN 13652605. doi: 10.1111/j.1365-2605.1993.tb01197.x.
- SUKCHAROEN, N. a KEITH, J. (1995). The effect of the antisperm auto-antibody-bound sperm on in vitro fertilization outcome. *Andrologia*, **27**. ISSN 14390272. doi: 10.1111/j.1439-0272.1995.tb01106.x.
- TEKTONIDOU, M. G., ANDREOLI, L., LIMPER, M., AMOURA, Z., CERVERA, R., COSTEDOAT-CHALUMEAU, N., CUADRADO, M. J., DÖRNER, T., FERRER-OLIVERAS, R., HAMBLY, K., KHAMASHTA, M. A., KING, J., MARCHIORI, F., MERONI, P. L., MOSCA, M., PENGO, V., RAIIO, L., RUIZ-IRASTORZA, G., SHOENFELD, Y., STOJANOVICH, L., SVENUNGSSON, E., WAHL, D., TINCANI, A. a WARD, M. M. (2019). Eular recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **78**. ISSN 14682060. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215213.
- TICCONI, C., ROTONDI, F., VEGLIA, M., PIETROPOLLI, A., BERNARDINI, S., RIA, F., CARUSO, A. a SIMONE, N. D. (2010). Antinuclear autoantibodies in women with recurrent pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, **64**. ISSN 10467408. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00863.x.
- \*TURVEY, S. E. a BROIDE, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**. ISSN 00916749. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016. review.
- \*VAZQUEZ-LEVIN, M. H., MARÍN-BRIGGILER, C. I. a VEAUTE, C. (2014). Antisperm antibodies: Invaluable tools toward the identification of sperm proteins involved in fertilization. *American Journal of Reproductive Immunology*, **72**. ISSN 16000897. doi: 10.1111/aji.12272. review.
- \*VICKRAM, A. S., DHAMA, K., CHAKRABORTY, S., SAMAD, H. A., LATHEEF, S. K., SHARUN, K., KHURANA, S. K., ARCHANA, K., TIWARI, R., BHATT, P., VYSHALI, K. a CHAICUMPA, W. (2019). Role of antisperm antibodies in infertility, pregnancy, and potential for contraceptive and antifertility vaccine designs: Research progress and pioneering vision. *Vaccines*, **7**. ISSN 2076393X. doi: 10.3390/vaccines7030116. review.
- VIVAS-A, G., LOZANO-H, J. a VELASCO, J. (2007). Regulación inmuno-testicular y citocinas. *Investigacion Clinica*, **48**. ISSN 05355133.
- WALLACH, E. E., BRONSON, R., COOPER, G. a ROSENFELD, D. (1984). Sperm antibodies: their role in infertility\*\*presented in part at the fortieth annual meeting of the american fertility society, april 2 to 7, 1984, new orleans, louisiana. *Fertility and Sterility*, **42**. ISSN 00150282. doi: 10.1016/s0015-0282(16)48009-x.
- WANG, M. Z., QIU, Z. L., CAI, X. S., LI, J. J., SHE, M. Q., XU, Y. F. a WU, Y. S. (2017). Secretary expression of a novel human spermatozoa antigen in e. coli and its application to a protein chip. *Biotechnology Letters*, **39**. ISSN 15736776. doi: 10.1007/s10529-017-2377-3.
- WHITTINGTON, K., HARRISON, S. C., WILLIAMS, K. M., DAY, J. L., McLAUGHLIN, E. A., HULL, M. G. a FORD, W. C. L. (1999). Reactive oxygen species (ros) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *International Journal of Andrology*, **22**. ISSN 01056263. doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00174.x.
- WHO (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (sixth edition)*, volume Edition, V.
- WHO (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (sixth edition)*, volume Edition, V.
- WINDT, M. L., BOUIC, P. J., LOMBARD, C. J., MENKVELD, R. a KRUGER, T. F. (1989). Antisperm antibody tests: Traditional methods compared to elisa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, **23**. ISSN 19396376. doi: 10.3109/01485018908986836.
- WOLFF, H. a SCHILL, W. B. (1985). A modified enzyme - linked immunosorbent assay (elisa) for the detection of antisperm antibodies. *Andrologia*, **17**. ISSN 14390272. doi: 10.1111/j.1439-0272.1985.tb01033.x.
- WU, Y., WU, X., CHEN, J., HU, J., HUANG, X. a ZHOU, B. (2020). A novel protein chip for simultaneous detection of antibodies against four epidemic swine viruses in china. *BMC Veterinary Research*, **16**. ISSN 17466148. doi: 10.1186/s12917-020-02375-7.
- XU, F., YE, L., HU, Y., CAI, C., WANG, Z., FAN, L., SONG, L., XU, Z. a DU, W. (2020). A novel protein biochip screening serum anti-sperm antibody expression and natural pregnancy rate in a follow-up study in chinese infertility. *Bioscience Reports*, **40**. ISSN 15734935. doi: 10.1042/BSR20191769.
- YING, Y., ZHONG, Y. P., ZHOU, C. Q., XU, Y. W., WANG, Q., LI, J., SHEN, X. T. a



- WU, H. T. (2012). Antinuclear antibodies predicts a poor ivf-et outcome: Impaired egg and embryo development and reduced pregnancy rate. *Immunological Investigations*, **41**. ISSN 08820139. doi: 10.3109/08820139.2012.660266.
- ZINI, A., PHILLIPS, S., LEFEBVRE, J., BAAZEEM, A., BISSONNETTE, F., KADOCH, I. J. a GABRIEL, M. S. (2010). Anti-sperm antibodies are not associated with sperm dna damage: a prospective study of infertile men. *Journal of Reproductive Immunology*, **85**. ISSN 01650378. doi: 10.1016/j.jri.2010.03.006.

# Seznam obrázků

1	Obrázek popisující základní rozdělení imunitního systému – převzato a upraveno z (*Oliveira a kol., 2015) . . . . .	5
2	Obrázek popisující vliv autoprotilátek na početí a fáze kde protilátky tento problém způsobují – převzato, přeloženo a upraveno z (*Shen a kol., 2021) . . . . .	8
3	Obrázek shrnující možný vznik a důsledek ASA u obou pohlaví, převzato z *Vickram a kol. (2019). . . . .	11

# Seznam tabulek

1	Referenční hodnoty pro Normozoospermie dle WHO 2010, převzato a přeloženo z WHO (2010). . . . .	3
2	Vyhodnocení spermogramu dle WHO, převzato a přeloženo z WHO (2010). . . . .	3