

Infekce a zánět – častá příčina neplodnosti mužů a žen

RNDr. Zuzana Krátká, Ph.D.
Imunologická laboratoř GENNET, Praha

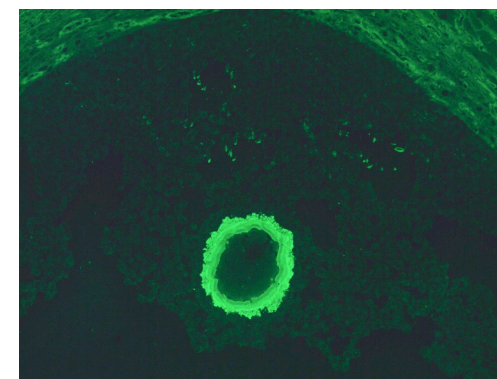
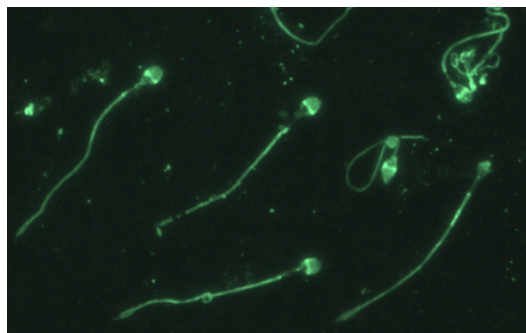
4. seminář reprodukční medicíny, Praha
13. února 2020



člen skupiny
FutureLife

Infekce a zánět

- **Novinky v andrologii**
- **Spermiogram \neq jen spermie**
- **Infekce a kvalita ejakulátu**
 - úvod k prezentaci MUDr. J. Nováka
- **Protilátky proti spermiím**
- **Protilátky proti zona pellucida**
 - úvod k prezentaci Ing. R. Křena, Ph.D.



Novinky v andrologii



Hessian Centre of Reproductive Medicine



6th International Workshop MOLECULAR ANDROLOGY

Germ cells • Somatic cells • Networks

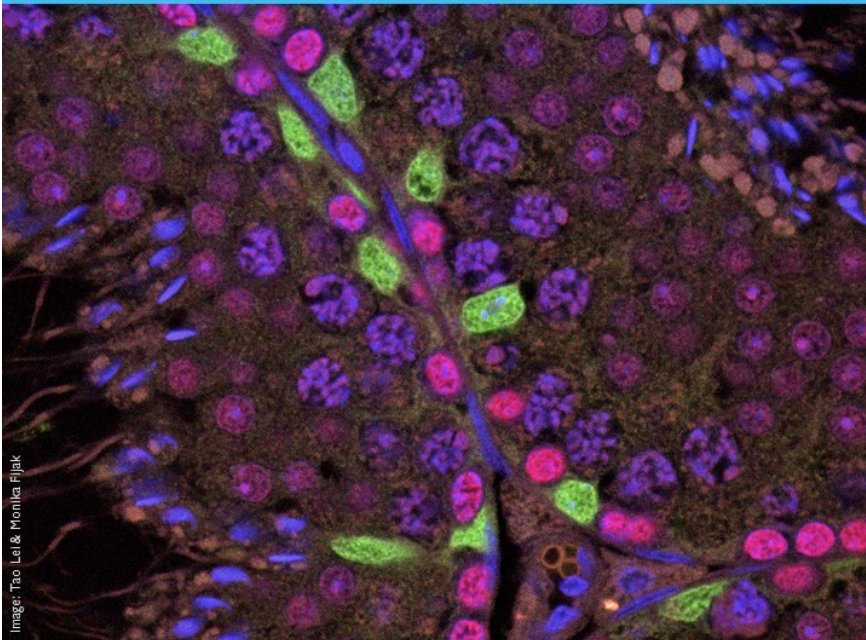


Image: Tao Lei & Monika Fijak

24-26 September 2019 | Giessen | Germany



Prof. Andreas Meinhardt

Prof. Hans – Christian Schuppe

„50 Jahre Urologie Giessen“

Hessenské centrum reprodukční medicíny při univerzitě Justuse Liebige, Giessen (od 1999)



člen skupiny
FutureLife

Organisationsstruktur Organisational Structure

Die untenstehende Übersicht zeigt den Aufbau des Hessischen Zentrums für Reproduktionsmedizin mit den beteiligten Kliniken und Instituten.
Durch die organisatorische Vernetzung fachspezifischer Kompetenzen ist eine optimale Betreuung von Paaren mit Kinderwunsch gewährleistet.

The chart below shows the structure of the Hessian Centre of Reproductive Medicine with the involved clinical departments and institutes.
Optimal care for couples seeking pregnancy is guaranteed by merging the competencies of each discipline.



Pro úspěch reprodukční medicíny je nezbytná spolupráce mnoha oborů

Nutnost neustálé edukace lékařů i veřejnosti

4. ročník semináře reprodukční medicíny

Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny GENNET
Vás s potěšením zve na **4. ročník semináře reprodukční medicíny**,
který se bude konat **13. února 2020 v Praze**.

Místo konání:

www.clarioncongresshotelprague.com

Clarion Congress Hotel Praha

Freyova 945/33

190 00 Praha 9 – Vysočany

GENNET

člen skupiny
FutureLife



Geburtshilfe und
Frauenheilkunde



Thieme

[Geburtshilfe Frauenheilkd.](#) 2019 Dec; 79(12): 1278–1292.

PMCID: PMC6924329

Published online 2019 Dec 11. doi: [10.1055/a-1017-3389](https://doi.org/10.1055/a-1017-3389)

PMID: [31875858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31875858/)

Diagnosis and Therapy Before Assisted Reproductive Treatments.
Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k Level, AWMF Register
Number 015-085, February 2019) – Part 1, Basic Assessment of the
Woman

The guideline was developed in the context of the guidelines program of the German Society of Gynecology and Obstetrics (DGGG) in cooperation with the Swiss Society of Gynecology and Obstetrics (SGGG) and the Austrian Society of Gynecology and Obstetrics (OEGGG)



[Geburtshilfe Frauenheilkd.](#) 2019 Dec; 79(12): 1278–1292.
Published online 2019 Dec 11. doi: [10.1055/a-1017-3389](https://doi.org/10.1055/a-1017-3389)

PMCID: PMC6924329
PMID: [31875858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31875858/)

Diagnosis and Therapy Before Assisted Reproductive Treatments.
Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k Level, AWMF Register
Number 015-085, February 2019) – Part 1, Basic Assessment of the
Woman



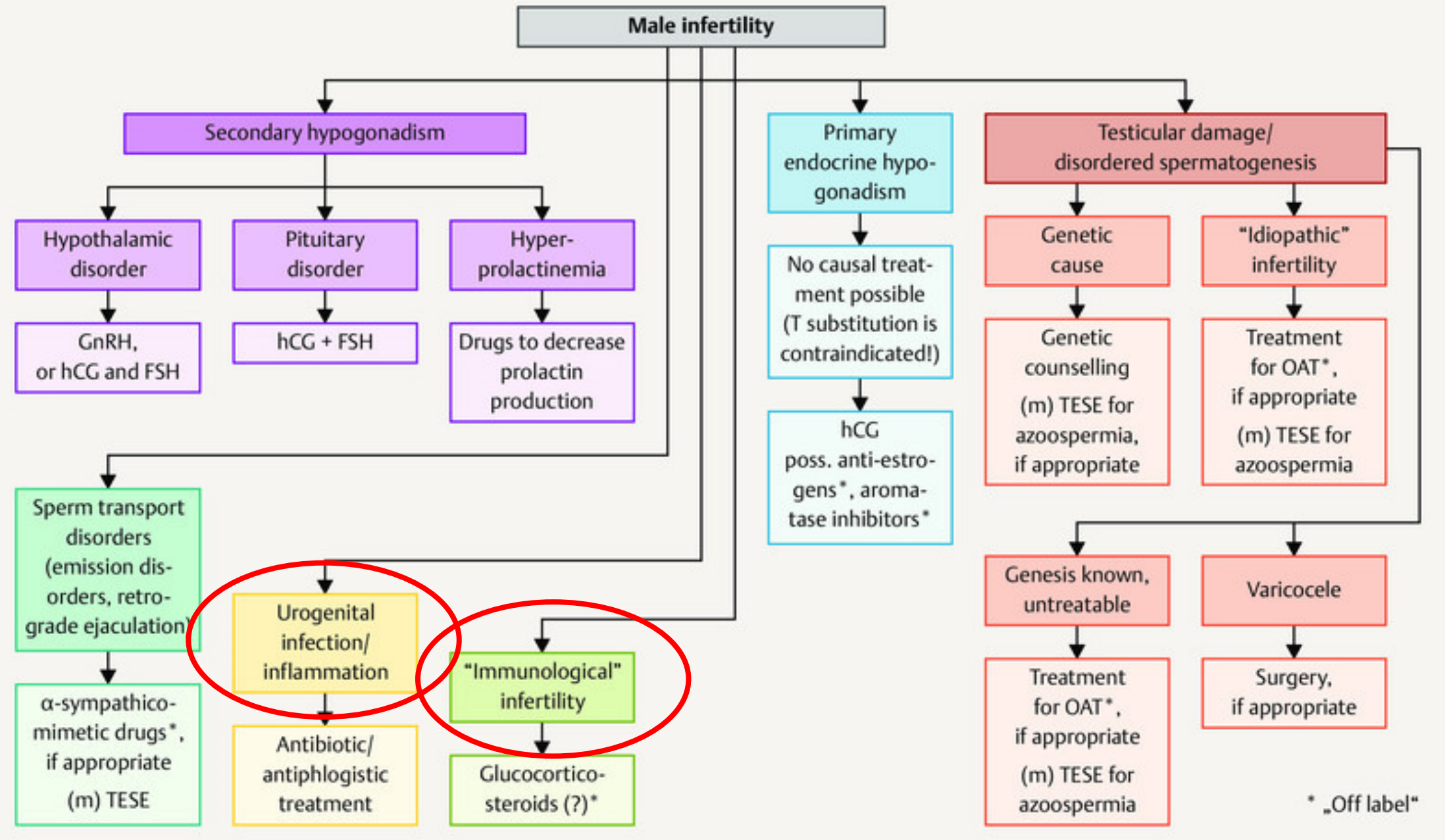
[Geburtshilfe Frauenheilkd.](#) 2019 Dec; 79(12): 1293–1308.
Published online 2019 Dec 11. doi: [10.1055/a-1017-3478](https://doi.org/10.1055/a-1017-3478)

PMCID: PMC6924330
PMID: [31875859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31875859/)

Diagnosis and Treatment Before Assisted Reproductive Treatments.
Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k Level, AWMF Register
Number 015-085, February 2019) – Part 2, Hemostaseology, Andrology,
Genetics and History of Malignant Disease

 GENNET

člen skupiny
FutureLife



Spermioqram ≠ jen spermie

MUŽ 33 let, žena 33 let, oba zdraví, snaha o těhotenství 3 roky

Vzorek číslo: [redacted]

Typ primárního vzorku: ejakulát

Datum a čas odběru: 24.01.2020
12:36:00

Přijal: [redacted]

Čas: 13:43:00

Způsob odběru: ortográdní ejakulace

Délka pohlavní abstinence: 3 dny

Doba zkapalnění: Normal

Vzhled: norma Viskozita: zvýšená

Hodnocený parametr	Hodnota laboratoře	Referenční hodnota	Doporučené hodnoty pro IVF, IUI
Objem (ml)	4	> 1,5	> 1,5
Celkový počet (10^6)	15,6	> 39	> 40
Koncentrace (10^6 /ml)	3,9	> 15	> 20
WHO A+B (%) progresivní	20,5	> 32	> 50
Morfologicky abnormální spermie (%)	98	< 96	< 70
Počet kulatých buněk	8	< 3	< 3
Koncentrace spermií po zpracování* (10^6 /ml)		neuvádí se	

* jen u zpracovaného ejakulátu pro OPU nebo IUI

Výsledek spermogramu

- sex. abstinence 3 dny
- zvýšená viskozita ejakulátu
- vzhled normální
- OAT
- vyšší počet kulatých buněk

Závěr a doporučení

Dle 5. vydání manuálu WHO pro vyšetření lidského semene z roku 2010 je kvalita vyšetřovaného ejakulátu označena jako: OAT. Počet i procento progresivně pohyblivých spermií nesplňuje normu a procento patologických spermií překračuje normu. V procesu IVF nedoporučujeme intrauterinní inseminaci IUI. Při IVF doporučujeme použití mikromanipulačních technik (ICSI).

Poznámka

Vzorek odeslán na vyšetření apoptózy spermií.
Kulaté buňky - doporučujeme urologické vyšetření.

IVF GENNET

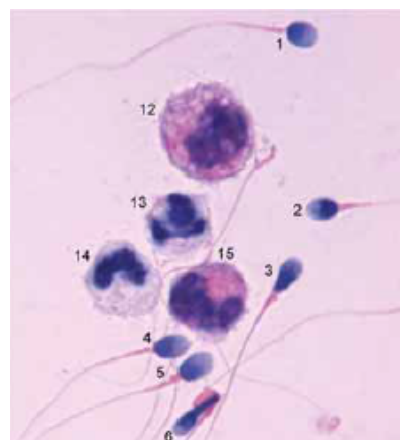
GENNET

člen skupiny
FutureLife

Dotaz č. 1 - EVENTEE

Zabýváte se při hodnocení spermogramu „kulatými buňkami“?

1. NE - kulaté buňky vůbec nehodnotím
2. ANO - nechám ověřit, zda jsou to leukocyty
3. ANO - nechám doplnit mikrobiologické vyšetření moči / ej. u muže
4. ANO – nechám doplnit mikrobiologické vyšetření moči u obou partnerů



Dotaz č. 1

Zabýváte se při zhodnocení spermogramu „kulatými buňkami“?

- 1. NE - kulaté buňky vůbec nehodnotím – to je škoda**
- 2. ANO - nechám ověřit, zda jsou to leukocyty nebo nezralá stádia spermatogeneze (histologické nebo cytometrické vyšetření)**
- 3. ANO - nechám doplnit mikrobiologické vyšetření moči / ejakulátu u muže***
- 4. ANO – nechám doplnit mikrobiologické vyšetření moči u obou partnerů ***

*vyšší riziko infekce (kultivace nebo PCR, první porce ranní moči – CHMU)



Interaktivní otázka

Zabýváte se při zhodnocení spermioqramu „kulatými buňkami“?

1. **NE - kulaté buňky vůbec nehodnotím – to je škoda**
2. ✓ **ANO - nechám ověřit, zda jsou to leukocyty nebo nezralá stádia spermatogeneze (histologické nebo cytometrické vyšetření)**
3. ✓ **ANO - nechám doplnit mikrobiologické vyšetření moči / ejakulátu u muže***

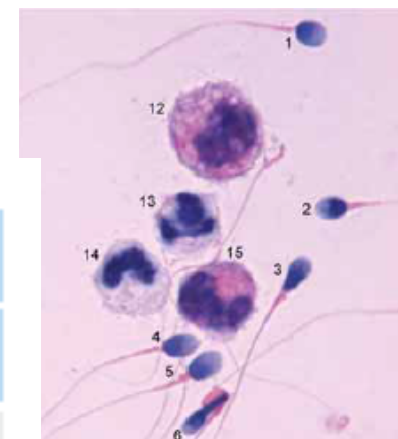
4. Consensus-based recommendation 3.11.E67

Expert consensus

Strength of consensus +++

*vy
moči

Microbiological examination of the ejaculate must be carried out if $> 1 \times 10^6$ /ml peroxidase-positive cells are detected in the ejaculate.



Infekce a kvalita ejakulátu

– úvod k přednášce MUDr. J. Nováka

MUŽ 33 let, žena 33 let, oba zdraví, snaha o těhotenství 3 roky

Vzorek číslo: [REDAKCE]

Typ primárního vzorku: ejakulát

Datum a čas odběru: 24.01.2020
12:36:00

Přijal: [REDAKCE]

Čas: 13:43:00

Způsob odběru: ortográdní ejakulace

Délka pohlavní abstinence: 3 dny

Doba zkapalnění: Normal

Vzhled: norma Viskozita: zvýšená

Hodnocený parametr	Hodnota laboratoře	Referenční hodnota	Doporučené hodnoty pro IVF, IUI
Objem (ml)	4	> 1,5	> 1,5
Celkový počet (10^6)	15,6	> 39	> 40
Koncentrace (10^6 /ml)	3,9	> 15	> 20
WHO A+B (%) progresivní	20,5	> 32	> 50
Morfologicky abnormální spermie (%)	98	< 96	< 70
Počet kulatých buněk	8	< 3	< 3
Koncentrace spermií po zpracování* (10^6 /ml)		neuvádí se	

* jen u zpracovaného ejakulátu pro OPU nebo IUI

Výsledek spermogramu

- sex. abstinence 3 dny
- zvýšená viskozita ejakulátu
- vzhled normální
- OAT
- vyšší počet kulatých buněk

Závěr a doporučení

Dle 5. vydání manuálu WHO pro vyšetření lidského semene z roku 2010 je kvalita vyšetřovaného ejakulátu označena jako: OAT. Počet i procento progresivně pohyblivých spermií nesplňuje normu a procento patologických spermií překračuje normu. V procesu IVF nedoporučujeme intrauterinní inseminaci IUI. Při IVF doporučujeme použití mikromanipulačních technik (ICSI).

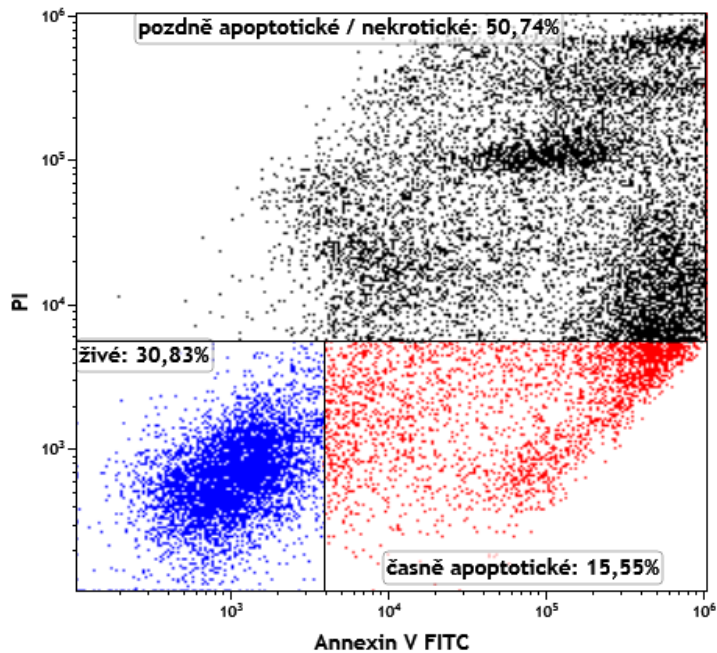
Poznámka

Vzorek odeslán na vyšetření apoptózy spermií.
Kulaté buňky - doporučujeme urologické vyšetření.

IVF GENNET

GENNET

člen skupiny
FutureLife



Cytometrické vyšetření muže:

Test apoptózy spermií - **30 % živých spermií** (norma je >50%)

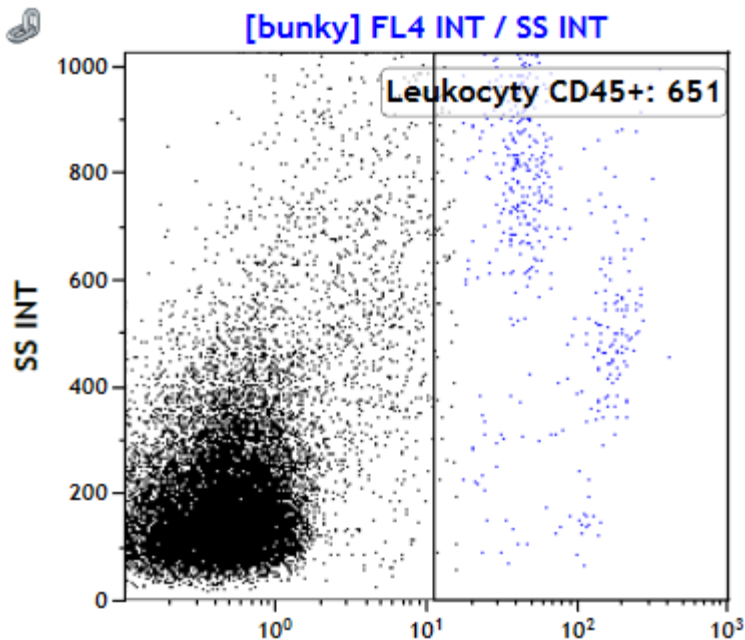
Zastoupení leukocytů – **2,5 mil leu / ml** (norma do 1 mil leu / ml)

Mikrobiologické vyšetření:

Kultivační – Ureaplasma a Mycoplasma hominis **neg**

PCR – Chlamydie trachomatis a Mycoplasma genitalium **neg.**

Prim./vyšetřený vzorek: Moč |



Metoda	Výsledek	Hodnota	Jednotka
--------	----------	---------	----------

Pohlavně přenosné nemoci:

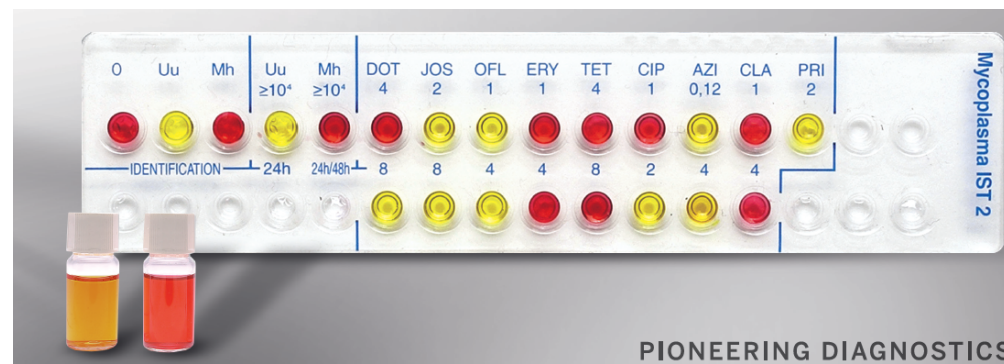
Kultivační vyšetření UREAPLASMA spp.	Negativní		
--------------------------------------	-----------	--	--

Kultivační vyšetření MYCOPLASMA hominis	Negativní		
---	-----------	--	--

Detekce nukleových kyselin:

DNA Chl. TRACHOMATIS PCR	Negativní		
--------------------------	-----------	--	--

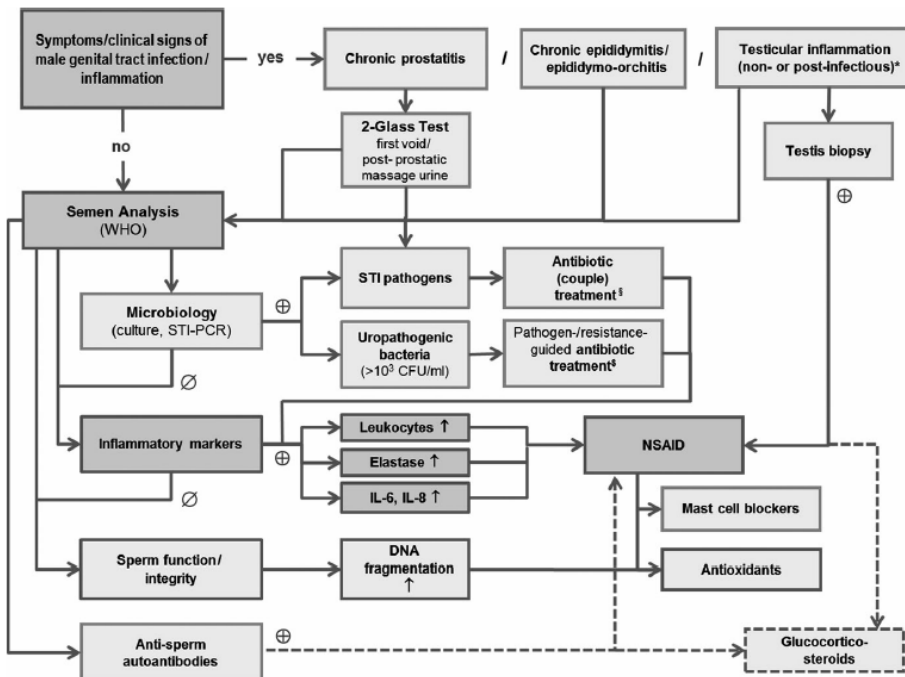
DNA MYCOPLASMA genitalium	Negativní		
---------------------------	-----------	--	--





INVITED REVIEW

Therapeutic options in male genital tract inflammation

Gerhard Haidl¹ | Friederike Haidl² | Jean-Pierre Allam¹ | Hans-Christian Schuppe^{3,4} HAIDL ET AL. | **ANDROLOGIA** WILEY | 3 of 11

INFEKCE x ZÁNĚT

- je-li prokázáný patogen, pak léčíme pacienta antibiotiky
- není-li prokázáný patogen nebo pokud přetrvává problém s kvalitou spermií po antibiotické léčbě, pak je třeba sledovat imunologické markery a léčit NSAID

Proč vadí leukocyty spermiím

- ✓ **Neutrofily / makrofágy produkují reaktivní kyslíkové radikály, proteázy a cytokiny**
 - apoptóza spermií
 - zvýšená fragmentace DNA
 - pokles motility spermií
- ✓ **Neutrofily / makrofágy fagocytují spermie a tvoří NETs / METs**
- ✓ **Plazmatické buňky - produkce protilátek proti spermiím**
- ✓ **Aktivace NK buněk**

Imunitní reakce neprobíhá pouze u muže, ale také po pohlavním styku dochází k aktivaci imunitního systému ženy (spermiemi, seminální tekutinou, leukocyty muže)

Leukocytes coincubated with human sperm trigger classic neutrophil extracellular traps formation, reducing sperm motility

Fabiola Zambrano, M.Sc.,^a Tessa Carrau, V.M.,^b Ulrich Gärtner, Ph.D.,^c Anika Seipp, M.T.,^c Anja Taubert, Ph.D.,^b Ricardo Felmer, Ph.D.,^{a,b,c,d} Raúl Sanchez, Ph.D.,^{e,f} and Carlos Hermosilla, Ph.D.^b

^a Laboratory of Reproduction, Centre of Reproductive Biotechnology, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; ^b Institute of Parasitology and ^c Institute of Anatomy and Cell Biology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany; and ^d Department of Agricultural Sciences and Natural Resources, Faculty of Agriculture and Forestry Sciences, ^e Laboratory in Reproductive Medicine and Molecular Endocrinology, Centre of Genetic and Immunology, and ^f Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

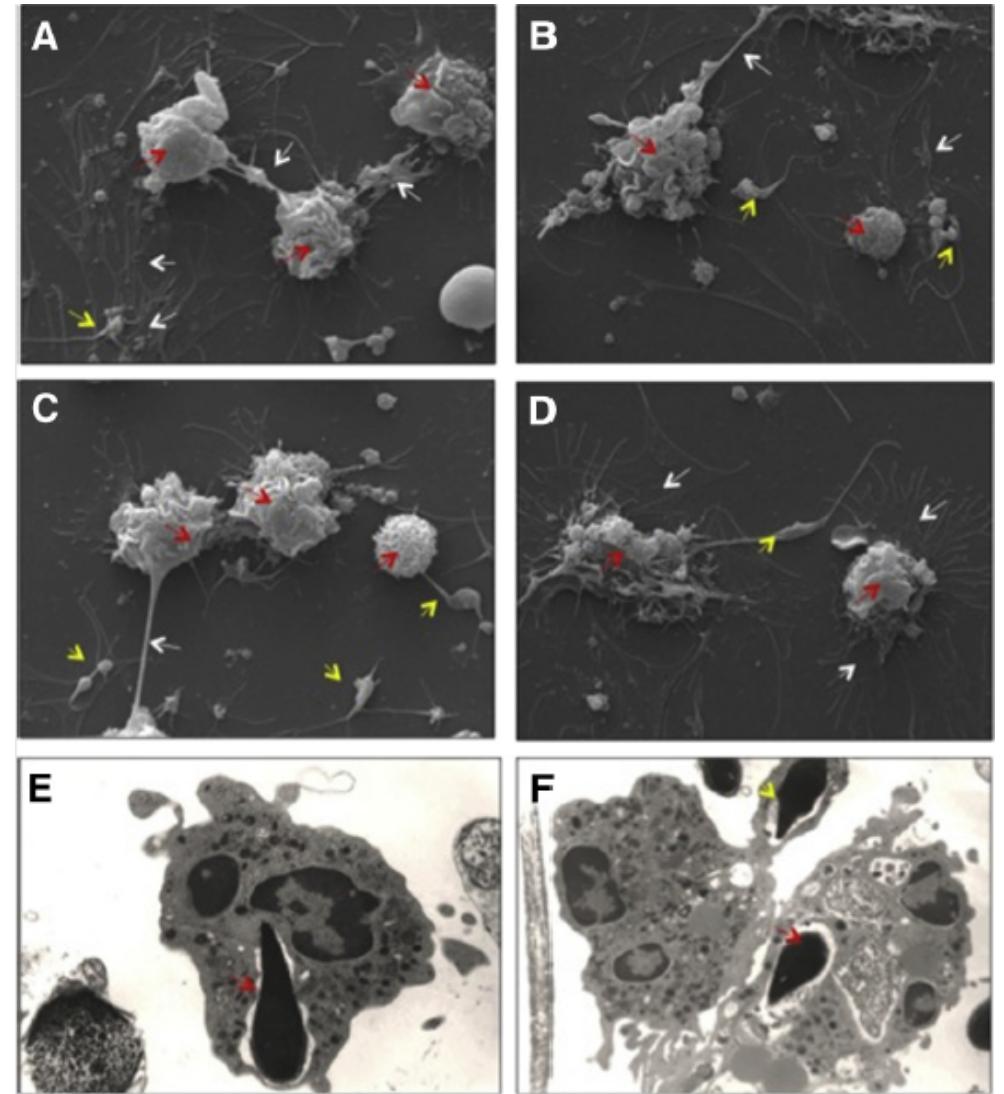
Fertility and Sterility® Vol. 106, No. 5, October 2016 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2016 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.06.005>

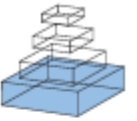
Neutrofilní extracelulární pasti (Neutrophil extracellular traps, NETs)

- síť tvořená rozvolněným chromatinem, jadernými a granulárními proteiny neutrofilů a antimikrobiálními peptidy přítomnými v granulách neutrofilů

NETóza - unikátní typ aktivní buněčné smrti

NETóza patří společně s fagocytózou a degranulací mezi mechanismy, jimiž neutrofilové napomáhají eliminaci patogenních bakterií přítomných v organismu.





Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss

Sinuhe Hahn^{1*}, *Stavros Giaglis*^{1,2*}, *Irene Hoesli*³ and *Paul Hasler*²

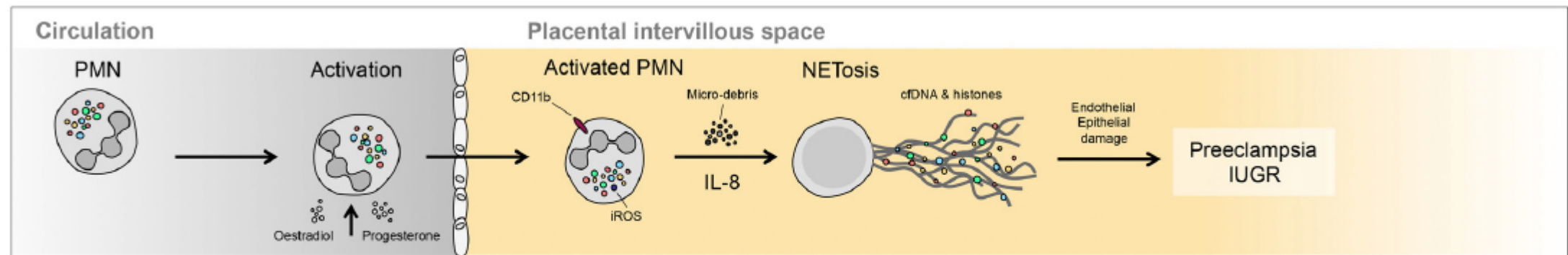


FIGURE 2 | Occurrence of NETs in preeclampsia. Large numbers of NETs have been detected directly in the intervillous space of preeclamptic placentae. These NETs appear to be triggered by the elevated release of highly inflammatory placental micro-debris.

Protilátky proti spermiím

Review
Role of Antisperm Antibodies in Infertility, Pregnancy, and Potential for Contraceptive and Antifertility Vaccine Designs: Research Progress and Pioneering Vision

Vickram A. S. ^{1,*}, Kuldeep Dhama ^{2,*}, Sandip Chakraborty ³, Hari Abdul Samad ⁴, Shyma K. Latheef ², Khan Sharun ⁵, Sandip Kumar Khurana ⁶, Archana K. ⁷, Ruchi Tiwari ⁸, Prakash Bhatt ⁹, Vyshali K. ⁷ and Wanpen Chaicumpa ^{10,*}

Vaccines 2019, 7, 116; doi:10.3390/vaccines7030116

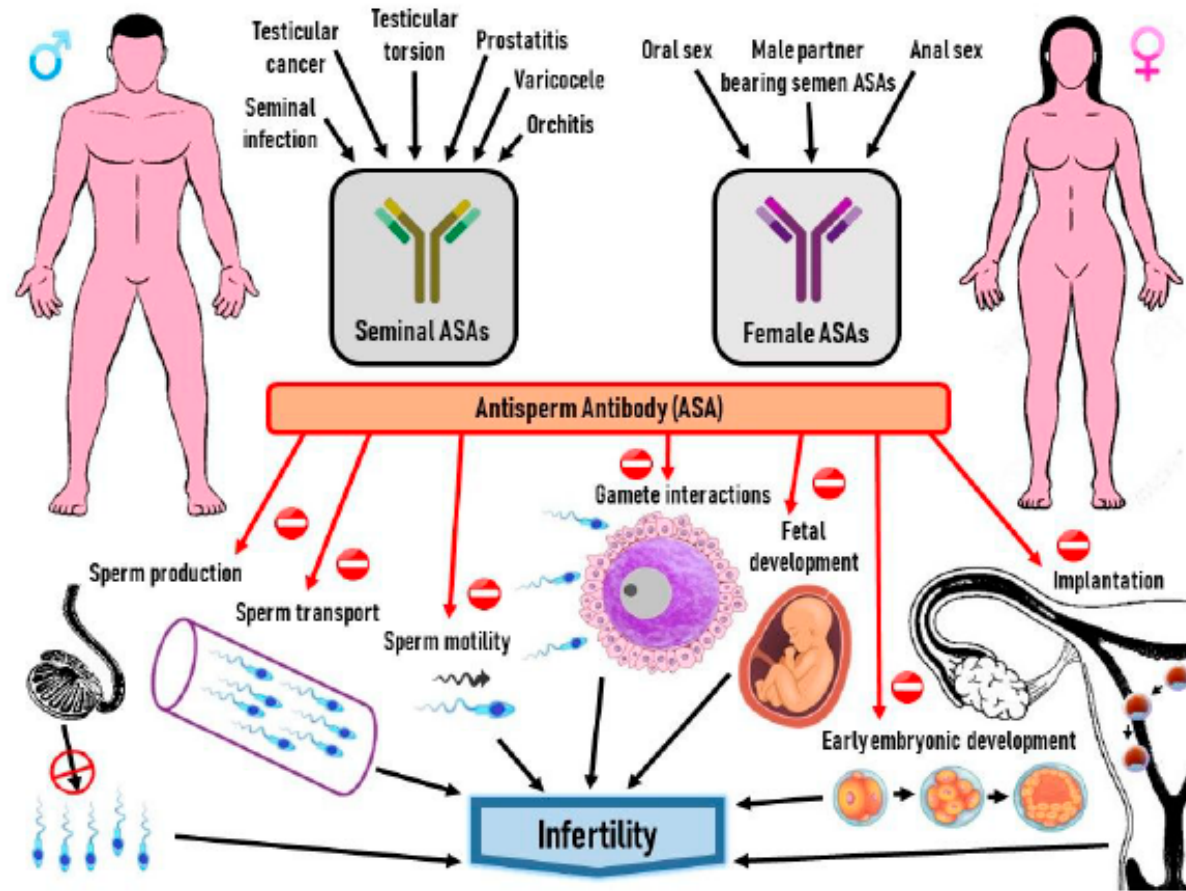


Figure 2. Production of antisperm antibodies and the mechanisms of action in the female reproductive tract that lead to infertility.

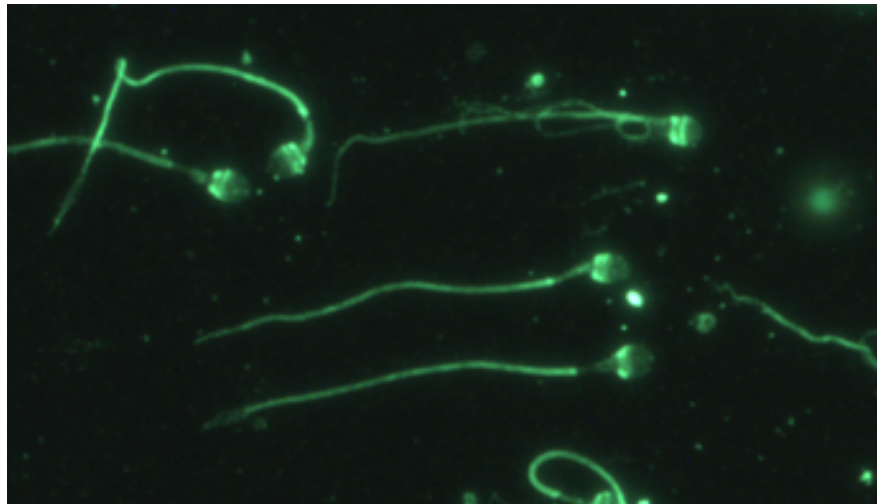
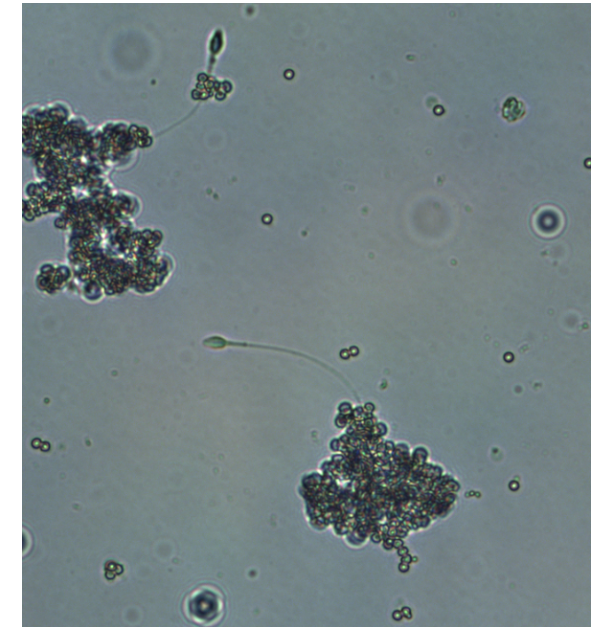
1.3.2.1 Immunological infertility

Consensus-based recommendation 3.11.E83

Expert consensus

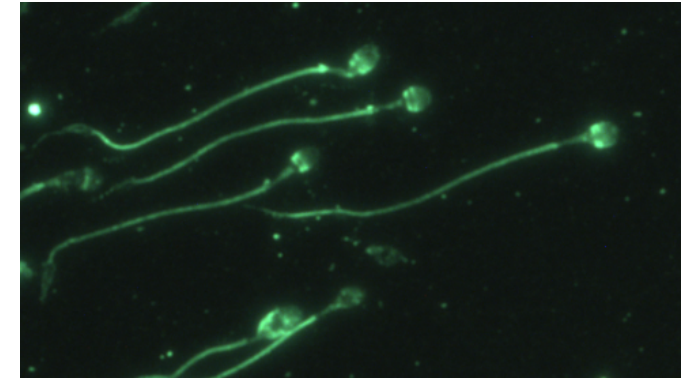
Strength of consensus +++

The confirmation of sperm autoantibodies in the ejaculate is an immunological infertility factor, and ART may be indicated.



ASA u neplodných žen (IF) - rok 2019

	Anti spermatické protilátky
Celkem vyšetřeno pacientek	3 249
Pozitivní	243 (7,5 %)
Hraniční	255 (7,9 %)
Negativní	2 747 (84,6 %)



EUROIMMUN
a PerkinElmer company

Medizinische
Labordiagnostika
AG



Pacientky s pozitivními ASA

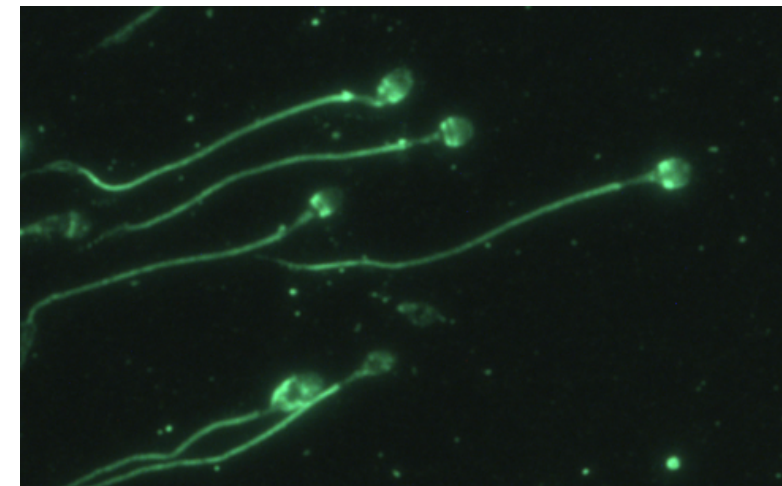
- **primární sterilita bez IVF (46 %)**
- sekundární sterilita po 1 a více dětech (24 %)
- opakované potraty či biochem. gravidity (14 %)
- opakovaně neúspěšné IVF cykly (10 %)

GENNET

člen skupiny
FutureLife

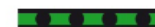
Opakovaně vyšetřené ASA u žen (IF)

	Opakované vyšetření (po 1-2 měsících)
Vyšetřeno pacientek	71
Pozitivní opakovaně	39 (54,9 %)
Hraniční	25 (35,2 %)
Negativní	7 (9,8 %)



EUROIMMUN
a PerkinElmer company

Medizinische
Labordiagnostika
AG



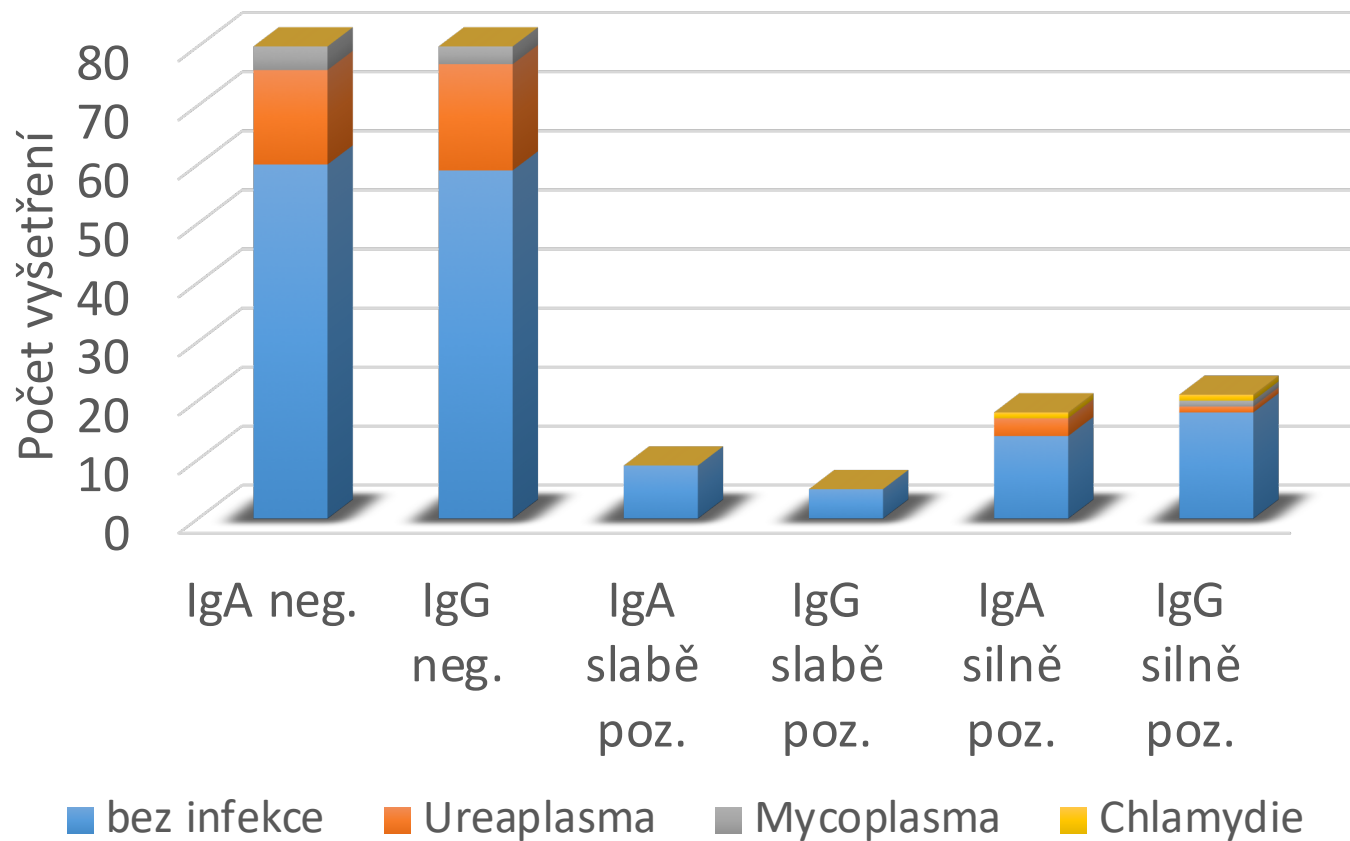
Antibiotická léčba může vést k poklesu protilátek proti spermiím.

Vhodná kontrola alespoň 2 měsíce po atb. léčbě

GENNET

člen skupiny
FutureLife

Zastoupení infekcí u mužů (MAR test)

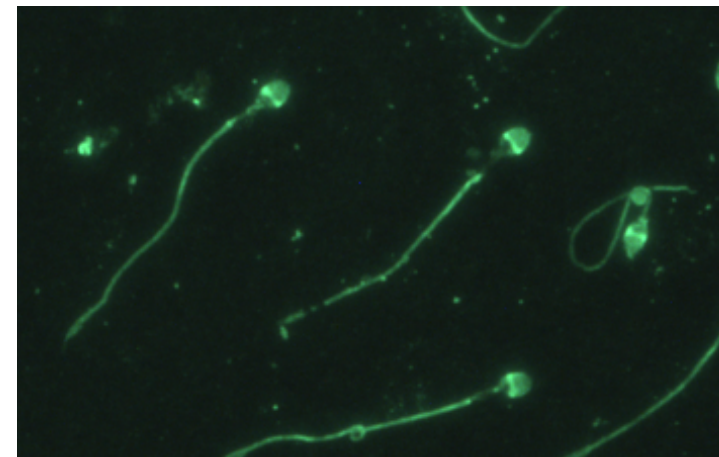


106 pacientů s vyšetřenými protilátkami proti spermiím v ejakulátu metodou MAR a vyšetřenou infekcí

Infekce zjištěna jak u pacientů bez protilátek (25 %), tak v menší míře u pacientů s protilátkami (u 17 % s poz MAR IgA, u 9 % s poz MAR IgG)

Protilátky proti spermiím - závěry

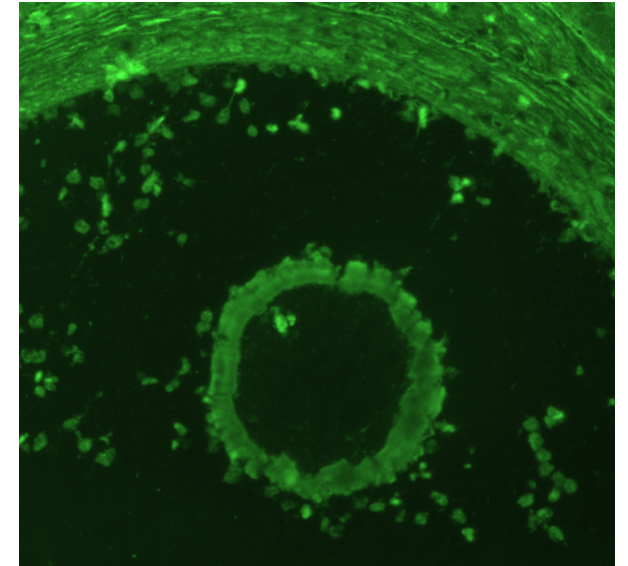
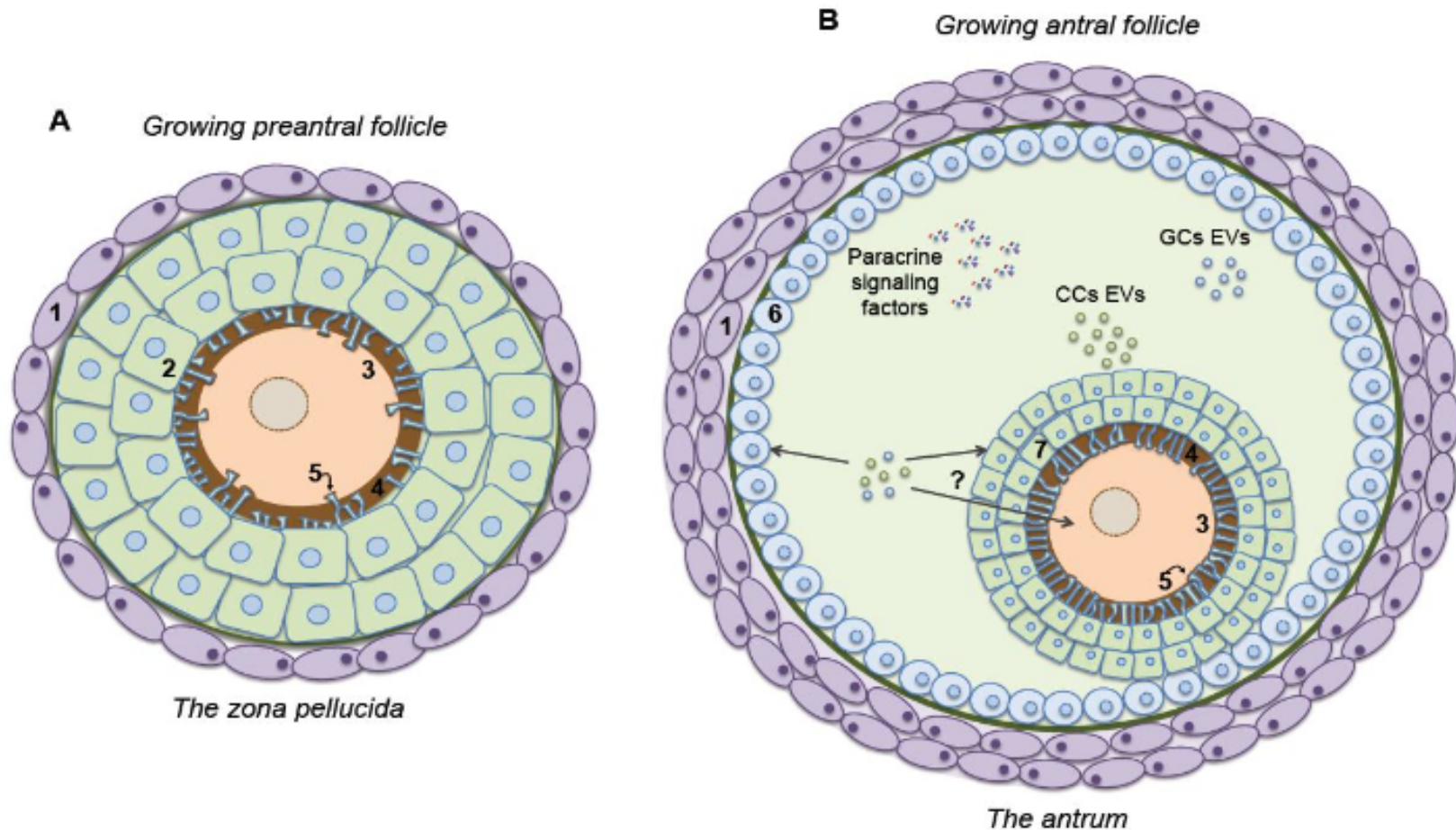
- Nebyla potvrzena závislost mezi výskytem infekce a protilátek proti spermiím
- Doporučená terapie – ICSI
- Pro pacientky, které nechtějí IVF, je vhodná antibiotická léčba (v případě infekce), případně kortikoidy (nemáme mnoho zkušeností)



Protilátky proti zona pellucida

– úvod k přednášce Ing. R. Křena, Ph.D.

Protilátky proti zona pellucida

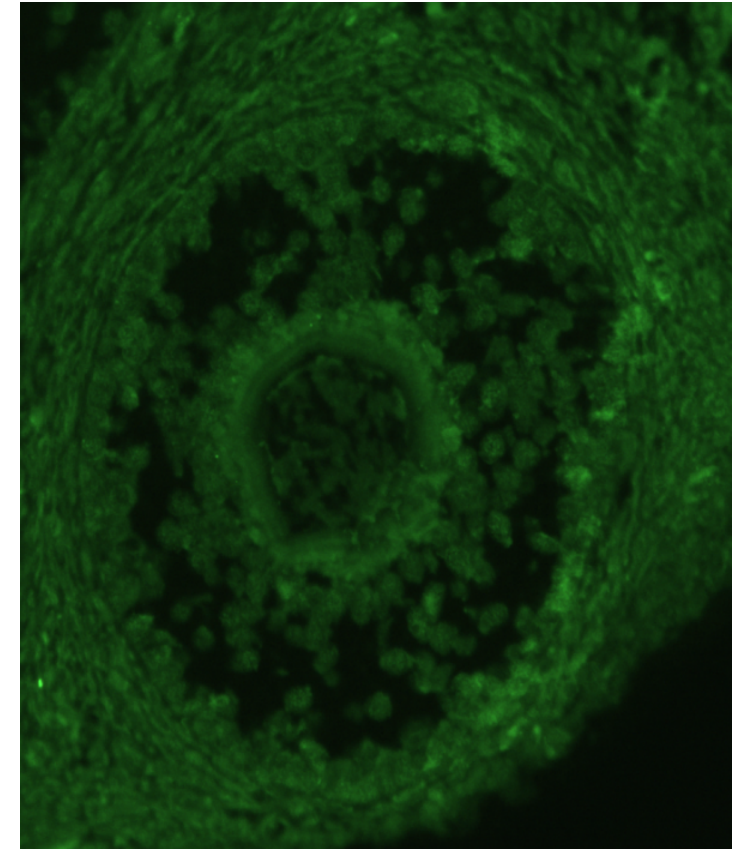
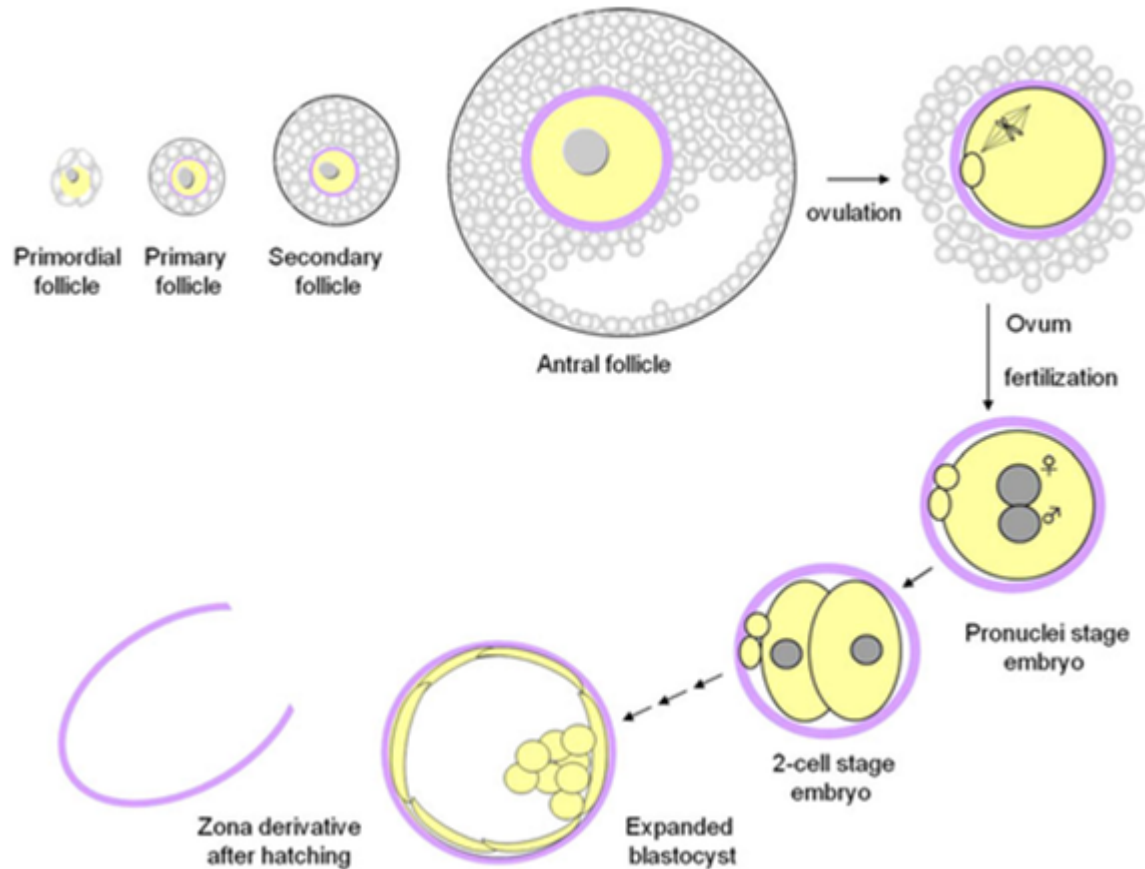


Legend: 1 – Theca cells; 2 – Granulosa cells; 3 – Oocyte; 4 – Zona pellucida; 5 – Transzonal projections; 6 – Mural granulosa cells; 7 – Cumulus cells.

Infertility and Immunocontraception based on zona pellucida

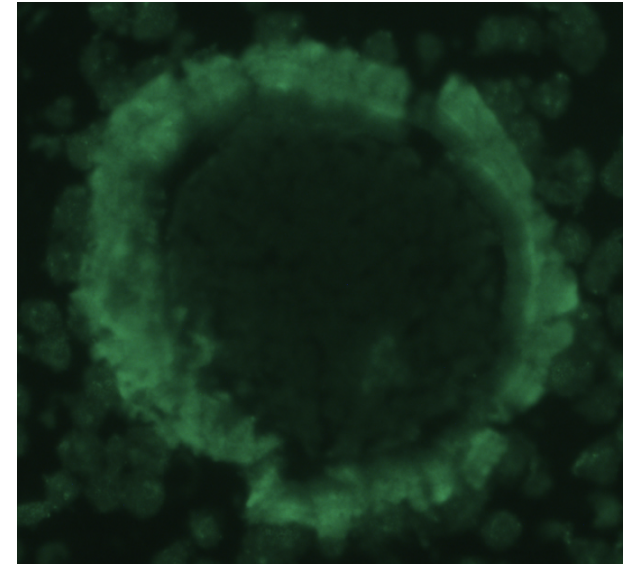
Akiko Hasegawa, Hiroyuki Tanaka, Hiroaki Shibahara

First published: 29 June 2013 | <https://doi.org/10.1007/s12522-013-0159-8> | Citations: 3



AZP u neplodných žen (IF) - rok 2019

	Protilátky anti zona pellucida
Celkem vyšetřeno pacientek	3 502
Pozitivní	131 (4 %)
Hraniční	133 (4 %)
Negativní	3 238 (92 %)



Protilátky proti zona pellucida

- opakovaně neúspěšné IVF (39 %)
- primární sterilita bez IVF (23 %)
- opakované potraty či biochem. gravidity (17 % žen)
- 1 dítě, pak sterilita (15 %)

EUROIMMUN
a PerkinElmer company

Medizinische
Labordiagnostika
AG

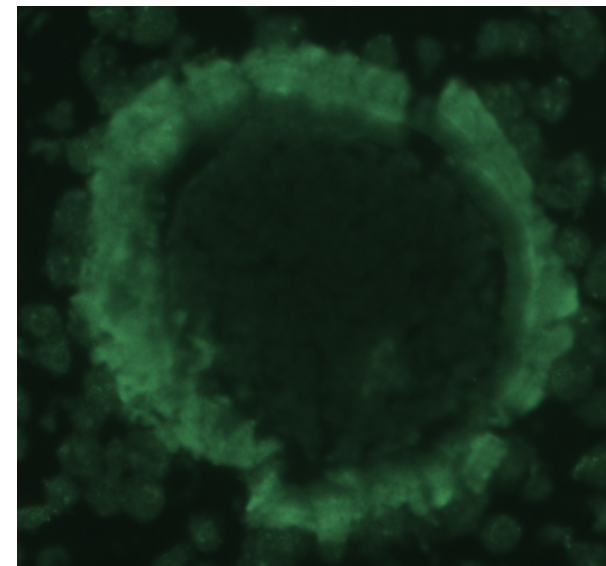


GENNET

člen skupiny
FutureLife

Opakovaně vyšetřené AZP u žen (IF)

	Opakované vyšetření (po 1-2 měsících)
Vyšetřeno pacientek	62
Pozitivní opakovaně	32 (52 %)
Hraniční	19 (31 %)
Negativní	11 (17 %)



EUROIMMUN
a PerkinElmer company

Medizinische
Labordiagnostika
AG



GENNET

člen skupiny
FutureLife

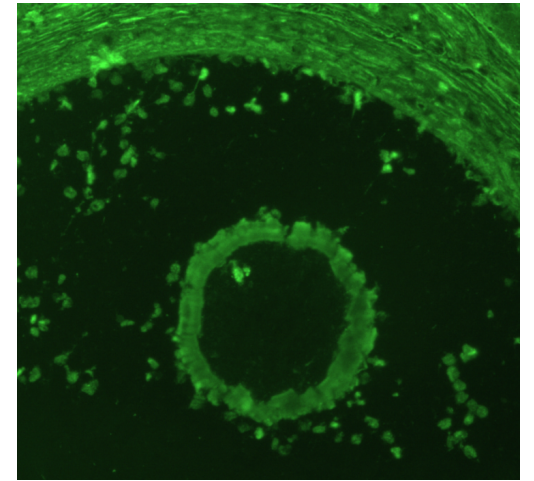
AZP po léčbě antibiotiky a kortikoidy

Protilátky proti zona pellucida jsou pouze jedním z projevů autoimunity. Reaktivní imunitní reakce se projevuje také zvýšenou aktivací NK buněk, případně zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů T lymfocyty po in vitro stimulaci PBMC.

Protilátky se mohou znovuobjevit po abortech, RCUI, potratech!

Terapie kortikoidy:

- Medrol, Metypred, Dexamed
- Dostatečně vysoká počáteční hladina
- Načasování kortikoterapie před OPU / KET
- **Kortikoidy + transfer zona free embryo**
- Kontrola AZP



Jak přelstít imunitu?

Zona-free embryo culture: is it a viable option to improve pregnancy rates?

Gábor Vajta ^{a,*}, Laura Rienzi ^b, Barry D Bavister ^c

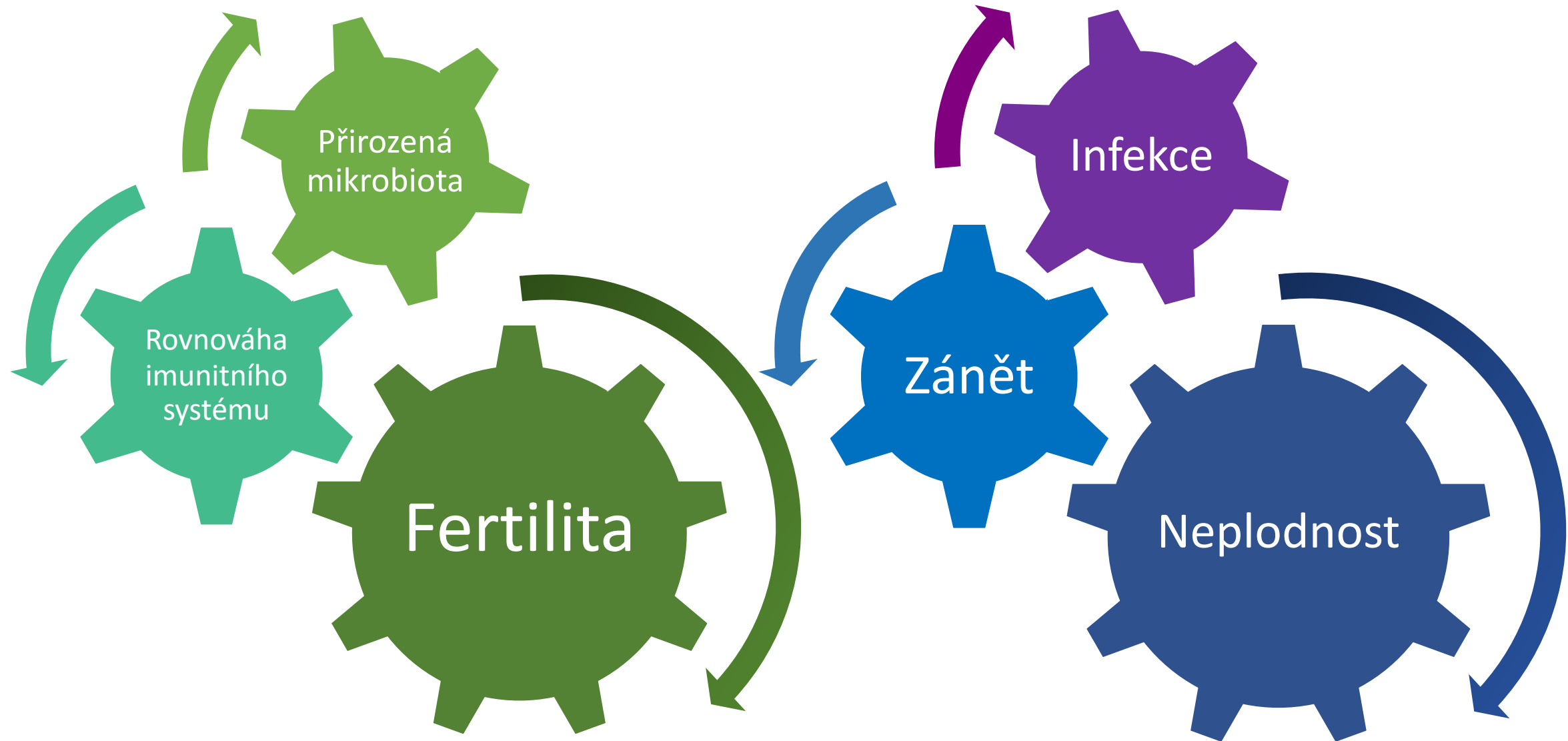
Reproductive BioMedicine Online (2010) 21, 17–25



Conclusion

The zona pellucida has numerous important functions during in-vivo preimplantation development. *In vitro*, however, some of these functions are not required, while others may be compromised and escape from the zona pellucida may become a demanding task for the embryos. Efficient methods are available for total removal of the zona pellucida as well as in-vitro culture, micromanipulation and cryopreservation of zona-free oocytes and embryos. Large-scale studies performed in domestic animals indicate that, in the future, zona-free culture may become a viable alternative to the conventional approach in human assisted reproduction.

Imunologie a léčba neplodnosti



Poděkování spolupracovníkům

- Imunologická laboratoř GENNET,
Praha
Ing. Štěpánka Luxová
- Mikrobiologie VIDIA
DIAGNOSTIKA, Praha

- Infekce

MUDr. Jan Novák

MUDr. Viktor Vik

MUDr. Alena Langerová

- Protilátky

MUDr. Karin Malíčková

MUDr. Jiří Novák

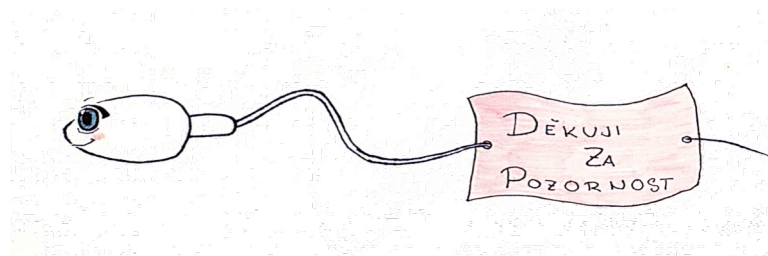
Ing. Radomír Křen



www.gennet.cz

<https://www.gennet.cz/vysetreni-muze>

zuzana.kratka@gennet.cz



GENNET

člen skupiny
FutureLife

Zona-free embrya u pacientek s AZP

	Gravidita	Bez gravidity
Bez léčby kortikoidy	8	5
Léčba s kortikoidy	8	7

- Z celkem 28 pacientek bylo po transferu ZF embrya 16 gravidních (57 %)
- Ve skupině 13 neléčených pacientek bylo 8 těhotných (61,5 %)
- Ve skupině 15 léčených pacientek bylo 8 těhotných (53 %)
8x Dexamed, 4x Medrol, 1x Intralipid, 1x Prednison, 1x IMIG

Nelčíme pouze AZP, ale často kombinaci různých patologií (vyšší aktivace NK buněk, vyšší produkce prozánětlivých cytokinů, MBL deficit atd)

NUTNOST DALŠÍHO VÝZKUMU!