

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**Autoimunitní poškození ovária u dospívajících dívek,
vliv antiovariálních protilátek na poruchy
menstruačního cyklu a fertilitu**

Disertační práce

MUDr. Hana Kosová

**školitel: prof. MUDr. Jan Hořejší, DrSc.
školitel specialista: prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc.**

Praha, 2006

OBSAH

1. Úvod.....	3
2. Seznam použitých zkratk.....	4
3. Teoretická část.....	6
4. Metody.....	27
5. Skupiny pacientek.....	33
5.1. Skupiny kontrolních pacientek.....	33
5.2. Skupina pacientek s poruchami menstruačního cyklu.....	33
5.3. Skupina pacientek léčených pro sterilitu.....	35
5.4. Skupina pacientek indikovaných k ovariální biopsii.....	36
5.5. Skupina pacientek léčených HRT.....	36
6. Výsledky.....	38
6.1. Prevalence antiovariálních protilátek v kontrolních skupinách.....	38
6.2. Prevalence antiovariálních protilátek ve skupině pacientek s poruchami menstruačního cyklu.....	39
6.3. Prevalence antiovariálních protilátek u pacientek léčených pro sterilitu.....	47
6.4. Výsledky ovariálních biopsií.....	50
6.5. Prevalence antiovariálních protilátek u pacientek léčených HRT.....	56
7. Závěr.....	59
8. Diskuse.....	63
9. Shrnutí.....	65
10. Poděkování a použité zdroje dat.....	66
11. Seznam použité literatury.....	69
12. Obrazová příloha.....	78
13. Seznam publikací, abstrakt a prezentací disertantky se ve vztahem k tématu práce.....	90

CONTENT

1. Prologue	3
2. Abbreviations and symbols	4
3. Introduction	6
4. Methods	27
5. Studied group	33
5.1. Control group of patients	33
5.2. Group of patients with menstrual cycle disturbances	33
5.3. Group of patients with infertility	35
5.4. Group of patients indicated for laparoscopic biopsy	36
5.5. Group of patients treated with HRT	36
6. Results	38
6.1. Prevalence of antiovarian autoantibodies in control group	38
6.2. Prevalence of antiovarian autoantibodies in patients with menstrual cycle disturbances	39
6.3. Prevalence of antiovarian autoantibodies in patients with infertility	47
6.4. Results of examination of bioptic ovarian samples	50
6.5. Prevalence of antiovarian autoantibodies in patients treated with HRT	56
7. Conclusion	59
8. Discussion	63
9. Summary	65
10. Acknowledgement and origin materials	66
11. Literature	69
12. Pictures	78
13. Publications, presentations, abstracts of PGS student	90

1. ÚVOD

Práce je věnována problematice autoimunitního poškození ovaria u dospívajících dívek. Problematika autoimunitního poškození ovaria je nyní stále více diskutována s přibývajícím poznatky na poli imunologie, vše vede k objasnění etiologie onemocnění, včasné a správné diagnostice a tím k nalezení adekvátní léčby. Všechny studie se dosud věnovaly autoimunitnímu onemocnění ovarii jen u pacientek ve fertilním věku, žádná se nezabývala touto problematikou u dospívajících dívek s poruchami menstruačního cyklu. Také výzkum ovariální tkáně na úrovni světelné a elektronové mikroskopie u postižených pacientek je v literatuře ojedinělý, častější je výzkum této problematiky na zvířecích modelech, které se mnohdy od situace u lidí značně liší. V současné době se intenzivně diskutují následující otázky, které jsou zahrnuty do cílů našeho projektu:

- (1) Jaký je výskyt protilátek proti ovariálním strukturám, které mohou indikovat autoimunitní poškození ovaria v populaci zdravých jedinců a u jedinců postižených poruchami menstruačního cyklu.
- (2) Jaký má toto onemocnění vliv na fertilitu postižených pacientek.
- (3) Jaký je vůbec význam nalezených protilátek a mají-li vztah k autoimunitnímu poškození ovaria. Základní otázka je, zda jsou antiovariální autoprotiátky příčinou nebo jen následkem poškození ovaria.
- (4) Jaký je vztah autoprotiátek proti ovariu k poruchám jeho funkce, jak postihují folikulární aparát a další ovariální struktury.
- (5) Jak správně a včas toto závažné onemocnění diagnostikovat.
- (6) Jak správně toto onemocnění léčit a minimalizovat tedy následky poškození ovaria především ve vztahu k budoucí fertilitě pacientky.

2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC	buňka předkládající antigen (antigen-presenting cell)
APECED	autoimunitní polyendokrinopatie-kandidóza-ektodermální dystrofie
AOP	antiovariální protilátky
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
Ced	cysteinové proteázy
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DR, DQ, DP	MHC molekuly II. třídy
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
E2	estradiol
ELISA	enzymový imunologický test (enzym-linked immunosorbent assay)
EIA	enzymový imunologický test
ERT	estrogenní substituční léčba (estrogen replacement therapy)
ET	embryo transfer
FasL	Fas-ligand, apoptotický receptor
FSH	folitropin, folikuly stimulující hormon
GnRh	gonadoliberin (gonadotropins releasing hormon)
HLA	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen (human leukocyte antigen)
hMG	lidský menopauzální gonadotropin
HRT	hormonální substituční léčba (hormonal replacement therapy)
ChA	chromozomální aberace
IDDM	inzulín dependentní diabetes mellitus
IFN, IFN- γ	interferon, interferon- γ
IgA	imunoglobulin A
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL-1 β	interleukin 1 β
IVF	in vitro fertilizace
l	litr

LB	luteinní buňky
LH	luteotropin, luteinizační hormon
LUF	syndrom neprasklého folikulu
MC	menstruační cyklus
M30 CytoDeath	protilátka proti cytokeatinu 18, detekce programované buněčné smrti
MG	membrana granulosa
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex
MIF	faktor inhibující makrofágy (migration inhibiting factor)
mg	miligramy
NK	přirozený zabijáč (natural killer)
NO	oxid dusnatý
NOS	NO-syntetáza (nitrose oxide syntethasis)
OO	oocyt, protilátky proti ooplasm
OGTT	orální glukozový toleranční test
OSA	oligomenorea a sekundární amenorea
p 450	cytochrom p 450
PA	primární amenorea
PAE	buňky exprimující periferní autoantigeny
PCO	syndrom polycystických ovárií (hyperandrogenní syndrom)
pmol	pikomol
POF	předčasné ovariální selhání (premature ovarian failure)
ROS	syndrom rezistentního ovária (resistant ovary syndrome)
SA	sekundární amenorea
SSLPs	sekvence krátkých polymorfismů
Tc	cytotoxický T lymfocyt
TCR	receptor T lymfocytů pro antigen
TG	thyreoglobulin
TH	pomocný T lymfocyt
TI	théca interna
TNF, α,β	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TPO	thyroideální peroxidáze
TSH	štítnou žlázu stimulující hormon
TRAK	protilátky proti TSH receptoru
ZP	zona pellucida

3. TEORETICKÁ ČÁST

ky 19
12.193

Schopnost autoimunitního systému rozpoznat antigeny vlastních tkání a reagovat s nimi je fyziologickým jevem, uplatňujícím se v homeostatických mechanismech. Pokud autoimunní reakce vede k poškození tkáně, pak mluvíme o autoimunitním onemocnění (1).

Autoimunitní reakce může být jak humorálního, tak buněčného typu. V případě humorálních reakcí dochází k tvorbě autoprotilátek, většinou izotypu IgG, které se na tkáňovém poškození podílejí buď cytotoxickými mechanismy, nebo tvorbou a ukládáním imunokomplexů, v některých případech působí autoprotilátka funkční změny buňky nebo proteinu, na který se váže. Buněčně zprostředkované autoimunitní reakce jsou charakterizovány poškozujícím zánětem způsobeným T_c a T_H1 -lymfocyty, jejich cytokinovými produkty a aktivací makrofágů.

Podle klasických kritérií lze onemocnění klasifikovat jako autoimunitní tehdy, když je možné charakterizovat autoantigen a když lze poškozující reakci reprodukovat in vitro nebo in vivo (přenosem sérových faktorů nebo buněk na experimentální zvíře). Tato kritéria však splňuje jen několik onemocnění, u řady chorob ještě není identifikován autoantigen nebo nelze onemocnění vyvolat u experimentálních zvířat.

Podmínkou vzniku autoimunitní choroby je prolomení autotolerance. Centrální autotolerance se ustanovuje v thymu pro T-lymfocyty a v kostní dřeni pro B-lymfocyty. V thymu probíhá pozitivní selekce, při které jsou zachovány ty T-lymfocyty, jejichž komplex TCR je schopen rozpoznat (s nízkou afinitou) vlastní MHC molekuly prezentující vlastní peptidy a negativní selekce (klonální delece), při které jsou eliminovány nebo inaktivovány ty lymfocyty, které rozpoznávají komplexy MHC-vlastní peptid s příliš vysokou afinitou.

V thymu jsou dobře prezentovány autoantigeny exprimované ve všech typech buněk, protože zde existují kromě buněk hemopoetického systému, především antigen prezentujících dendritických buněk, i buňky PAE, což jsou thymické epiteliální medulární buňky, které exprimují tkáňově specifické antigeny. V nich má klíčovou funkci gen AIRE, jehož porucha může vyústit v selhání centrální tolerance a ke vzniku autoimunitního polyglandulárního syndromu. Produkt tohoto genu je transkripčním aktivátorem, který reguluje thymovou expresi tkáňově specifických antigenů. Proces centrální tolerance je významně doplňován mechanismy periferní tolerance, který je

založen na tlumivých T-lymfocytech, které operují přímo ve tkáních nebo v regionálních uzlinách.

Periferní tolerance je udržována několika způsoby:

1) klonální delece - autoreaktivní lymfocyty po aktivaci autoantigenem hynou apoptózou. Klonální delece T a B-lymfocytů však není zcela dokonalá, protože T a B-lymfocyty specifické pro autoantigenní peptidy jsou nalézány i v cirkulaci. Tento jev je částečně vysvětlen tím, že ne všechny autoantigeny jsou exprimovány v thymu a v kostní dřeni. Některé autoantigeny jako například antigeny oční čočky, ale také některých struktur ovária jsou vyčleněny z imunitního systému (tzv. privilegovaná místa). Jiné autoantigeny, například antigeny spermií jsou exprimovány až během pozdního fetálního života nebo jen v dospělosti. Autoantigeny, které pravděpodobně nikdy v thymu ani v kostní dřeni exprimovány nejsou, představují kryptické epitopy. Kryptické epitopy jsou de novo exprimované epitopy autoantigenů a jejich vznik souvisí se změnou antigenní prezentace například v případě zánětlivého procesu (2, 3).

2) klonální anergie - lymfocyt rozpozná autoantigen, ale chybí kostimulační signál nutný k aktivaci buňky, důsledkem je funkční útlum. Indukce imunologické anergie T-lymfocytů je způsobena chyběním exprese sekundárních signálů antigen prezentujícími buňkami (APC). Pokud je antigen prezentován T-lymfocytům neprofesionálními APC, jako jsou např. MHC II. třídy pozitivní epiteliální buňky, vznikající nejčastěji vlivem infekce, může dojít ke klonální anergii (4, 5). U některých orgánově specifických autoimunit (např. autoimunitní IDDM a autoimunitní thyroiditis) nacházíme aberantní expresi MHC molekul II. třídy na epiteliálních buňkách postižených orgánů (7). Zpočátku byla tato aberantní exprese interpretována jako impuls k zvýšené autoreaktivitě, ale později bylo zjištěno, že aberantní exprese MHC II třídy u orgánově specifických autoimunit může vést právě k indukci klonální anergie (8, 9).

3) klonální ignorance - autoantigeny jsou exprimovány na vlastních tkáních v podprahovém množství, lymfocyty tedy autoantigeny nerozpoznají.

4) suprese - potlačení aktivity autoreaktivních lymfocytů jinými imunokompetentními buňkami a jejich produkty. Tento mechanismus je pravděpodobně nejdůležitější, ale dosud ne zcela objasněný. Mezi supresorové buňky patří ne jen CD4+ a CD8+ T-lymfocyty, ale také supresorové makrofágy. Nejnovější poznatky naznačují že u každého jedince existuje individuální rovnováha mezi autoreaktivními efektorů a supresorovými imunitními buňkami (10, 11). U zdravých jedinců je tato rovnováha

nakloněna na stranu imunosuprese, u jedinců postižených autoimunitním onemocněním je naopak přikloněna na stranu autoreaktivity.

Nejnovější teorie pohlíží na problém kontroly autoreaktivity z jiného úhlu (12, 13). Autoimunní endokrinní onemocnění s definitivním selháním cílové žlázy, jako je například inzulin dependentní diabetes mellitus (IDDM), je způsobeno T_H1 -lymfocyty zprostředkovanou cestou, kdy endokrinní buňky jsou zničeny γ -IFN-aktivovanými scavengerovými (uklízecími) makrofágy. Tato teorie zdůrazňuje reciproký vztah mezi T_H1 a T_H2 a je v souladu se zjištěním, že cytokiny produkované T_H1 -lymfocyty dále podporují vývoj T_H1 -lymfocytů a silně inhibují T_H2 a naopak. Začne-li tedy T_H1 lymfocytární odpověď, bude mít silnou tendenci automaticky se stabilizovat a potlačovat konkurenční T_H2 odpověď a T_H1 zprostředkovaná autoimunitní reaktivita bude zvýšena. Při opačné reakci je tato odpověď naopak snížena. Autotolerance sice není nastolena, ale škodlivá autoimunitní reakce je přesměrována na méně škodlivou. Existují ověřené studie s použitím cytokinové léčby, které dokázaly, že cytokiny jsou schopny vyvolat přechod z T_H1 na T_H2 zprostředkovanou cestu, což vede ke zlepšení endokrinní autoimunitní nemoci. Cirkulující protilátky, jejichž produkce je zvýšena T_H2 buňkami, zřejmě ale také přispívají ke zničení cílových buněk. Současně je ale známo, že endokrinní autoprottilátky mohou existovat v cirkulaci mnoho let před tím, než se endokrinní autoimunitní onemocnění rozvine (14,15).

Vzhledem k redundanci mechanismů udržujících autotoleranci je k jejímu prolomení nutné působení několika faktorů. Jedná se o kombinaci zevních a vnitřních faktorů (1). Mezi hlavní vnitřní faktory ovlivňující vznik a průběh autoimunitního onemocnění patří:

- 1) asociace s MHC - u řady autoimunitních chorob je známá asociace s určitým haplotypem nebo určitými alelami MHC I. a II. třídy. Všechny studie ale svědčí o tom, že dědičný je pouze sklon k onemocnění, klinická manifestace pak záleží na dalších, konkrétních podmínkách. Mechanismus tohoto fenoménu však není znám, ovlivnění repertoáru TCR nebo selektivní prezentace peptidů (snad se jedná o podobnost s určitými exoantigeny) vyvolávají snáze autoimunitní reakce.
- 2) geny kódující cytokiny - deficit nebo nadbytek určitého cytokinu může vyvolat autoimunitu nejspíše proto, že dojde k poruše regulace T_H1 a T_H2 .
- 3) geny řídící a regulující apoptózu - mutace v genech kódujících molekuly, které se účastní procesu apoptózy, tím dochází k poruše procesu apoptózy aktivovaných lymfocytů a adekvátní regulace.

4) asociace s imunodeficiencí - vyšší incidence autoimunitních chorob je pozorována především u buněčných imunodeficiencí, ale i humorálních.

5) polymorfismus genů kódujících TCR a H-řetězce imunoglobulinů

6) faktory hormonální - většina autoimunitních chorob je až několikanásobně častější u žen, jejich intenzita a incidence se zvyšuje v dospívání a po porodu a snižuje během těhotenství. Jde zřejmě o rozdílnou citlivost regulačních T-lymfocytů k estrogenům u žen a u mužů.

Ze zevních faktorů se nejvíce uplatňují infekce, stres, léky a jiné chemikálie. Zejména infekcím je přisuzován největší podíl na indukci autoimunity. Infekce se na indukci autoimunity může podílet různými mechanismy, které se také mohou kombinovat:

1) infekce odkryje kryptické antigeny - antigeny intracelulární či z imunologicky privilegovaných míst. Imunitní reakce proti primárnímu autoantigenu prohlubuje místní zánět a odhaluje další kryptické autoantigeny.

2) ektopická exprese MHC II. třídy - která vniká pod vlivem zánětlivých cytokinů, což napomáhá prezentaci peptidů, které jsou jinak imunitnímu systému nepřístupné.

3) exprese kostimulačních molekul pod vlivem zánětlivých cytokinů následné stimulaci anergických autoreaktivních lymfocytů.

4) infekční agens může vyvolat tvorbu autoprotilátek mechanismem zvaným molekulární mimikry.

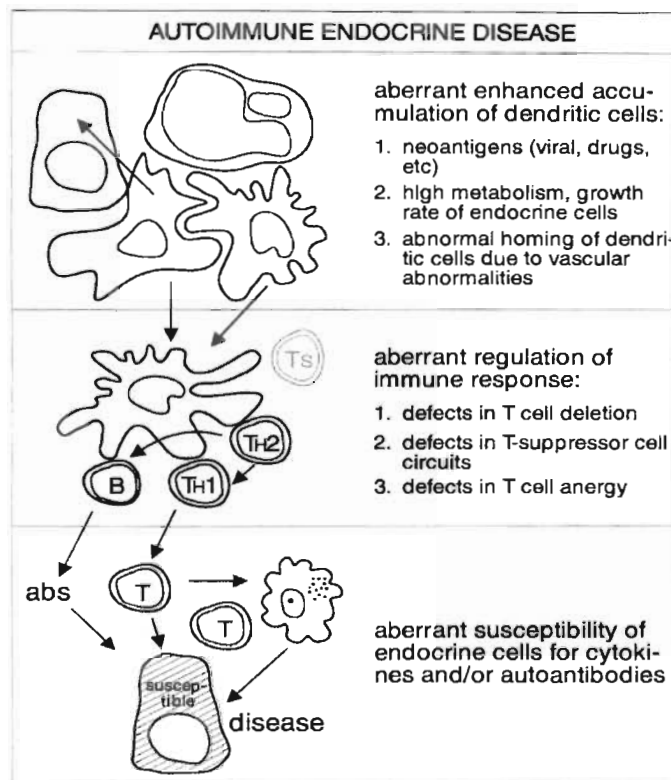
5) některé mikrobiální superantigeny mohou vyvolat polyklonální aktivaci velkého počtu T lymfocytů včetně autoreaktivních.

Autoimunitní onemocnění lze rozdělit na systémová a orgánově specifická. Hranice mezi těmito chorobami není ostrá. celková incidence autoimunitních chorob v populaci je kolem 5%.

Zvířecí modely autoimunitního IDDM a thyroiditis, které jsou autoimunitnímu poškození ovarií nejbližší a často se s tímto onemocněním asociují ukazují, že patogenese autoimunitního selhání endokrinní žlázy je složitý, několikastupňový proces. Rozvoj onemocnění pobíhá v těchto fázích: 1) iniciální fáze akumulace APC a přídatných buněk (DC, podtřídy makrofágů) v postižené endokrinní tkáni, 2) pozdní fáze nekontrolované proliferace autoreaktivních CD4+ a CD8 + lymfocytů a protilátek třídy IgG v drénujících lymfatických uzlinách, 3) další fáze, kdy se stává cílová endokrinní tkáň citlivá na autoimunitní T-lymfocyty a protilátky, což vede ke konečnému výsledku - destrukci cílové tkáně (16, 17, 18).

Při modelování autoimunitní endokrinopatie na zvířecím modelu je iniciální akumulace makrofágů a APC v postižené žláze následována fází nekontrolované klonální expanze autoreaktivních T a B-lymfocytů s produkcí autoprotilátek v drénujících lymfatických uzlinách. K modelování autoimunit se používají speciálně upravené kmeny krys a myši, jejichž důležitým znakem je geneticky vázaná systematická imunodysregulace, která vede k lokální nadprodukci T a B-lymfocytů a IgG protilátek proti různým autoantigenům. Tato systémová imunitní abnormalita je často asociována s přítomností konkrétních haplotypů MHC I. a II. třídy a zdá se, že její přítomnost vede k abnormální stimulaci a diferenciaci buněk, které se účastní indukce tolerance jako jsou APC, makrofágy a T-lymfocyty (16). Například APC u studovaných zvířat vykazují defekt ve schopnosti stimulovat T supresorové buňky nebo zcela chybí regulační populace T-lymfocytů. V některých situacích jsou tyto zvířecí modely podobné vrozeným defektům imunity a autoimunitním onemocněním u lidí. Mnohé práce totiž vykazují jak početní tak funkční deficit systému supresorových buněk u pacientů s autoimunitní thyroditidou a IDDM (18, 20) viz. schéma č. 1.

Schéma č. 1



Převzato z Hoeck a spol. 1997 (120)
Tři vývojová stádia autoimunitní endokrinní nemoci.

Pro multifaktoriální charakter autoimunity svědčí výsledky sledování incidence daného onemocnění mezi páry jednovaječných dvojčat nebo to, že u geneticky definovaných experimentálních zvířat (inbrední kmeny) dochází k onemocnění často jen v určité frakci celkové populace a v závislosti na vnějších podmínkách. Klinické onemocnění stejného charakteru u různých jedinců může být způsobeno různými příčinami a naopak, stejný genetický defekt může mít různé klinické manifestace v závislosti na dalších faktorech.

V současnosti existuje dostatek přesvědčivých důkazů pro vztah mezi predispozicí k endokrinní autoimunitě a konkrétními TCR haplotypy nebo polymorfismy, imunoglobulinovými alotypy a idiotypy nebo cytokinovými geny. U lidské thyroditidy a IDDM a Addisonovy choroby a také u pacientek s autoimunitním postižením ovária jsou častěji postiženi jedinci s HLA DR3, DR4 a DR5 haplotypy. Peptidy glandulárních autoantigenů mohou být vázány více právě s těmito konkrétními MHC molekulami než s jinými. Bez ohledu na tyto mechanismy je zřejmé, že určité MHC haplotypy nejsou samy o sobě jedinou podmínkou pro vývoj endokrinní autoimunitní nemoci, což je dokumentováno faktem, že s autoimunitou asociované HLA haplotypy nalézáme i u zcela zdravých lidí. Také na zvířecích modelech se ukazuje, že přítomnost určitých MHC molekul nemusí vést u těchto zvířat k rozvoji autoimunitní endokrinopatie (21).

Jednou z možností vysvětlení této skutečnosti, která je v současnosti intenzivně studována je výzkum mikrosatelitů neboli jednoduchých sekvencí krátkých polymorfismů (SSLPs), což jsou opakující se sekvence, které se projevují vysokým stupněm polymorfismu mezi jednotlivými jedinci a počet opakování je dán chromozomální plochou. SSLPs nacházíme v genomu mnoho (>100.000) a jsou v něm nahodile rozptýleny. Specifické SSLP lokusy mohou být lehce definovány pomocí PCR použitím oligonukleotidových primerů specifických pro konzervované sekvence charakterizované individuálním opakováním a délka polymorfismů mezi jedinci se identifikuje elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. *Todd et al.* (22) používali mikrosatelity k definování genů asociovaných s diabetem u speciálních kmenů myši, čímž získali 10 odlišných lokusů (Idd-1 do Idd-10) které u myši ovlivňují různé imunopatologické reakce. Vyšetřením určitých Idd bylo identifikováno několik alel, které vedou k různému stupni rezistence k IDDM. Tento model je nyní intenzivně zkoumán u lidí bez diabetu mellitu s MHC haplotypy, které predisponují tyto jedince k vývoji diabetu mellitu (22,23).

Lidské ovarium může být cílem autoimunního útoku za nejrůznějších okolností, zahrnujících různé orgánově-specifické nebo systematické autoimunní onemocnění. Klinicky se prezentující ovariální dysfunkce je často vystředána předčasným ovariálním selháním, ale i jiným onemocněním vaječniku, jako jsou nevysvětlitelná sterilita, polycystická ovaria a endometriosa, u kterých je možný vývoj často dáván do souvislosti s autoimunitou (25,26).

Diagnóza autoimunitního mechanismu u těchto patologií je založena na dlouhodobé detekci antiovariálních protilátek, i když v poslední době se pozornost soustředí více na buněčnou komponentu autoimunitní odpovědi, přestože o molekulárním cíli autoimunních efektorů je známo jen málo a formálně bylo doposud identifikováno jen velmi málo antigenů (27,28).

Sledování prevalence antiovariálních protilátek bylo provedeno v mnoha studiích u pacientek s předčasným ovariálním selháním, ale výsledky různých studií se stále rozcházejí, částečně pro různost metod užívaných k jejich diagnostice. Nicméně lokalizace těchto protilátek pomocí nepřímé imunoflorescence umožnilo identifikovat cíle autoproti látek na buněčné úrovni, a v současnosti se stále více daří charakterizovat tyto cíle na molekulární úrovni.

Detekce autoproti látek namířených proti různým ovariálním strukturám silně podporuje hypotézu autoimunitní etiologie POF. První nález antiovariálních protilátek byl popsán poprvé právě u pacientek s POF asociovaným s Addisonovou chorobou (29). U těchto pacientek byly zjištěny protilátky proti různým typům steroidy produkujících buněk nadledvinové kůry, testes, placenty a ovárií. Prevalence těchto protilátek je popisována v 60% u pacientek s polyglandulárním syndromem I. (viz dále), ve 25-40% u polyglandulárního syndromu II., ale nejvyšší prevalence 78-100% je pozorována u pacientek s Addisonovou chorobou a POF (30, 31) V jedné dlouhodobé studii bylo vyšetřeno 33-34% normálně menstrujících pacientek s polyendokrinopatiemi a nálezem protilátek proti steroidy produkujícím buňkám, rozvoj POF u těchto pacientek byl popsán po 8-15 letech trvání nemoci. Přítomnost AOP je tedy rizikový faktor pro vývoj POF (32).

Nepřímá imunoflorescence je nejčastěji používaná metoda k detekci AOP v séru. V laboratořích se běžně používá k detekci AOP lidská nebo zvířecí ovária. Takto se dá detekovat lokalizace protilátek v různých histologických kompartmentech ovaria (33). V literatuře se popisuje použití různých tkání, které zahrnují lidské, opičí, prasečí, hovězí, krysí, morčecí a králičí ovária, což by mohlo vysvětlit variabilitu získaných výsledků

prevalence, lokalizace a specificity detekovaných protilátek. Mimoto ovariální tkáň může pocházet od žen nebo zvířat v různém věku a v různých fázích menstruačního cyklu, což také přispívá k variabilitě dosažených výsledků (34). Posledním faktorem, který přispívá ke kontroverzním závěrům různých studií je, že neexistují kritéria pro zařazení pacientek do studie ani pro kontrolní subjekty. Proto v mnohých studiích mělo pozitivní záchyt antiovariálních protilátek více než 38% zdravých kontrolních pacientek (35).

Abnormality v buněčné imunitě, např. v T-lymfocytech, makrofázích a dendritických buňkách hrají důležitou roli v autoimunitní reakci, konkrétně v rozvoji autoimunitních lézí. Některé tyto abnormality byly popsány u POF a tak opět podporují autoimunní mechanismus této nemoci (36).

Jako u jiných autoimunit, byl nalezen zvýšený počet a procento periferních krevních T-lymfocytů hlavně CD4+ u pacientek s POF. Mnozí autoři (36,37) používali průtokovou cytometrii k imunofenotypizaci podskupin periferních lymfocytů u POF, ale závěry těchto studií byly velice rozporuplné. Někteří autoři zjistili u POF pacientek nízké hladiny CD 8+ T-lymfocytů a celkově vyšší poměr CD4+/CD8+, Chernyshov (36) zase popisuje vzestup hladin CD4+, další skupina popisovala poměr CD4+/CD8+ snížený, ačkoliv tento popisovaný pokles u pacientek s POF může být způsoben chronickým hypoestrinismem (37). U pacientek s POF je také dokumentován zvýšený počet cirkulujících B buněk a vysoké procento CD19+/CD5 (B-lymfocyty související s autoimunitou).

Alterace buněčné imunity byla také popsána u kutánní kandidózy testem opožděné hypersenzitivity, který byl negativní u 50% POF pacientek. Konečně výsledky výzkumu ukazují, že krevní monocyty u 20-46% pacientek vykazují abnormální odpověď na chemotaktické faktory, a dendritické buňky u 36 % pacientek vykazovaly redukovanou kapacitu agregovat s T-lymfocyty (38). Podobné nálezy byly nalezeny i u jiných autoimunit jako IDDM a Graves-Basedovova choroba (39).

Také množství NK buněk se zdá být u pacientek s POF redukováno. Koexistence autoimunitního ovariálního zánětu a poškozené buněčné imunitní odpovědi dále ilustruje komplexní defekt imunitní regulace v případě autoimunitního poškození ovaria.

Pouhá přítomnost autoprottilátek v séru pacientek však není totožná s patogenním významem protilátek, protože autoprottilátky mohou být také následkem buněčné destrukce, jak lze dokumentovat na rostoucí hladině anti-myokardiálních protilátek po destrukci myokardiálních buněk při infarktu myokardu (40). Ukazuje se nicméně, že

sérové antiovariální protilátky u pacientů s polyglandulárním syndromem typu I. a Addisonovou chorobou, jsou cytotoxické pro kulturu granulózových buněk při současné přítomnosti komplementu. Komplement dependentní cytotoxicita antiovariálních protilátek může být jedním z mechanismů vedoucí k destrukci steroidy produkujících buněk in vivo a tak k ovarialnímu selhání, i když novější studie cytotoxicitu antiovariálních protilátek popírají (41).

Bylo zjištěno, že hlavními cíli antiovariálních protilátek jsou cytochrom P 450 a 21-hydroxyláza (která konvertuje 17- α -progesteron a progesteron na 11-deoxykortizol a deoxykortikosteron) (42, 43, 44).

Základem normální reprodukce jsou procesy folikulogeneze, kterými začíná folikulární růst od stádia primordiálního až po stádium zralého Graafova folikulu, který dospívá v ovulaci. Většina rostoucích folikulů však svůj vývoj nedokončí a degeneruje.

Oocyty vznikají z kmenových buněk extragonadálně v entodermu žlutkového váčku. Objevují se ve čtvrtém týdnu gestačního věku, následně migrují améboidním pohybem podél stěny zadního střeva a dosahují genitálních valů. Po celou dobu se intenzivně dělí mitózou a tím dochází k rychlému zvyšování jejich počtu. V interfázi, která následuje poslední mitotické dělení mezi třetím až sedmým měsícem gestace je oogonie transformována v oocyt a je obklopena granulózovými buňkami a začíná proces meiotického dělení. Oocyt po dosažení diplotenního stádia meiózy se ocitá v klidové fázi, ve které setrvává až do dospělosti jedince. Tvorba oocytů končí v sedmém měsíci gestace a nikdy již nepokračuje, i když nejnovější studie transplantace kmenových buněk ozářeným myším se snaží tento fakt vyvrátit. Během růstu oocyty při vývoji folikulu vnikají i sekreční produkty, zejména glykoproteiny, které tvoří zonu pellucidu. Kompletní vývoj oocyty končí v období formace sekundárního folikulu. Další vývoj folikulu následuje již po ukončení růstu oocyty (45, 46).

Po narození obsahují ovaria novorozence asi 2 milióny folikulů, ze kterých pouze okolo 400 folikulů dosáhne ovulace. Procesu atrézie tedy podlehnou asi 99% všech folikulů. Příčiny, které stojí za tímto plýváním nejsou jasné a základní podstatu tohoto procesu je nutné dále objasnit. Studium procesu atrézie je komplikováno přítomností velkého počtu folikulů v jednotlivých stádiích vývoje a obtížným poznáním začínajících fází atretických pochodů. Folikuly mohou podlehnout atrézii ať již patří k nerostoucím folikulům nebo rostoucí zásobě. Degenerativní proces může postihnout folikul před nebo v průběhu rekrutace do procesů folikulogeneze. Folikulární atrézie tedy doprovází

všechny fáze ovariálního cyklu a stádia života (i perinatálně kdy je ztráta folikulů a oocytů zvláště vysoká).

Menopauza, čili ukončení menstruace na základě vyhasnutí ovarii se u západních žen se objevuje ve věku asi 50 let (47, 48, 49). Množství primordiálních folikulů se zmenšuje věkem a konečné vymizení folikulů v ovariu se považuje za hlavní příčinu snížení ovariální funkce v menopauze (50, 51). Přesto i v ovariu postmenopauzálních žen lze najít primordiální folikuly, což dává tušit, že vymizení folikulů nemusí být jediný faktor vedoucí k vzniku menopauzy. Jedna z hypotéz předpokládá, že zbývající folikuly u postmenopauzálních žen jsou málo senzitivní na vysoké hladiny gonadotropinů (52, 53).

Předčasné ovariální selhání (POF) je onemocnění definované jako nefyziologické ukončení menstruačního cyklu po pubertě a před 40 rokem. Frekvence tohoto onemocnění je v populaci asi 1%. Hormonální hladiny vykazují hypergonadotropní hypoestrismus (FSH větší než 40 IU/l). Nástup onemocnění může být pozvolný. Nejčastěji se setkáváme s tím, že po menarché a pravidelných cyklech následují poruchy cyklu typu oligomenorey až po sekundární amenoreu. V reprodukčním období se onemocnění může projevit jako sterilita či infertilita. Jednou z příčin vzniku předčasného ovariálního selhání je autoimunní poškození ovária, které může nastoupit kdykoliv od puberty po reprodukční období.

Syndrom předčasného ovariálního selhání byl prvně diagnostikován po roce 1939, kdy byla poprvé u části pacientek stanovena vysoká hladina gonadotropinů v moči (54). POF jako klinický syndrom byl poprvé popsán 1950 Atriou (56). Tento autor zkoumal skupinu žen mladších 35 let se sekundární amenoreou, návaly horka, infertilitou a nálezem atrofického endometria. Retrospektivně lze říct, že šlo o případy POF, ačkoliv v té době se rutinně gonadotropiny nevyšetřovaly (55, 56).

Klinický obraz žen s POF je zpočátku onemocnění velmi nenápadný. Onemocnění se může prezentovat dle literatury nejčastěji jako infertilita způsobená snížením ovariální funkce. Tyto ženy mají v anamnéze normální menarché, následuje pravidelný menstruační cyklus (57, 58). Onemocnění se později projevuje oligomenoreou až sekundární amenoreou. Amenoreu často vidíme u těchto pacientek po ukončení léčby hormonální antikoncepcí. Ojedinele nacházíme u pacientek pozitivní rodinnou anamnézu. 50% z nich má vasomotorické symptomy typické pro postmenopauzální období – návaly horka, zvýšené pocení způsobené hypoestrinismem. Další vážnější příznaky jsou atrofická vulvovaginitis, cystitis, dyspareunie (58, 59, 60).

Vzácně se s tímto onemocněním můžeme setkat i u adolescentních dívek. Nejčastěji následuje po menarché a několika normálních, pravidelných cyklech oligomenorea až sekundární amenorea. Můžeme se však setkat i s amenoreou primární s různě pokročilým vývojem sekundárních pohlavních znaků, což vypovídá o nedostatečné ovariální hormonální produkci, která trvala po různě dlouhou dobu v období puberty. Typicky nacházíme hypergonadotropní hypoestrinismus (61, 62).

Diagnóza POF závisí na přítomnosti klinického obrazu a zvýšené hladině gonadotropinů (63). Hladina FSH je disproporcionálně vyšší než LH, sérová hladina FSH je vyšší než 40 IU/l, toto jsou hlavní znaky POF. Vyšetření hladiny gonadotropinů by mělo být provedeno opakovaně, nejméně 2x až 3x za sebou, protože hladina gonadotropinů může růst a klesat (64, 65, 66). Začátek onemocnění lze jen těžko určit. Nemoc může mít fluktuující průběh s vysokými hladinami gonadotropinů, které se později mohou normalizovat a následují opět normální ovulační cykly s možností těhotenství (67, 68, 69). Příkladem je v literatuře zmíněná práce zabývající se 65 pacientkami, které byly zařazeny do studie pro podezření na POF (70). U všech pacientek byl diagnostikovaný hypergonadotropní hypoestrinismus. Pacientky byly během dvou měsíců každý týden vyšetřovány, byla stanovena hladina gonadotropinů, estradiolu a bylo prováděno pravidelné ultrazvukové vyšetření. V 50% případů byla zastižena během studie folikulární aktivita, v 16% případů byly zjištěny sekreční změny. Ovariální biopsie byly provedeny u 6 pacientek s nálezem luteinizovaného Graafova folikulu. 7,5% pacientek z tohoto souboru bylo po stanovení diagnózy schopno otěhotnět.

Udávaná hranice 40 let po diagnózu POF byla stanovena arbitrážně. *Kinch* (71) byl první kdo rozlišil 2 základní formy POF – folikulární a afolikulární. Deplece ovariálních folikulů je nejčastěji nalézána u pacientek s gonadální a ovariální dysgenezí, setkat se s ní můžeme také u pacientek hermafroditických. Genetické a chromozomální abnormality jsou nejčastější známou příčinou nedokonalého vyvinutí a vymizení germ-line buněk. Akcelerovaná atrezie folikulů vedoucí k POF je zachytitelná především u jedinců s mozaikovým karyotypem – 45 X0/46 XX, 47 XX atd. Chybění migrace germ line buněk, nebo porucha vývoje folikulů ve vznikající gonadální tkáni vede k vývoji proužkovitých gonád. U pacientek s mozaikovým karyotypem a dysgenetickými gonádami se POF vyvíjí nejčastěji již před pubertou, ale o tom rozhoduje především aktuální počet primordiálních folikulů v ovariální tkáni (71).

U folikulární formy jsou folikulární struktury stále zachovány, proto existuje možnost spontánního nebo indukovaného návratu ovariální funkce (72). Folikulární forma může být rozdělena na :

1. oophoritis
2. ovaria s malým množstvím normálně reagujících folikulů
3. nereagující ovarium s velkým počtem folikulů tzv. rezistent ovary syndrom (ROS)

Ačkoli histologická klasifikace ostře odděluje folikulární a afolikulární formu, je zřejmé, že některé případy POF které začínají jako folikulární forma přecházejí do formy afolikulární. Výsledky výzkumu posledních let ukazují, že ovariální autoimunita je možná příčina obou forem onemocnění - folikulární i afolikulární formy POF (73, 74).

Autoimunní poškození postihující ovariální hormonální produkci, řadí toto onemocnění mezi autoimunitní endokrinopatie, způsobené přímou destrukcí cílové tkáně jako je thyroditida, inzulin dependentní diabetes a Addisonova choroba (75, 76, 77). Modelování těchto onemocnění na zvířatech prokázaly, že manifestaci choroby předchází složitý několikastupňový proces, který je dán genetickými a imunologickými faktory a také vlivy zevního prostředí. Tkáňové poškození u těchto chorob vyvolávají buď autoreaktivní T-lymfocyty nebo autoprotilátky, které mají cytotoxický účinek, nebo ovlivňují funkci cílové struktury. Přítomnost autoprotilátek je velmi důležitým diagnostickým znakem, zatímco autoreaktivní T-lymfocyty se laboratorně prokazují velmi těžko.

Poměrně dlouho se popisuje spojení POF se různými orgán-specifickými autoimunitními nemocemi. Nejlépe prozkoumána (ačkoliv nejméně častá) je asociace s Addisonovou chorobou. Spojení mezi ovariálním selháním a nadledvinovou autoimunitou byla poprvé prezentována před 70 lety u 2 pacientek s Addisonovou chorobou a atrofickými ovárii. Tato asociace je prokázána v mnoha klinických případech publikovaných před rokem 1950 a některé tyto případy byly asociovány i s jinými endokrinními chorobami, jako je hypothyroidismus a diabetes mellitus (77,78). Později byla nalezena asociace s dalšími orgánově specifickými nemocemi jako je Hashimotova struma, Graves-Basedovova choroba, myastenia gravis, revmatoidní artritida, perniciozní anemie, vitiligo, Crohnova choroba, roztroušená skleroza a některé systémové autoimunitní nemoci jako systémový lupus erythematoses nebo idiopatická trombocytopenie. Častá asociace více endokrinních chorob byla postupně definována jako polyglandulární syndrom. V současné době jsou rozeznávány 3 základní typy:

1) Polyglandulární syndrom I, také zvaný APECED (autoimunitní polyendokrinopatie-kandidioza-ektodermální dystrofie) je vzácné autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genu AIRE (autoimunní regulátor). Diagnóza je stanovena nejčastěji v dětství při nálezů nadledvinové a parathyroideální autoimunity, často je toto onemocnění asociováno s buněčným defektem imunity, způsobujícím chronickou superficiální kandidózu, nacházíme také ektodermální defekty, dentální hypoplasii nebo nehtovou dystrofii (80). Prevalence POF u tohoto typu polyglandulárního syndromu se popisuje ve 39% do 15 let a 72% do 40let (81).

2) Polyglandulární syndrom II, zvaný Schmidt–Carpenter syndrom, zahrnuje Addisonovu chorobu, autoimunitní onemocnění štítné žlázy a diabetes mellitus I.typu. Tento syndrom je mnohem více frekventovaný než I.typ, ale klinické známky onemocnění se objevují až v dospělosti (82). Prevalence POF v tomto případě je jen v 10% do 40 let. Na rozdíl od I. typu není asociován s konkrétním genem ale s určitými alelami MHC (HLA DR a DQ), které jsou spojeny s vysokou vnímavostí k autoimunitní chorobě (83).

3) Polyglandulární syndrom III je částečně podobný typu II., ale nenacházíme Addisonovu chorobu, ale jiné autoimunity jako perniciózní anemii nebo vitiligo (82).

Prevalence asociovaných autoimunit u POF pacientů je asi 10-20%, v různých studiích až 40% nebo 55 % (83). Je známo, že v případě POF jsou nejčastějšími doprovodnými chorobami nemoci štítné žlázy (Hashimotova struma 15-37 %, Graves-Basedovova choroba 7-18%). Na druhé straně u pacientů s manifestním autoimunitním postižením štítné žlázy se následně přidružují poruchy ovariální funkce a to až v 30 % (84, 85). V 18% případů nacházíme rodinou anamnézu autoimunitního onemocnění štítné žlázy, proto by podrobná anamnéza a rutinní skrining funkce štítné žlázy měly patřit mezi základní vyšetřovací metody u všech pacientek s POF (86, 87).

Někteří autoři testovali séra idiopatických POF pacientů na velké množství orgánově specifických a nespecifických protilátek. Tento skrining nemá podle mnohých autorů význam pro diagnózu autoimunitní formy POF pro nízkou specificitu, ale ilustruje to frekvenci autoimunitního onemocnění při diagnostice ovariálních patologií (88, 89).

U polyglandulárního syndromu typu I jsou autoproti látky namířené proti jiným členům cytochrom P 450 enzymové rodiny, a to jmenovitě proti p 450- side- chain

cleavage enzymu (p450-scc), proti 17- α -hydroxylaze a proti nejasně vymezenému 51-kDa proteinu. Enzym p450 a 21-hydroxyláza jsou specifické pro nadledvinu, 17- α -OH je exprimována jak nadledvinou, tak gonádami, zatímco p450-scc je produkován v nadledvině, gonádách a placentě (91, 92). Protein 51-kDa je produkován Langerhansovými ostrůvky, granulózovými buňkami a placentou (93, 94, 95).

Velmi úzký vztah k reprodukčním neúspěchům, ale i poruchám menstruačního cyklu mají nálezy protilátek proti štítné žláze. Jsou to protilátky proti TSH receptoru (TRAK), charakteristické pro hyperthyreozu (Graves-Basedovova choroba). Protilátky proti thyroglobulinu (TG) a proti thyroideální peroxidáze (TPO), které se objevují jak při hyper tak při hypothyreozě (Hashimotova struma). Nález protilátek proti štítné žláze je významným markerem opakovaných těhotenských ztrát. Jak prokázaly in vitro studie je trijodtyronin důležitý pro proliferaci a diferenciaci buněk membrana granuloza. Následkem hypothyreozy může proto dojít k poklesu konverze ovariálních hormonů, což vede k nedostatečné luteální fázi (96).

Makroskopický vzhled ovarí s lymfocytární oophoritis bývá dle literatury buď cystický (50% případů), s malými a většími cystami nebo normální. Cystická formace je vysvětlována jako důsledek zvýšených hladin gonadotropinů u postižených pacientek (97).

Ve většině případů jsou primordiální folikuly nedotčené, stejně jako kůra ovária. Jsou to vyvíjející se folikuly, které jsou převážně infiltrované mononukleárními zánětlivými buňkami (98). Preantrální folikuly jsou ohraničeny malými lemy lymfocytů a plazmatických buněk, zatímco větší folikuly mají výraznou zánětlivou celulizaci externí a interní thékální vrstvy. Granulózová vrstva je běžně ušetřena tohoto procesu až do ovulace, kdy se objevuje degenerace folikulu. Při studiu postižených ovarí nacházíme zřetelnou infiltraci leukocytů ve stěně cyst s destrukcí lemujících buněk. Atretické folikuly a jsou-li přítomny, corpora lutea a albicantia jsou také infiltrovány. Mírná infiltrace může být v dřeni a hilové části ovarí.

Imunohistochemická analýza lymfocytární oophoritidy odhalila, že zánětlivé buňky patří převážně do skupiny T-lymfocytů (CD4+ a CD8+) s velkým množstvím plazmatických buněk, v malém množství jsou nalezeny také makrofágy a NK buňky. Plazmatické buňky hlavně sekretují IgG, ale také IgA nebo IgM. Participace T-lymfocytů u lidské oophoritis je prokazatelná z případů pacientek s autoimunitní thyroiditidou, adrenalitidou a POF, u kterých byl nalezen migration inhibiting faktor (MIF) produkován periferními T-lymfocyty, namířenými proti ovariálním a testikulárním

antigenům (99). MIF test je senzitivní antigen-specifický test produkce cytokinů, periferními krevními T-lymfocyty když jsou kultivovány za přítomnosti specifických antigenů. Bylo zjištěno, že granulozové buňky u POF pacientek jsou více senzitivní na γ -IFN, a jiné T-lymfocytární cytokiny, než normální granulózové buňky(100).

Estrogenní substituce prokazatelně snižuje počet aktivovaných periferních T lymfocytů u pacientek s POF, ačkoliv ne k normálním hladinám. *Ho a spol.* (117) také demonstroval důležitost určité estrogenní hladiny pro určité zastoupení subpopulací periferních lymfocytů. Mnozí autoři proto považují hypergonadotropní hypoestrinní stav u POF pacientek a postmenopauzálních žen za konkrétní příčinu zvýšeného počtu aktivovaných T-lymfocytů.

Výzkumy prováděné u pacientek s POF potvrdily, že se tedy patogeneticky může na onemocnění podílet autoimunitní poškození ovária, které řadí toto onemocnění mezi autoimunitní endokrinopatie a tento závěr je podporován: 1) přítomnost autoprotilátek proti steroidy produkujícím buňkám v séru postižených pacientek, 2) histologickým obrazem ovarí u některých případů (lymfoplasmacelulární infiltrát kolem steroidy-produkujících buněk).

Asi 60% zkoumaných případů pacientek s POF v různých studiích postrádalo ovariální folikuly a byly nalezeny jen fibrotické ovaria. U 40% pacientek byly folikuly detekovány jak v malém množství, tak v normálním počtu. Asi 10% folikulárních případů mělo velké množství primordiálních folikulů, tato skupina patří do obrazu syndromu rezistentního ovaria (ROS) (viz výše) (101).

V 1969 *Jones* (102) a *Moreas Ruehsen* (103) jako první informovali o třech pacientkách s ROS, také zvaných Savageové syndrom dle jména první pacientky. Syndrom byl definován jako současná přítomnost mnoha primordiálních folikulů v ovarích a hypergonadotropní hypoestrinismus a hyporeceptivita na vysoké dávky exogenních gonadotropinů, které byly podány k indukci ovulace u postižených pacientek. ROS pacientky se sekundární amenoreou byly prezentovány jako pacientky s POF (102, 103). Etiologie syndromu je neznámá, jakkoliv bylo vysloveno mnoho hypotéz. Příčinou může být chybění gonadotropinových či estrogenních receptorů, postreceptorová chyba, přítomností gonadotropinů s inadekvátní bioaktivitou nebo imunitní faktory jako jsou protilátky proti gonadotropinovým receptorům (104).

Postupně bylo stále jasnější z mnoha studií zabývajících se přítomností antiovariálních protilátek, že klinický obraz POF nekoreluje přímo s přítomností protilátek v séru. Mimo to výsledky dokazují stále více a více, že ačkoliv protilátky proti

ovariálním antigenům jsou běžně nalézány u pacientek s POF, jejich patogenní role je diskutabilní. Spíše se zdá, že mohou být následkem více než příčinou nemoci. Konfliktní výsledky byly také získány při vyšetření antireceptorových protilátek. Tyto protilátky mohou napodobovat akci hormonů, jestliže mají podobnou specificitu a afinitu pro receptor. Stimulující protilátky proti TSH receptoru jsou příčinou hyperthyreoidismu a strumy u pacientů s Graves-Basedovovou chorobou, nebo mohou blokovat akci korespondujícího hormonu, tím že stále obsazují receptor. Blokování receptoru jako příčina nemoci je popsáno například u myastenie gravis a některých forem inzulin-rezistentního diabetu a primárního hypothyreoidismu (105).

V jedné studii byly použity rekombinantní lidské humánní receptory k detekci údajné přítomnosti imunoglobulinů proti gonadotropinů nebo jejich receptorům v séru pacientů s POF. Autoři však nebyli schopni demonstrovat přítomnost blokujících protilátek proti LH nebo FSH receptorům ani u jedné z 38 POF sledovaných pacientek (106). Získané data o receptorových protilátkách u POF nejsou přesvědčivá, protilátky proti LH a FSH receptorům mohou existovat, ale jejich přesná role a prevalence se dále musí zkoumat (107).

Velmi důležitou roli hrají dle literárních údajů protilátky (AOP) proti zona pellucida (ZP). ZP je aceluární matrix, která ohraničuje vyvíjející se a ovulující oocyty a je také detekovatelná v atretických folikulech. AOP proti ZP jsou popisovány jako příčina nevysvětlitelné sterility žen, kde jsou tyto AOP prokazatelné v 5,6% případů, zatím co u normálních kontrol byla pozitivita nalezena jen u v 1,7 % případů (108,109). Autoprotilátky proti ZP nápadně interferují se spermie-oocytární interakcí a takto zřejmě mohou indukovat sterilitu. Pozitivita těchto autoprotilátek vedla u zvířecích modelů k folikulární depleci a amenoree. *Dean a spol.* (110) zabývající detekcí těchto protilátek pomocí ELISA metody detekoval pozitivitu AOP ZP u 3 z 34 sledovaných POF pacientek. Ale 3 z 6 postmenopauzálních žen byly také pozitivní, proto jsou zřejmě AOP proti ZP výsledkem ovariálního selhání a ne jejich příčinou (110).

U většiny sledovaných pacientek však chybí typický histologický obraz lymfocytární oophoritis. Hypoteticky mohou být přítomny antiovariální autoprotilátky v ovariu bez dosažení detekovatelných hladiny v séru nebo vyvolání lokálního zánětu. Histologie POF tedy sama od sebe nemůže soužit k diagnostice autoimunitní patologie ovariálního selhání. To se vztahuje k nálezů ovariální atrofie u většiny případů, což může reprezentovat poslední stádium autoimunitního procesu proti ovariálním strukturám (podobně na zvířecím modelu), ale může také reprezentovat finální depleci

oocytů způsobených genetickými vlivy či vlivy zevního prostředí. K diagnostice je tedy nutná kombinace přítomnosti antiovariálních protilátek a histologického nálezu biopsie ovária.

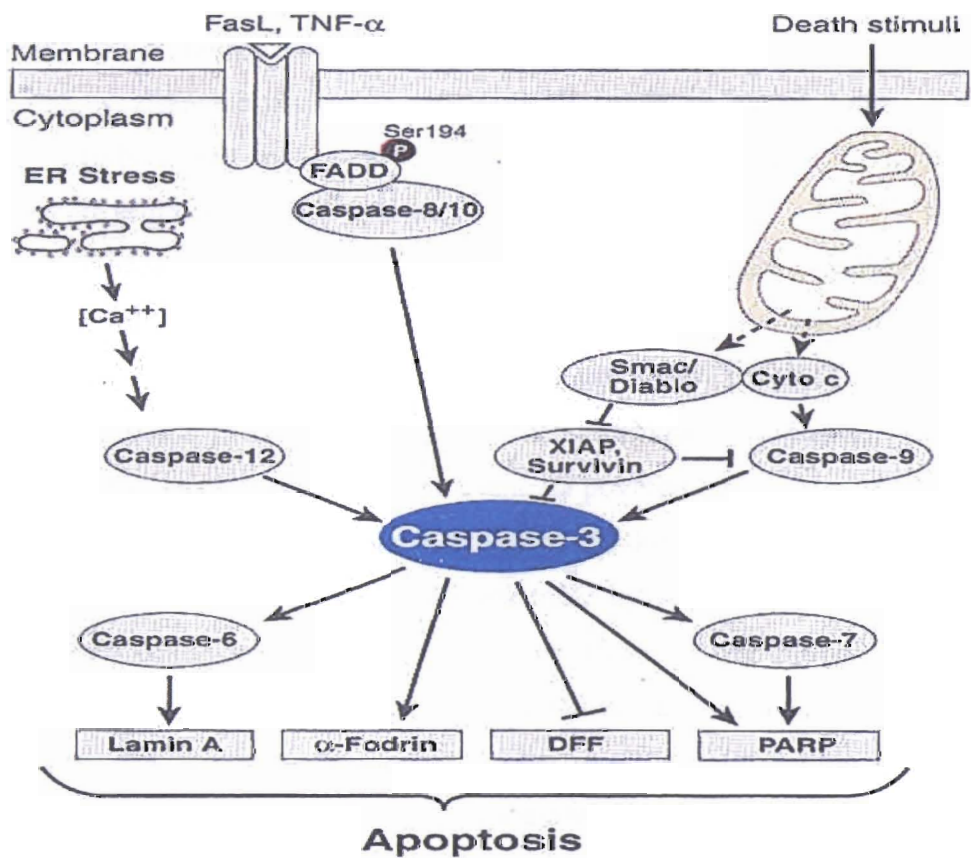
Nejčastěji nacházíme v ovariálních biopsiích postižených pacientek nález vystupňovaného zániku folikulů. Folikulární atrezie je přitom nejtypičtějším příkladem programované buněčné smrti, která probíhá v ovariu fyziologicky. U pacientek s autoimunitním onemocněním s tvorbou autoprotilátek proti ovariu nacházíme v ovariálních biopsiích obraz vystupňované buněčné smrti, apoptózy v různých stádiích vývoje. Ve folikulech lze pozorovat opožděnou tvorbu zona pellucida -v intercelulárních prostorech mezi cytoplazmatickou membránou oocytu a folikulárními buňkami, agregaci intermediálních filament, akumulaci mitochondrií, hyperchromatinizaci jádra atd..

Jak již bylo řečeno, onemocnění se prezentuje nejčastěji jako ovariální dysfunkce. Patofyziologicky se na ovariální dysfunkci ale také podílí např. chromozomální aberace (ovariální, gonadální dysgenese, Turnerův syndrom), které vedou ke změnám exprese membránových antigenů, což stimuluje apoptózu a zároveň s deplecí receptorů v postižených folikulech snižuje ovariální odpověď na hormonální stimulaci. Poruchy signální dráhy se uplatňují zvýšenými hladinami „second messengerů“, především cAMP a cGMP což vede ke stimulaci programované buněčné smrti, především ve vrstvě granulózových buněk. Abnormální hormonální stimulace (např. hyperandrogenismus) zvyšuje apoptotické procesy a akceleruje folikulární atrezii. Překonání fagocytární bariéry ovária iniciuje vznik endogenních antigenních determinant, což vede k rozvoji autoimunitního onemocnění a k produkci ovariálních protilátek. Hlavní efekt signálních molekul, především oxidu dusného (NO) a aktivních kyslíkových radikálů (ROS) je, že působí proapoptoticky, ale uplatňují se i v antigenní prezentaci. Zejména oxid dusný a jeho syntetáza (NOS) je velmi zajímavá i z hlediska průkazu iniciálních stádií apoptózy folikulů. Oxid dusný působí v nízkých koncentracích antiapoptoticky v koncentracích vysokých proapoptoticky. Tyto všechny etiologické činitele vedou společně k akceleraci programované buněčné smrti, následované restrikcí a vymizením folikulárního aparátu. Odlišit tedy příčinu vystupňované smrti v ovariu v autoimunitním postižení ovária je proto velmi složité a k detekci tohoto onemocnění zdá se může přispět sledování hladin antiovariálních protilátek.

Apoptóza je v dnešním pojetí zánik buňky způsobený aktivací Ced cysteinových proteáz a následně pak jaderných endonukleáz s atakou DNA, po čemž následuje

vyhasnutí a zánik veškerých biosyntetických funkcí buňky. V patogenetickém řetězci apoptózy, který je pravděpodobně společný jak fyziologické regulaci, tak indukci za patologických stavů se rozlišují 3 základní etapy: Etapa první: nastartování apoptotického procesu podnětem pocházejícím jak z extracelulárního tak intracelulárního prostředí, etapa druhá: aktivita systémů zachycujících tento signál a předávajících příslušný signál dále a třetí etapa: aktivita vlastního centrálního efektorového systému apoptózy, přestavovaná skupinou Ced. Klíčovou roli ve vývoji apoptotického procesu hraje kaspáza 3 (viz. schéma č. 2).

Schéma č. 2



Tento složitý enzym je ovládán řadou jiných kaspáz. Obecně lze říct, že existují dvě hlavní cesty stimulace kaspázy 3. Interní formu představuje generování zdroje signálu v mitochondriích, což vede k aktivaci kaspázy 3. Externí cesta je představována membránovými receptory (FASL, TNF α , růstové faktory, perforiny atp.), přes které se dostává proapoptotický signál do buňky. Po proniknutí signálu přes receptor do buňky dojde k aktivaci second messengerů s následnou aktivací kaskády kaspáz a v konečném

stádiu k aktivaci kaspázy 3. Ta se uplatňuje ve štěpení cytokeratinu 18, který je součástí intermediálních filament. Pokud si označíme monoklonální protilátku proti štěpným produktům cytokeatinu 18, můžeme sledovat kaspázovou aktivitu v místech, kde dochází k agregaci intermediálních filament. Tím můžeme již na úrovni světelné mikroskopie sledovat iniciální stadia apoptózy, zjištělná dosud jen morfologickými změnami na úrovni elektronového mikroskopu. Místa aktivity kaspázy 3 lze tedy sledovat na elektronmikroskopické úrovni při morfologické analýze ovariálních biopsií jako agregáty intermediálních filament (111).

Jak již bylo řečeno inadekvátní biologická odpověď ovárií na gonadotropinovou stimulaci a následné zvýšení gonadotropinů vede v ovariu k folikulární restriksi a k akcelerované apoptóze. Velmi složitý je proto tento problém u pacientek sterilních a léčených pro sterilitu. Obecně jsou pacientky s antiovariálními protilátkami typicky tzv. "low responderi" při stimulaci ovulace gonadotropiny. Také zisk oocytů u těchto pacientek je velmi nízký, získané oocyty se špatně fertilizují a počet získaných embryí je také velmi nízký. Tento fakt jsme dokázali především v naší studii u pacientek léčených pro sterilitu, v literatuře se podobné údaje vyskytují jen sporadicky.

U postižených pacientek se ani vysoké hladiny FSH již nemohou výrazněji uplatnit v pokračování folikulogeneze. U skupin pacientek s poruchami menstruačního cyklu lze pozorovat abnormální lokalizaci gonadotropinových receptorů. Jako opodstatněná se zdá představa, že se může jednat o poruchu recyklace cytoplasmatické membrány, a proto nejsou uvedené receptory vystavené na povrchu oocytu. Je ale také nutné vzít v úvahu možnou genetickou mutaci receptprů, která je dle literatury popisována především u mužů. Receptorový deficit pak může být příčinou nedostačující odpovědi ovária na hormonální signál základního systému řízení na ose hypotalamus-hypofýza-ovarium z toho resultující syndrom rezistentního ovária, vysoké hladiny FSH tedy nejsou provázeny pokračováním folikulární diferenciaci, ba naopak mohou být startovacím mechanismem kaskády procesu programované buněčné smrti - apoptózy.

Zatímco receptory pro FSH hrají rozhodující roli v iniciální stimulaci primárních folikulů při vstupu do diferenciačního procesu vývoje folikulu sekundárních a terciárních. Receptory LH se pak rozhodujícím způsobem uplatňují při výběru dominantního folikulu a v procesu přeměny primárního oocytu v sekundární, tedy odbrzdění meiotického dělení a vzniku pólového tělíska. V obou případech jde o děje multifaktoriální pro jejichž nástup i pokračování musí být vytvořeny podmínky. Ve sféře neurohumorální regulace gonád jsou to snad na prvním místě receptorově

zprostředkované účinky nadledvinových androgenů a gestagenů, jakož i steroidní hormony ovariální provenience.

S rozvojem detekce autoimunitního postižení ovária byly zahájeny pokusy o léčbu tohoto onemocnění. Možný efekt imunosuprese pomocí kortikosteroidů na opětovné zahájení ovariální funkce byl doporučen několika autory a dokumentován studii, zároveň s konstatováním, že jde o důkaz autoimunitní etiologie tohoto onemocnění. V literatuře šlo však vždy jen o kazuistiky, není přítomna souvislá studie u více pacientek a proto byly zkoušeny různé typy a schémata terapie, což přispívá k rozporům mezi jednotlivými studii. U dvou pacientek se sekundární amenorheou, zvýšenými gonadotropiny a perifolikulární lymfocytární infiltrací, se menstruace objevila po 1 měsíci kortikosteroidní terapie, ale pacientky neotěhotněly (112). Jiná kazuistika uvádí pacientku, která byla léčena estrogen-replacement terapií pro POF >15 let, s rozvinutou Addisonovou nemocí, výsledkem bylo spontánní a fyziologické těhotenství po jednom roce kortikosteroidní terapie (113). V další studii dvě pacientky s dokumentovaným POF otěhotněly a porodily zdravé děti po vysoké dávce kortikosteroidů, ale v obou případech se po těhotenství POF vrátilo (114). Další studie u 2 z 11 idiopatických POF pacientek po podání vysoké dávky kortikosteroidů popisuje po 15 dnech návrat ovariální funkce a následné těhotenství. V jiných pokusech 15 POF pacientek vybraných pro sdružené autoimunitní onemocnění bylo léčeno hMG a kortikosteroidy po hypofyzární desenzitizaci pomocí GnRh agonistů. Osm z nich otěhotnělo ^{aa}nejméně jednou a celkově bylo popsáno 14 těhotenství, porozeno bylo 10 dětí. Všechny tyto těhotenství nastaly v průběhu 3 měsíců od začátku léčby (115).

Pokud lze tuto léčbu tolerovat a užít, pak zřejmě jen v krátkém období, kdy žena chce otěhotnět, dlouhodobou kortikoidní léčbu však pro své vedlejší účinky (zejm. na kostru) nepovažujeme za vhodnou. Na druhé straně spontánní těhotenství byla popisována u POF pacientek i při chybění jakékoliv terapie (118).

Ve velké většině případů neznáme primární příčinu autoimunitních chorob, proto je jedinou možností jejich léčby použití imunosupresivních látek, které nespecificky potlačují aktivitu lymfocytů a působí protizánětlivě. Imunosupresivní léčba se používá převážně u pacientů se systémovými autoimunními chorobami. U autoimunních chorob orgánově specifických, mezi která zdá se patří i autoimunitní poškození ovária se imunosupresivní látky aplikují jen omezeně. Manifestace těchto onemocnění je obvykle výsledkem ireverzibilního zničení tkáně autoimunitním procesem a proto je na místě léčba substituční. Imunoterapie je dosud jen experimentální způsob léčby, který se nyní

ověřuje na zvířecích modelech. Nejvíce se zatím používají inhibitory TNF, ať už je to solubilní receptor pro TNF (ethanercept) nebo monoklonální protilátka proti TNF (infiximab). Nevýhodou léčby inhibitory TNF je fakt, že po přerušení léčby dojde opět k relapsu onemocnění. Vedlejšími účinky léčby je snížení antiinfekční obrany pacienta, zejména reaktivace tuberkulózy (1).

Cílem naší studie bylo zmapování výskytu orgánově specifických autoprotiátěk proti složkám ovaria u dívek a žen sledovaných pro poruchy menstruačního cyklu, sterilitu a infertilitu ve srovnání s výskytem antiovariálních protilátek v populaci zdravých žen. Byly sledovány protilátky proti zárodečným buňkám a steroidy produkujícím buňkám (116). V indikovaných případech u dívek s pozitivitou antiovariálních protilátek, bylo v rámci biopsie ovariální tkáně provedeno i vyšetření ovariální tkáně pomocí imunohistochemických metod, jež umožnily pozorovat morfologické změny ovaria u postižených žen (119, 120). U pacientek léčených pro infertilitu a sterilitu do IVF programu jsme korelovali hladinu AOP protilátek s úspěšnou fertilizací a otěhotněním pacientek (121). V šestiměsíčním odstupu po zavedení léčby, která nastartovala arteficiální cyklické změny, bylo u skupiny dívek léčených pro poruchy menstruačního cyklu provedeno kontrolní vyšetření hladiny antiovariálních protilátek

4. METODY

Standardním postupem který jsem v naší studii použili pro stanovení protilátek (jako mnozí autoři) metoda nepřímé imunoflorescence. Jako cílový orgán byla použita ovária pohlavně zralých krys kmene Wistar, zpracovaná s použitím Tissue-tec media v kryostatu na řezy o síle 6-8 μ m. Po ověření zachování antigenních determinantů u různých fixačních postupů (formaldehyd, glutaraldehyd, metanol) byla jako rutinní použita modifikovaná aldehydová směs podle Karnovského (2% formaldehyd, 2,5 % glutaraldehyd v 0,08 M Na-kakodylátovém pufru pH 7,4 s 25 mg CaCl₂ na 100 ml směsi). Výhodou tohoto postupu bylo i simultánní využití této směsi jako prvního fixačního kroku při zpracování materiálu pro elektronovou mikroskopii. Současně s řezy ovária byly zpravidla lepením 1% kamencovou želatinou na podloží sklo zachyceny i řezy z nadledviny pro ověření reaktivity dalších steroidy-produkujících buněk. řezy byly až do použití uchovávány při teplotě -15°C.

Po opakovaném ověření byla rovněž použita parafinová technika a kromě imunofluorescenčního pükazu ovariálních protilátek (obr. č. 1 a 2) aplikována imunohistochemicky metodika se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou (obr. č. 3). Parafinové řezy byly lepeny 1% želatinou k popotlačení případné interference vazebných míst při lepení směsí bílku s glycerinem.

Technika parafinového postupu byla rovněž použita pro zpracování bioptických vzorků lidských ovarií získaných v indikovaných případech při laparoskopická biopsii ovária. Část materiálu byla současně zpracována pro elektronovou mikroskopii po dvojité fixaci (Karnovského směs, 1,33% OsO₄ v 0,66 m Na-kakodylátovm nárazníku pH 7,4) zalitím do Eponu 912.

Rovněž eponové polotenské řezy byly použity pro detekci vazebných míst pro autoprotilátky ve vlastním séru pacientky po „deponování“ etanolátem sodným. Podobně byly ultratenké řezy využity pro zjištění lokalizace antigenních determinantů pro autoprotilátky „postembedding technikou“ s použitím kozího protilidského séra značeného definovanými částicemi koloidního zlata.

Z hlediska přístupnosti antigenních determinantů ve vyšetřovaném vzorku byla rovněž aplikována zalévací média typu derivátů kyseliny akrylové. V našem případě jsme použili média LR White, které navíc dovoluje provedení dehydratace i prosycení médiem při snížené teplotě. Polymerace byla iniciována UV zářením v chladícím boxu při teplotách -5° až -15 °C.

Kryostatové neparafinované řezy byly v prvním kroku inkubovány s vyšetřovaným sérem. V běžném postupu bylo používáno sérum neředěné, později jsme vycházeli ze základního ředění 1:1 (PBS). 30 min. inkubace probíhala ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po důkladném opakování vyprání v PBS následovala postinkubace, prokazující navázané sérové protilátky na cílové struktury. Pro omezení možnosti nespecifických vazeb detekční protilátky na struktury v řezu je výhodné jejich vysycení 5% hovězím sérovým albuminem (BSA). Tento postup však bylo třeba použít pouze při testování na neparafinovaných řezech.

Zpočátku jsme k detekci antiovariálních protilátek používali vzorky lidských ovárií, ale pro jejich nedostatek jsme se snažili najít dostupnější materiál. V literatuře je uvedeno velké množství informací o použitých cílových orgánech k detekci protilátek proti ováriu, od opičích až po myši. My jsme pro snadnou dostupnost zvolili právě ovária pohlavně zralých krys. Po důkladné kontrole, kdy jak při použití lidských i kryších ovárií jako cílových orgánů získali naprosto identické výsledky jsme dále užívali již jen krysí ovária.

K postinkubaci byla rutinně užitá prasečí protilátka proti lidskému imunoglobulinu značená fluoroisothiocyanátem (SwAHu/Ig FITC) s PBS v poměru 1:20 (1:50). Pro každou novou frakci bylo testováno optimální ředění. Detekční sérum bylo aplikováno s 0,01 % Evansovy modři a postinkubace trvala opět 30 min. V rutinním postupu byl užíván Ig komplex (IgG, M, A) pro upřesnění tříd imunoglobulinů byly použita protilátky proti IgG, IgA, IgM a v omezeném měřítku i IgE. Každé stanovení protilátek bylo doplněno pozitivní a negativní kontrolou. Po opětovném důkladném vyprání byly řezy montovány do Mowiolu a vyšetřovány ve fluorescenčním mikroskopu FLUOVAL (Zeiss) a Leova DMLS při vlnové délce excitačního světla 490 nm. Na ováriu se vyhodnocovaly následující struktury:

1. ooplasma OO
2. zona pellucida ZP
3. buňky membrána granuloza MG
4. buňky theca folliculi interna (TI)
5. luteinní buňky LB

Kromě jednotlivých pozitivit byl pro každé vyšetřované sérum stanoven sumář pozitivit (SU) jako součet struktur, jehož dimenze byly mezi 0-5.

U části vyšetřovaných sér bylo rovněž použito klasického imunohistochemického průkazu, při němž byla sekundární protilátka (SwAHU/Ig Pox)

značená peroxidázou a pro specifickou vazbu protilátek proti zona pellucida pak i monoklonální protilátky připravené ve FÚ AV ČR.

Ultratenké řezy, připravené z eponovaných nebo LR Whitových bloků, a zachycené na niklových sítkách byly po předchozím působení tritonu X 100 (0,5%) inkubovány na kapce vyšetřovaného séra (1:1) po dobu 60 min. Po důkladném vyprání sítěk v destilované vodě následovala postinkubace na kapce kozího protilidského imunoglobulinu (1:20), který byl značen koloidním zlatem (GAHu Ig/10 nm Au). Po opětovném důkladném vyprání následovalo běžné kontrastování uranylacetátem a citronanem olova a vyšetření v elektronovém mikroskopu JEM 100 B a Tesla BS 500 (obr. č. 4).

Submikroskopické nálezy zmnožení cytoskeletových komponent ve folikulárních buňkách i oocytech nás vedl k závěru, že bude třeba věnovat soustředěnou pozornost procesům zániku sledovaných buněčných složek. Proto jsme se v dalším výzkumu orientovali na průkaz apoptotických procesů a to v první etapě sledováním kaspázy 3. Pomocí protilátky M 30 CytoDeath byly detekovány degradační produkty cytokeratinu 18, štěpných produktů kaspázy 3, jak ve folikulárních buňkách tak i oocytech. Kolokalizace imunopozitivity ve zmíněných strukturách tak mohla být akceptována jako doklad apoptotického procesu, který představuje nejčastější mechanismus zániku buněčných elementů a jejich produktů v kůře ovaria.

Zaměřili jsme se tedy na sledování procesů programované buněčné smrti na úrovni submikroskopické a průkaz pomocí imunohistochemicky detekce používaných markerů (TUNEL-fragmentace DNA M30 CytoDeath- průkaz štěpení cytokeratinu 18 aktivovanou kaspázu 3, Annexin V) (obr. č. 5 a 6).

TUNEL (terminal deoxynukleotid transferase (TDT)-mediated dUTP nick-end-labelling), metoda využívající enzym (TDT), který prodlužuje přerušené řetězce templář-nezávislou cestou (na rozdíl od DNA polymerázy). V reakční směsi jsou nukleotidy konjugované s epitopem detegovány. Řetězec navázaných nukleotidů detegovaných pomocí monoklonální protilátky značené křenovou peroxidázou je pak příčinou pozitivního, typicky hnědo-červeného zbarvení apoptotických jader (obr. č. 6).

Pro vysvětlení rychlého nástupu deplece folikulárního aparátu ovariální kůry jsme se pokusili nalézt možný signální mechanismus, který by se účastnil při nastartování změn buněčného cyklu germinativního epitelu i stromálních buněk. Ukázalo se, že takovou signální strukturou by mohl být oxid dusnatý (NO), či přesněji Nitric oxide synthase (NOS), proto jsme se zaměřili na imunohistochemicky průkaz

přítomnosti NOS ve strukturách kůry ovária. Pokusili jsme se tedy detekovat NOS pomocí protilátek značených opět křenovou peroxidázou (viz. obr. 8).

Dále jsme se pokusili vysledovat expresi FSH, LH, estrogenních a progesteronových receptorů v ovariálních komponentách, i když jejich výskyt a regulační význam je téměř ubikviterní (nosní sliznice, slinné žlázy, tonsily, svalová tkáň, endometrium). Sledování FSH receptorů bylo možné na kryostatových, parafinových i polotných deeponizovaných řezech (Obr. č. 9). U LH receptorů jsme mohli prakticky využít jen řezů kryostatových, kdy ani technika vystavení antigenních determinant receptorů varem v citrátovém pufru v mikrovlné troubě nepřinesla podstatný efekt. Je však třeba vzít v úvahu, že jejich exprese je časově limitovaná očekávaným vrcholem uvolňování LH za situace, kdy je v ováriu připravena skupina terciárních folikulů, což bylo u našich postižených pacientek velmi vzácné. Dalším limitem byla velikost vzorku získaného při laparoskopickém odběru, který po zpracování pro elektronovou mikroskopii neposkytuje reálnou šanci kryostatového zpracování.

Na rozdíl od FSH a LH receptorů se steroidní receptory vyskytují především ve frakci cytosolové a nukleární. Jejich membránová lokalizace je stále ještě diskutována jako sporná a to vzhledem k jejich solubilitě ve fosfolipidové komponentě biologické membrány a tedy jejich rychlé a bezproblémové internalizaci. Pro imunodetekci bylo použito Mouse Anti-Human Estrogen (případně progesterone) Receptor Monoclonal antibody (Chemicon USA) s fluorochromem značeným Goat Anti-Mouse IgG Cy 3 Conjugate (Zymed Laboratoriem, USA), případně Texas Red (Obr. č. 10). Použití Cy3 fluorochromu (Obr. č. 11 a 12) nabízí možnost podstatně delší expoziční identifikace ve fluorescenčním mikroskopu v porovnání s FITC.

Hormonální hladiny byly stanovovány metodou EIA (ABBOTT) imunoanalytické laboratoře Kliniky nukleární medicíny FNM.

Ke statistickému zpracování dat byl použit test shody parametrů π_1 a π_2 alternativního rozdělení (relativních četností výskytu jednotek s určitou vlastností ve dvou souborech – oba soubory musí být nezávislé). Na 5% hladině významnosti zamítáme testovanou hypotézu ($\pi_1 = \pi_2$), ve prospěch alternativní hypotézy, tzn., že $\pi_1 < \pi_2$.

Testovali jsme hypotézu, kde $H_0: \pi_A = \pi_B$, tj. podíl pozitivních zdravých pacientek v kontrolní skupině je stejný jako ve skupině nemocných pacientek, proti

alternativní hypotéze $H_1: \pi_A < \pi_B$, kde podíl pozitivních zdravých pacientek v kontrolní skupině je menší než ve skupině nemocných pacientek.

Test se provádí na základě testového kritéria

$$U = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{p(1-p)} \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}},$$

kde $p_1 = \frac{m_1}{n_1}$, $p_2 = \frac{m_2}{n_2}$ jsou výběrové podíly v prvním a ve druhém výběru a

$$p = \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}.$$

Volíme 5% hladinu významnosti (tj. 5% riziko omylu, na které jsme ochotni při testu přistoupit – test tedy provádíme s 95% spolehlivostí), značíme $\alpha = 0,05$. Kritický obor pro levostranný test (tj. pro $\pi_A < \pi_B$) je $W_\alpha = \{U; U \leq -u_{1-\alpha}\}$, kde $-u_{0,95} = -1,64486$ je kvantil normovaného normálního rozdělení neboli kritická hodnota.

Alternativním způsobem je výpočet tzv. „vypočítané hladiny významnosti“ ((HV), P-value). Pro tento způsob platí následující - jestliže $HV \leq \alpha$, zamítáme H_0

$$HV = P(U \leq -8,05283) = 0,00000, \text{ takže } HV = 0,00000 \leq \alpha = 0,05$$

Závěr: $U = -8,05283 \in [0,00000]$ zamítáme testovanou hypotézu H_0 .

Ke statistickému zpracování dat získaných od pacientek léčených 6 měsíců HRT jsme použili McNemarův test (test pro významnost změn), který byl použit proto, že se jedná o případ závislých výběrů. Zde sledujeme u každé pacientky výskyt uvedených protilátek před léčbou a po léčbě.

H_0 : "Procento pozitivního výsledku před léčbou je stejné jako po léčbě."

H_1 : "Procento pozitivního výsledku před léčbou není stejné jako po léčbě."

		po léčbě		
	před léčbou	0	1	Celkem
0		a	b	a + b
1		c	d	c + d
Celkem		a + c	b + d	n

$$\chi^2 = \frac{(b - c)^2}{b + c}$$

Testovaná hypotéza se zamítá pokud $\chi^2 > \chi^2_{1-\alpha}(1)$, kde při 5% hladině významnosti je $\chi^2_{1-\alpha}(1) = \chi^2_{0,95}(1) = 3,84$.

Ke statistickému zhodnocení hladin FSH, LH a jejich poměru jsme využili analýzu rozptylu.

Testuje se hypotéza, že střední hodnoty v různých výběrech jsou stejné

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_1: \text{non } H_0$$

$$\text{TK: } F = \frac{\frac{S_{y,m}}{k-1}}{\frac{S_{y,v}}{n-k}} = \frac{\sum_{i=1}^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 n_i}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2} \quad F \approx F(k-1, n-k), \quad \text{kde } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k \bar{x}_i n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

$$W: \{F; F > F_{1-\alpha}(k-1, n-k)\}$$

5. STUDOVANÉ SOUBORY PACIENTEK

5.1. Kontrolní skupiny zdravých žen a dívek

Jako kontrolní skupina byly vybrány tři skupiny žen a dívek. Účelem bylo zjistit prevalenci antiovariálních protilátek ve zdravé populaci a tím i důkaz vztahu ovariální patologie a výskytu antiovariálních protilátek. V literatuře panuje velké množství kontroverzních nálezů při zjišťování přítomnosti antiovariálních protilátek jak ve zdravé populaci žen, tak ve skupině pacientek nemocných, což souvisí mimo jiné s rozdílnými postupy vyšetřování hladin autoprotilátek u jednotlivých autorů a různými a různě definovanými soubory vyšetřovaných pacientek (117).

První skupinu tvořilo 41 dárek krve, průměrný věk 32,3 roky (rozmezí 32-39 let). Překvapivý výskyt autoprotilátek u zdravých žen nás vedl k provedení retrospektivní analýzy anamnestických dat a po individuálním ověření se ukázalo, že jedna z žen měla spontánní potrat na konci 2. měsíce těhotenství gravidity, druhá vyhledala antisterilní poradnu pro potíže s otěhotněním, dalších 6 žen uvádělo poruchy menstruačního cyklu (4x nepravidelný cyklus, 2x oligomenorea). Tyto ženy byly proto z kontrolní skupiny vyřazeny. Pouze u jedné ženy nebylo nalezeno žádné vysvětlení pro pozitivitu protilátek proti LB buňkám.

K ověření v literatuře uváděné 5 % positivity antiovariálních protilátek v populaci zdravých žen jsme provedli vyšetření prevalence těchto protilátek v dalších skupinách zdravých žen a dívek. Druhou kontrolní skupinu proto tvořily pacientky ambulance gynekologie dětí a dospívajících před zavedením hormonální antikoncepce. Vyšetřeno bylo 30 pacientek, průměrný věk 21,3 roky (rozmezí mezi 16-24 let).

Ve třetí skupině pacientek před podáním hormonální antikoncepce bylo vyšetřeno 23 dospělých pacientek gynekologické ambulance Gynekologicko-porodnické kliniky UK 2.LF a FN v Motole, průměrný věk 32,08 roků (rozmezí 21-38 let). U všech 53 pacientek z těchto dvou skupin jsme provedli odběr krve k detekci antiovariálních protilátek v rámci preventivního vyšetření před zavedením hormonální antikoncepce.

5.2. Skupina dívek s poruchami menstruačního cyklu

Tato skupina představovala hlavní vyšetřovaný soubor. Po dobu mého postgraduálního studia bylo vyšetřeno 110 pacientek, které byly hospitalizované nebo

ambulantně léčené na Gynekologicko-porodnické klinice a Klinice gynekologie dětí a dospívajících UK 2.LF a FN v Motole. Z tohoto souboru bylo 63 patientek vyšetřováno pro primární amenoreu a 47 patientek pro oligomenoreu či sekundární amenoreu.

Vyšetření antiovariálních protilátek jsme zahrnuli do základního vyšetření, které provádíme na našem pracovišti u patientek se závažnou poruchou menstruačního cyklu. Odběr je součástí rutinního vyšetřování v rámci tzv. estrogenového testu neboli testu funkčnosti pozitivní zpětné vazby.

Primární amenorea je stav, při kterém pacientka nemenstruuje po 15 roce života. V našem souboru trpělo touto poruchou 63 patientek, průměrný věk 15,2 let (rozmezí 10-23 let). Ze skupiny jsme vyloučili všechny pacientky s fyziologicky pozdějším nástupem puberty, kde bylo možno anamnesticky zachytit hereditárně pozdní výskyt menarché v rodině, především u matky a babiček. Pacientky s primární amenoreou byly standardně vyšetřeny gynekologicky s posouzením vývoje sekundárních pohlavních znaků, následovalo vyšetření vývoje vnitřního genitálu palpací a ultrazvukem. Další součástí vyšetření bylo hodnocení ochlupení pomocí skóre podle Ferriman-Gallwyerové, byl proveden odběr krve ke stanovení hormonálního profilu (hladin FSH, LH, estradiolu, progesteronu a prolaktinu). Ke zhodnocení stavu periferní estrogenizace používáme hormonální funkční poševní cytologii, jako jednoduchou a rychlou klinickou metodu hodnotící účinek hormonů (především estrogenů) na snadno dostupnou cílovou tkáň - na pochvu (viz. obr. č. 15, 16), proto součástí vyšetření byl odběr hormonální poševní cytologie. Rentgenovým vyšetřením ruky jsme hodnotili kostní věk podle Tannera a Whitehouse. Následně byl patientkám aplikován Agofollin i.m. v dávce 2,5-3 mg a poté byl proveden odběr FSH a LH za tři a čtyři dny po aplikaci k zjištění, zda je již funkční pozitivní zpětná vazba. Při odběru krve první den testu byl rovněž odebrán vzorek krve, ze kterého se následnou centrifugací oddělilo sérum a to bylo po zmrazení na -20 °C použito ke stanovení výskytu antiovariálních protilátek.

Pacientky s oligomenoreou a sekundární amenoreou představovaly pestrý soubor patientek. Soubor sestával ze 47 patientek průměrného věku 15,9 let (rozmezí 13-22). Část souboru tvořily dívky s mentální anorexií (n=10) s prudkým poklesem váhy a tím rezultující sekundární amenoreou, nebo dívky s postupně se zhoršující oligomenoreou až se sekundární amenoreou, při současném nálezu hypoestrinismus (hormonální hladina, poševní hormonální cytologie atd.). U tří patientek jsme v průběhu vyšetřování zjistili poruchu štítné žlázy s následnou léčbou v Endokrinologickém Ústavu AVČR v Praze. Všechny pacientky byly vyšetřeny stejně jako pacientky s primární amenoreou.

Nejprve bylo provedeno gynekologické vyšetření zahrnující vyšetření palpační a ultrazvukové ke zhodnocení event. hypoplazie vnitřního genitálu, zhodnocení přítomnosti involuce sekundárních pohlavních znaků (v důsledku hypoestrinismus), vyšetřili jsme hormonální hladiny (hladina FSH, LH, estradiolu, progesteronu a prolaktinu) a funkční hormonální poševní cytologii. Při odběru krve v rámci hormonálního profilu byl proveden odběr krve, z které se následnou centrifugací oddělilo sérum a to bylo opět po zmrazení použito k detekci antiovariálních protilátek.

5.3. Skupina pacientek léčených pro sterilitu

Ke zjištění výskytu protilátek proti jednotlivým ovariálním strukturám a vztahu jejich přítomnosti k reprodukčnímu úspěchu bylo vyšetřeno 90 žen s reprodukčním problémem sledovaných a léčených v antisterilní poradně Gynekologicko-porodnické kliniky FN v Motole, u nich byla léčebnou metodou in vitro fertilizace (IVF). Věk sledované skupiny byl 28 let (rozmezí 22-34 let) let a klíčem k zařazení bylo pořadové číslo při indikaci této léčebné metody. U všech pacientek byla vyšetřena hladina antiovariálních protilátek v séru a ve folikulární tekutině proti jednotlivým strukturám ovaria (proti OO, ZP, MG, TI, LB).

K hodnocení prevalence antiovariálních protilátek v séru byly pacientky rozděleny nejprve do dvou skupin, na pacientky, které otěhotněly (n=27) a na ty, které neotěhotněly (n=63).

Hodnocení dále vycházelo ze vztahu koncepčního úspěchu, a proto jsme podle výsledku pacientky rodělili do 4 skupin:

- otěhotnění (n=27)
- fertilizace, ale bez těhotenství (n=40)
- oocyt se nepodařilo fertilizovat (n=15)
- nezískán žádný oocyt (n=8)

a v těchto jednotlivých skupinách jsme sledovali přítomnost protilátek ve folikulární tekutině proti jednotlivým strukturám ovaria. .

V rámci základního vyšetření byly tyto pacientky v ambulanci pro poruchy plodnosti vyšetřeny tak, že bylo provedeno vyšetření hladin FSH, LH, estradiolu a progesteronu, odběr byl proveden 8. den menstruačního cyklu.

5.4. Pacientky indikované k laparoskopické biopsii ovária

Po vyšetření hladin antiovariálních protilátek a funkčních testů u pacientek s primární a sekundární amenoreou, které odhalily hormonální poruchu na úrovni ovária byla část pacientek indikována k laparoskopické biopsii ovária. V této skupině bylo 30 pacientek, z nichž 17 bylo indikováno pro primární amenoreu a 13 pro sekundární amenoreu. Průměrný věk pacientek byl 18 let. Základní spektrum vyšetření těchto pacientek je shrnuto v tabulce č. 1

Z tohoto souboru jsme po vyšetření karyotypu diagnostikovali v jednom případě syndrom testikulární feminizace, u pěti pacientek s primární amenoreou jsme diagnostikovali mozaikový karyotyp, nejčastěji 46 XX/45 X0 a 46 XX, 21 ps.

Tab. č. 1

r.č.	věk	Dg	OO	ZP	MG	TI	LB	SU	karyotyp	FSH	LH	E2	PRL	Prog
X1	17,8	OSA	0	0	0	1	1	2	46 XX	3,4	7,7	1,8	7,2	
X2	17,5	OSA	0	0	1	1	1	3	46 XX	5,3	37,0	0,4	14,0	
X3	16,2	PA	0	1	1	1	1	4	46 XX	7,5	13,0	0,3	6,9	
X4	23,8	OSA	0	0	1	1	1	3		3,4	6,5	1,9		12,0
X5	18,2	PA	0	0	0	1	1	2	46 XX,6 % 45 X	73,0	39,0		21,0	
X6	18,2	PA	0	0	1	1	1	3	46 XX	4,2	11,0		35,0	
X7	17,5	SA	0	0	0	1	1	2	46 XX	10,0	10,0	0,3		0,8
X8	17,2	SA	0	0	1	1	1	3		3,3	0,0		2,9	
X9	15,9	OSA	1	1	1	1	1	5		8,1	17,0	0,2	5,4	
X10	18,2	PA	0	0	1	1	1	3		7,2	5,8	100,0	379,0	1,2
X11	22,3	PA	0	0	0	0	1	1	46 XX	3,1	1,3	0,0	8,0	0,0
X12	28,5	SA	0	1	1	1	1	4		80,0	68,0	110,0	30,0	3,9
X13	34	SA								56,0	38,0	61,0	16,0	
X14	19,5	PA	0	0	0	1	1	2	46 XX	2,0	0,4	149,0	16,1	0,4
X15	16,4	SA	0	0	0	1	1	2						
X16	24,2	PA	0	0	1	0	1	2	46XX,5 % 46 X	86,5	59,5	72,0	0,5	0,3
X17	27,4	SA	1	1	1	1	1	5		8,1	2,7	42,0	221,0	0,3
X18	26,8	PA	0	0	0	0	0	0	46 XX	1,3	0,4	36,7	307,0	0,8
X19	31,2	SA	0	0	1	1	1	3						
X20	18,1	SA	0	0	0	0	1	1						
X21	X36												

5. 5. Skupina pacientek vyšetřovaných opakovaně a léčených hormonální substituční terapií

V současné dětské gynekologii je kromě kauzálního a rekonstrukčního chirurgického přístupu metodou volby také „estrogen replacement therapy“ a „hormone

replacement therapy“ (ERT/HRT). To vychází z předpokladu, že hormonální substituční terapie uvede ovárium do funkčního klidu a jako každá substituční léčba endokrinního orgánu vede k jeho inaktivitě s eliminací antigenní imunizace, u ovaria navíc i k zástavě růstu folikulů. Protože právě rostoucí folikuly jsou nejčastěji zdrojem autoantigenních epitopů, nejčastěji zde nacházíme monocyto-makrofágovou infiltraci, uvedení ovária do klidu může vést k snižování úrovně antigenních podnětů, což se projeví snížením množství autoprotilátek.

Léčený soubor se skládal ze 42 pacientek v průměrném věku 15,9 let (rozmězí 11-23 let). Pacientky v tomto souboru trpěly poruchou menstruačního cyklu, 25 pacientek se léčilo pro primární amenoreu, 17 pro oligomenoreu a sekundární amenoreu. 25 pacientek z tohoto souboru bylo indikováno k laparoskopické biopsii ovária (viz. soubor 5.4.).

Dávkování a postup při podávání ERT/HRT vychází z obecně uznávaného principu „tailor made therapy“. Tento postup spočívá v podávání malých dávek estrogenů za pravidelných kontrol. Ke zhodnocení účinku estrogenů používáme hormonální funkční poševní cytologii, jako jednoduchou a rychlou klinickou metodu hodnotící účinek hormonů (především estrogenů). Dosažení obrazu pozdní proliferace pak určuje okamžik, kdy režim pouze estrogenové terapie měníme na bifázickou estrogen-progesteronovou HRT. Příznivým jevem jsou nejen změny a úpravy klinického stavu (navození umělého cyklu s příznivým vlivem na dělohu, tělesný vývoj a vzhled pacientky), ale především což nás u dospívajících hypoestrinních pacientek trápí nejvíce, vliv na kostní metabolismus. Zároveň předpokládáme zmenšení a vymizení antigenních podnětů, to se projevuje poklesem protilátek proti ováriu což jsme na základě opakovaného doberu krve k detekci antiovariálních protilátek potvrdili.

Po vyšetření pacientek z tohoto souboru a po laparoskopické biopsii ovária v indikovaných případech, byly tyto pacientky zařazeny do léčebného schématu, kdy se v první fázi aplikoval estradiolum hemihydriate (Estrofem 1-2mg tbl.) denně či ob den za pravidelné kontroly hormonální cytologie a ultrazvukového změření výšky endometria. Po nástupu známek pozdní proliferace (obr. č.17) v hormonální cytologii a při výšce endometria alespoň 6 mm (viz. schéma č. 3) byl nasazen gestagenní preparát (Provera 10 mg či Duphaston 10 mg) nejčastěji v režimu ob den 8-10 dní, po vysazení terapie se dostavilo menstruační krvácení. Všechny pacientky souboru byly po 6 měsících léčby opakovaně odebrány k zjištění prevalence antiovariálních protilátek.

6. VÝSLEDKY

6.1. Prevalence antiovariálních protilátek u kontrolní skupiny žen a dívek

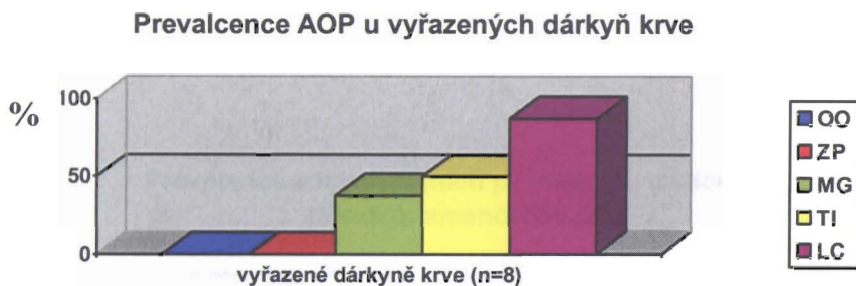
V první skupině dárcyň krve ($n=41$) byla zachycena pozitivita antiovariálních protilátek (AOP) u 9 žen. Překvapivý výskyt autoprotilátek u zdravých žen, který byl v rozporu s údaji z literatury, kde výskyt protilátek proti ováriu v populaci zdravých žen byl udáván kolem 5 %, i když v některých studiích až v 38%, nás vedl k provedení retrospektivní analýzy anamnestických dat a po individuálním ověření se ukázalo, že jedna z žen měla spontánní potrat na konci 2. měsíce těhotenství, jedna žena se léčila pro primární sterilitu, dalších 6 žen uvádělo poruchy menstruačního cyklu (4x nepravidelný cyklus, 2x oligomenorea), proto byly tyto pacientky z kontrolní skupiny žen vyřazeny. Pouze u jedné ženy nebylo nalezeno žádné vysvětlení pro pozitivitu protilátek proti LB buňkám, to odpovídá v dané skupině žen 3 %, což zcela souhlasí s většinou literárních údajů o prevalenci protilátek proti ováriu ve zdravé populaci.

Všechny vyřazené ženy ($n=8$) měly pozitivitu autoprotilátek proti LB buňkám, čtyři ženy měly pozitivitu protilátek jen proti jedné struktuře ovária, dvě proti dvěma strukturám a dvě ženy měly pozitivní nález protilátek proti třem strukturám ovária. Ani u jedné ženy z této kontrolní skupiny nebyly nalezeny protilátky proti germinálním složkám ovária (ooplasma, zona pellucida). Zpětným vyšetření jsme zjistili, že dvě ženy, které vykazovaly pozitivitu protilátek proti třem strukturám ovária (protilátky proti MG, TI, LB buňkám) - jedna spontánně potratila a druhá se neúspěšně snaží o graviditu (graf č. 1).

V dalších dvou kontrolních skupinách žen a dívek ($n=53$) před nasazením hormonální antikoncepce byl nález protilátek proti LB buňkám podobný jako ve skupině dárcyň krve (tj. 5,6%). U 4 pacientek z obou souborů byla zjištěna pozitivita protilátek, jednou byla zjištěna pozitivita protilátek proti TI a LB buňkám a 3x byla nalezena izolovaná pozitivita proti LB buňkám. U pacientky, která měla dva pozitivní nálezy protilátek (TI, LB) jsme dodatečně zjistili, že je sice po porodu, ale úspěšnému těhotenství předcházely spontánní potraty, proto byla tato pacientka opět z kontrolního souboru vyřazena.

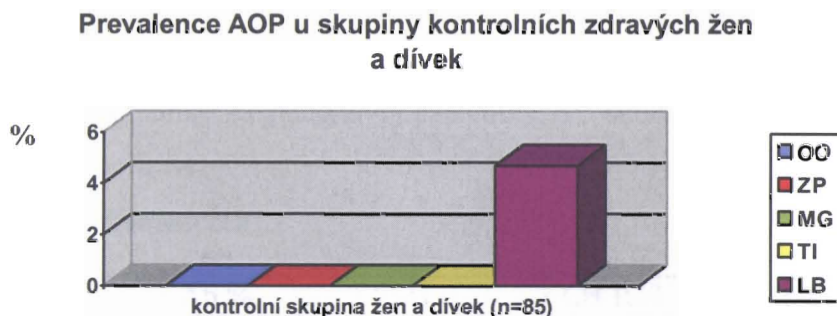
Prevalenci antiovariálních protilátek ve všech třech kontrolních skupinách jsme shrnuli do grafu č. 2, u těchto zdravých žen a dívek ($n=85$) jsme našli pozitivitu protilátek jen proti luteinním buňkám a to u 4,7% z nich.

Graf. č. 1



OO ooplasma, ZP zona pellucidu, MG membrana granuloza
TI théca interna, LB luteinní buňky

Graf č. 2



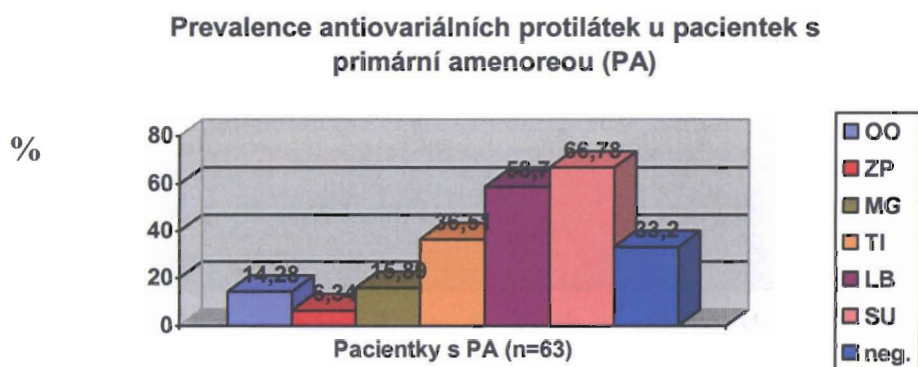
OO ooplasma, ZP zona pellucidu, MG membrana granuloza
TI théca interna, LB luteinní buňky

6.2. Prevalence antiovariálních protilátek ve skupině dívek s poruchami menstruačního cyklu

Výsledek prevalence antiovariálních protilátek u pacientek s primární amenoreou (n=63) je uveden v grafu č. 3 a tab. č. 2. Ve srovnání s kontrolní skupinou, kde byl výskyt antiovariálních protilátek nalezen jen u 4,7 % žen a jen proti luteinickým buňkám ovária, je pozitivita protilátek u pacientek s primární amenoreou proti všem složkám ovária statisticky významně zvýšená $U = -8,05283 [0,00000]$, v této skupině byla celková pozitivita antiovariálních protilátek prokazatelná u 66,78 % pacientek. Obecně jsme v této skupině v porovnání se skupinou pacientek se sekundární amenoreou zachytili více protilátek proti germinálním složkám ovária (obr. č. 1 a 3). Zcela výjimečně byla u pacientek z toho souboru (n=4) nalezena pozitivita protilátek proti

strukturu zona pellucida. Nejvíce byly zastoupeny protilátky proti luteinním buňkám, ale méně než u pacientek s oligomenoreou/sekundární amenoreou což zcela koreluje s nálezy ovariálních biopsií (kap. 6.4).

Graf č. 3



OO ooplasma, ZP zona pellucida, MG membrana granuloza, TI théca interna, LB luteinní buňky, neg negativní pacientky, SU sumář, neg. negativní protilátky

Tab. č.2 Primární amenorea

	Ab %	FSH IU/l	LH IU/l	FSH/LH
OO Ab	14,28	35,88	19,03	1,9
ZP Ab	6,34	22,3	16,6	1,3
MG Ab	15,89	23	17,47	1,3
TI Ab	36,51	18,5	14,5	1,3
LB Ab	58,7	16,7	13,64	1,2

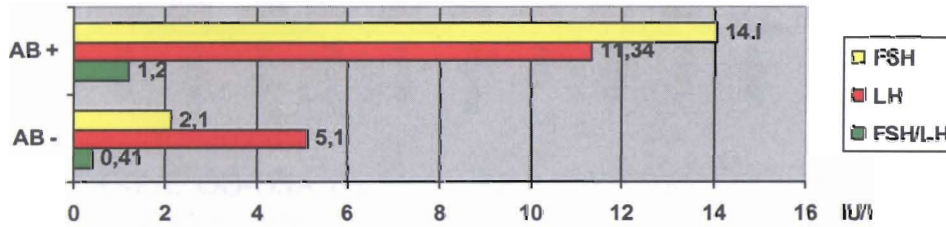
Při vyšetření hladin gonadotropinů jsme prokázali u pacientek s primární amenoreou výrazně vyšší hladiny FSH ve srovnání s hladinami FSH, LH a jejich poměru u kontrolní skupiny - viz graf. č. 4. Při statistickém zpracování dat jsme zjistili, že hladina FSH u pacientek s PA s protilátkami proti OO, ZP, MG, TI a LB při 5% hladině významnosti byla statisticky významně zvýšená proti hladině FSH u zdravých dívek a žen kontrolní skupiny, u jednotlivých průměrů hladin FSH $F = 1,57 [0,1904]$. Hladina LH u pacientek s PA a pozitivitou protilátek proti OO, ZP, MG, TI a LB při 5% hladině významnosti byla prokázatelně rovněž vyšší, statisticky významná odlišnost jednotlivých průměrů hladin LH $F = 0,79 [0,5361]$ (graf č.5)

Také při srovnání hladin FSH, LH a jejich poměru u pacientek s primární amenoreou a oligomenoreou/sekundární amenoreou je hladina gonadotropinů u

pacientek s primární amenoreou vyšší (graf. č. 6), i když i u pacientek s oligomenoreou nebo sekundární amenoreou je hladina gonadotropinů ve srovnání s kontrolní skupinou žen také zvýšená (tab. č. 3).

Graf. č. 4

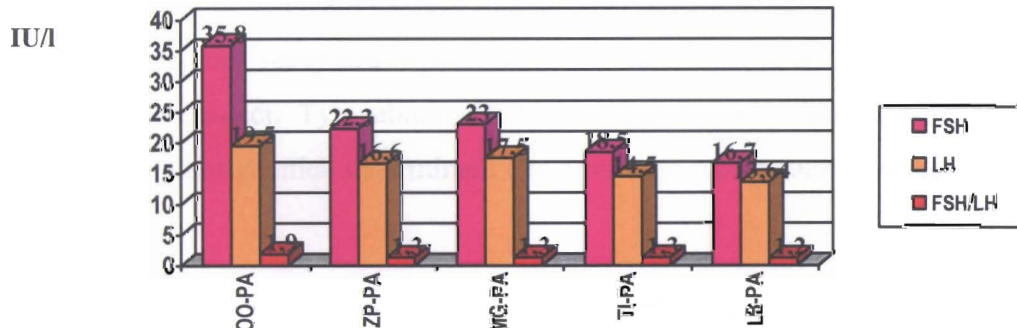
Hladiny FSH, LH a FSH/LH u autoprotilátky-pozitivních a negativních pacientek s primární amenoreou



AB + pacientky s pozitivní prevalencí antiovariálních protilátek
 AB - pacientky s negativní prevalencí antiovariálních protilátek

Graf. č. 5

Hladiny FSH, LH a FSH/LH u pacientek s primární amenoreou

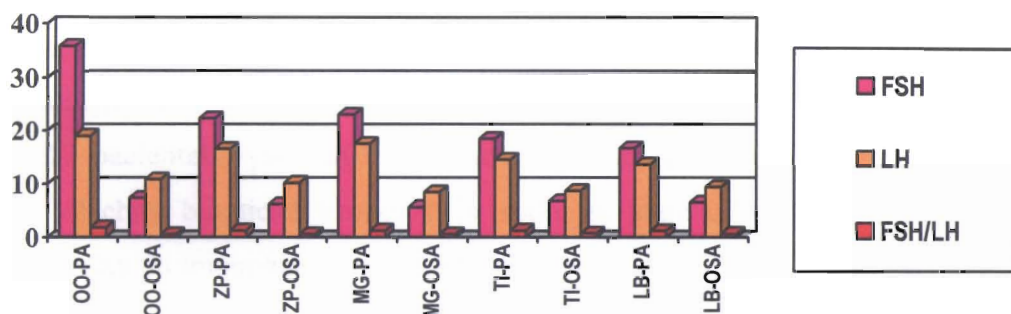


OO-PA ooplasma, ZP-PA zona pellucida, MG-PA membrana granuloza
 TI-PA théca interna, LB-PA luteální buňky

Vysoká hodnota FSH nasvědčuje primární poruše na úrovni oocyty. Takovéto nereagující folikuly s defektními germinálními buňkami zřejmě nedokáží dostatečně reagovat na běžné hladiny FSH a proto zpětná vazba v hypotalamo-hypofyzárním systému vede k aktivaci produkce FSH buňkami hypofýzy.

Graf. č. 6

**Hladiny FSH, LH a poměr FSH/LH
u patientek s primární amenoreou a oligo-/sekundární amenoreou**

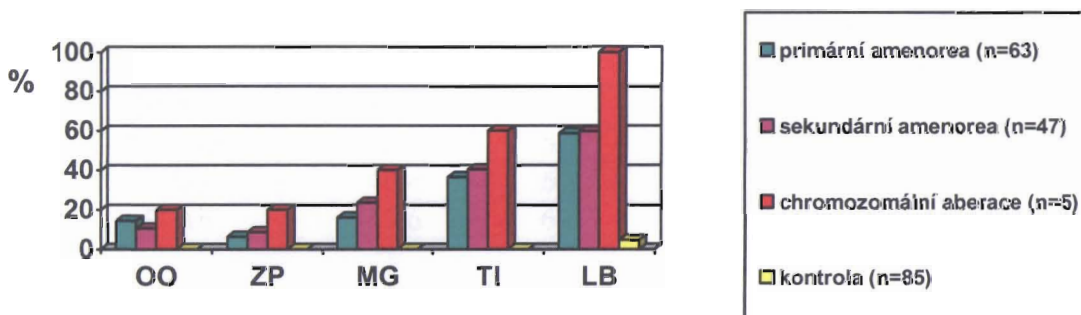


OO-PA, OO-OSA ooplasma, ZP-PA, ZP-OSA zona pellucidu, MG-PA, MG-OSA membrana granuloza, TI-PA, TI OSA théca interna, LB-PA, LB-OSA luteální buňky

U 17 patientek z tohoto souboru bylo provedeno vyšetření karyotypu, u pěti patientek byly nalezeny chromozomální aberace (viz kap. 5.5.). Prevalence antiovariálních protilátek u těchto patientek ve srovnání s patientkami s primární a sekundární amenoreou bez současně přítomné chromozomální aberace je graficky vyjádřena v grafu č. 7. Chromozomální aberace (ChA) prezentující se ovariální dysfunkcí vedou ke změnám exprese membránových antigenů, což stimuluje apoptózu a zároveň se deplecí receptorů v postižených folikulech snižuje ovariální odpověď na hormonální stimulaci. Tyto abnormální ovariální struktury pravděpodobně způsobují tvorbu nových antigenních determinant a to stimuluje tvorbu autoprotilátek.

Graf č. 7

Prevalence antiovariálních protilátek u patientek s primární amenoreou, oligo-/sekundární amenoreou, chromozomální aberací a u kontrolní skupiny



OO ooplasma, ZP zona pellucidu, MG membrana granuloza
TI théca interna, LB luteinní buňky

Hladina antiovariálních protilátek u skupiny patientek s primární amenoreou a chromozomální aberací ve srovnání s kontrolní skupinou žen je statisticky vyšší $U = -6,90268 [0,00000]$. I v porovnání s výskytem antiovariálních protilátek u patientek s poruchami cyklu bez chromozomální poruchy je prevalence autoprotilátek v této skupině vyšší, i když zde může hrát roli soubor o malém počtu patientek. U jedné patientky jsme diagnostikovali syndrom testikulární feminizace.

Těchto 17 patientek vyšetřených geneticky bylo indikováno k laparoskopické biopsii ovárií. Všechny bioptické vzorky byly spolu se standardním histologickým vyšetřením zkoumány po imunohistochemickém zpracování.

U patientek s oligomenoreou a sekundární amenoreou ($n=47$) jsem zachytili proti skupině patientek s amenoreou primární významně vyšší hladiny antiovariálních protilátek proti steroidy produkujícím buňkám (obr. č. 2) a opět statisticky významně vyšší prevalenci antiovariálních protilátek proti skupině zdravých žen a dívek $-7,438 [0,00000]$. Výskyt antiovariálních protilátek v této skupině shrnuje graf č. 8.

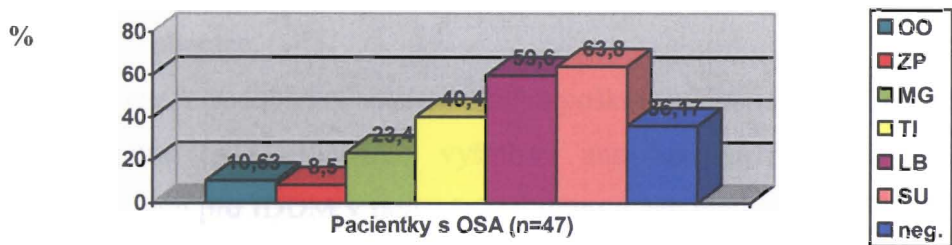
Také u této skupiny jsme, jak již bylo zmíněno, v porovnání s kontrolní skupinou zachytili výrazně vyšší hladiny FSH proti zdravým ženám - viz tab. č. 3 a graf. č. 9. Při statistickém zpracování dat byla hladina FSH u patientek s OSA a pozitivitou protilátek proti OO, ZP, MG, TI a LB na 5% hladině významnosti prokazatelně statisticky významně zvýšená proti hladině FSH u zdravých žen, u jednotlivých průměrů hladin FSH $F = 0,12 [0,9740]$, hladina LH u patientek s protilátkami proti OO, ZP, MG, TI a LB na 5% hladině významnosti byla také prokazatelně statisticky významně zvýšená u jednotlivých průměrů hladin LH $F = 0,61 [0,6605]$ proti kontrolní skupině zdravých žen a dívek.

Tab č. 3 Oligomenorea a sekundární amenorea

	AB %	FSH IU/l	LH IU/l	FSH/LH
OO Ab	10,63	7,4	10,9	0,67
ZP Ab	8,5	6,2	10,22	0,6
MG Ab	23,4	5,7	8,5	0,67
TI AB	40,4	6,8	8,7	0,78
LB Ab	59,6	6,6	9,4	0,7

Graf. č. 8

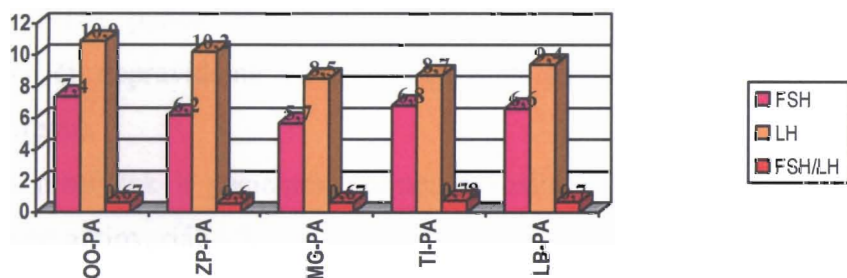
Prevalence antiovariálních protilátek u pacientek s oligo- /sekundární amenoreou (OSA)



OO ooplasma, ZP zona pellucidu, MG membrana granulosa
 TI théca interna, LB luteinní buňky, SU sumář, neg. - negativní protilátky

Graf. č. 9

Hlady FSH, LH a FSH/LH u OSA pacientek

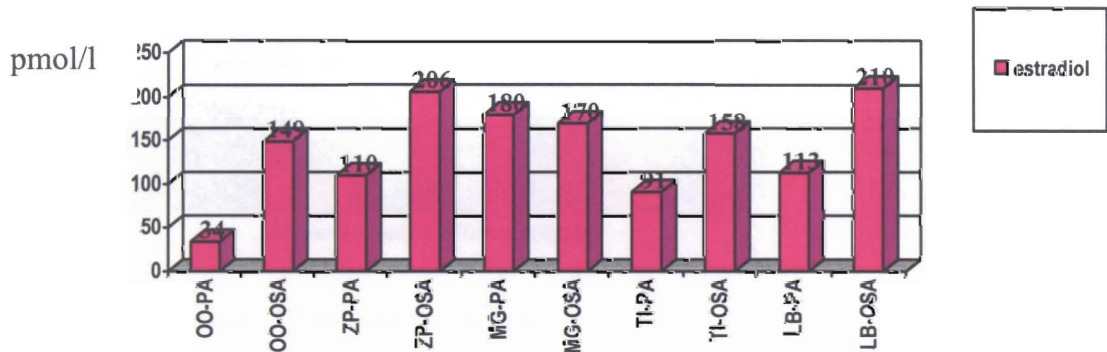


OO-PA ooplasma, ZP-PA zona pellucida, MG-PA membrana granulosa
 TI-PA théca interna, LB-PA luteální buňky

Hlady estradiolu u obou skupin pacientek s poruchou menstruačního cyklu
 shrnuje graf. č. 10.

Graf. č. 10

Hlady estradiolu u pacientek s PA a OSA



OO-PA ooplasma, ZP-PA zona pellucida, MG-PA membrana granulosa
 TI-PA théca interna, LB-PA luteální buňky

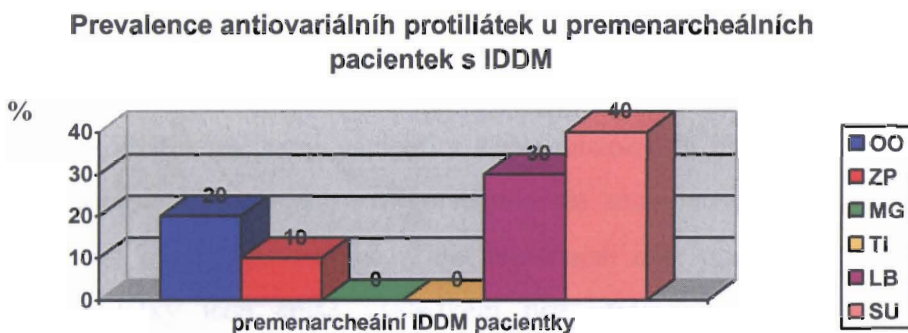
Vybraných 13 pacientek ze skupiny dívek s oligo/sekundární amenoreou bylo indikováno k laparoskopické biopsii ovária podobně jaké ve skupině pacientek s amenoreou primární. V této skupině byl také vyšetřen karyotyp pacientek, bez nálezu chromozomální aberace.

Vzhledem k podobnosti autoimunitního poškození ovária s inzulin dependentním diabetes mellitus bylo provedeno vyšetření antiovariálních protilátek u skupiny pacientek léčených pro IDDM v rámci řešení grantových úkolů IGA č. 2866-3 a 1155-3 v letech 1992-1997 (viz. kap. 10) na našem pracovišti. Výsledky jsme použili retrospektivně ke srovnání prevalence antiovariálních protilátek u námi sledované skupiny pacientek s poruchami menstruačního cyklu bez IDDM.

Vyšetřená skupina pacientek II.dětské kliniky UK 2.LF a FN v Motole léčené pro IDDM byla rozdělena podle toho, zda již pacientky menstruovaly (n=96) či zda byly premenarcheální (n=10), pokud menstruovaly, pak byly rozděleny podle toho, jestli pravidelně (n=67) či nepravidelně (n=29) (nejčastěji trpěly oligomenoreou, nebo sekundární amenoreou).

Prevalenci protilátek u pacientek premenarcheálních představuje graf. č. 11. Srovnání prevalence antiovariálních protilátek u pacientek s IDDM premenarcheálních s pacientkami menstrujícími se vyznačuje vyšší pozitivitou proti germinálním buňkám. Tyto nálezy nasvědčují podobnosti s našimi výsledky prevalence protilátek proti ováriu u dívek s primární amenoreou bez IDDM.

Graf. č. 11



OO ooplasma, ZP zona pellucidu, MG membrana granulosa
TI théca interna, LB luteinní buňky

V četnosti výskytu autoprotilátek proti ováriu jsou mezi oběma skupinami pacientek s IDDM menstrujícími pravidelně a nepravidelně zřetelné rozdíly vázané na typ menstruačního cyklu. Zatímco významně vyšší prevalence protilátek proti ooplasmě, membraně granulozy a luteinním buňkám charakterizuje skupinu s nepravidelnou menstruací, u pacientek s pravidelnou menstruací byla zjištěna vyšší prevalence naopak proti ZP struktuře.

Poněkud zvláštní postavení zaujímají folikulární buňky membrany granulozy, protože u nich se steroidogeneze dostavuje s vývojem folikulu a proto se přítomnost protilátek proti membrana granuloza může nepříznivě uplatnit při kavitaci ovariálního folikulu, což je spojeno s možným ovlivněním průběhu cyklu. Souhrn nalezených protilátek viz tab. č. 4. Z toho přehledu, především z hodnot HbA1c je zřejmé, že poruchy menstruačního cyklu u pacientek s IDDM souvisí jak s hladinou antiovariálních protilátek tak především s dekompenzací diabetu mellitu.

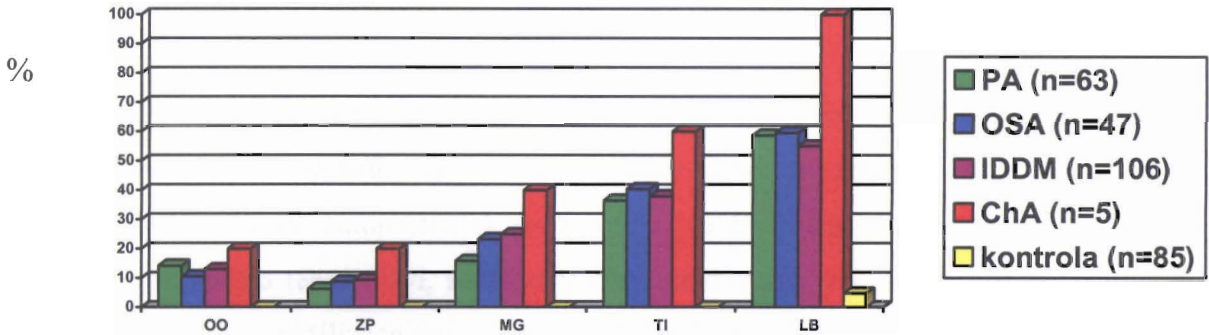
Tab.č. 4 Souhrn pacientek s IDDM

cyklus	n	věk	m.cyklus	počátek diabetu	HbA1c	OO	ZP	MG	Ti	LB
pravidelný	67	17,8±2,5	29±2	10±4,1	9,8±1,7	8,10%	8,10%	2,70%	40,50%	48,60%
nepravidelný	29	17,8±3,4	34±9	8,6±3,5	10,5±2,1	23,50%	2,10%	23,50%	41,20%	64,70%
premenarcheální	10	12,7±2,8	0	7,8±3,8	9,9±1,4	20%	10%	0	0	30%

Zajímavé je srovnání prevalence antiovariálních protilátek proti jednotlivým strukturám oocytu u pacientek s primární amenoreou, sekundární amenoreou, chromozomálními aberacemi a inzulín dependentním diabetem mellitem s populací zdravých žena a dívek - viz graf. č. 12. Z tohoto grafu vyplývá, že nejvyšší prevalenci antiovariálních protilátek vykazují pacientky s chromozomální aberací, dále pacientky s primární amenoreou. U pacientek s oligo/sekundární amenoreou a IDDM je hladina autoprotilátek proti ováriu srovnatelná. Tato skutečnost dále podporuje hypotézu, že antiovariální protilátky jsou spíše výsledkem než příčinou poškození ovariálních struktur.

Graf č. 12

Prevalence antiovariálních protilátek u PA, OSA, IDDM, ChA a kontrolní skupiny dívek



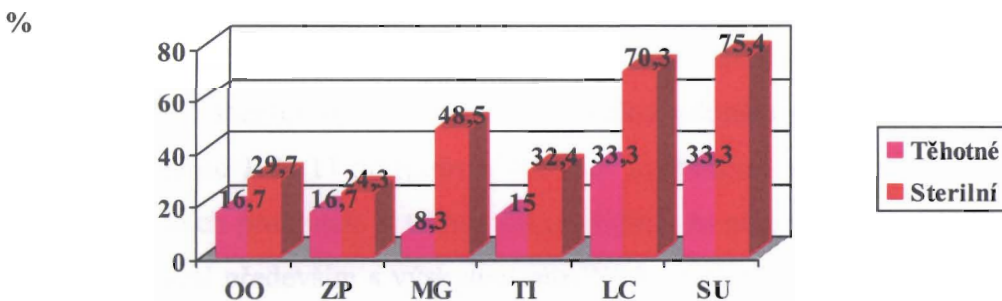
OO ooplasma, ZP zona pellucidu, MG membrana granuloza
 TI théca interna, LB luteinní buňky

6.3. Prevalence antiovariálních protilátek u pacientek léčených pro sterilitu

Dle úspěchu v následném programu IVF byly nejprve pacientky rozděleny do dvou skupin na pacientky, které po zařazení otěhotněly a na pacientky které zůstaly sterilní, výskyt antiovariálních protilátek v séru u této skupiny pacientek shrnuje graf. č. 13.

Graf. č. 13

Prevalence AOA v séru u pacientek sterilních a s úspěšným těhotenstvím



OO ooplasma, ZP zona pellucidu, MG membrana granuloza
 TI théca interna, LB luteinní buňky

Hodnocení výskytu antiovariálních protilátek ve folikulární tekutině vycházelo ze vztahu koncepčního úspěchu, fertilizace oocyty bez následující gravidity, nefertilizovaného oocyty, neúspěchu při zisku oocyty, k přítomnosti protilátek proti jednotlivým ovariálním strukturám, takto byly tedy pacientky rozděleny do 4 skupin. Prevalence antiovariálních protilátek u těchto pacientek je shrnuta v tab. č. 5 a grafu č. 14 a 15

Při statistickém hodnocení dat získaných při vyšetření folikulární tekutiny jsme neměli srovnání s výsledky folikulární tekutiny zdravých žen. Z našich výsledků je zachycená pozitivita autoprotilátek proti ováriu ve folikulární tekutině u pacientek, u kterých se zdařilo těhotenství, statisticky významně menší než ve skupině pacientek, u kterých se zdařila fertilizace oocyty, ale které neotěhotněly $U = -3,40298 [0,00033]$.

Velkým překvapením pro nás bylo zjištění, že celkové množství pozitivních autoprotilátek u pacientek, u kterých se zdařilo těhotenství je stejný jako ve skupině pacientek, u kterých se nezdařila fertilizace oocytů $U = -0,95299 [0,170297]$ a stejný jako ve skupině pacientek bez zisku oocytů, $U = -0,79423 [0,786488]$.

Tab.č. 5 Přehled pozitivivity AOP pacientek rozdělených do 4 skupin

Podskupina n 90/ 100%	OO	ZP	MG	TI	LC
Gravidita n 27/30%	3,7	0	18,5	37,0	70,4
Fertilizace n 40/44,4%	25,0	2,5	17,5	87,5	100,0
Bez fertilit. n 15/16,7%	40,0	20,0	66,7	73,3	80,0
Bez oocyty n 8/ 8,9%	50,0	12,5	25,0	87,5	87,5

Tyto výsledky nás vedly k podrobnější analýze výskytu antiovariálních protilátek v séru a ve folikulární tekutině vzhledem k úspěchu fertilizace. Proto jsme retrospektivně srovnali data získaná při řešení grantového úkolu č. Z 2866-3, kde bylo vyšetřeno 12 žen, u kterých byla odebrána folikulární tekutina z jednotlivých folikulů ($n=114$), o objemu od 1 do 11 ml (průměr 4,2 l) se současným odběrem krve k detekci hladin antiovariálních protilátek. Z těchto dat je zřejmé, že nález nízkého fertilizačního úspěchu se shodoval především s výskytem protilátek proti ooplasmě jak v krvi tak ve folikulární tekutině postižených pacientek, na rozdíl od protilátek proti jiným strukturám ovária (tab. č. 6).

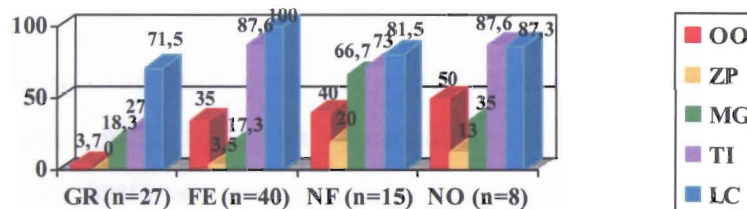
Tab. č. 6 Protilátky proti ooplasmě a fertilizační úspěch

Ooplasma pozitivní	N pacientek
Fertilizační úspěch 100%	1 pacientka
Fertilizační úspěch < 100%	5 pacientek
Ooplasma negativní	
Fertilizační úspěch 100%	5 pacientek
Fertilizační úspěch < 100%	1 pacientka

Dále byla u sterilních pacientek hodnocena hladina FSH, LH a jejich poměru z krve, estradiolu a progesteronu, odběr byl proveden 8. den menstruačního cyklu. Výsledky vyšetření hladin FSH, LH a FSH/LH jsou shrnuty v grafu č. 16, výsledky zjištěných hladin estradiolu a progesteron shrnuje tab. č. 7

Graf. č. 14

Vztah výsledku IVF programu k distribuci antiovariálních profilátek



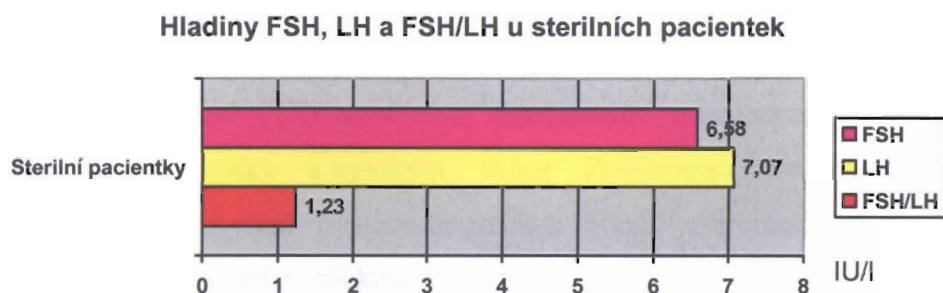
GR úspěšná gravidita, FE úspěšná fertilizace, těhotenství nevzniklo, NF oocyt získán, fertilizace se nezdařila, NO nezískán oocyt,

Graf. č. 15

Distribuce pacientek dle výsledku IVF



FE úspěšná fertilizace, těhotenství nevzniklo, NF oocyt získán, fertilizace se nezdařila, NO nezískán oocyt, GR úspěšná gravidita



Tab. č. 7 Hladiny estradiolu a progesteron u sterilních pacientek

	rozmezí	průměr
Estradiolu 8.den MC	0,6-1,0	0,47
Progesteron 8.den MC	0,16-300	66,85

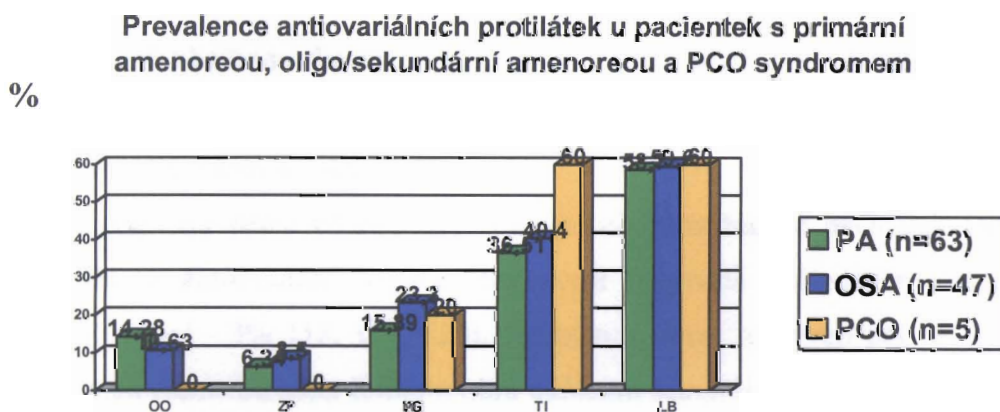
Z rozboru výskytu ovariálních protilátek vyplývá, že pro úspěšnou graviditu je rozhodující nepřítomnost protilátek proti germinálním strukturám, zejména proti ooplasmě. Dále platí, že fertilizace oocyty a jeho následné rýhování je možné i při výskytu protilátek proti ooplasmě, ale zvýšená frekvence protilátek proti germinálním ovariálním složkám, a to zvláště pokud jde o protilátky proti zona pellucida, může být významná pro samotnou fertilizaci. Lze se domnívat, že ZP protilátky vázané na zona pellucida mohou obsahovat receptory pro navázání spermií. Konečně 50% přítomnost OO protilátek ve skupině bez zisku oocyty při aspiraci může být výrazem defektní maturace oocyty.

6.4. Výsledky vyšetření ovariálních biopsií

Světelné mikroskopické nálezy lze shrnout tak, že v případech primární amenorey převládaly nálezy spíše jednotlivých primárních folikulů a méně často stimulované folikuly se dvěma vrstvami folikulárních buněk a zcela ojediněle jsme našli corpus luteum. Lymfocytární infiltrace byla v této skupině pacientek diagnostikována jen v jednom případě (obr. č. 18). Sekundární amenorea byla oproti

tomu charakterizována rozsáhlejší fibrotizací kůry ovária a prořídlym folikulárním aparátem. Pouze u jedné pacientky z této skupiny byla zachycena rozsáhlejší skupina primárních folikulů. Jednou byl v klinicko-patologickém nálezu diagnostikován syndrom polycystických vaječníků, jednou PCO s vyjádřením mononukleární infiltrace (obr. č. 18). Na základě tohoto nálezu a dat získaných z literatury, kde mnoho autorů uvádí jako příčinu PCO syndromu autoimunitní onemocnění ovária, jsme zpětně dovyšetřili pacientky s vysokým skóre Ferrimana-Galweyerové se zvýšeným ochlupením a nálezem hyperandrogenních buněk v hormonální cytologii. Pomocí vyšetření androgenního spektra a rozšířeného OGTT testu s průkazem inzulínové rezistence jsme vyčlenili další skupinu. Celkový počet pacientek v této skupině s diagnostikovaným hyperandrogenním ovariálním syndromem bylo 5, z toho 4 pacientky byly sledovány pro oligomenoreu či sekundární amenoreu, jedna pro amenoreu primární. Srovnání hladin antiovariálních protilátek u těchto pacientek uvádí graf č. 17. Z tohoto grafu vyplývá, že prevalence antiovariálních protilátek u této skupiny pacientek se neliší významně od pacientek s oligomenoreou a sekundární amenoreou bez hyperandrogenního syndromu, ale výsledek může být samozřejmě zatížen chybou malých čísel.

Graf č. 17



OO ooplazma, ZP zona pellucida, MG membrana granulosa
TI théca interna, LB luteinní buňky

Analýza biotických vzorků ovária již na úrovni světelné mikroskopie přinesla tyto závěry: na úrovni polotenkových řezů bylo možné v obalu oocytů tvořeném plochými

folikulárními buňkami pozorovat výskyt elementů s nápadně silněji barvitelnou cytoplazmou (obr. č. 19 a 20). Kromě toho se v cytoplasmě světlejších folikulárních buněk i v ooplasmě nalézají často rozměrná tělíška, u nichž submikroskopická struktura potvrzuje zařazení k sekundárním lysosomům (Obr.č. 21). U dvou pacientek s primární amenoreou se ve stromatu na poloténkém řezu podařilo identifikovat mononukleární infiltraci (obr. č. 18), která byla potvrzena spolu s přítomností dendritických buněk i submikroskopicky. V několika případech byly nalezeny u PA pacientek stimulované folikuly s kubickými folikulárními buňkami kde ani elektronmikroskopický obraz neprokázal tvorbu zona pellucida. Tento nálezný koresponduje s nižší prevalencí protilátek právě proti této struktuře v krvi postižených pacientek (obr. č. 1). Oproti normální situaci zde totiž bohatě členěné membrány oocyty i folikulárních buněk uzavírali jen nepatrný intercelulární prostor bez ukládání materiálu zona pellucida. Folikulární buňky mají často méně denzní cytoplasmu než oocyt a jejich tmavé mitochondrie s naznačením tabulárního typu krist by mohly nasvědčovat zvýšené steroidní stimulaci (obr. č. 4). K typickému znaku alterovaných primárních folikulů při elektronmikroskopické morfologické analýze patří výrazné zluštění a nepravidelnost Slavjanského membrány (obr. č. 22). a počátek atretického procesu pak dokresluje vzestup denzity ooplasmu a také hluboké invaginace oolemy s dlouhými výběžky folikulárních buněk (obr.č. 23). Použití séra, získaného od pacientky (pozitivní MG, TI, LB), k navázání na epitopy v ultratenkém řezu lze sledovat jejich lokalizaci pomocí sekundární protilidské protilátky značené kloidním zlatem. Tento případ dokumentuje obr.č.4 agregacemi 10 nm velkých partikulí v mitochondriové matrix v blízkosti krist (enzymy steroidogeneze) i v ooplasmě zvláště u formací skeletu.

Až na výjimky nelze v bioptickém materiálu u postižených pacientek zachytit známky rozvinuté autoimunitní reakce, což zcela odpovídá v literatuře uvedeným faktům (Hoek a spol - 3% 118, 119, 120). Jediným znakem tu bývají nečetné nálezy mononukleárních elementů mezi folikulárními buňkami sekundárních folikulů, které lze považovat za NK buňky. Nejčastěji nacházíme vystupňované procesy vedoucí k zániku folikulů. Lidské ovárium má ale fyziologicky vytvořeny obecně známé mechanismy regulující počet folikulů v cyklickém procesu stimulace, růstu a zrání. Platí však a tato práce je toho důkazem, že v atrezii folikulů působí spíše projevy apoptózy než jiné zánikové jevy. Soudíme, že pokud dojde k autoimunitní reakci, je její průběh časově omezen a další změny již připomínají vystupňované procesy atrezie. Na celé situaci se také mohou významně podílet také zřejmě sekundárně vznikající protilátky, které

mohou vést k dalšímu poškození, event. obsazení určitých epitopů příslušnou protilátkou může výrazně změnit reaktivitu aktuálního systému. Výsledkem je narušení harmonie souhry regulačních mechanismů, která se projeví nejen ve funkční ale často i morfologické oblasti.

V průběhu výzkumu nás zmnožení cytoskeletových komponent ve folikulárních buňkách i oocytech (obr. č.23) vedl k názoru, že je třeba zvýšenou pozornost věnovat procesům zániku sledovaných buněčných složek, jak již bylo zmíněno. Proto jsme se orientovali na důkaz apoptotických procesů a to v první etapě sledováním kaspázového systému 3 (schéma č. 3). Pomocí protilátky M 30 CytoDeath (obr. č.5, 13, 26) byly detekovány degradační produkty cytokeratinu 18, jak ve folikulárních buňkách, tak i v oocytech. Kolokalizace imunopozitivity ve zmíněných strukturách, doložená i akumulací intermediálních filament na elektronmikroskopické úrovni, kdy zmnožení cytoskeletu na elektronmikroskopické úrovni (obr. č. 23) zcela koreluje s pozitivitou značené protilátky M 30 CytoDeath proti štěpným produktů cytokeratinu 18 (obr. 10, 11), může být akceptována jako doklad apoptotického procesu, který představuje nejčastější mechanismus zániku buněčných elementů a jejich produktů v kůře ovária.

Apoptotický charakter těchto procesů lze tedy prokázat jak na úrovni světelné, tak elektronové mikroskopie provedením morfologické analýzy (viz obr.č. 24, 25). Kondenzace chromatinové struktury při jaderném obalu spolu je spolu s jeho invaginacemi a redukcí celkového objemu buněčných jader až po pyknotické formy jedním s nejčastějších nálezů (obr. č. 14). Dalším důkazem apoptotického charakteru atrezie folikulů v postiženém ováriu lze najít na druhé straně fragmentací DNA v případě karyohexe (obr. č. 6). Toto jsou základní morfologické znaky apoptózy, které pocházejí s pionýrských dob identifikace programované buněčné smrti již na počátku minulého století.

Pro vysvětlení rychlého nástupu deplece folikulárního aparátu ovariální kůry jsme se pokusili nalézt možný signální mechanismus, který by se účastnil při nastartování změn buněčného cyklu germinativního epitelu i stromálních buněk. Ukázalo se, že takovou signální strukturou by kromě očekávaných signálních proteinů z rodiny cytokinů (Epidermal a Fibroblast Growth Factor, TNF α , Transforming Growth Factor, interleukiny..) mohl být oxid dusnatý (NO), či přesněji NO syntáza (NOS) jako enzym NO produkující. O jeho významné roli v regulačních procesech diferenciaci buněk byla věnována řada experimentálních studií, také o jeho proapoptotické i antiapoptotické funkci bylo již mnoho napsáno. Proto jsme se zaměřili na imunohistochemický průkaz

přítomnosti NOS ve strukturách kůry ovária. Ze získaných výsledků vyplývá, že jak v ooplasmě, tak i v cytoplasmě folikulárních buněk počínaje primárními až terciárními folikuly je významně zastoupena především endotelová isoforma NO syntézy (NOS 3), kdežto inducibilní NO syntéza (NOS 2) nebyla dosud v ováriu prokázána. Také isoforma NOS 1 jako neuronální typ se v ováriu nevyskytuje. Zajímavá byla také ložisková kolokalizace tohoto enzymu s výsledky imunodetekce aktivní kaspázy 3 v cytoplasmě folikulárních buněk (oocytech terciárních folikulů pacientek s OSA (obr. č. 5, 6 a 8). Důležitou funkcí NOS 3 (endotelová NOS) je produkce NO, který má významnou vasoregulační roli, protože působí na svalovinu medie arterií. Také se však podílí na procesech angiogenense, což ve fyzických procesech masivní proliferace při vývoji folikulů i rozvoji corpus luteum a zajištění jeho endokrinní funkce je úloha velmi důležitá.

Během řešení výzkumu bioptických vzorků ovária pacientek s poruchami menstruačního cyklu a pozitivitou antiovariálních protilátek nás také zaujala lokalizace jak gonadotropních, tak estrogenových a progesteronových receptorů. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, výzkum protilátek proti steroidním receptorům a proti gonadotropinovým receptorům v analogii s jinými autoimunitami (Graves-Basedovova choroba, myastenia gravis) (105, 106, 107), nebyl úspěšný. Během výzkumu jsme ale narazili na jiné zajímavé odlišnosti u pacientek s ovarialním onemocněním. Za významnou považujeme skutečnost, že u skupiny dívek trpících primární amenoreou převládala oproti povrchové zpravidla intraooplazmatická lokalizace FSH receptorů (obr.č. 9), kdežto u oligo/sekundární amenorey nepotvrdili nálezy tuto variantu jednoznačně. Jako opodstatněná se zdá představa, že se může jednat o poruchu recyklace cytoplazmatické membrány, a proto nejsou uvedené receptory vystaveny na povrchu oocytu. Je také nutno vznít v úvahu možnou mutaci receptorů, jejichž intracytoplazmatická doména může být významněji vázána na struktury uvnitř ooplasmy, a to především transportní složky cytoskeletu. Receptorový deficit by pak mohl být příčinou nedostačující odpovědi ovária na hormonální signál základního systému řízení na ose hypotalamus-hypofýza-ovárium a z toho rezultující syndrom rezistentního ovaria (102, 103). Na druhé straně platí, že ani vysoké hladiny FSH nejsou provázeny pokračováním folikulární diferenciace, ba naopak mohou být startovacím mechanismem kaskády procesů programované buněčné smrti.

Zatímco sledování výskytu a distribuce FSH receptorů přineslo přinejmenším v jejich internalizaci v ooplasmě možné vysvětlení neadekvátního účinku i značně

vysokých hladin FSH ve skupině pacientek s primární i oligo/sekundární amenoreou (viz graf. č.6), výsledky vyhodnocení exprese receptorů LH jsou značně nejednotné. Také sledování těchto receptorů imunohistochemicky bylo složité, protože zatímco FSH receptory bylo možné sledovat na kryostatových, parafinových i polotekných deponizovaných řezech, u LH receptorů jsme prakticky mohli využít vazby monoklonálních protilátek proti LH receptorům jen u řezů kryostatových. Ani technika vystavení antigenních determinant receptorů varem v citrátovém pufru v mikrovlnné troubě tu nepřinesla podstatný efekt. Na druhé straně je však nezbytné vzít v úvahu, že jejich exprese je časově limitovaná očekávaným vrcholem uvolňování LH za situace, kdy je v ováriu připravena skupina terciálních folikulů, což je u sledovaných skupin pacientek a primární amenoreou a oligo/sekundární amenoreou situace spíše výjimečná. Dalším limitujícím faktorem je velikost odebraného vzorku při laparoskopickém odběru, který po zpracování pro elektronovou mikroskopii neposkytuje reálnou šanci zachování tkáně ke kryostatovému zpracování.

Na rozdíl od membránové lokalizace FSH a LH receptorů se estrogenní a progesteronové receptory vyskytují především ve frakci cytosolové a nukleární. Vycházeli jsme z předpokladu, že jsou to především steroidní receptory, které se mohou uplatnit ve stimulaci proteosyntetické aktivity buněk a jež jsou cílem autoprotilátek, a proto nacházíme u sledovaných pacientek převahu autoprotilátek proti strukturám rostoucího folikulu. To je podloženo významnou proliferační aktivitou především folikulárních buněk stimulovaných folikulů, počínaje od stádia přechodu primárního folikulu v sekundární, kde je manifestovaná transformace jednovrstevného obalu folikulárních buněk v mnohvrstevný a tedy i vyšší očekávaná konverze estrogenů. Dokladem této skutečnosti jsou početné nálezy nukleární frakce estrogenních receptorů ve folikulárních buňkách i oocytech bez známek atrezie nebo dokonce hyperestrogenních novotvarů (obr. 11, 12). Naproti tomu produkt luteinních buněk – progesteron, který se přes progesteronové receptory uplatňuje spíše jako inhibiční faktor procesu transkripce a tedy následné proteosyntézy a v kombinaci s estrogenním vlivem, podporuje vylučování sekretu. Ve srovnání se estrogenními receptory jsme nukleární frakci progesteronových receptorů nacházeli podstatně vzácněji. V případě rozsáhlejší atrezie folikulů a frekventnějších projevů apoptózy buněk je nukleární výskyt frakce estrogenních receptorů omezen pouze na jednotlivá jádra a to dokonce v takové míře, že v některých folikulech zcela chybí a ve stromálních elementech ovariální kůry jsou jen ojedinělé. (obr. č.10). Cytosolová frakce estrogenních receptorů však byla detekována

alespoň v limitované míře téměř pravidelně.

V souboru pacientek, u kterých bylo provedeno bioptické vyšetření ovariální tkáně pro závažnou poruchu menstruačního cyklu bylo zajímavé srovnání výskytu steroidních receptorů s dvěma dívkami s nálezem hormonálně aktivního tumoru (2x nádor z buněk granulózy, hormonálně aktivní s rozvojem předčasné puberty). Zde se nám podařilo prokázat nejen extrémně vysoké počty primárních folikulů v ovariální kůře, ale také vysokou incidenci atretických procesů v oocytech a folikulárních buňkách, ale také v porovnání s dospívajícími i rozdílnou expresi estrogenních receptorů. Zatímco u prepubertálních a pubertálních dívek byla zjištěna pozitivita těchto receptorů jak v jádrech folikulárních buněk (nukleární receptory) tak i v jejich cytoplasmě (cytosolové receptory) a stejně tak i v ooplasmě i jádru oocytu, ve zmíněných vzorcích nádorem změněných ovárií byla exprese estrogenních receptorů minimální a to jen v jádru oocytu.

Spíše kazuistický nález pak představovala biopsie 16-ti leté dívky u níž bylo geneticky zjištěno pro primární amenoreou a opožděný vývoj puberty chromozomová vada 46 XY. V operačním nálezu dominovala hypoplastická děloha s vejcovody a spíše jen proužkovitými gonádami. Mikroskopické vyšetření poskytlo obraz, ložiskovitě připomínající ovotestis s projevy kalcifikace primitivních kanálků, zatímco na jiných místech gonády byly zastoupeny okrouhlé eosinofilní masy obklopené prakticky nediferencovanými buňkami coelomového epitelu jako výraz folikulárního uspořádání. Vedle toho byly masy se znaky gonocytů je nepravidelně ohraničené coelomovými buňkami, blízcími se morfologii seminomu (obr. č. 28).

6.5. Prevalence antiovariálních protilátek ve skupině pacientek léčených hormonální substituční terapií

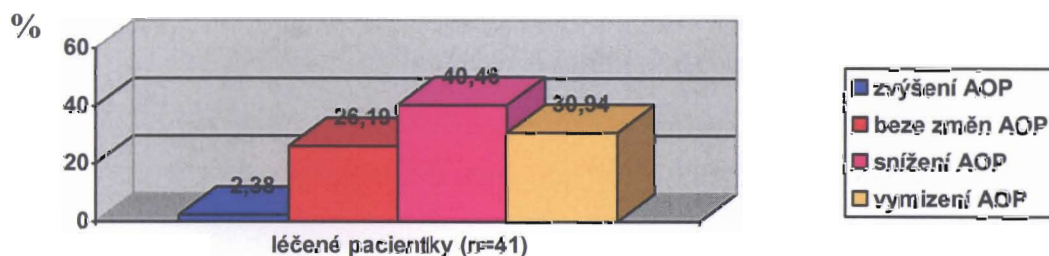
Pacientky z tohoto souboru (n=41) byly po základním vyšetření, průkazu positivity antiovariálních protilátek a většinou po laparoskopické biopsii ovária zařazeny do terapeutického schématu s použitím hormonální substituční léčby. Dávkovací schéma vycházelo s obecně uznávaného moderního principu „taylor made therapy“. Spočívá v podávání malých dávek estrogenů za pravidelných kontrol hormonální funkční poševní cytologie (viz obr. 29). Dosažení obrazu pozdní proliferace (obr. č.17) pak určuje okamžik, kdy režim pouze estrogenové terapie měníme na bifázickou estrogen-progesteronovou HRT (obr. č. 29). Příznivým efektem je také vliv

této terapie na dělohu (růst, zpětná rekonstrukce involvované dělohy v důsledku dlouhodobějšího hypoestrinismu), tělesný vovoj (sekundární pohlavní znaky), a na metabolismus, především kostní (u velké části našich pacientek byla prokázána před léčbou osteopenie při vyšetření kostní densitometrií, u malé části dokonce i osteoporóza), ale především, tím, že hormonální substituce uvede ovárium do funkčního klidu, s následným snížením až vymizením antigenních determinant. Po 6 měsících terapie byly pacientky opakovaně odebrány ke zjištění prevalence antiovariálních protilátek.

V naší skupině pacientek (n=41), u 2,38% pacientek se hladiny antiovariálních protilátek zvýšily, u 26,19% pacientek nedošlo ke změně a u 40,46 % se výrazně hladiny autoprottilátek snížily nebo prottilátky ve 30,94% zcela vymizely – viz graf. č. 18, 19.

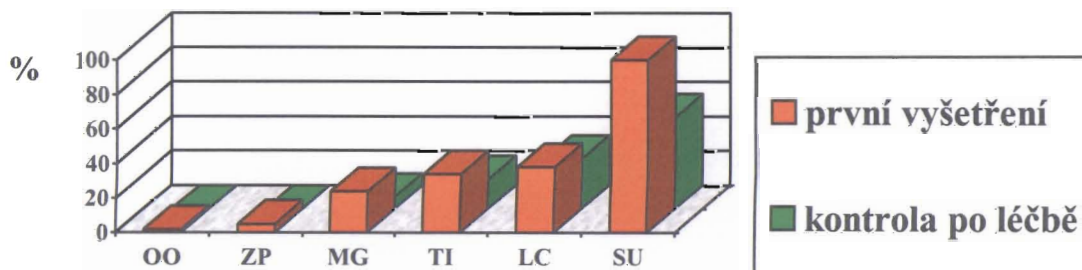
Graf. č. 18

Prevalence antiovariálních protilátek u pacientek po 6 měsíční terapii



Graf. č. 19

Prevalence antiovariálních protilátek při prvním odběru a při kontrolním odběru po léčbě



OO ooplasma, ZP zona pellucida, MG membrana granulosa
 TI théca interna, LB luteinní buňky

Na základě McNemarova testu (testu pro významnost změn) bylo zjištěno, že: u pacientek s pozitivitou protilátek proti strukturám OO a ZP po 6měsíční léčbě byla hladina antiovariálních protilátek statisticky významně snížena $\chi^2 = 5,00$ [0,0253], u pacientek s pozitivitou protilátek proti MG byly hladiny také sníženy $\chi^2 = 15,21$ [0,00009], u pacientek s pozitivitou protilátek proti byla hladina po léčbě také významně nižší $\chi^2 = 13,76$ [0,00021] a u positivity proti LB také $\chi^2 = 9,00$ [0,00269] tím zamítáme testovanou hypotézu, tzn. že procento pozitivního výsledku před léčbou není stejné jako po léčbě.

7. ZÁVĚR

Jednou z příčin vzniku předčasného ovariaálního selhání je autoimunní poškození ovaria. Nástup onemocnění je velmi pozvolný, kdy po menarché a zprvu pravidelných menstruačních cyklech následují poruchy cyklu, nejčastěji typu oligomenorey až sekundární amenorey. Toto onemocnění je velice závažné a může nastoupit kdykoliv od puberty po celé reprodukční období a může být příčinou sterility postižené ženy, vzácně je popisován u dospívajících dívek.

Panují veliké rozpory a rozpaky, zda vůbec toto onemocnění řadit mezi autoimunitní choroby, či co je příčinou onemocnění, zda kolující autoprotilátky či buněčná složka imunity. Často kladenou otázkou je také význam detekce a výskytu antiovariaálních protilátek, zda jde o příčinu onemocnění či zda se jedná o výsledek vlastního postižení ovárií.

V naší studii jsme se pokusili zmapovat výskyt antiovariaálních protilátek u pacientek s poruchami menstruačního cyklu, pacientek léčených pro sterilitu a porovnat je s výskytem těchto protilátek ve zdravé populaci žen a dívek. Současně jsme provedli morfologickou a imunohistochemickou analýzu bioptických vzorků, které byly odebrány u indikovaných pacientek s těmito závěry:

1. ve skupině zdravých žen jsme zachytili pozitivitu antiovariaálních protilátek jen proti luteinním buňkám a to kolem 3-6%. To zcela odpovídá v literatuře uváděným hodnotám výskytu ve zdravé populaci. Výskyt protilátek v první skupině dárkyň krve však byl nejprve kolem 20%. Toto zjištění nás vedlo k retrospektivní analýze anamnestických dat dárkyň krve, 8 pacientek s pozitivitou protilátek mělo poruchy menstruačního cyklu nebo koncepční neúspěchy a proto jsme tyto ženy z kontrolní skupiny vyřadili.

V hlavní vyšetřované skupině pacientek s poruchami menstruačního cyklu byl výskyt protilátek velmi vysoký, ve skupině pacientek s primární amenoreou byl nález autoprotilátek kolem 67 % ve skupině pacientek s oligo/sekundární amenoreou kolem 64 %. U pacientek s primární amenoreou jsme zachytili více autoprotilátek proti germinálním složkám ovaria, zejména proti ooplazmě, což souvisí s atrézií folikulů již v časném stádiu vývoje. Současně jsme v této skupině zachytili vysokou hladinu FSH v porovnání se skupinou zdravých žen a dívek. Tento stav je zřejmě způsoben neadekvátní odpovědí folikulů. Při vyšetřování pacientek z toho souboru jsme u 5

pacientek narazili na chromozomální abnormality. U jedné pacientky s průkazem syndromu androgenové rezistence (testikulární feminizace při karyotypu 46,XY) jsme nezjistili pozitivitu protilátek proti strukturám ovária. Naopak u skupiny pacientek s mozaikovým karyotypem jsme zachytili nejvyšší prevalenci antiovariálních protilátek ze všech námi sledovaných skupin. Tento fakt sice je zatížen chybou malých čísel, ale podporuje hypotézu, že antiovariální protilátky nejsou přímou příčinou, ale výsledkem onemocnění.

Ze sérových protilátek jsme nejčastěji zachytili v obou skupinách protilátky proti steroidy produkujícím buňkám, což zcela odpovídá literárním údajům, že jsou to právě vyvíjející se folikuly, které jsou převážně infiltrované mononukleárními zánětlivými buňkami (98). Preantrální folikuly jsou ohraničeny malými lemy lymfocytů a plasmatických buněk, zatímco větší folikuly mají výraznou zánětlivou celulizaci externí a interní thékální vrstvy. Tento závěr opět koresponduje s naším nálezem vysoké prevalence protilátek proti buňkám theca folliculi interna. Jen v 15.6 % u pacientek s primární amenoreou a u 23% pacientek s oligo/sekundární amenoreou byly zjištěny protilátky proti buňkám membrana granulosa, což koresponduje s morfoloogickým obrazem atrezie folikulů již v ranných stádiích diferenciaci. Granulozová vrstva je běžně ušetřena lymfocytární infiltrací až do ovulace, kdy se objevuje degenerace folikulu.

Ze závěrů grantových zpráv řešených na našem pracovišti v letech 1992-1997 (kap. 10.) byla prevalence protilátek u pacientek s inzulín dependentním diabetes mellitus premenarcheálních podobná nálezu prevalence protilátek u naší skupiny pacientek s primární amenoreou. Skupinu pacientek s IDDM a s nepravidelnou menstruací charakterizuje významně vyšší prevalence protilátek proti ooplasmě, membráně granuloze a luteinním buňkám, u pacientek s pravidelnou menstruací byla zjištěna vyšší prevalence proti struktuře zona pellucida. Z hodnot HbA1c však vyplývá, že poruchy menstruačního cyklu u pacientek s IDDM souvisí jak s hladinou antiovariálních protilátek tak především s dekompenzací diabetes mellitus.

2. Z rozboru výskytu ovariálních protilátek u sterilních pacientek je zřejmé, že pro úspěšnou graviditu je rozhodující nepřítomnost protilátek proti germ-line strukturám (OO,ZP). Dále platí, že fertilizace oocyty a jeho následné rýhování je možné i při výskytu protilátek proti ooplasmě, ale jejich zvýšená frekvence, a to zvláště pokud jde o protilátky proti zona pellucida, může být významná pro samotnou fertilizaci. Lze se domnívat, že protilátky vázané na zona pellucida mohou obsahovat receptory pro

navázání spermie. Konečně 50% přítomnost OO-protilátek ve skupině bez zisku oocyty při aspiraci může být výrazem defektní maturace oocyty.

3. Ačkoliv bylo ovárium považováno za orgán chráněný imunoprotektivní bariérou, což je pochopitelné vzhledem k přítomnosti buněk pohlavní linie (germ-line cells), lze očekávat, že při masivní atrezii folikulů nebo zániku corpus luteum může být tato hematoovariální bariéra překonána, s následnou aktivní účastí aktivovaných makrofágů (celulární imunita). Právě taková situace nabízí nejsnadnější vysvětlení možnosti vzniku autoimunitního onemocnění na základě zvýšené hladiny endogenních ovariálních antigenů, která je předpokládánou příčinou syndromu primárního ovariálního vyhasnutí. Proti tomuto faktu však zdánlivě svědčí nález mononukleární infiltrace ovariální kůry v našem souboru jen u dvou pacientek z 30 pacientek indikovaných k ovariální biopsii, což podporuje i literární nález mononukleární infiltrace kůry ovária u 3 % pacientek s předčasným ovariálním selháním. Avšak právě taková situace nabízí nejsnadnější vysvětlení možnosti vzniku autoimunitního onemocnění na základě zvýšení hladiny endogenních ovariálních antigenů a jejich dostupnosti imunitnímu systému. Ze získaných výsledků se zdá, že akutní autoimunitními buňkami zprostředkované onemocnění je jev časově velmi omezený, po kterém následuje vznik endogenních antigenních determinant a to vede k sekundární tvorbě antiovariálních protilátek, které se následně podílejí na zvýšené atrezii folikulů, což je postupně následováno vymizením folikulárního aparátu. Až po významném snížení množství folikulů v ováriu se projeví onemocnění klinicky (viz. analogie s IDDM).

4. Dle našich výsledků se domníváme, že na základě sledování sérových antiovariálních protilátek, hladin hypofyzárních, ovariálních hormonů a bioptických nálezů lze konstatovat, že je možné interpretovat aktuální stav neurohumorální regulace, imunní odpověď organismu a také odhadnout stav postižených gonád. Zatímco vlastní průběh autoimunitního onemocnění ovária lze tedy zachytit jen ve výjimečných případech, prakticky ve všech případech je zřejmá stimulace atretických procesů a to až po úplný deficit rozvoje folikulárního aparátu. Tyto procesy, provázené až vymizením germ-line komponent v kůře ovária, jsou asociovány s fibrotizací stromatu kůry ovária, v němž převládá složka mezibuněčné hmoty. Aplikace imunohistochemické detekce apoptozy pomocí průkazu kaspázového účinku na cytokeratin 18 prokázala v souladu s aktuálními literárními daty apoptotickou povahu atrezie folikulů.

5. Většina pacientek soustředěných v dispenzární péči byla na základě vyšetření hladin gonadotropních (FSH,LH) a ovariálních hormonů (E2 a progesteronu) léčena náhradní hormonální léčbou (hormonal replacement therapy), jako analogie jiných autoimunitních endokrinopatií (léčba inzulinem u IDDM, léčba onemocnění štítné žlázy, atd.). Nejčastějším používaným schématem bylo zpravidla podání Estrofemu 1-2 mg ob den do vyvolání proliferačního efektu a následná léčba Proverou 10mg ob den. To umožnilo nastartovat zprvu arteficiální cyklické procesy postmenarchálního období, ale také vyhodnotit autoimunitní odpověď organismu na ovariální antigenní determinanty. Úspěšnost zvoleného terapeutického postupu se odrazila i v profilu výskytu antiovariálních protilátek, kdy ve 40,46% případů se hladina autoprottilátek výrazně snížila a ve 30,94% protilátky úplně vymizely po nejméně 6 měsíčním odstupu od úvodního stavu. Jsme si vědomi toho, že se nejedná o kauzální terapii, ale jen o léčbu substituční, ale předpokládáme, že substituční terapií můžeme oddálit přechasný ovariální selhání. Vzhledem k tomu, že cílem autoimunitního útoku jsou především rostoucí folikuly, pokud uvedeme ovarium pomocí substituční léčby do klidového stavu, snížíme další poškozování ovária. Touto prací bychom chtěli zdůraznit nutnost včasné a správné diagnostiky a včasné léčby poruch menstruačního cyklu u dospívajících dívek, které jsou mnohdy lékaři podceňovány, a které při tom mohou být známkou závažného postižení ovária.

8. DISKUSE

Jak již bylo mnohokrát uvedeno, existuje velké množství kontroverzních názorů na autoimunitní příčinu předčasného ovariaálního selhání a na roli a výskyt antiovariálních protilátek u všech autorů, kteří se tímto problémem zabývají či se zabývali. Různost nálezů i názorů vyplývá mimo jiné s různých metod detekce hladin antiovariálních protilátek i sledování buněčné složky autoimunity i použití těchto metod u různých, často nejasně definovaných souborů pacientek.

My jsme se zaměřili na detekci autoprotiilátek proti ováriu v několika základních skupinách, včetně skupiny kontrolní. K korelaci výsledků antiovariálních jsme u části pacientek, které byly indikovány k laparoskopické biopsii ovária provedli také morfologický a imunohistochemický výzkum ovariaálních bioptických vzorků.

Již na začátku výzkumu, který probíhá na gynkologicko-porodnické klinice UK 2.LF a FN v Motole v od r. 1992 (1, 2) byla položena otázka, jaký cílový orgán použít při detekci antiovariálních protilátek. I v tomto ohledu panuje v literatuře velké množství nesourodých informací. Po důkladném výzkumu jsme začali k detekci využívat ovária pohlavně zralých krys, kdy jsme srovnávali výsledky zjištěné prevalence autoprotiilátek současně proti vzorkům lidských ovárií. Vzhledem k tomu, že všechny kontrolní výsledky byly zcela shodné, začali jsme prakticky využívat k detekci autoprotiilátek proti ováriu jen krysí ovária, která jsou na rozdíl od lidských snadno dostupná.

Další problém nastal při výzkumu prevalence antiovariálních protilátek již v kontrolní skupině zdravých žen, kdy jsme ve skupině dárcyň krve zachytili prevalence autoprotiilátek proti ováriu až u 20% žen. Vedlo nás to k retrospektivní analýze anamnestických dat dárcyň krve a posléze jsme zjistili, že 8 žen z 9 pozitivních mělo gynkologické problémy – především poruchy menstruačního cyklu a poruchy fertility. Následné výsledky dalších kontrolních skupin již podpořili v literatuře nejčastěji uváděné množství 5% výskytu prevalence autoprotiilátek proti luteinním buňkám i ve zdravé populaci bez subjektivních i objektivních obtíží.

Ve zkoumaném hlavním souboru dívek s poruchami menstruačního cyklu jsme prokazali statisticky významný výskyt protilátek proti ovariaálním strukturám korelujících s klinickým obrazem. Nejvyšší hladiny autoprotiilátek jsme však našli u skupiny dívek s chromozomální aberací (n=5). Získané výsledky sice mohou být zatíženy chybou malých čísel, ale při dřívějších výzkumech byla provedena detekce antiovariálních

protilátek u 41 pacientek s Turnerovým syndromem léčených na ambulanci gynekologie dětí a dospívajících UK 2.LF a FN v Motole a v endokrinologické ambulanci II. dětské kliniky UK 2.LF a FN v Motole (kap. 10., 20, 21). Tato větší skupina fakt nejvyšší nalezené prevalence právě u dívek s chromozomální aberací potvrdila a svědčí o tom, že hladina antiovariálních protilátek je spíše výsledkem nežli příčinou postižení ovária a podporuje fakt primárně buněčné příčiny autoimunitního onemocnění.

Proti tomuto faktu zase svědčí jen výjimečný nález mononukleární infiltrace kůry ovária biopťovaných pacientek. Tyto ojedinělé nálezy si vysvětlujeme tak, že akutní autoimunitní onemocnění je časově omezený jev, který je náledován chronicky vystupňovanou programovanou buněčnou smrtí folikulů v ováriích, což vede postupně ke snížení až vymizení germ-line buněk s to se projeví nejčastěji oligomenoreou až sekundární amenoreou, vzácněji amenoreou primární. V době, kdy se onemocnění projeví již prakticky nenalézáme akutní stav charakterizovaný buněčnou imunitní infiltrací ovária, ale jen vystupňovanými procesy fibrotizace kůry ovária. Zánik folikulů probíhá při tom apoptózou, což jsme prokázali, čili je prakticky stejný, jako děj, kterým zanikají fyziologicky folikuly v ováriu i u zcela zdravých jedinců, avšak u našich pacientek byl tento stav vzhledem k věku vystupňovaný.

Při statistickém hodnocení dat získaných při vyšetření folikulární tekutiny jsme neměli srovnání s výsledky folikulární tekutiny zdravých žen. Velkým překvapením tak pro nás bylo zjištění, že celkový podíl pozitivních autoprotilátek u pacientek, u kterých se zdařilo těhotenství je stejný jako ve skupině pacientek, u kterých se nezdařila fertilizace oocytů a stejný jako ve skupině pacientek bez oocytů. Tyto výsledky nás vedly k podrobnější analýze výskytu antiovariálních protilátek v séru a ve folikulární tekutině vzhledem k úspěchu fertilizace, při tom jsme zjistili, že nález nízkého fertilizačního úspěchu se shodoval především s výskytem protilátek proti ooplasmě jak v krvi tak ve folikulární tekutině postižených pacientek, na rozdíl od protilátek proti jiným strukturám ovária. Proto právě ve skupině pacientek od nichž nebyl získán ani jeden oocyt byla hladina protilátek proti této struktuře ovária nejvyšší.

Dalším důležitou součástí naší práce byla snaha o zjištění nejlepší terapie pro naše pacientky. V literatuře opět existovaly různé studie s různými výsledky, které se často rozcházely. Ve většině studií byly použity k terapii kortikosteroidy. Vzhledem k různosti výsledků použití této léčby v různých studiích a jejich nežádoucím účinkům, především při dlouhodobém použití a použití u dospívajících dívek jsme se v naší studii rozhodli, že v analogii k nejčastěji se vyskytujícím souběžným autoimunitám (IDDM,

Graves-Basedovova choroba atd.) použijeme hormonální substituční léčbu. V našem případě jsme použili „taylor made therapy“, tedy podávání malých, kontrolovaně individuálních dávek estrogenů, následovaných po zjištění pozdní proliferace v hormonální funkční cytologii progesteronem. O úspěchu naší terapie jsme se přesvědčili po 6 měsících léčby pomocí detekce hladiny antiovariálních protilátek, kdy jsme v 40,46 % zaznamenali snížení a u 30,94% pacientek vymizení protilátek. Tento fakt je doložen i tím, že u většiny pacientek při této terapii se objektivně zlepšil stav vnitřních rodidel, sekundárních pohlavních znaků. Za zcela zásadní považujeje současně zlepšení kostní density.

9. SHRNU TÍ

Výsledky naší studie a mapování výskytu sérových antiovariálních protilátek nás vede k přesvědčení, že výskyt autoprotilátek proti ovariu koresponduje s dříve či později se prezentujícími klinickými příznaky. Onemocnění může propuknout v období od puberty po celé reprodukční období. Zavedení adekvátní léčby (v naší studii se osvědčilo použití HRT) podle našich poznatků vedlo ke snížení autoimunního poškození ovaria na minimum, k zachování jeho hormonálních funkcí a především k zachování zdravé ovariální tkáně, nezbytné pro budoucí fertilitu pacientky. Naše studie tedy potvrdila nepochybně obrovský význam včasné diagnostiky a léčby autoimunitního onemocnění ovaria. Z výsledků vyšetření hladin antiovariálních protilátek ve folikulární tekutině pacientek zařazených od IVF programu vyplývá, že při řešení neplodnosti je třeba myslet i na tuto příčinu sterility spojenou s menšími úspěchy v IVF programu.

10. PODĚKOVÁNÍ

Výzkum probíhal ve spolupráci Kliniky gynekologie dětí a dospívajících a Gynekologicko-porodnické kliniky UK 2.LF a FN v Motole a Ústavu histologie a embryologie UK 1.LF v Praze. Mé poděkování patří zejména mému školiteli a učiteli prof. MUDr. Janu Hořejšímu, DrSc., za pomoc, cenné rady a odborné vedení mého studia. Dále bych chtěla poděkovat za pomoc i laskavé rady svému školiteli-specialistovi prof. MUDr. Jindřichu Martínkovi, DrSc., zejména za laboratorní část tohoto projektu. Velmi bych také chtěla poděkovat RnDr. Daně Novákové, která byla vzácnou rádkyní při tvorbě této práce a zasloužila se o výzkum problematiky antiovariálních protilátek v ČR, zejména v počátcích výzkumu. Práce by samozřejmě nevznikla bez pomoci kolegů dětských gynekologů a lékařů Centra asistované reprodukce gynekologicko-porodnické kliniky MUDr. Leoše Teslíka, MUDr. Radky Vetešníkové-Koubové, MUDr. Milady Brandejské, MUDr. Dagmar Smetanové, CSc., MUDr. Martina Charváta, MUDr. Jindřicha Madara, CSc. z Ústavu péče o matku a dítě v Podolí, který se zasloužil především o výzkum protilátek u sterilních pacientek, endokrinoložky doc. Marty Šnajdrové, CSc. II. dětské kliniky naší fakulty, která se podílela zejména na výzkumu protilátek u dívek s Turnerovým syndromem a diabetes mellitus. Můj dík patří také sestřám ambulance a oddělení dětské gynekologie, laborantkám Ústavu histologie a embryologie UK 1.LF a sestřám a laborantkám Ústavu péče o matku a dítě v Podolí a II. dětské kliniky UK 2.LF a FNM..

Disertantka ve své práci vychází z grantového výzkumu, jehož byla spoluřešitelkou. Do některých souborů zařadila i poznatky z předchozích grantů se stejnou či obdobnou tematikou, zejména tam, kde to bylo vhodné pro srovnání vlastních výsledků, a dokládá to seznamem publikací a přednášek, v nichž byly tyto materiály prezentovány.

Grantové závěrečné zprávy:

1. Hořejší J., Nováková D., Martínek J.: Studium autoimunního poškození ovária a jeho funkcí. Závěrečná zpráva grantu IGA MZ ČR č. Z 1153-3 (1992 – 1994), FN Motol, Praha 1994, 95 s.
2. Hořejší J., Martínek J., Nováková D., Šnajderová M., Teslík L., Zuntová A., Brandejská M.: Studium významu protilátek a jejich vztah k endokrinní a reprodukční

funkci lidského ovaria. Závěrečná zpráva grantového úkolu IGA MZ ČR č. Z 2866-3 (1995 – 1997) FN Motol, Praha 1998, 144 s.

3. Hořejší J., Martínek J., Makalová D., Šnajderová M., Teslík L., Jirsová Z., Koloušková S., Vetešníková-Koubová R., Mlčochová H.: Autoimunitní endokrinopatie u dospívajících dívek a jejich odraz ve funkci ovaria. Závěrečná zpráva grantového úkolu IGA MZ ČR č. NH 5664-3 (1999 – 2001). UK 2. LF, Praha 2001, 107 s.

Publikace:

1. Šnajderová M., Martínek J., Nováková D., Hořejší J., Lebl J., Koloušková S.: Antiovarian antibodies in girls with type I. diabetes mellitus. *Hormone research* 1994, 41:130.

2. Hořejší J., Nováková D., Martínek J., Teslík L.: The role of antiovarian autoantibodies in primary amenorrhoea and primary ovarian dysfunction in girls.

Singapore Journal of Obstetrics and Gynecology 1996, 27/2:73-75

3. Hořejší J., Nováková D., Martínek J.: Circulating ovarian autoantibodies and FSH, LH levels in adolescent girls with primary menstrual cycle disorders. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 1996, 9/2:74-78

4. Martínek J., Madar J., Nováková D., Hořejší J.: Ovarian antibodies and cytokines in the follicular fluid. Abstracts of Symposium „Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry“. Charles University, Prague 1997, s.33.

5. Nováková D., Martínek J., Hořejší J., Pechová M.: Autoantibodies against adrenal gland and thyroid gland. Abstract. 3. symposia českých reprodukčních imunologů s mezinárodní účastí. Masarykova Univerzita v Brně, 1997, s.25.

6. Hořejší J., Martínek J., Brandejská M.: Autoimmune ovarian antibodies and its influence on succes of IVF-ET program. Book of abstracts, 4th International Congress „The Young Woman at the Rise of the 21th Century: Gynecological and Reproductive Issues in Health and Disease“. *Adolescent Gynecology, Reproduction and Menopause* 1998, 10/4:294.

7. Hořejší J., Martínek J., Nováková D., Madar J.: Autoimmune antiovarian antibodies and its influence on menstrual irregularities and infertility. Abstracts of 13th Congress of European Gynecologists and Obstetricians (EAGO). Ares Serono International, Jerusalem, 1998, s.58.

8. Šnajderová M., Martínek J., Hořejší J., Nováková D., Lebl J., Koloušková S.:

Premenarchal and postmenarchal girls with insulin-dependent diabetes mellitus: Ovarian and other organ-specific autoantibodies, *Menstrual cycle. J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 1999, 12/4:209-214.

9. Šnajderová M, Koloušková S, Šumník Z, Cinek O, Martínek J, Hořejší J, Štěchová K, Vavřinec J.: Menstrual cycle in young patients with type I diabetes mellitus. Abstracts of the 8th World Congress of Gynecological Endocrinology, Florence, Italy *Gynecological Endocrinology* 2000, 14, 2:161.

10. Nováková D., Martínek J., Hořejší, J., Šnajderová: Autoimunitní poškození ovárií. Abstrakta z imunologického sjezdu, Liberec, 2000 *Alergie*, 2, Suppl. 2., 2000, s. 28.

11. Hořejší J., Martínek J., Jirsová Z.: Structure of the Ovary in Adolescent Females with Functional Disturbances with Regard to Progressive Apoptosis and Prevalence of Antiovarian Autoantibodies. Abstract. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2000, 70:16.

12. Hořejší J., Martínek J., Nováková D., Madar J., Brandejská M.: Autoimmune Antiovarian Antibodies and Their Impact on the success of an IVF/ET. In: Creatas, G., Mastorakos, G., Chrousos G.P. (Eds.): *The Young Woman at the Rise of the 21st Century. Gynecological and Reproductive Issues in Health and Disease. Annals of the New York Academy of Sciences* 900, April 2000, p. 351-356.

13. Martínek J., Hořejší J., Šnajderová M.: Structural and functional aspects of the ovary in consequence to circulating ovarian autoantibodies. *Sborník lékařský* 2001, 102:301.

14. Hořejší J., Martínek J., Nováková D., Madar J.: Autoimmune antiovarian antibodies and its influence on menstrual irregularities and infertility. Abstracts of 13th Congress of European Gynecologists and Obstetricians (EAGO). Ares Serono International, Jerusalem, 1998, s.58.

15. Šnajderová M., Heresová J., Mardešič T., Křenek M., Hořejší J., Kalvachová B., Popelová J., Mikešová E., Wohlová G., Feber J., Geržová H., Hroboňová V., Teslík L., Zoumarová M., Vejvalková Š.: Turnerův syndrom: Přehled problematiky, současný stav, návrh koncepce péče a protokol sledování v dětství, adolescenci a v dospělosti. *Čas. Lék.čes.* 2001, 140/17:533-537.

16. Šnajderová M., Mardešič T., Geržová H., Teslík L., Zapletalová J., Lebl J., Hořejší J., Zoumarová M., Zikmund J., Brandejská M., Kalvachová B., Lánská V.: Faktory ovlivňující vývoj dělohy u žen s Turnerovým syndromem. Abstrakta XXIV. endokrinologických dnů v Hradci Králové, 25.-27.9.2001. *Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa* 4, Suppl. 3., 2001, s. 38.

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Bartůňková J., Hořejší V.: *Základy imunologie*. Praha 2005, 3:205-220
2. Kroemer G., Martinez C.: Mechanisms of self tolerance. *Immunol Today* , 1992, 13:401–404.
3. Kappler J.W., Roehm N., Marrack P.: T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987, 49:273–280.
4. Schwartz R.H.: A culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990, 248:1349–1356.
5. Morahan G., Allison J., Miller JF.: Tolerance of class I histocompatibility antigens expressed extrathymically. *Nature* 1989, 339:622–624.
6. Mohler K.M., Streilein J.W.: Differential expression of helper vs. effector activity in mice rendered neonatally tolerant of class II MHC antigens. *Transplantation* 1989, 47:633–640.
7. Voorbij H.A., Kabel P.J., de Haan M., Jeucken P.H., van der Gaag R.D., de Baets M.H., Drexhage H.A.: Dendritic cells and class II MHC expression on thyrocytes during autoimmune thyroid disease of the BB rat. *Clin Immunol Immunopathol* 1990, 55:9–22.
8. Hanafusa T., Pujol-Borell R., Chiovato L., Doniach D., Russell R.C., Doniach D., Bottazzo G.F.: Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. *Lancet* 1983, 2:1111–1115.
9. Iwatani Y., Amino N., Miyai K . Peripheral self tolerance and autoimmunity: the protective role of expression of class II major histocompatibility antigens on non-lymphoid cells. *Biomed Pharmacother* 1989, 43:593–605.
10. Miller A., Hafler D.A., Weiner H.L.: Tolerance and suppressor mechanisms in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for immunotherapy of human autoimmune diseases. *FASEB J* 1991, 5:2560–2566.
11. Batchelor J.R., Lombardi G., Lechler R.I.: Speculations on the specificity of suppression. *Immunol Today* 1989, 10:37–40.
12. Mosmann T.R., Coffman R.L.: Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989, 7:145–173.
13. Day M.J., Tse A.G., Puklavec M., Simmonds S.J., Mason D.W.: Targeting autoantigen to B cells prevents the induction of a cell mediated autoimmune disease in rats. *J Exp Med* 1992, 175:655–659.

14. Milgrom F., Witebsky E.: Autoantibodies and autoimmune disease. *JAMA* 1962, 181:706–717.
15. Bottazzo G.F.: Banting Lecture. On the honey disease. A dialogue with socrates. *Diabetes* 1993, 42:778–800.
16. Wick G., Brezinschek H.P., Hala K., Dietrich H., Wolf H., Kroemer G.: The obese strain of chickens: an animal model with spontaneous autoimmune thyroiditis. *Adv Immunol* 1989, 47:433–500.
17. Voorbij H.A., van der Gaag R.D., Jeucken P.H., Bloot A.M., Drexhage H.A.: The goitre of the BB/O rat: an animal model for studying the role of immunoglobulins stimulating growth of thyroid cells. *Clin Exp Immunol* 1989, 76:290–295.
18. Sakaguchi S., Sakaguchi N.: Organ-specific autoimmune disease induced in mice by elimination of T cell subsets. V. Neonatal administration of cyclosporin A causes autoimmune disease. *J Immunol* 1989, 142:471–480.
19. Greiner D.L., Handler E.S., Nakono K., Mordes J.P., Rossini A.A.: Absence of the RT-6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats. *J Immunol* 1986, 136:148–151.
20. Volpe R.: The immunoregulatory disturbances in autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 1988, 2:55–72.
21. Weetman A.P.: Immunogenetics and autoimmunity. In: Weetman AP (ed) *Autoimmune Endocrine Disease*. Cambridge Reviews in Clinical Immunology 1991. Cambridge University Press, p.39–65.
22. Todd J.A., Aitman TJ., Cornall R.J., Ghosh S., Hall J.R. et al.: Genetic analysis of autoimmune type I diabetes mellitus in mice. *Nature* 1991, 351:542–547.
23. Epplen J.T., Buitkamp J., Bocker T., Epplen C.: Indirect gene diagnoses for complex (multifactorial) diseases. a review. *Gene* 1995, 159:49–55.
24. Turkington R.W., Lebovitz H.E.: Extra-adrenal endocrine deficiencies in Addison's disease. *Am J Med* 1967, 43:499–507.
25. Luborsky J., Llanes B., Roussev R. and Coulam C.: Ovarian antibodies, FSH and inhibin B: independent markers associated with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2000, 15:1046–1051.
26. Luborsky J.L., Thiruppathi P., Rivnay B., Roussev R., Coulam C. and Radwanska E.: Evidence for different aetiologies of low estradiol response to FSH: age-related accelerated luteinization of follicles or presence of ovarian antibodies? *Hum Reprod* 2002, 17:2641–2649.
27. Anasti J.N.: Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril* 1998, 70:1–15.

28. Kalantaridou S.N., Davis S.R., Nelson L.M.: Premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998, 27:989–1006.
29. Wulffraat N.M., Drexhage H.A., Bottazzo G.F.: Autoimmune aspects of Addison's disease. In: James VHT (ed) *The Adrenal Gland*, ed 2. Raven Press 1992, New York, p. 263–288.
30. Muir A., Schatz D.A., MacLaren N.K.: Autoimmune polyglandular syndrome. In: de Groot LS (ed) *Endocrinology*, ed. 3. WB Saunders 1995, Philadelphia, p. 3013–3024.
31. Betterle C., Rossi A., Dalla Pria S., Artifoni A., Pedini B., Gavasso S., Caretto A.: Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993, 39:35–43.
32. Golonka J.E., Goodman A.D.: Coexistence of primary ovarian insufficiency, primary adrenocortical insufficiency and idiopathic hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1968, 28:79–82.
33. Ho P.C., Tang G.W.K., Fu K.H., Fan M.C., Lawton W.M.: Immunologic Studies in patients with premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1988, 71:622–626.
34. Damewood M.D., Zacur H.A., Hoffman G.J., Rock J.A.: Circulating antiovarian antibodies in premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986, 68:850–854.
35. Novosad J., Kalantaridou S.N., Tong Z.B., Nelson L.M.: Ovarian antibodies as detected by indirect immunofluorescence are unreliable in the diagnosis of autoimmune premature ovarian failure: a controlled evaluation. *BMC Women's Health* 2003, 3:2–9.
36. Chernyshov V.P., Radysh T.V., Gura I.V., Tatarshuk T.P., Khominskaya Z.B.: Immune disorders in women with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 2001, 46:220–225.
37. Mignot M.H., Drexhage H.A., Kleingeld M., Van den Plassche-Boers E.M.: Premature ovarian failure. II: Considerations of cellular immunity defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989, 30:67–72.
38. Hoek A., van Kasteren Y., de Haan-Meulman M., Hooijkaas H., Schoemaker J.: Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets, NK cells, and delayed type hypersensitivity skin test in patients with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 1995, 33:495–502.
39. Pekonen F., Sieberg R., Makinen T., Miettinen A., Ili-Korkala O.: Immunological disturbances in patients with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986, 25:1–6.

40. Damjanovic M.: Experimental autoimmune oophoritis. II. Both lymphoid cells and antibodies are successful in adoptive transfer. *Autoimmunity* 1991, 9:217–223.
41. Tung K.S.K., Garza K.M., Lou Y., Bagavant H.: Autoimmune ovarian disease: mechanism of induction and prevention. *J Soc Gynecol Invest* 2001, 8(Suppl), 49–51.
42. Furmaniak J., Kominami S., Asawa T., Wedlock N., Colls J., Smith B.R.: Autoimmune Addison's disease - evidence for a role of steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:1517–1521.
43. Winqvist O., Karlsson F.A., Kämpe O.: 21-Hydroxylase, a major autoantigen in idiopathic Addison's disease. *Lancet* 1992, 339:1559–1562.
44. Baumann-Antczak A., Wedlock N., Bednarek J., Kiso Y., Krishnan H.: Autoimmune Addison's disease and 21-hydroxylase. *Lancet* 1992, 340:429–430.
45. Poruchy menstruačního cyklu
46. Martínek, J., Kučera T., Jirsová Z., Mlčochová H., Hořejší J.: Possible regulatory mechanisms in the ovarian disorders. *Biomedical Papers* 2004, December, 148: p. 233–235
47. Jaszmann L., van Lith N.D., Zaat J.C.A.: The age at menopause in the Netherlands: the statistical analysis of a survey. *Int J Fertil* 1969, 14:106–117.
48. Krailo M.D., Pike M.C.: Estimation of the distribution of age at natural menopause from prevalence data. *Am J Epidemiol* 1983, 117:356–361.
49. Walsh R.J.: The age of menopause of Australian women. *Med J Aust* 1978, 2:181–182.
50. Baker T.G.: A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond* 1973, 158:417–433.
51. Block E.: Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. Variations at different ages. *Acta Anat* 1952, 14:108–123.
52. Costoff A., Mahesh V.B.: Primordial follicles with normal oocytes in the ovaries of postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc* 1975, 23:193–196.
53. Cameron I.T., O'Shea F.C., Rolland J.M., Hughes E.G., de Kretser D.M.: Occult ovarian failure: a syndrome of infertility, regular menses, and elevated follicle-stimulating hormone concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 67:1190–1194.
54. de Moraes-Ruehsen M., Jones G.S.: Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1967, 18:440–461.
55. Heller C.G., Heller E.J.: Gonadotropic hormone: assays of normal cycling, menopausal, castrated and estrin treated females. *J Clin Invest* 1939, 18:171–178.

56. Atria A.: La menopausia precoz y su tratamiento hormonal. *Rev Med Chile* 1950, 8:373–377.
57. Smith A., Fraser I.S., Noel M.: Three siblings with premature gonadal failure. *Fertil Steril* 1979, 32:528–530.
58. Coulam C.B., Stringfellow S., Hoefnagel D.: Evidence for a genetic factor in the etiology of premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1983, 40:693–695.
59. Mattison D.R., Evans M.I., Schwimmer W.B., White B.J., Jensen B.: Familial premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 1984, 36:1341–1348.
60. Starup J., Sele V.: Premature ovarian failure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1973, 52:259–268.
61. Alper M.M., Garner P.R.: Premature ovarian failure: its relationship to autoimmune disease. *Obstet Gynecol* 1985, 66:27–30.
62. Zarate A., Karchmer S., Gomez E., Castelazo-Ayala L.: Premature menopause. A clinical, histologic, and cytogenetic study. *Am J Obstet Gynecol* 1970, 106:110–114.
63. Rebar R.W., Erickson G.F., Yen S.S.: Idiopathic premature ovarian failure: clinical and endocrine characteristics. *Fertil Steril* 1982, 37:35–41
64. Alper M.M., Jolly E.E., Garner P.R.: Pregnancies after premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986, 67:59s–62s
65. Schreiber J.R., Davajan V., Kletsky O.A.: A case of intermittent ovarian failure. *Am J Obstet Gynecol* 1978, 132:698–699.
66. Alper M.M., Garner P.R., Seibel M.M.: Premature ovarian failure: current concepts. *J Reprod Med* 1986, 31:699–708.
67. Wright C.S., Jacobs H.S.: Spontaneous pregnancy in a patient with hypergonadotropic ovarian failure. *Br J Obstet Gynecol* 1979, 86:389–392.
68. Jeppsson S., Ljungberg O., Rannevik G.: Hypergonadotropic hypogonadism with preserved fertility: a new syndrome? *Acta Endocrinol* 1980, 95:388–392.
69. Nelson L.M., Anasti J.N., Kimzey L.M., Defensor R.A., Lipetz K.J.: Development of luteinized graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:1470–1475.
70. Coulam C.B., Adamson S.C., Annegers J.F.: Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986, 67:604–606.
71. Kinch R.A.H., Plunkett E.R., Smout M.S., Carr D.H.: Primary ovarian failure: a clinicopathological and cytogenetic study. *Am J Obstet Gynecol* 1965, 91:630–641

72. Jones G.S., de Moraes-Ruehsen M.: A new syndrome of amenorrhea in association with hypergonadotropism and apparently normal ovarian follicular apparatus. *Am J Obstet Gynecol* 1969, 104:597–600.
73. Coulam C.B.: Premature gonadal failure. *Fertil Steril* 1982, 38:645–655.
74. Plunkett E.R., Garner P.R.: Ovarian failure: possible etiological mechanisms. In: Velardo JT, Kaspro BA (eds) *Biology of Reproduction: Basic and Clinical studies*. Presented at the Pan American Congress of Anatomy, New Orleans, 1972, pp 235–239.
75. Fraser I.S., Shearman R.P., Smith A., Russell P.: An association among blepharophimosis, resistant ovary syndrome, and true premature menopause. *Fertil Steril* 1988, 50:747–751.
76. Panidis D., Rousso D., Vavilis D., Skiadopoulos S., Kalogeropoulos A.: Case report. Familial blepharophimosis with ovarian dysfunction. *Hum Reprod* 1994, 9:2034–2037.
77. Fraser I.S., Russell P., Greco S., Robertson D.M.: Resistant ovary syndrome and premature ovarian failure in young women with galactosaemia. *Clin Reprod Fertil* 1986, 4:133–138.
78. Betterle C., Volpato M.: Adrenal and ovarian autoimmunity. *Eur J Endocrinol* 1998, 138,16–25.
79. DalPra C., Chen S., Furmaniak J., Rees Smith J., Pedini B., Moscon A.: Autoantibodies to steroidogenic enzymes in patients with premature ovarian failure with and without Addison's disease. *Eur J Endocrinol* 2003, 148:565–570.
80. Nagamine K., Peterson P., Scott H.S., Kudoh J., Minoshima S., Heino M. et al.: Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 1997, 17:393–398.
81. Perheentupa J.: APS-I/APECED: the clinical disease and therapy. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2002, 31:295–320.
82. Schatz D.A., Winter W.E.: Autoimmune polyglandular syndrome II: clinical syndrome and treatment. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2002, 31:339–352.
83. Maclaren N., Chen Q.Y., Kukreja A., Marker J., Zhang C.H., Sun Z.S.: Autoimmune hypogonadism as part of an autoimmune polyglandular syndrome. *J Soc Gynecol Invest* 2001, 8:S52–S54.
84. Alper M.M., Garner P.R.: Premature ovarian failure: its relationship to autoimmune disease. *Obstet Gynecol* 1985, 66:27–30.
85. Rebar R.W., Erickson G.F., Yen S.S.: Idiopathic premature ovarian failure: clinical and endocrine characteristics. *Fertil Steril* 1982, 37:35–41.

86. Kim J.G., Moon S.Y., Chang Y.S., Lee J.Y.: Autoimmune premature ovarian failure. *J Obstet Gynecol* 1995, 21:59–66.
87. Kim T.J., Anasti J.N., Flack M.R., Kimzey L.M., Defensor R.A.: Routine endocrine screening for patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1997, 89:777–779.
88. Furmaniak J., Kominami S., Asawa T., Wedlock N., Colls J., Smith B.R.: Autoimmune Addison's disease - evidence for a role of steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:1517–1521.
89. Winqvist O., Karlsson F.A., Kämpe O.: 21-Hydroxylase, a major autoantigen in idiopathic Addison's disease. *Lancet* 1992, 339:1559–1562.
90. Baumann-Antczak A., Wedlock N., Bednarek J., Kiso Y., Krishnan H.: Autoimmune Addison's disease and 21-hydroxylase. *Lancet* 1992, 340:429–430.
91. Krohn K., Uibo R., Aavik E., Peterson P., Savilahti K.: Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17- α -hydroxylase. *Lancet* 1992, 339:770–773.
92. Winqvist O., Gustafsson J., Rorsman F., Karlsson F.A., Kämpe O.: Two different cytochrome p450 enzymes are the adrenal antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I and Addison's disease. *J Clin Invest* 1993, 92:2377–2385.
93. Uibo R., Perheentupa J., Ovod V., Krohn K.J.: Characterization of adrenal autoantigens recognized by sera from patients with autoimmune polyglandular syndrome (APS) type I. *J Autoimmun* 1994, 7:399–411.
94. Uibo R., Aavik E., Peterson P., Perheentupa J., Aranko S., Pelkonen R.: Autoantibodies to cytochrome p450 enzymes p450 scc, p450c17, and p450c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78:323–328.
95. Velloso L.A., Winqvist O., Gustafsson J., Kämpe O., Karlsson F.A.: Autoantibodies against a novel 51 kDa islet antigen and glutamate decarboxylase isoforms in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Diabetologia* 1994, 37:61–69.
96. Bottazzo G.F., Todd I., Mirakian R., Belfiore A., Pujol-Borrell R.: Organ-specific autoimmunity: a 1986 overview. *Immunol Rev* 1986, 94:137–169.
97. Bannatyne P., Russell P., Shearman R.P.: Autoimmune oöphoritis: a clinicopathologic assessment of 12 cases. *Int J Gynaecol Pathol* 1990, 9:191–207.

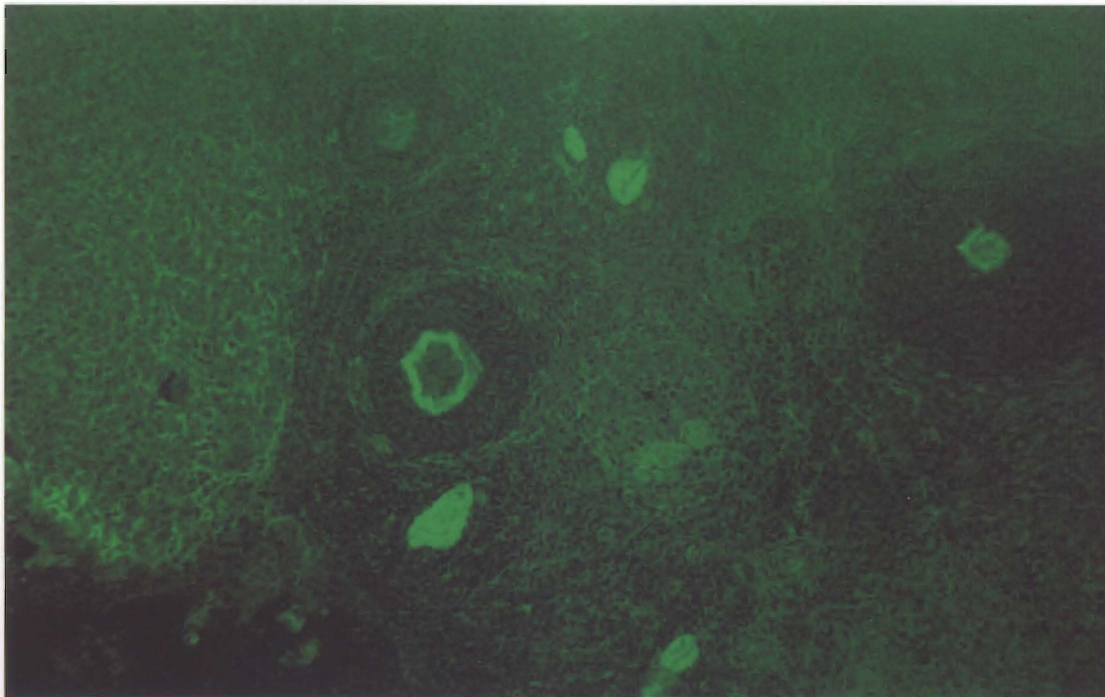
98. Sedmak D.D., Hart W.R., Tubbs R.R.: Autoimmune oöphoritis: a histopathologic study involved ovaries with immunologic characterization of the mononuclear cell infiltrate. *Int J Gynecol Pathol* 1987, 6:73–81.
99. Gloor E., Hurlimann J.: Autoimmune oöphoritis. *Am J Clin Pathol* 1984, 81:105–109.
100. Edmonds M., Lamki L., Killinger D.W., Volpe R.: Autoimmune thyroiditis, adrenalitis and oöphoritis. *Am J Med* 1973, 54:782–787.
101. Dewhurst C.J., De Koos E.B., Ferreira H.P.: The resistant ovary syndrome. *Br J Obstet Gynecol* 1975, 82:341–345.
102. Zourlas P.A., Comninou A.C.: Primary amenorrhea with normally developed secondary sex characteristics. *Obstet Gynecol* 1971, 38:298–303.
103. Koninckx P.R., Brosens I.A.: The "gonadotropin-resistant ovary" syndrome as a cause of secondary amenorrhea and infertility. *Fertil Steril* 1977, 28:926–931.
104. Kim M.H.: "Gonadotropin-resistant ovaries" syndrome in association with secondary amenorrhea. *Am J Obstet Gynecol* 1974, 120:257–263.
105. Moncayo-Naveda H.E., Moncayo R., Benz R., Wolf A., Lauritzen C.: Organ-specific antibodies against ovary in patients with system lupus erythematosus. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 160:1227–1229.
106. Jia X.C., Oikawa M., Bo M., Tanaka T., Ny T., Boime I., Hsueh A.J.: Expression of human luteinizing hormone receptor: interaction with LH and chorion gonadotropin from human but not equine, rat, and ovine species. *Mol Endocrinol* 1991, 5:759–768.
107. Tilly J.L., Aihara T., Nishimori K., Jia X.C., Billig H., Kowalski K.I., Perlas E.A., Hsueh A.J.: Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding, signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology* 1992, 131:799–806.
108. Skinner S.M., Mills T., Kirchick H.J., Dunbar B.S.: Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology* 1984, 115:2418–2432.
109. Rhim S.H., Millar S.E., Robey F., Luo A.M., Lou Y.H.: Autoimmune diseases of the ovary induced by ZP3 peptide from the mouse zona pellucida. *J Clin Invest* 1992, 89:28–35.
110. Dean J.: Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucida. *J Clin Invest* 1992, 89:1055–1059.
111. Elleder a spol.: Vybrané kapitoly z patologie buňky I. 1997, s.40-42.

112. Barbarino-Monnier P., Gobert B., Guillet-May F., Béné M.C., Barbarino A.: Ovarian autoimmunity and corticotherapy in an in-vitro fertilization attempt. *Hum Reprod* 1995, 10:2006–2007.
113. Blumenfeld Z., Halachmi S., Alik Peretz B., Shmuel Z., Golan D.: Premature ovarian failure—the prognostic application of autoimmunity on conception after ovulation induction. *Fertil Steril* 1993, 59:750–755.
114. Cowchock F.S., McCabe J.L., Montgomery B.B.: Pregnancy after corticosteroid administration in premature ovarian failure (polyglandular endocrinopathy syndrome). *Am J Obstet Gynecol* 1988, 158:118–119.
115. Corenblum B., Rowe T., Taylor P.J.: High-dose, short-term glucocorticoids for the treatment of infertility resulting from premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1993, 59:988–991.
116. Horejsi J., Martinek J., Novakova D., Madar J., Brandejska M.: Autoimmune antiovarian antibodies and their impact on the success of an in IVF/ET program. *Ann NY Acad Sci* 2000, 900:351–356.
117. Ho P.C., Tang G.W., Lawton J.W.: Lymphocyte subsets and serum immunoglobulins in patients with premature ovarian failure before and after oestrogen replacement. *Hum Repris* 1993, 8:714–716.
118. Hoek A., van Kasteren Y., de Haan-Meulman M., Schoemaker J., Drexhage HA: Dysfunction of monocytes and dendritic cells in patients with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 1993, 30:207–217.
119. Hoek A., van Kasteren Y., de Haan-Meulman M., Hooijkaas H., Schoemaker J.: Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets, NK cells, and delayed type hypersensitivity skin test in patients with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol* 1995, 33:495–502.
120. Hoek A., Schoemaker J., Drexhage H.A.: Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 1997, 18:107–134.
121. Fučíková T.: *Klinická imunologie v praxi*. Praha 1997, 2:241–242.

12. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

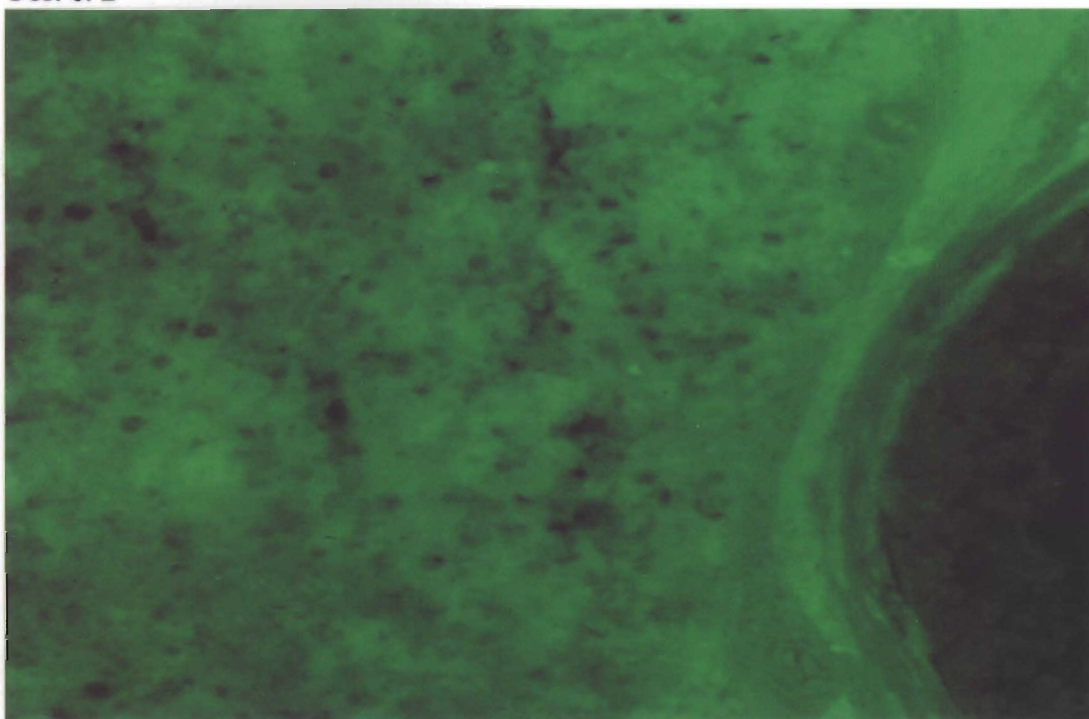


Obr. č. 1



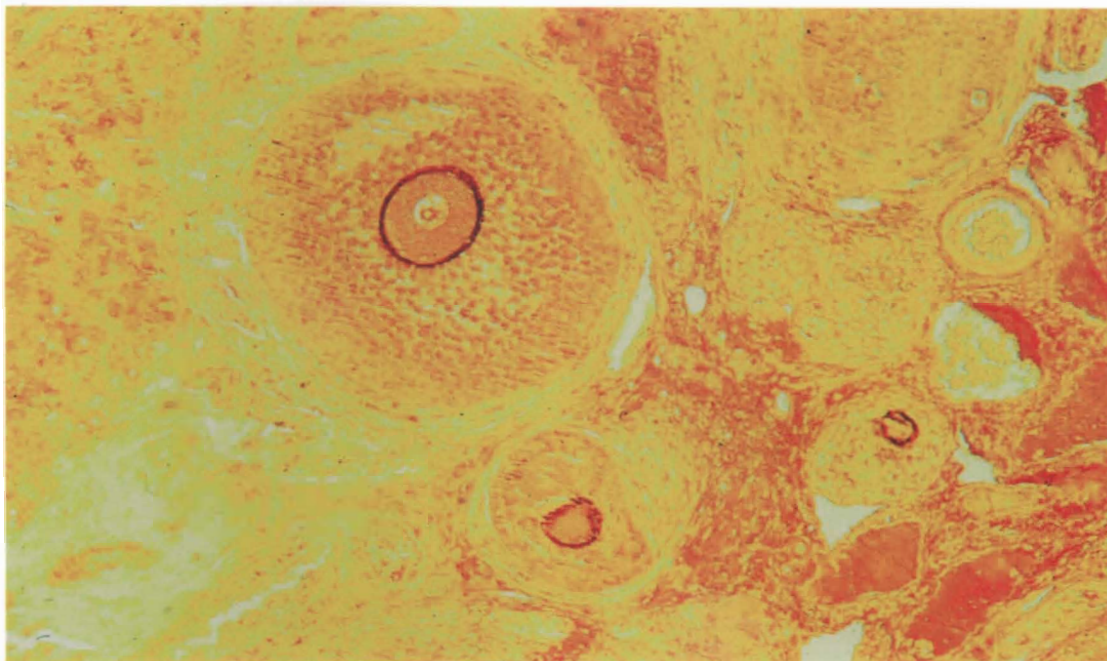
Použití monoklonálních protilátek značených fluoroscianatem proti ovariálním strukturám pohlavně zralých krys. Průkaz protilátek proti zona pellucida. 300x

Obr. č. 2



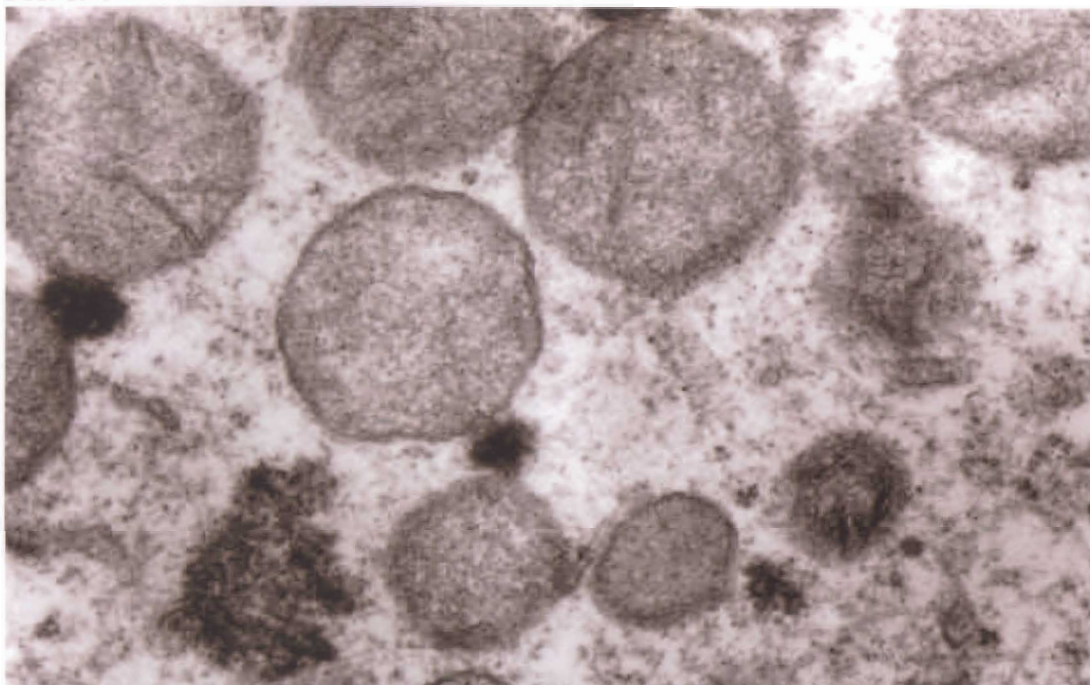
Detail terciálního folikulu, pozitivita AOA proti théca luteinním buňkám a granulóza luteinním buňkám. 90x

Obr. č. 3



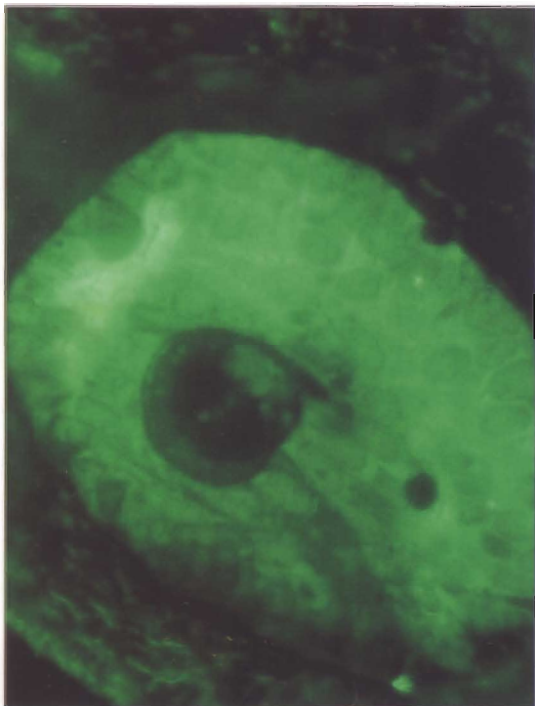
Monoklonální protilátky barvené křenovou peroxidázou s typickým červeno-hnědým zbarvením - pozitivita protilátek proti zona pellucida. 300x

Obr. č. 4

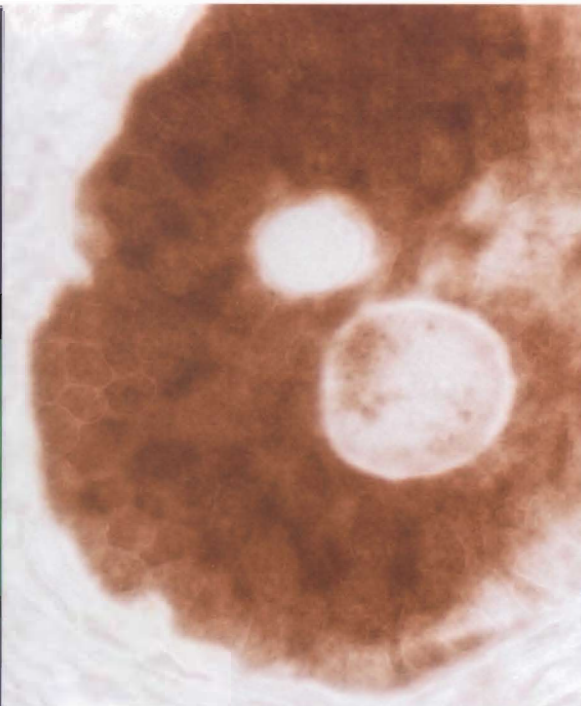


Detail cytoplasmy rostoucího folikulu. Ve skupině mitochondrií agregace částic zlata. Lokalizace protisteroidních protilátek. 15 600x

Obr. č. 5



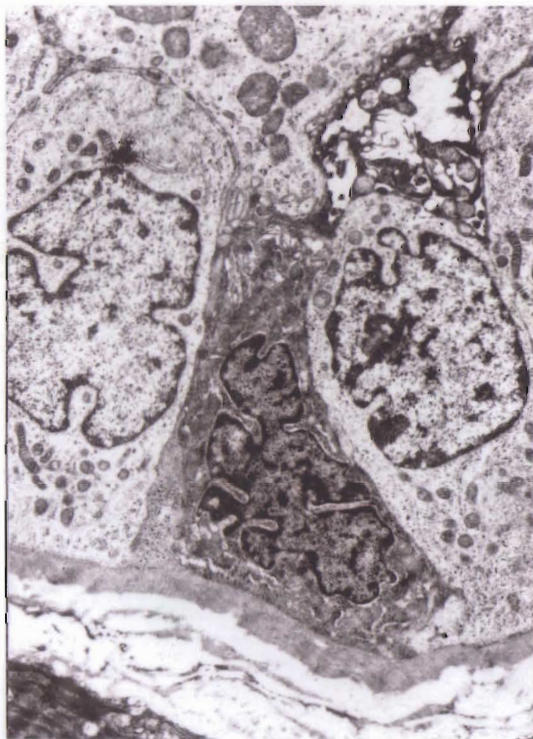
Obr. č. 6



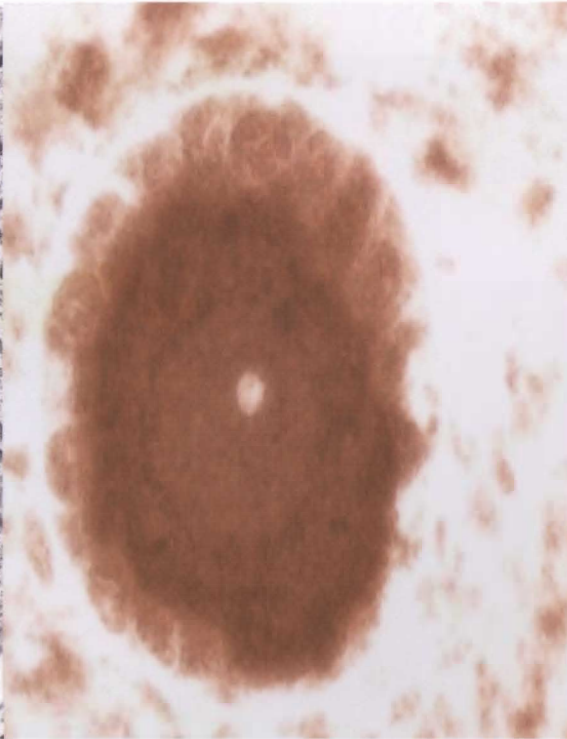
Obr. 5. Detekce apoptózy pomocí M30 CytoDeath. Sekundární folikul. 180 x.

Obr. 6. Průkaz apoptotické fragmentace jaderné DNA. Metoda TUNEL. Značení křenovou peroxidázou. Terciární folikulu. 180 x.

Obr.č. 7



Obr. č. 8



Obr. 7 Folikulární buňka v pokročilém stádiu apoptózy. Hyperchromatinizace jádra, hluboké invaginace jaderné membrány, denní cytoplasma. 2700 x

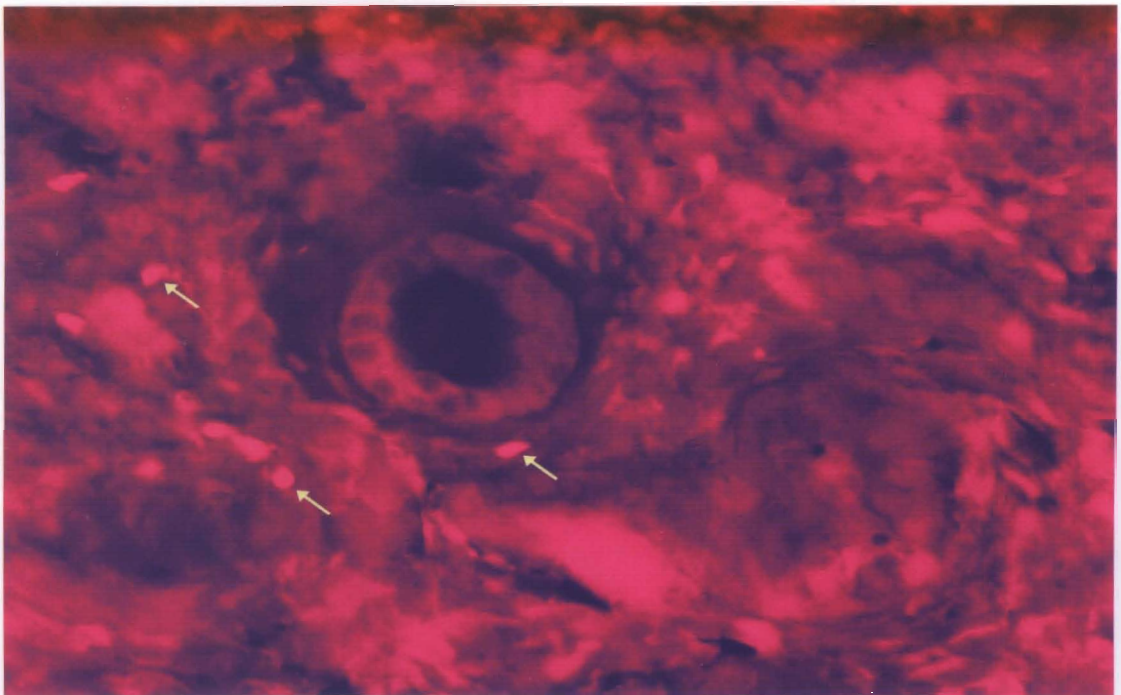
Obr. 8 Průkaz NOS 3 jako producenta NO v primárním folikulu. 230x

Obr. č. 9.



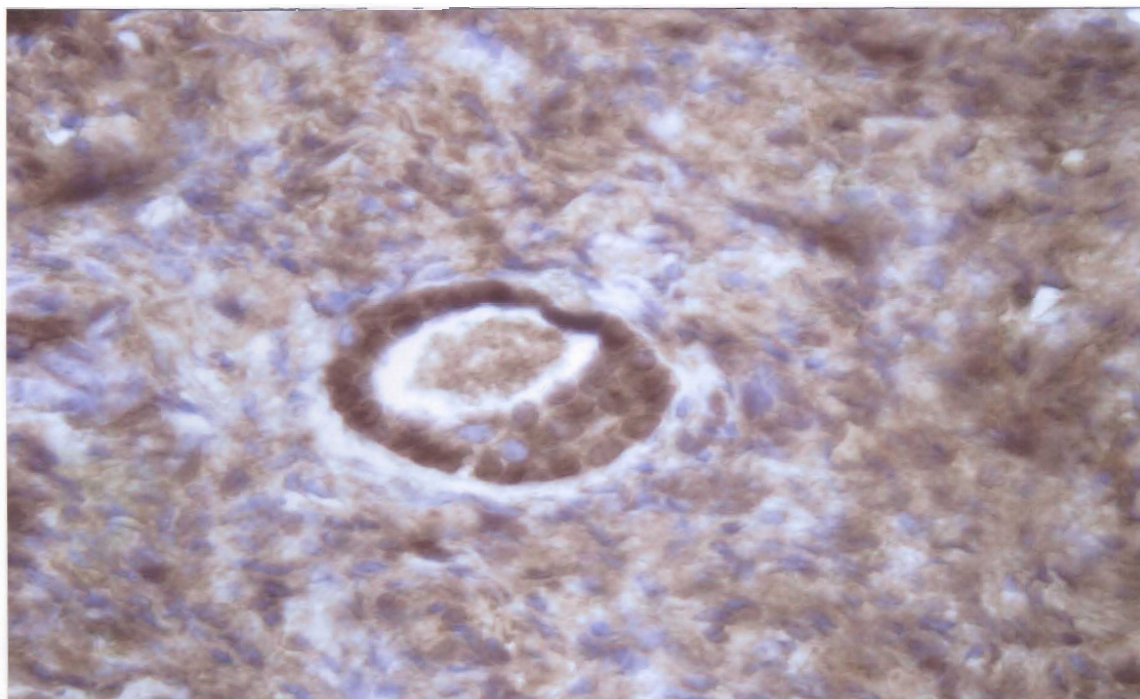
Imunofluorescenční průkaz FSH receptorů. Šipky demonstrují intracytoplasmatickou lokalizaci v časném stimulovaném folikulu (sekundární folikul). FITC. Prim. zv.450 x.

Obr. č. 10.



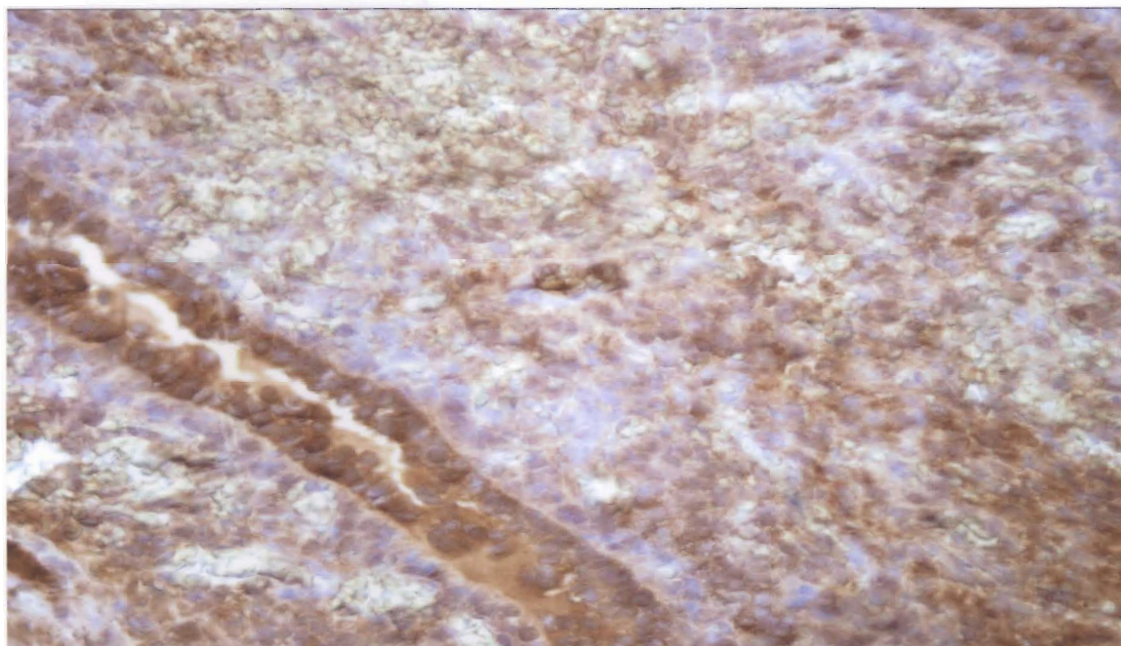
Imunofluorescenční detekce nukleárních estrogenových receptorů v kůře ovaria (šipky). Oocyt i folikulární buňky negativní. Texas Red. 450 x.

Obr. č. 11.



Distribuce cytosolových a nukleárních estrogenových receptorů v časném sekundárním folikulu. V oocytu lze zachytit jen cytosolovou frakci. Expres je patrná v jednotlivých buňkách kůry ovaria. Kryostatový řez, značení křenovou peroxidázou. 250 x.

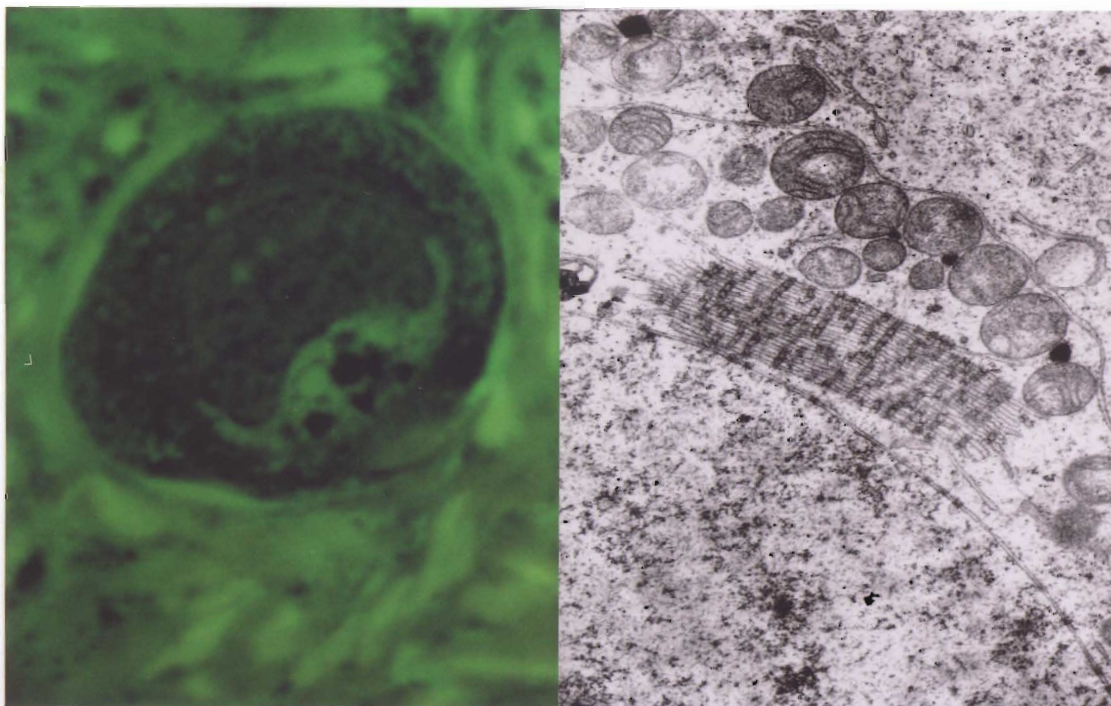
Obr. č. 12.



V zanikajícím c. luteum (vpravo) jsou pouze cytosolové receptory, zatímco ve folikulárních buňkách lze zachytit i nukleární frakci (vlevo). Křenová peroxidáza. 180 x.

Obr. č. 13

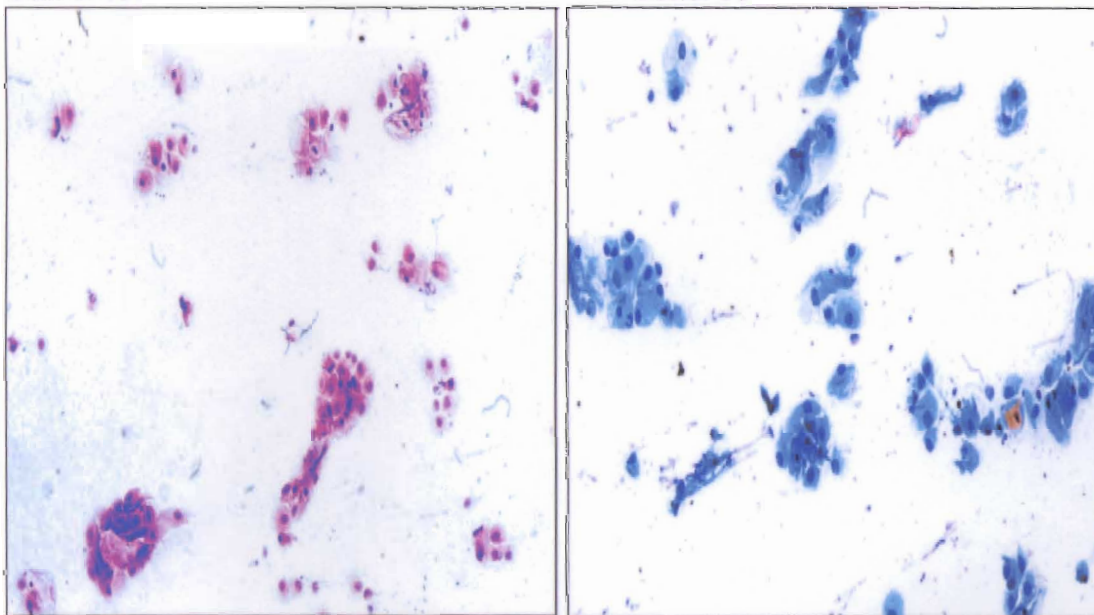
Obr. č. 14



Obr. 13. Detail primárního folikulu s pozitivitou M30 CytoDeath v ooplazmě. 270 x.
Obr. 14. Elektronmikroskopický obraz anulate lamellae v paranukleární lokalizaci v oocytu primárního folikulu spolu s četnými lysosomy. 6 200 x.

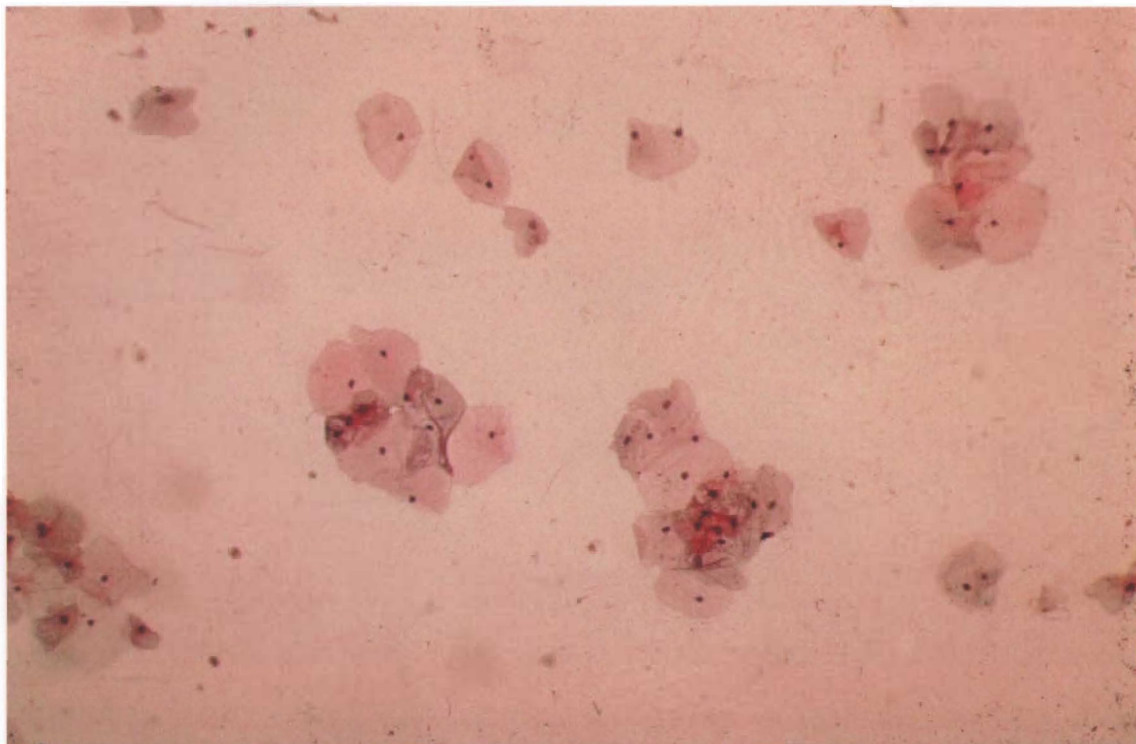
Obr. č. 15.

Obr.č. 16



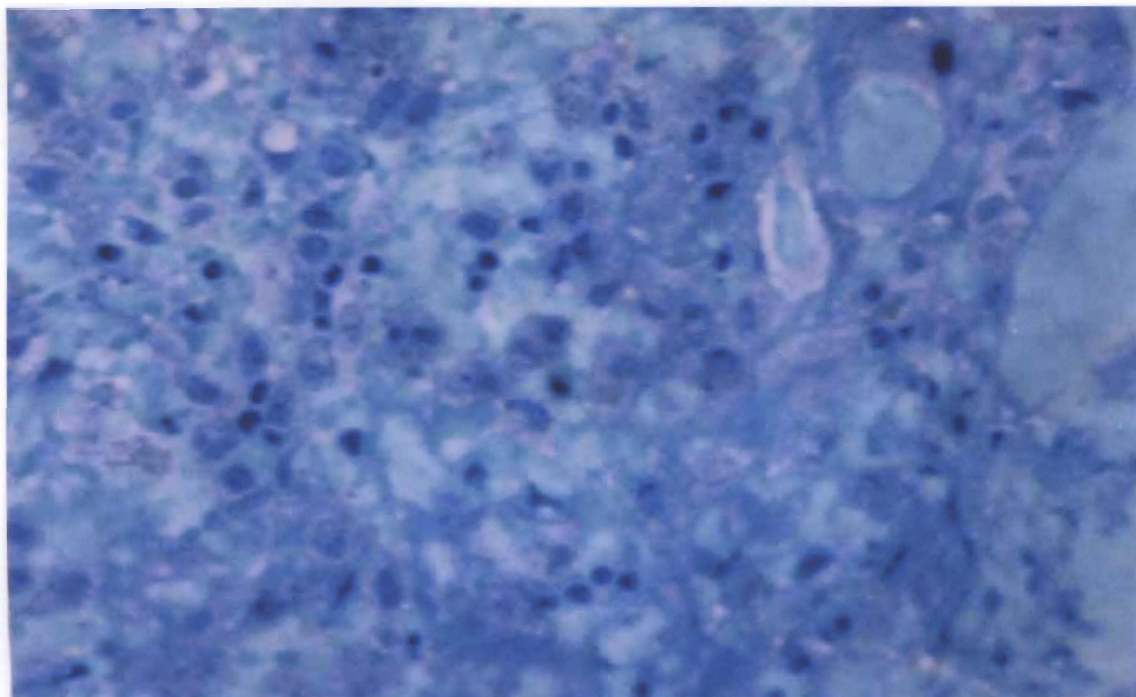
Obr. 15. a 16. Hormonální funkční oševní cytologie. Ranná proliferace na obou snímcích. Nátěr obsahuje parabazální a nejnižší intermediální buňky. Znamka těžkého hypoestrinismu v oblasti cílové tkáně - pochvy.

Obr. č. 17



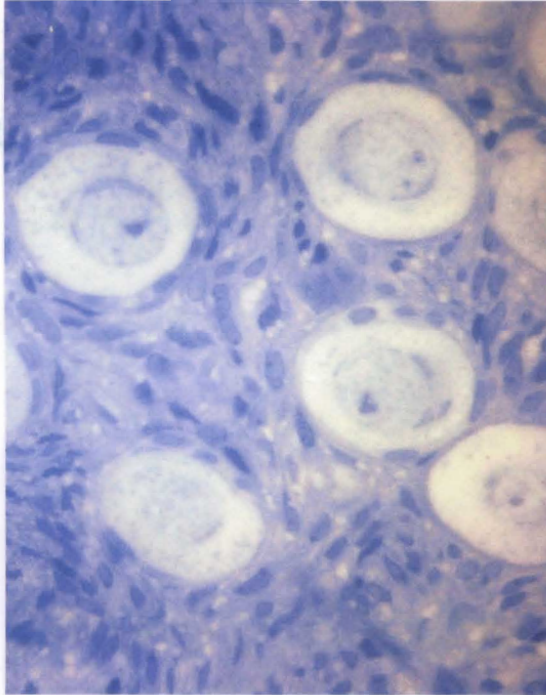
Pozdní proliferace. Nátěr obsahuje převahu superficiálních poševních epitelí, 70% eosinofilí. Je známkou hyperestrinismu, nutno podat gestageny.

Obr. č. 18

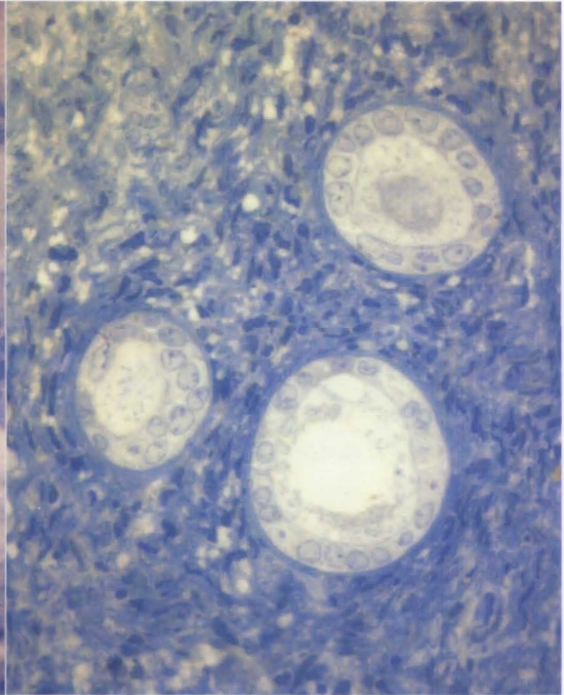


Polotenný řez. Detaili kůry ovária s mononukleární infiltrací. Vazivové buňky stromatu jsou bohaté na jádra s jemnou chromatinovou strukturou. 1400x

Obr. č. 19

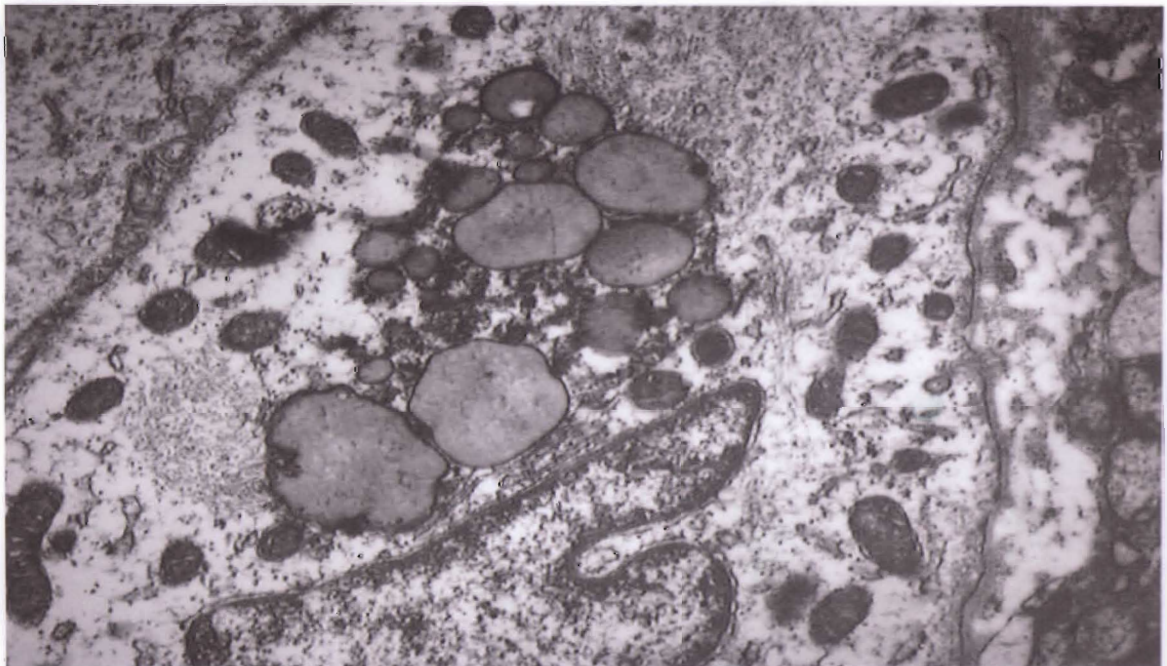


Obr. č. 20



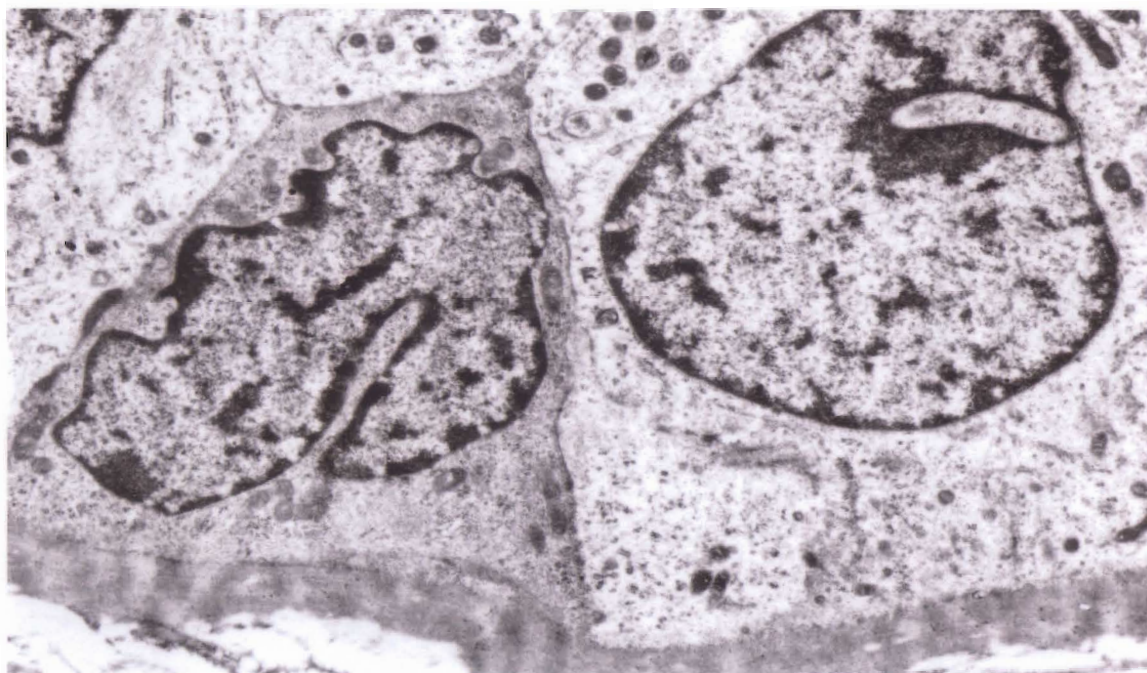
Obr. 19. a 20. Polotenké eponové řezy. Na prvním snímku skupina primárních folikulů, ale již v těchto folikulech lze vidět folikulární buňky s denzním jádrem (incip. stádium buněčné smrti). Vpravo skupina stimulovaných folikulů, charakterizovaných zvětšováním buněčných vrstev opět s částí folikulárních buněk s denzním jádrem. Toluidinová modř. 180x

Obr.č. 21.



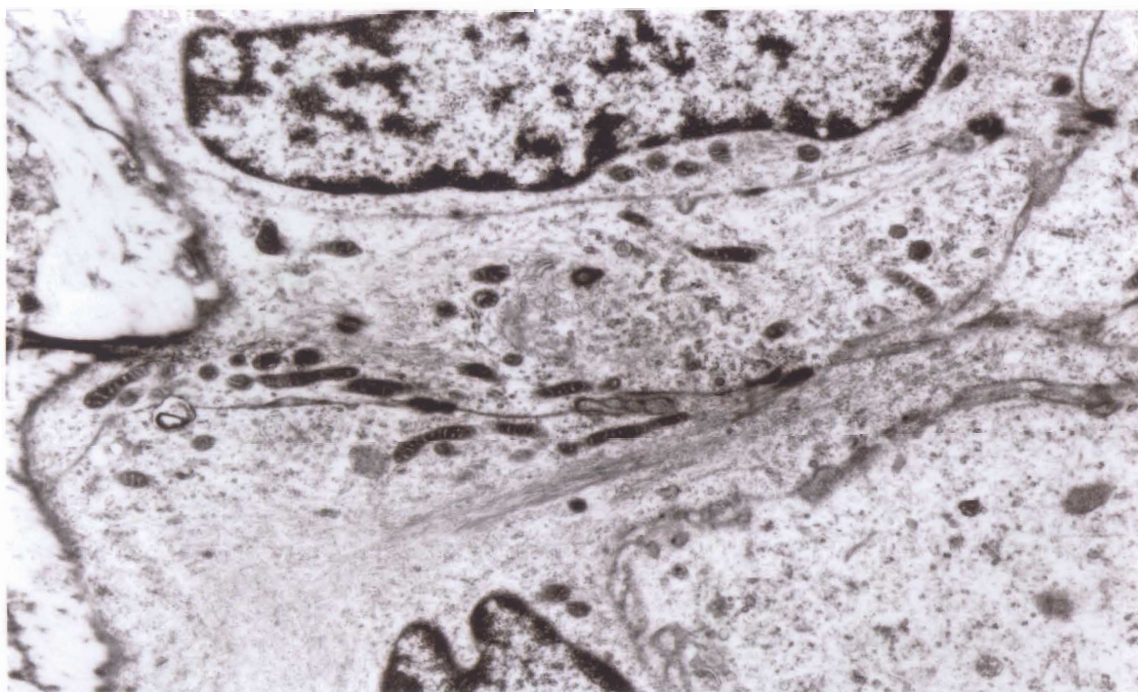
Detail folikulární buňky s velkým množstvím sekundárních a terciárních lysosomů, jádro s hlubokými invaginacemi - pokročilé stádium buněčné smrti. 6200x

Obr. č. 22



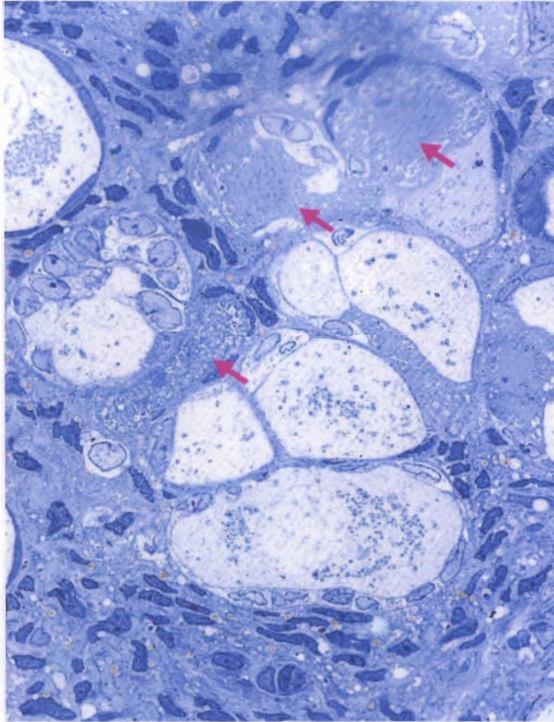
Periferní oblast sekundárního folikulu vykazuje zřetelně nepravidelně ztlustělou Slavjanského membránu. Jedna z folikulárních buněk má nápadně denní cytoplazmu a známky kondenzace chromatinu při karyolemě s hlubokými invaginacemi. 6 200 x

Obr. č. 23

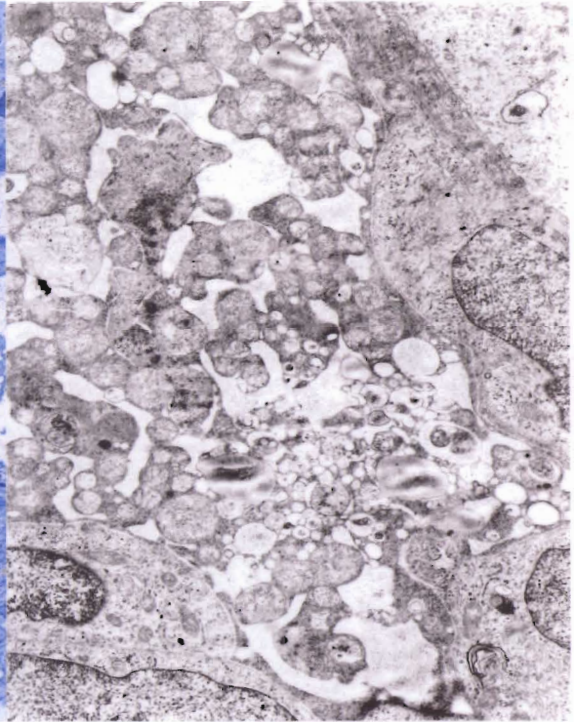


Agregace intermediárních filament v cytoplazmě folikulárních buněk sekundárního folikulu. Podle jejich zakotvení k cytoplazmatické membráně lze soudit, že jde o cytokeratin. 8 400 x.

Obr. č.24



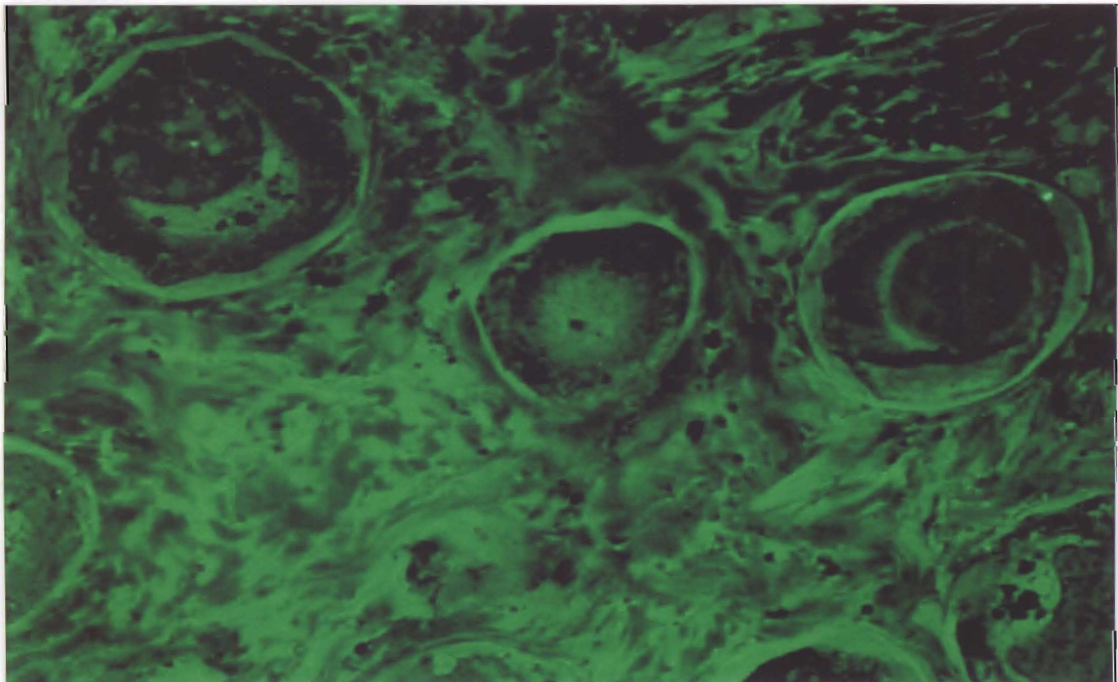
Obr.č.25



Obr. 24. Polotekný eponový řez. Skupina primárních folikulů s apoptotickými oocyty (šipky). Také některé folikulární buňky mají jádra s kondenzovaným chromatinem zřetelnými invaginacemi jaderného obalu. Toluidinová modř. 180x.

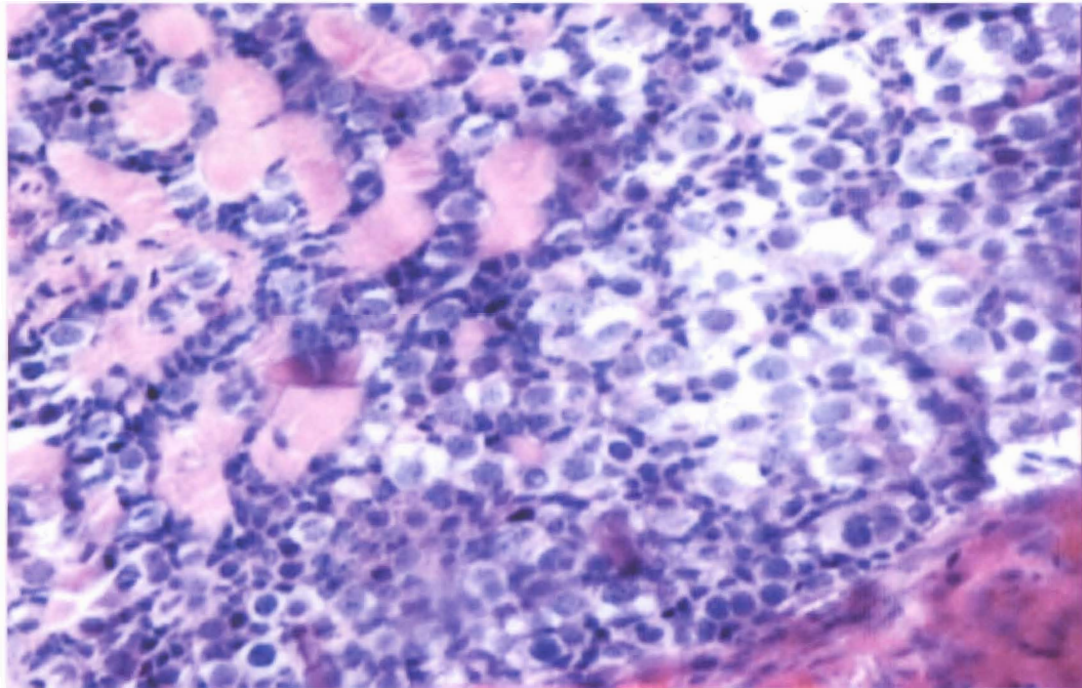
Obr. 25. Apoptotická tělíska po oocytu v obalu folikulárních buněk. 2 800 x.

Obr.č.26



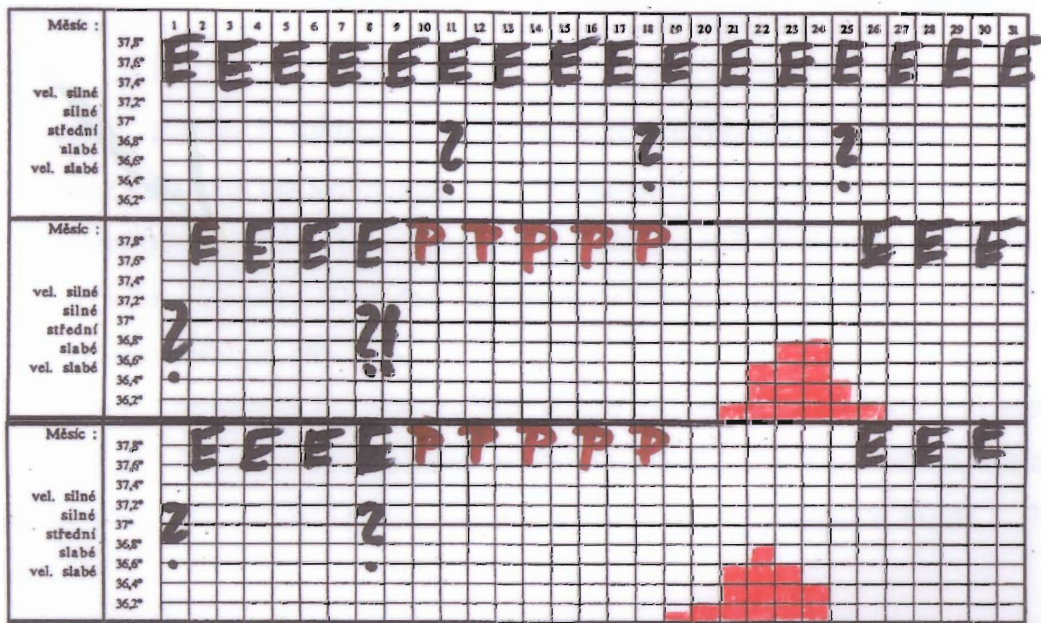
Immunofluorescenční průkaz štěpeného cytokeratinu 18 pomocí M30 CytoDeath protilátky dokumentuje probíhající apoptotické procesy ve folikulárních buňkách i ooplasmě primárních folikulů. FITC. 90 x

Obr.č.27.



Obraz gonadální dysgenese při kofiguraci XY heterosomů připomíná „ovotestis“ se zachovanými gonocyt a dosud nediferencovanými buňkami coelomového epitelu v pruhovitých formacích, oddělených pruhy hustého kolagenního vaziva. Parafinový řez, HE. 150 x.

Obr.č. 28



Obr. 28 Kalendářové schéma ERT a následně HRT. E = Estrofem 1-2 mg tbl. ob den, P = Provera 10 mg tbl. ob den, ? = kontrolní funkční poševní cytologie, ?! nález pozdní proliferace v hormonální funkční cytologii.

13. SEZNAM PUBLIKACÍ, ABSTRAKT A PREZENTACÍ DISERTANTKY SE VZTAHEM K TÉMATU PRÁCE

Publikace zahraniční

1. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek J.: Treatment of autoimmune ovaria damage in adolescent girls. *Neuroendocrinology Letters* 2005, 26:131-135. IF 1,047
2. Martínek J., Kučera T., Jirsová Z., Mlčochová H., Hořejší J.: Possible regulatory mechanisms in the ovarian disorders. *Biomedical Papers* 2004, 148: p. 233-235
3. Halaška M., Vlk R., Feldmar P., Hrehorčák M., Krčmář M., Mlčochová H. a spol.: Predicting term birth weight usány ultrasound and maternal characteristics. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. Přijato k tisku v r. 2006. IF 1,47

Publikace české

1. Teslík L., Mlčochová, H.: Cysty a nádory vaječníků u mladistvých. *Časopis lékařů českých*, 142, 2003, č. 4.

Abstrakty na zahraničních a mezinárodních kongresech:

1. Teslík L., Hořejší J., Martínek J., Mlčochová H.: Morphological findings in ovaries in adolescent girls with the antiovarian autoantibodies. In: J.M. Mendez-Ribaz (Ed.): *Book of Abstract of the XIII. World Congress of Pediatric and Adolescent Gynecology and VII. ALOGIA Congress, Sociedad Argentina de Ginecologia Infanto Juvenil (SAGIJ)*, Buenos Aires, 2001, p. 148
2. Hořejší J., Mlčochová H.: Non-traditional rare indications of ERT/HRT in adolescent females and young women. *Abstract of the 10th World Congress on the Menopause, Berlina 2002, The Journal of the International Menopause Society*, 5, Suppl. 1, 2002, p. 88-.
3. Hořejší J., Uhlrová E., Teslík L., Mlčochová H.: Treatment of irregular endometrial bleeding in adolescence. *Abstract of the 17th European Congress of Obstetric and Gynaecology. Česká gynekologie*, 67, supp. 2, 2002, s. 7-.

4. Hořejší J., Martínek J., Jirsová Z., Mlčochová H.: Programmend cell death in the ovary of adolescent viros.Abstract, XVII. FIGO World Congress, Santiago de Chile, Int. J Gynekology and Obstetric, 83, Supp. 3, 2003 p. 77-.
5. Kosová H., Hořejší J., Martínek J.: Possible mechanisms of regulation of programmed cell death in the human ovary. Journal of Applied Biomedicine, vol. 3 Supplement 1 (Cells VI) 2005, p.26.
6. Kosová H., Hořejší J., Martínek J.: Autoimmune ovarian disease. Abstract of the14th Meeting of Pediatric Research of Central European Countries 2005, p. 33.

Abstrakty na českých kongresech

1. Mlčochová, H., Hořejší, J., Martínek, J., Teslík, L.: Morfologické změny ovarií u dospívajících dívek s pozitivitou antiovariálních protilátek. Studentská vědecká konference UK 2.LF, duben 2003, s.17.
2. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek J., Jirsová Z., Vetešníková-Koubová R.: Programovaná buněčná smrt v ovariu dospívajících dívek. Studentská vědecká konference UK 2.LF, duben 2004, s.16
3. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek J., Brandejská M.: Prevalence antiovariálních protilátek u dospívajících pacientek s poruchami menstruačního cyklu a žen léčených pro sterilitu. Studentská vědecká konference UK 2.LF, duben 2005, s. 9

Prezentace a postery- mezinárodní a zahraniční kongresy:

1. Hořejší J., Uhrová E., Teslík L., Mlčochová H.: Treatment of irregular bleeding in adolescence. 17th European Congress of Obstetrics and Gynaecology. Prague 2002
2. Hořejší J., Mlčochová H.: Non-traditional rare indications of ERT/HRT in adolescent females and young women. IX. European Congress of Pediatric and Adolescent Gynaecology, Firenze, Italy, 2002
3. Mlčochová H., Hořejší J.: Morphological changes in ovaries in adolescent with antiovarian autoantibodies. IX. European Congress of Pediatric and Adolescent Gynecology, Firenze, Italy, 2002.
4. Hořejší J., Mlčochová H.: ERT/HRT v gynekologii dětí a dospívajících VIII.konference Sekce gynekologie dětí a dospívajících dívek SGPS a XXXII. Konference Sekce gynekologie dětí a dospívajících ČGPS, Lubovňanské Kúpele, 2003

5. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek J.: Programmed cell death in the ovary of adolescent girls. World Congress on Pediatric and Adolescent Gynecology, Athens, May 8- 11, 2004
6. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek, J.: Treatment of autoimunné ovarian damage World Congress on Pediatric and Adolescent Gynecology, Athens, May 8- 11, 2004 (poster)
7. Kosová H., Hořejší J., Martínek J.: Autoimmune ovarian disease. 14th Meeting of Pediatric Research of Central European Countries, Prague, May 2005 (poster)
8. Kosová H., Hořejší J., Martínek J.: Possible mechanisms of regulation of programmed cell death in the human ovary. Cells VI, České Budějovice, 2005

Prezentace - české konference a kongresy:

1. Mlčochová H., Martínek J., Hořejší J., Jirsová Z., Vetešníková-Koubová R.: Programovaná buněčná smrt v ováriu u dospívajících dívek. XXXIII. konference Gynekologie dětí a dospívajících, Sekce gynekologie dětí a dospívajících ČGPS, Hradec Králové, 2003.
2. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek J., Teslík L.: Morfologické změny ovarií u dospívajících dívek s pozitivitou antiovariálních protilátek. Studentská vědecká konference UK 2.LF, Praha, duben 2003
3. Martínek J., Hořejší J., Mlčochová H., Jirsová Z.: Programed cell death in the ovary of adolescent girls. 40. sjezd české histo- a cytochemické společnosti, Hradec Králové, 2003
4. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek J.: Léčba dospívajících pacientek s pozitivitou antiovariálních protilátek a poruchami menstruačního cyklu, XXXIV. Konference gynekologie dětí a dospívajících, Třebíč, 14.10 – 16.10 2004
6. Mlčochová H., Hořejší J., Martínek J., Brandejská M.: Prevalence antiovariálních protilátek u dospívajících pacientek s poruchami menstruačního cyklu a žen léčených pro sterilitu. Studentská vědecká konference UK 2.LF, Praha, duben 2005
7. Kosová, H., Hořejší, J., Martínek, J.: Možné mechanismy regulace programované buněčné smrti v lidském ováriu. XXXV. Konference gynekologie dětí a dospívajících, Poděbrady, 3.- 5.11 2005